

Bioprospección de especies naturales bioactivas como potenciales agentes terapéuticos o preventivos sobre SARS-CoV-2

Tesinista: Tomás I. GOMEZ

Firma:.....


Directora: Dra. Susana C. NÚÑEZ MONTOYA

Firma:.....


Codirectora: Dra. Brenda S. KONIGHEIM

Firma:.....


**Trabajo de Tesina para optar por el título de Biólogo, realizado
en:**

Grupo de Farmacognosia perteneciente al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV) del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y al Dpto. Cs. Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales, Instituto de Virología “Dr. José María Vanella”, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Mayo 2021

Tribunal Examinador

Dra. Diana Labuckas

Investigadora UNC

Profesora Adjunta

Cátedras de Química Orgánica y Productos Naturales, Facultad de Ciencias Exactas
Físicas y Naturales (FCEfyN) de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC).
IMBIV-CONICET

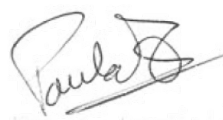
Firma: *Dra. Diana Labuckas*

Dra. María P. Zunino

Investigadora Independiente (IMBIV-CONICET)

Profesora Asistente en las Cátedras de Química Orgánica y Productos Naturales
(FCEfyN-UNC, IMBIV-CONICET).

Firma:



Dr. José Sebastián Dambolena

Investigador Adjunto (IMBIV-CONICET)

Profesor Asistente en las de Cátedras de Química Orgánica y Productos Naturales
(FCEfyN-UNC, IMBIV-CONICET)

Firma:



Calificación final: 10 (diez)

Fecha: 27 de mayo de 2021

Índice

Resumen	4
Palabras claves	5
Introducción	6
Hipótesis y objetivos	15
Materiales y métodos	
A- Búsqueda bibliográfica	16
B- Muestras para evaluar la actividad biológica <i>in vitro</i>	16
B.1- Criterios de selección	17
B.2- Procedencia de las muestras a ensayar	18
B.3- Preparación del material vegetal	18
B.4- Obtención de los extractos	18
B.4.1- Extractos de “cúrcuma”	19
B.4.2- Extractos de “equinácea”	19
B.5- Preparación de muestras para ensayos biológicos	20
C- Ensayos para evaluación de actividad biológica	20
C.1- Evaluación de la citotoxicidad	20
C.1.1- Línea celular	20
C.1.2- Medio de Crecimiento	21
C.1.3- Medio de Mantenimiento	21
C.1.4- Observación del efecto citopático	21
C.1.5- Determinación de la viabilidad celular <i>in vitro</i> por método colorimétrico	22
C.2- Actividad virucida y antiviral <i>in vitro</i>	23
C.2.1- Cepa viral estudiada	23
C.2.2- Determinación del título del stock viral	23
C.2.3- Actividad antiviral <i>in vitro</i>	24
C.2.4- Evaluación de la actividad virucida <i>in vitro</i>	24
C.2.5- Análisis estadístico	25
Resultados y discusión	
A- Búsqueda bibliográfica	26
A.1- Fuentes naturales con potencial efecto antiviral sobre coronavirus	26
A.2- Antecedentes científicos de <i>Curcuma</i> spp. y <i>Echinacea</i> spp.	38
A.2.1- <i>Curcuma</i> spp.	38
A.2.2- <i>Echinacea</i> spp.	39
B- Actividad biológica <i>in vitro</i>	44
B.1- Rendimiento de los extractos	44
B.2- Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i>	45
B.2.1- Observación del efecto citopático	45
B.2.2- Evaluación de la viabilidad celular	47
B.3. Determinación del título del stock viral	49
B.4. Actividad antiviral <i>in vitro</i>	50
B.5. Evaluación de la actividad virucida <i>in vitro</i>	52
Conclusiones	55
Proyecciones	57
Bibliografía	58
Anexo	67

Resumen

En el marco de la pandemia por el nuevo coronavirus, SARS-CoV-2, y frente a la falta de antivirales efectivos, se aplicaron terapias farmacológicas para contrarrestar los síntomas de una enfermedad cuya fisiopatogenia se iba conociendo a medida que avanzaba como una epidemia mundial. Simultáneamente, se inició la búsqueda de nuevos antivirales, comenzando con el uso de fármacos conocidos, bajo la forma “off label”, es decir medicamentos autorizados para otras indicaciones terapéuticas (antibióticos, antiparasitarios, anticancerígenos), inclusive se recurrió a fármacos en vía de investigación (muchos de origen biotecnológico). En este contexto, los compuestos químicos de origen natural no quedaron ajenos, como por ejemplo la colchicina por sus propiedades antimaláricas. Y el acervo popular/tradicional comenzó a proponer plantas medicinales. En consecuencia, se planteó como objetivo de este trabajo de tesina: buscar potenciales agentes terapéuticos o preventivos para COVID-19 a partir de especies naturales bioactivas.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio exploratorio de carácter bibliográfico de posibles drogas naturales (especies vegetales, macrohongos y líquenes) que, en función de sus antecedentes antiinflamatorios, inmunomoduladores y su efecto inhibitorio sobre otros *Betacoronavirus* (género al cual pertenece el agente etiológico de COVID-19: SARS-CoV-2) o virus ARN-envueltos con características similares, puedan ser propuestas como fuente de potenciales agentes terapéuticos o preventivos para COVID-19.

Esta búsqueda evidenció una gran variedad de especies vegetales, incluidos sus principales metabolitos secundarios, que han sido ensayados en cuanto a su actividad antiviral sobre otros *Betacoronavirus*, especialmente sobre MERS-CoV y SARS-CoV (filogenéticamente relacionados con SARS-CoV-2) que fueron responsables de infecciones epidémicas previas, con significativo porcentaje de letalidad. A partir del análisis de los trabajos científicos encontrados, se pudieron identificar los principales mecanismos de acción involucrados en el efecto de preparados o metabolitos secundarios sobre estos dos modelos virales: inhibición de la replicación viral, inhibición enzimática, acción virucida e interacción entre la proteína S y los receptores ACE2. A su vez, permitió registrar especies naturales bioactivas o compuestos químicos, que podrían ser investigados con mayor profundidad para proponerlos como posibles fuentes de compuestos antivirales (Drogas vegetales) o como agentes antivirales (metabolitos secundarios), y que deberían evaluarse en cuanto a su actividad antiviral o virucida sobre SARS-CoV-2.

En segundo lugar, debido a numerosas consultas recibidas sobre el uso de “cúrcuma” y “equinácea” como tratamiento terapéutico o preventivo de COVID-19, se realizó un estudio bibliográfico de los géneros a los cuales pertenecen las especies conocidas popularmente con estos nombres: *Curcuma* L. (Zingiberaceae) y *Echinacea* Moench (Asteraceae).

Se estableció que las plantas medicinales con mayor cantidad de estudios químicos y con efectos biológicos que podrían actuar sobre la fisiopatogenia de COVID-19, esto es actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora y antiviral, son: *Curcuma longa* L., (rizomas) y *Echinacea purpurea* (L.) Moench (planta entera). Sin embargo, son necesarios estudios experimentales para evaluar su eficacia sobre SARS-CoV-2 y realizar ensayos farmacológicos más profundos para determinar su seguridad en humanos.

En tercer lugar, se propuso verificar el uso sugerido por el acervo popular sobre *C. longa* (“cúrcuma”) y *Echinacea* spp. (“equinácea”) como agentes terapéuticos/preventivos de COVID-19. En el caso de *C. longa* se evaluó la actividad antiviral y virucida *in vitro* de infusión y decocción; mientras que para *Echinacea* spp., se ensayó infusión y tintura, preparadas a partir de material vegetal comercializado en la ciudad de Córdoba. Estos preparados no mostraron actividad antiviral/virucida sobre SARS-CoV-2 *in vitro*; por lo tanto, no se pudo confirmar el uso popular propuesto para estas especies, respecto de COVID-19.

Por otro lado, se evaluaron dos metabolitos secundarios presentes en líquenes: parietina (PTN) y ácido úsnico (AUs), ya que demostraron ser activos sobre ARN-envueltos (similitud con betacoronavirus) y, por lo tanto, con potencial acción sobre SARS-CoV-2. Sin embargo, en este trabajo no se demostró la capacidad de estos compuestos para inhibir este virus *in vitro* a las concentraciones ensayadas.

Como hallazgo a destacar de este trabajo, es que se trata del primer reporte relacionado a la investigación de la actividad antiviral y virucida *in vitro* de extractos acuosos de *Curcuma longa* y *Echinacea* spp., parietina (PTN) y ácido úsnico (AUs) sobre SARS-CoV-2.

Palabras claves: COVID-19, SARS-CoV-2, *Curcuma*, *Echinacea*, plantas medicinales, actividad antiviral.

Introducción

La pandemia declarada oficialmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 11 de marzo de 2020, ha producido hasta el momento más de tres millones (3.000.000) de muertes en todo el mundo (John Hopkins University). Se trata de una infección causada por un nuevo coronavirus (CoV), que fue denominada COVID-19, por sus siglas en inglés Coronavirus Infectious Disease y en referencia al año que se reportó el primer caso en la ciudad de Wuhan, China (OMS, 2020).

En 2020, el virus responsable (agente etiológico) de esta pandemia fue finalmente clasificado taxonómicamente en la subfamilia Coronavirinae (vulgarmente llamados coronavirus), familia Coronaviridae, orden Nidovirales (Gorbalenya et al., 2020).

La subfamilia Coronavirinae está constituida por cuatro géneros: alfacoronavirus, betacoronavirus (betaCoV), gammacoronavirus y deltacoronavirus (Gorbalenya et al., 2020). Los alfacoronavirus y betaCoV infectan únicamente a mamíferos, mientras que los gammacoronavirus y deltacoronavirus infectan a las aves, pero ocasionalmente algunos de ellos también pueden infectar mamíferos (Su et al., 2016).

Los coronavirus (CoV) causan infecciones respiratorias y gastrointestinales en animales, incluyendo al ser humano (Cui et al., 2019). El primer CoV identificado de un humano fue en la década del 1960, en un paciente con síntomas de resfrío común. Esto dió origen a la denominación HCoV: coronavirus humanos (por sus siglas en inglés) (Gorbalenya et al., 2020). Con anterioridad a la pandemia de 2020, existían al menos seis CoV asociados a enfermedades respiratorias en el ser humano: HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, MERS-CoV y SARS-CoV (Cui et al., 2019). MERS hace referencia a una primera epidemia registrada en Oriente Medio en el 2012, caracterizada por un Síndrome Respiratorio (siglas en inglés de Middle East Respiratory Syndrome); mientras que SARS, a un Síndrome Respiratorio Agudo Severo (en inglés: Severe Acute Respiratory Syndrome), detectado por primera vez a finales de 2002 en Guangdong, China (Ye et al., 2020).

Los estudios taxonómicos del nuevo CoV lo agrupan junto a SARS-CoV debido a que produce síntomas similares al Síndrome Respiratorio Agudo Severo y a su similitud en la secuencia de nucleótidos de sus genes, la secuencia de aminoácidos de ciertas proteínas y a sus relaciones filogenéticas (Fig. 1) (Gorbalenya et al., 2020). Se trata de un betaCoV que posee ARN monocatenario con sentido positivo y envoltura similar al virus SARS-CoV, de allí que fue denominado SARS-CoV-2 (FIP, 2020; Chen et al., 2020).

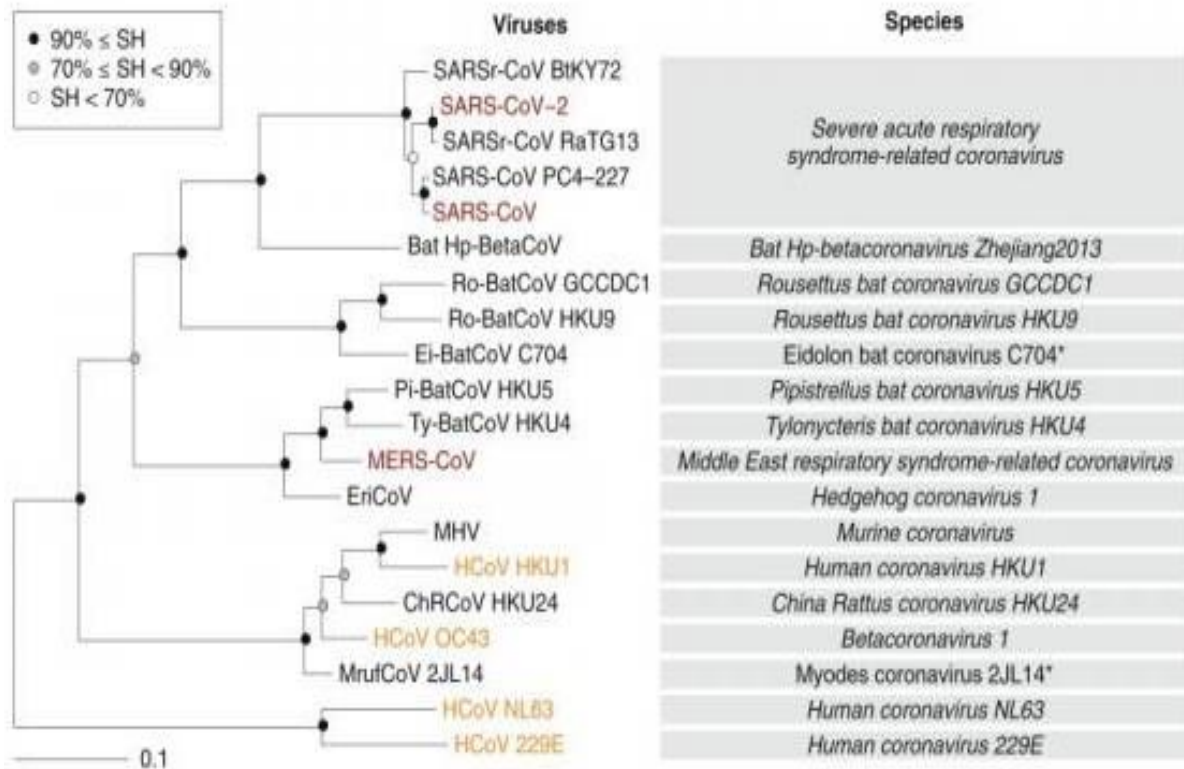


Figura 1: Filogenia de *Betacoronavirus*. Árbol de máxima probabilidad de representantes de coronavirus del género *Betacoronavirus*, relacionado con el síndrome respiratorio agudo severo (SARS). El árbol tiene sus raíces con HCoV-NL63 y HCoV-229E, que representan dos especies del género *Alphacoronavirus*. El texto en rojo hace referencia a los virus zoonóticos con patogenicidad variable en humanos. El texto naranja destaca los virus respiratorios comunes que circulan en los seres humanos. El apoyo de las ramas se estimó utilizando la prueba de razón de verosimilitud aproximada similar a Shimodaira-Hasegawa con 1000 repeticiones. Los asteriscos indican dos especies de coronavirus cuyas demarcaciones y nombres están pendientes de aprobación por parte del comité internacional de taxonomía de virus (ICTV) (Adaptado de Gorbalenya et al., 2020).

Las partículas virales (o viriones) de SARS-CoV-2 presentan una morfología esférica de un diámetro de 60 a 140 nm. La estructura del virión (Fig. 2A) consiste principalmente en una nucleocápside que contiene al material genético y en una envoltura lipídica externa. En la nucleocápside, el genoma viral está asociado con la proteína de la nucleocápside (N), la cual se halla fosforilada y en contacto con la bicapa de fosfolípidos de la envoltura externa. En la envoltura externa se encuentran proteínas estructurales principales, denominadas proteína espiga (S: spike), proteína de membrana (M) y proteína de envoltura (E); además de proteínas accesorias, tales como: la proteína hemaglutinina esterasa (HE), proteína 3, proteína 7a, entre otras (Li et al., 2020; Mousavizadeh and Ghasemi, 2021).

Al igual que el resto de los CoV, el SARS-CoV-2 es un virus ARN monocatenario de polaridad positiva (ARN mc+) (Fig. 2B). El tamaño del genoma es de aproximadamente 29,9 kb. Este presenta un casquete metilado en el extremo 5' (cap-5') y un segmento rico en adeninas (cola poli-A) en el extremo 3', y a su vez contiene varios marcos abiertos de lectura (ORF: open reading frame). Las primeras dos secciones del genoma contienen dos ORF

(ORF 1a y ORF 1b) que codifican 16 proteínas no estructurales (NSP: non-structural protein), las cuales desempeñan numerosas funciones en los procesos de replicación y ensamblaje del virus. El último tercio del genoma contiene genes que codifican para las proteínas estructurales (S, M y E) y otras proteínas accesorias, además de varios ORF (Mousavizadeh and Ghasemi, 2021).

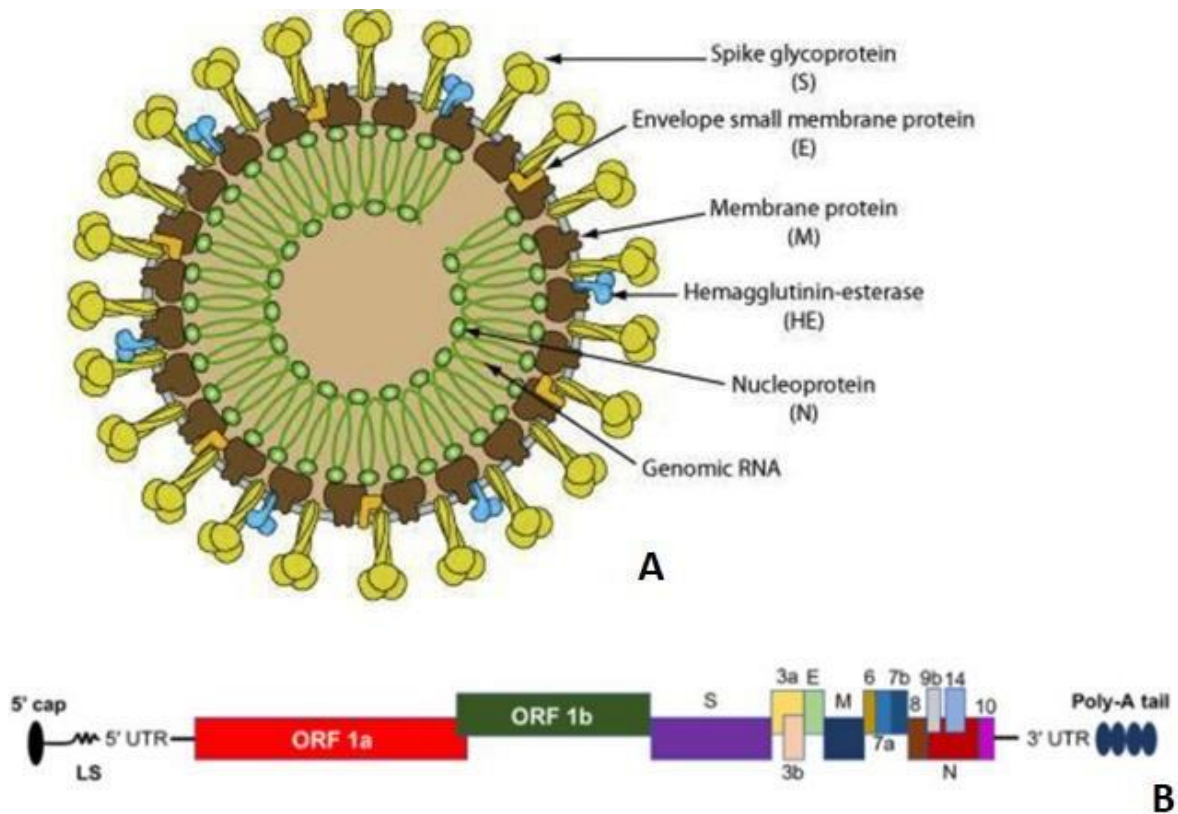


Figura 2: Organización estructural y genómica de SARS-CoV-2. A- Representación esquemática de la estructura de SARS-CoV-2. B- Representación esquemática del ARN viral; desde 5' a 3' presenta cap, secuencia líder (LS), 5' UTR, ORF1a, ORF1b, S (codifica proteína S), ORF3a, E (codifica proteína E), M (codifica proteína M), ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, N (codifica proteína N), ORF10, 3' UTR, cola poli-A. (Adaptado de Naqvi et al., 2020 y Mousavizadeh and Ghasemi 2021).

Para que se inicie su ciclo replicativo en la célula hospedadora (Fig. 3), es necesaria la interacción entre la proteína S y la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2). Esta unión esclarece el tropismo del virus hacia ciertos tejidos y órganos particulares, debido a que la ACE2 se halla expresada principalmente en células epiteliales alveolares tipo II de pulmón, enterocitos del íleon y colon, células miocárdicas, células del túbulo proximal del riñón, células epiteliales estratificadas del esófago superior y células uroteliales de la vejiga (Zou et al., 2020).

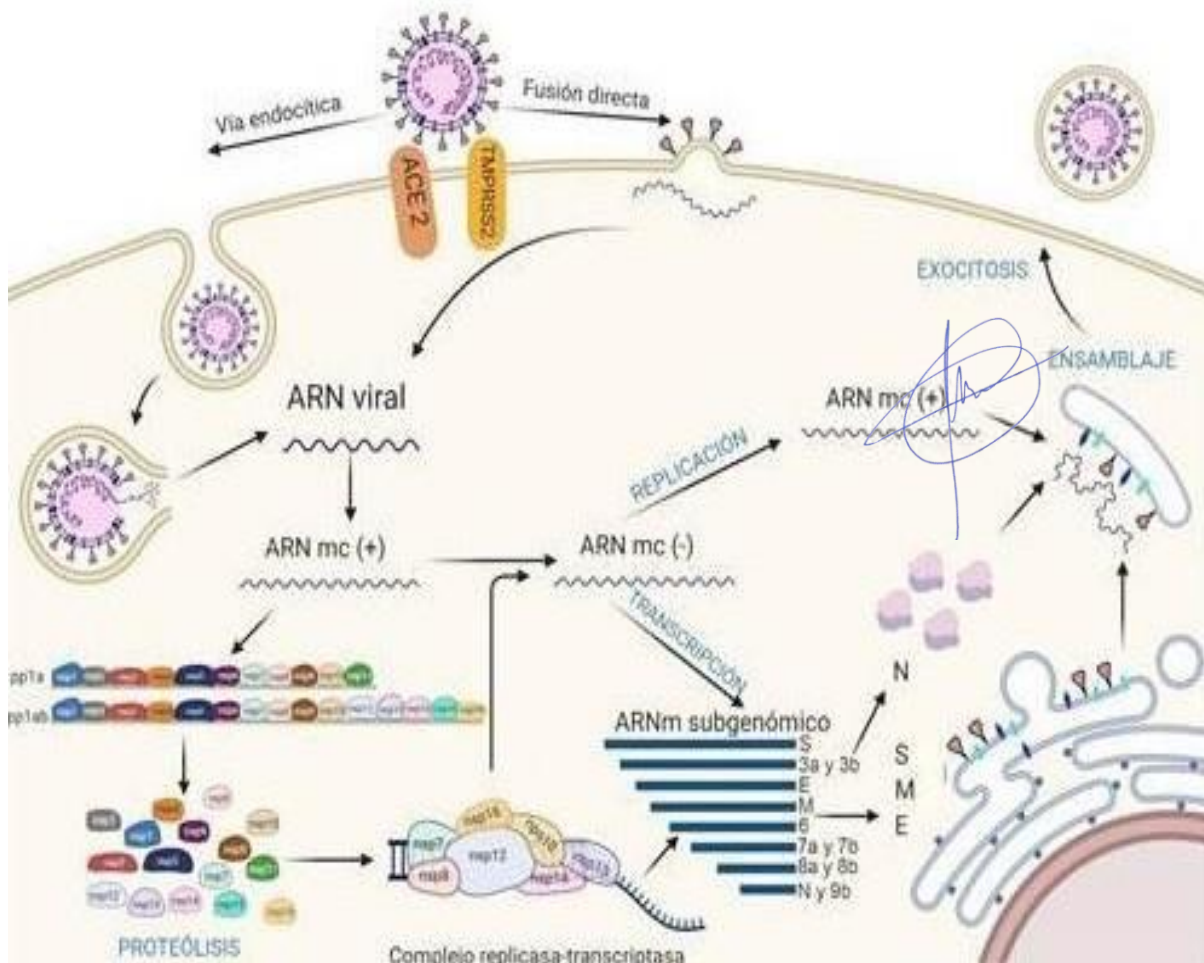


Figura 3. Mecanismo de replicación y patogénesis del SARS-CoV-2. Entrada del SARS-CoV-2 a través de 2 vías: endocitosis y fusión directa. Cuando el virus ingresa a la célula, se libera el ARN viral y este ARN monocatenario en sentido positivo (ARN mc+) se traduce en las poliproteínas: pp1a y pp1ab a partir de las regiones ORF 1a y ORF 1ab, respectivamente. Posteriormente, la proteólisis por parte de 3CLpro y PLpro, dará lugar a 16 proteínas no estructurales, que formarán el complejo replicasa transcriptasa (RTC), el cual producirá ARN monocatenario de polaridad negativa (ARN mc-) a partir de la cadena positiva. Por otra parte, el complejo RTC también sintetiza ARN subgenómico que codifica las proteínas estructurales (S, M y E), ensambladas en Retículo Endoplasmático antes de ser transportadas al Aparato de Golgi, donde se asociará con el nuevo ARN viral (ARN mc+) y la proteína de la nucleocápside (N). Finalmente, se exportará en forma de vesículas para la posterior liberación del nuevo virus (Adaptado de Lam-Cabanillas et al., 2021).

La proteína S (Fig. 4) posee dos subunidades (S1 y S2). La subunidad S1 es la que interacciona y se une al receptor ACE2 por medio del dominio de unión al receptor (RBD: receptor binding domain); mientras que la subunidad S2 determina la fusión de la membrana del virus con la de la célula hospedadora. Para que el virus complete la entrada en la célula, la proteína S debe ser cortada o escindida por la proteasa TMPRSS2 (Transmembrane protease, serine 2). La escisión de la proteína S ocurre en 2 diferentes posiciones de la subunidad S2, esto contribuye a la separación de la unión RBD de la subunidad S1 con el receptor ACE2 y a la posterior fusión de las membranas, facilitando la entrada del virus mediante endocitosis (Li, 2016; Pastrian-Soto and Pastrian-Soto, 2020).

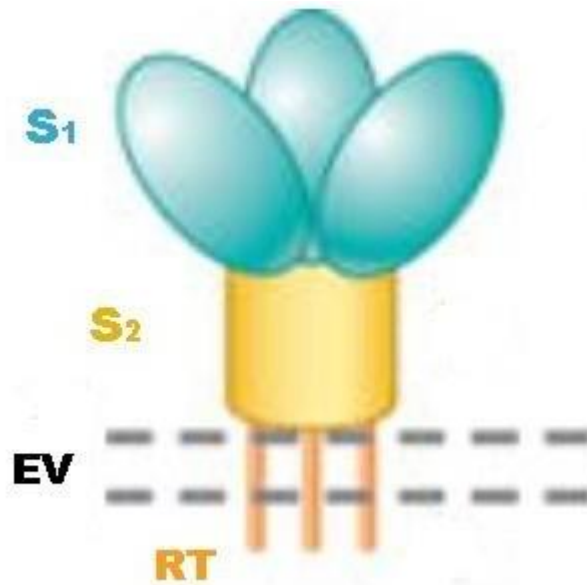


Figura 4. Estructura de la proteína de la espícula (S) de coronavirus. Se esquematiza la estructura de la proteína S, constituida por el ectodominio formado por la subunidad trimérica de unión al receptor ACE2 (S1) y la subunidad de fusión a la membrana de la célula huésped (S2); continuando al ectodominio, sigue una región transmembrana (RT) que atraviesa la envoltura viral (EV) (Adaptado de Li, 2016).

Una vez que el virus está en el endosoma, ocurre una baja de pH mediada por lisosomas, que promueve la fusión de la membrana del endosoma con la envoltura del virus, lo que libera la nucleocápside al citoplasma (desnudamiento viral). Como los CoV son virus ARN de sentido positivo, el ARN liberado actúa como un ARNm que se transcribe directamente el gen de la replicasa viral (hacia el extremo 5') por medio de ORF 1a y ORF 1ab, traducándose en las poliproteínas replicasas: pp1a y pp1ab (Li et al., 2020).

Luego, estas poliproteínas pp1a y pp1ab son procesadas proteolíticamente por 2 enzimas principales: la proteasa similar a 3-cisteína (3CLpro) y la proteasa similar a la papaína (Plpro), junto a otras proteasas. Esto da lugar a la producción de 16 NSP (Angeletti et al., 2020). La mayoría de las NSP actúan en la replicación y transcripción del genoma viral, ejerciendo actividades enzimáticas de tipo proteasa, ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), helicasa, exorribonucleasa, endorribonucleasa y metiltransferasa (Snijder et al., 2016). Estas proteínas forman el complejo replicasa transcriptasa (RTC: replicase transcriptase complex), el cual utiliza como molde el ARN mc+, para sintetizar una copia de ARN monocatenario de polaridad negativa (ARN mc-) (Rohaim et al., 2021).

A partir de esta hebra negativa ocurren 2 procesos. Por un lado, se sintetiza un conjunto de ARNm sub-genómicos (ARNsg) que codifican las proteínas estructurales (S, M y E) y accesorias; éstas se producen en los ribosomas del retículo endoplasmático (RE), para luego ser transportadas al Aparato de Golgi (AG). Paralelamente, ocurre la transcripción de esta hebra negativa, dando lugar a una ARN monocatenario de polaridad positiva (genoma de la nueva partícula viral), la cual es movilizadada hacia el AG, donde ocurre el ensamble de las proteínas estructurales y el genoma viral. Una vez ensamblado, la partícula viral se transporta

a la membrana celular por medio de vesículas, para luego sufrir exocitosis de la célula (Mousavizadeh and Ghasemi, 2021; Rohaim et al., 2021).

Se considera que todos los CoV humanos tienen un origen evolutivo en animales (zoonótico). En base a datos moleculares, HCoV-NL63, HCoV-229E, MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2 se originaron en murciélagos; mientras que HCoV-OC43 y HCoV-HKU1 probablemente se originaron en roedores (Cui et al., 2019).

HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 y HCoV-HKU1 son reconocidos como los menos virulentos, ya que generalmente inducen enfermedades leves en vías respiratorias superiores; aunque se han reportado algunos casos de infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos y en personas mayores de edad. Estos CoV se distribuyen globalmente y tienden a transmitirse predominantemente durante la temporada de invierno en climas templados o en coinfección con otros virus respiratorios (Influenza, Metapneumovirus, Virus Sincitial Respiratorio, entre otros) (Ottogalli et al., 2021).

Los tres restantes virus, MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2, son los agentes más patogénicos dentro de los CoV que infectan humanos y se distinguen principalmente, por ser causantes de diferentes sucesos/eventos epidemiológicos que provocaron un gran número de muertes (Ye et al., 2020).

Los pacientes con SARS presentan mialgia, dolor de cabeza, fiebre, seguidos de disnea, tos y dificultad respiratoria. Entre el 20-30% de los pacientes requieren cuidados intensivos y ventilación mecánica, resultando una infección letal para un 10% de los infectados. La epidemia de SARS en el 2002 resultó en más de 8.000 casos positivos y un total de 774 muertes reportadas en al menos 26 países. Finalmente, la OMS declaró a la epidemia de SARS como contenida el 5 de julio de 2003, a menos de un año de su comienzo, aunque se han registrado algunos casos positivos luego de esa fecha (Cheng et al., 2007).

MERS-CoV se aisló por primera vez en 2012, del pulmón de un paciente de 60 años con una neumonía aguda e insuficiencia renal, en Arabia Saudita. MERS presenta síntomas clínicos en parte similares a SARS (dolor de cabeza, fiebre, tos, dificultad respiratoria, entre otros). Sin embargo, lo que diferencia a esta infección es el desarrollo de un cuadro de insuficiencia renal aguda, siendo una de las principales causas de su alta tasa de letalidad (34,4 %). Hasta el momento, la epidemia de MERS provocó aproximadamente 2.500 casos positivos y unos 858 muertos en 27 países (Hilgenfeld and Peiris, 2013).

La mayoría de las personas sintomáticas, infectadas con COVID-19, experimentan una enfermedad respiratoria leve a moderada. Los adultos mayores y las personas con problemas médicos subyacentes como enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades respiratorias crónicas y cáncer tienen más probabilidades de desarrollar afecciones graves, que incluye neumonía, síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), sepsis y shock séptico (OMS, 2020).

Si bien la patogenicidad y virulencia de SARS-CoV-2 es mucho menor que la registrada para SARS-CoV y MERS-CoV, los atributos que destacan a SARS-CoV-2 frente a los agentes etiológicos de SARS y MERS, son: una alta **transmisibilidad**, mayor **infectividad** y la **inmunogenicidad** característica de este virus, factores claves en la dinámica de la pandemia por COVID-19 (Blanco-Melo et al., 2020; Naqvi et al., 2020; Ye et al., 2020).

La transmisión del virus se produce principalmente a través del contacto cercano entre personas por la emisión de gotas respiratorias cargadas con partículas virales, y en menor medida (1 en 10000) a través de fómites (objetos contaminados). Otra forma de transmisión es por vía fecal-oral (OMS, 2020).

La mayor infectividad de SARS-CoV-2 se debe a que las proteínas de las espículas se unen con mayor afinidad al receptor de enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2, angiotensin-converting enzyme 2), facilitando aún más la entrada de las partículas virales a la célula (Lam-Cabanillas et al., 2021).

Por último, el problema clave en el desarrollo clínico y en el tratamiento de los pacientes con COVID-19 es la capacidad que tiene SARS-CoV-2 de desatar una respuesta inmunológica de carácter aberrante y con aspectos particulares. Estudios en modelos animales con infección por SARS-CoV-2 y en perfiles transcriptómicos de células de pacientes con COVID-19, caracterizaron esta respuesta con una baja concentración de interferones (IFN) tipo I y III (no detectado en SARS y MERS) y un aumento en la expresión de citoquinas (CK), específicamente interleuquinas (IL): IL-1 β , IL-6 y IL-10, como también un aumento del Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α) y de la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1). Esto se tradujo en una reducción de la respuesta antiviral innata acoplada a una fuerte reacción inflamatoria (Blanco-Melo et al., 2020). Esta hiperactivación leucocitaria y aumento de la expresión de CK se la designa como Síndrome de Liberación de Citoquinas (CRS, cytokine release syndrome). El CRS está implicado en el deterioro de tejidos y órganos, y conduce a la enfermedad hacia episodios clínicos graves, predisponiendo el aumento de la inflamación, edema, disnea y hasta fibrosis pulmonar (Blanco-Melo et al., 2020; Soy et al., 2020).

La farmacoterapia utilizada para el tratamiento de COVID-19 sigue en constante revisión y estudio debido a la complejidad inmuno-inflamatoria de la enfermedad, la cual a su vez puede verse empeorada o limitada de acuerdo con los antecedentes de salud y comorbilidades presentes en cada paciente (Cervera et al., 2020).

A las personas enfermas con síntomas leves se les pide que conlleven la enfermedad de forma aislada con un estilo de vida saludable (descanso y correcta alimentación), y solo realizar tratamiento sintomático de ser necesario como, por ejemplo, antipiréticos (generalmente paracetamol). En el caso de los pacientes con síntomas moderados a graves de la enfermedad, se procede a la intervención farmacoterapéutica y si hay compromiso respiratorio, se prosigue a la oxigenoterapia (soporte ventilatorio) y resto de medidas necesarias (Cervera et al., 2020).

Al no existir en la actualidad un régimen farmacológico específico basado en evidencia científica (ensayos clínicos), el mismo puede variar según las pautas y alcances de cada centro de salud (Cervera et al., 2020; Ministerio de Sanidad Gobierno de España, 2020), los cuales suelen contemplar:

- Antipirético/analgésico que se administra según síntomas y fiebre, se prefiere paracetamol (Cervera et al., 2020).
- Vitamina D, ya que recientemente se demostró que esta vitamina y sus metabolitos participan activamente en la regulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas. La vitamina D aumenta la producción de moléculas de la inmunidad

innata que favorecen el control de infecciones, a la vez que promueve un control eficiente de las respuestas inmunes a través de la diferenciación de linfocitos regulatorios y la producción de citoquinas antiinflamatorias, promoviendo el control de respuestas inmunológicas exacerbadas (autoinmunes y alérgicas) (RACIM, 2020).

- Glucocorticoides: ejercen su actividad antiinflamatoria mediante el bloqueo del factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), con la consiguiente disminución de la transcripción y la síntesis de CK pro-inflamatorias como IL (IL-1, IL-6) y de TNF- α , entre otros. Dentro de este grupo de fármacos se encuentra la dexametasona (Cervera et al., 2020; RACIM, 2020).
- Aspirinetas, según riesgo de trombosis vascular (Cervera et al., 2020).
- Claritromicina, un antibiótico que se usa en caso de compromiso respiratorio (Ministerio de Sanidad Gobierno de España, 2020).
- Ivermectina, un antiparasitario que se encuentra en etapa de ensayos clínicos (RACIM, 2020).
- Fármacos biológicos (anticuerpos monoclonales, interferones), antiinflamatorios de origen natural como la colchicina, entre otros (RACIM 2020).

Por supuesto, también se han probado fármacos antivirales disponibles, como hidroxicloroquina, lopinavir, ritonavir, remdesivir, que han demostrado efecto trivial o nulo sobre el riesgo de infección por SARS-CoV-2, el ingreso a unidad de cuidados intensivos o sobre la mortalidad en ensayos clínicos de pacientes con COVID-19 (OMS, 2020; BMJ, 2021).

El contexto actual, caracterizado por más de 160 millones de casos positivos de COVID-19, y la aparición de nuevas variantes de SARS-CoV-2 más virulentas y con menor susceptibilidad a las inmunoterapias (vacunas y anticuerpos monoclonales), sustentan el impulso de seguir buscando agentes terapéuticos o preventivos para COVID-19 (OMS, 2020; Wang et al., 2021).

En la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, los productos naturales siguen constituyendo una fuente de compuestos químicos con potencialidad para tratar una gran variedad de enfermedades. Aproximadamente el 40% de los fármacos aprobados para el uso humano provienen de productos naturales, tanto de origen vegetal como animal o de hongos (Drogas vegetales, animales o fúngicas), incluyendo derivados semisintéticos y sintéticos producidos a partir de farmacóforos naturales (compuestos químicos aislados de una droga natural) (Newman and Cragg, 2020).

En simultáneo, diversas drogas naturales son utilizadas como medicina alternativa en todo el mundo, en base al gran repertorio de estudios científicos que respaldan sus propiedades terapéuticas, como también su extenso uso en diferentes sistemas de medicina tradicional (Jassim and Naji, 2003). Algunos trabajos proponen el posible uso de diferentes plantas medicinales en el tratamiento y prevención del COVID-19, basados en sus antecedentes en el uso de enfermedades respiratorias. Así, podemos mencionar a *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. (Acanthaceae) y *Sambucus nigra* L. (Viburnaceae), para tratar la fiebre y la inflamación de las vías respiratorias; *Althaea officinalis* L. (Malvaceae) y *Hedera helix* L. (Araliaceae) por sus propiedades antitusivas y expectorantes (Hensel et al., 2020; Silveira et al., 2020).

El grupo de investigación en el área de Farmacognosia, que trabaja en forma interdisciplinaria con el Centro de Información de Medicamentos de la Facultad de Ciencias Química de la Universidad de Córdoba (CIME-FCQ-UNC), recibió consultas informales sobre el potencial uso de dos especies vegetales como antivirales, en el contexto de la infección por SARS-CoV-2. Una de ellas es *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), utilizada ampliamente en medicina ayurveda y con reconocidas propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas y, por otro lado, *Echinacea* spp. (Asteraceae), la cual es vastamente consumida en medicina alternativa para “activar” el sistema inmunológico debido a su reconocimiento como planta medicinal inmunomoduladora (WHO, 1999; Choudhary and Rahi, 2018; Parsons et al., 2018).

Hipótesis y objetivos

En función de todo lo expuesto, se plantea como **hipótesis**: Las especies vegetales, hongos, líquenes y los compuestos químicos de origen natural, con reconocida actividad antiviral *in vitro*, podrían tener efecto sobre el agente etiológico de COVID-19.

El **objetivo general** de este trabajo fue la búsqueda de potenciales agentes terapéuticos o preventivos para COVID-19 a partir de especies naturales bioactivas.

Para responder a este objetivo se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Realizar una búsqueda bibliográfica de posibles drogas naturales (especies vegetales, macrohongos y líquenes) que, en función de sus antecedentes, pueden ser ensayadas *in vitro* como antivirales contra SARS-CoV-2.
- 2) Desarrollar un estudio bibliográfico en base a la evidencia científica acerca de *Curcuma longa* L. y *Echinacea* spp. que nos permita evaluar su potencial uso en COVID-19.
- 3) Evaluar la citotoxicidad y actividad antiviral *in vitro* sobre SARS-CoV-2 de *C. longa* y *Echinacea* spp.
- 4) Evaluar la citotoxicidad y actividad antiviral *in vitro* sobre SARS-CoV-2 de compuestos de origen natural disponibles que hayan demostrado efecto sobre otros virus.
- 5) Establecer la composición química de los extractos ensayados que resulten bioactivos, identificando los principales metabolitos secundarios presentes en las especies vegetales seleccionadas.

Cabe aclarar que el objetivo 2, no estaba planteado en el plan de trabajo inicial, pero se agregó en virtud de las consultas recibidas sobre “cúrcuma” y “equinácea”.

Materiales y Métodos

A- Búsqueda bibliográfica

Este estudio o proceso de búsqueda tuvo como propósito relevar (identificar y seleccionar) la bibliografía/literatura existente sobre especies vegetales, macrohongos y líquenes como posibles fuentes de productos naturales, ya sea para la obtención de extractos o compuestos químicos purificados con actividad antiviral. Por tanto, estas especies serían candidatas para ser ensayadas *in vitro* sobre el SARS-CoV-2, agente etiológico de COVID-19 (Chen et al., 2020; Federación Farmacéutica Internacional, 2020).

Complementariamente, se buscó información sobre dos especies vegetales que cobraron interés para la población en el marco de la pandemia por COVID-19, debido a sus conocidos antecedentes como plantas medicinales, vulgarmente conocidas como “cúrcuma” (*Curcuma longa* L.) y “equinácea” (*Echinacea* spp.).

Se consultaron las bases de datos de libre acceso PubMed y Google académico (PubMed, Google Scholar); además se tuvo acceso a la base de datos paga Science Direct (Science Direct), provista por la FCQ-UNC. Se incluyeron todos los trabajos que arrojó la búsqueda en todas las bases consultadas hasta marzo de 2021.

En el caso de la búsqueda de fuentes naturales, la misma se limitó a especies vegetales, hongos (macrohongos) y líquenes; por tanto, los términos de búsqueda (palabras claves) fueron “plants”, “vegetal species”, “phytochemicals”, “mushrooms”, “lichen”, buscados cada uno en combinación con los términos “coronavirus” o “antiviral activity”, respectivamente. Se seleccionaron aquellos artículos que trataban sobre productos naturales (extractos o metabolitos secundarios) con actividad antiviral contra virus envueltos ARN monocatenario no retrotranscrito, con especial énfasis sobre coronavirus, molecularmente relacionados a SARS-CoV-2 (betaCoV), y a sus proteínas virales. Se incluyeron trabajos científicos que versaban sobre estudios *in vitro*, *in vivo* y ensayos clínicos, excluyéndose los estudios *in silico* y los estudios con mezclas herbales.

En la búsqueda de artículos científicos referentes a “cúrcuma” y “equinácea”, se utilizaron como palabras claves “*Curcuma*” o “*Echinacea*” (nombre genérico) en combinación con algunos de los siguientes términos: “antiviral”, “immunomodulatory”, “anti-inflammatory” y “ethnobotany”. Se utilizó el género para abarcar todas las especies que poseen valor etnobotánico o han sido estudiadas como antivirales, inmunomoduladoras y/o antiinflamatorias. La documentación etnobotánica fue incluida ya que provee información valiosa de las plantas en la medicina tradicional/popular.

B- Muestras para evaluar la actividad biológica *in vitro*

B.1- Criterios de selección

Las especies vegetales “cúrcuma” y “equinácea” fueron seleccionadas fundamentalmente por su reconocimiento como planta medicinal, tanto en medicina tradicional como por

numerosos trabajos científicos debido a su bioactividad o utilidad frente a la prevención o tratamiento de diferentes enfermedades; lo cual propulsó la utilización de estas plantas en diversos ensayos clínicos. Además, en la actualidad, el consumo de “cúrcuma” y “equinácea” está ampliamente difundido como medicina alternativa en gran parte del mundo, siendo el material vegetal de estas especies sencillamente adquiribles.

Paralelamente, los metabolitos secundarios, parietina (PTN) y ácido úsnico (AUs) fueron seleccionados debido a su amplia actividad antimicrobiana *in vitro*: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria, entre otros (Fazio et al., 2007; Luzina and Salakhutdinov, 2018) y a su disponibilidad en el momento que transcurrió esta tesina de grado.

B.2- Procedencia de las muestras a ensayar

El material vegetal (MV) de “cúrcuma” y “equinácea” se adquirió en negocios de la ciudad de Córdoba, que se dedican a la comercialización de productos naturales, en octubre de 2020.

Con el fin de corroborar la identidad de cada MV adquirido, se siguieron las Floras oficiales para determinar la ubicación de las especies en sus respectivas familias y la verificación de los nombres científicos de las mismas. En el caso de *C. longa* se siguió la Flora de China (Flora of China) y para *Echinacea* spp., la Flora de América del Norte (Flora of North America). Con la intención de reafirmar fehacientemente la identidad del MV, se enviaron respectivas muestras al Museo Botánico de Córdoba que pertenece a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC) y al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV) del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

La parietina (PTN), un derivado antraquinónico (Fig. 5A), se purificó previamente del líquen *Telochistes nodulifer* (Nyl.) Hillman (Telochistaceae), con una pureza mayor al $95,5 \pm 0,2$ % determinada por HPLC-UV-Vis (Mugas et al., 2021).

El ácido úsnico (AUs), un derivado natural del dibenzofurano (Fig. 5B), fue cedido por el Dr. José L. Cabrera (Dpto. Ciencias Farmacéuticas, FCQ, UNC e IMBIV, CONICET), cuya pureza ($81,3 \pm 0,5$ %) se determinó mediante un método de HPLC-UV-Vis previamente descrito (Fazio et al., 2007).

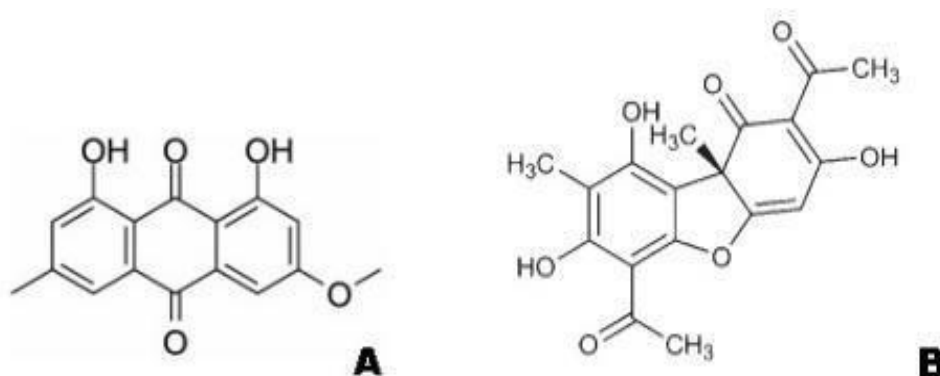


Figura 5: Estructura de parietina (A) y ácido úsnico (B)

B.3- Preparación del material vegetal

El MV de ambas muestras (“cúrcuma” y “equinácea”) se desecó a temperatura ambiente y al abrigo de la luz, con el fin de disminuir el contenido de agua sin alterar los metabolitos secundarios (Villar del Fresno, 1999). Luego, se eliminaron las materias extrañas que pudieron identificarse a simple vista (hilos, papel, arena, principalmente).

El MV de “equinácea” (250 g) se sometió a un muestreo, realizando 4 cuarteados sucesivos hasta obtener una muestra representativa de $29,8 \pm 0,2$ g, que se apartó para su identificación botánica. El resto del MV se procesó en un molino de cuchillas (Retsch KG 5657 HANN, Germany), usando un tamiz N° 3 a fin de obtener un polvo más homogéneo, lo cual mejora el rendimiento de la extracción al aumentar la superficie de contacto (vegetal-solvente) (Villar del Fresno, 1999).

Los rizomas de “cúrcuma” se fragmentaron con ayuda de una cuchilla, en trozos no mayores a 0,5 cm, y luego se redujeron/aplastaron en un mortero de porcelana (Fig. 6).



Figura 6: Rizomas de *C. longa* (“cúrcuma”) fragmentados. Puede observarse el color característico de los curcuminoides

B.4- Obtención de los extractos

La selección de las metodologías de extracción y los tipos de extractos (acuosos u orgánicos) obtenidos a partir de cada MV se realizó en base a las formas de consumo que comúnmente se utilizan en medicina tradicional (antecedentes etnomedicinales) o en el consumo popular para *Curcuma* spp. y *Echinacea* spp. (Barrett et al., 2003; Barnes et al., 2005; Singh et al., 2012; Catanzaro et al., 2020).

Con el fin de respetar la forma tradicional/popular de usar estas plantas, se procedió a realizar una infusión y una decocción de “cúrcuma”, y en el caso de “equinácea” se preparó una tintura madre y una infusión.

B.4.1- Extractos de “cúrcuma”

Para la infusión de cúrcuma (Icur), 100 mL de agua destilada (H_2O_d) a punto ebullición se agregaron a 5 gr de rizomas triturados y se dejó en reposo durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se filtró y al MV residual se le añadieron otros 100 mL de H_2O_d a punto de ebullición; luego de 30 min, se filtró y el filtrado se adicionó a la primera extracción para constituir el

extracto acuoso obtenido por infusión. Se decidió someter el MV a dos infusiones sucesivas debido a la poca solubilidad de los curcuminoides en agua (González-Albadalejo et al., 2015; Mondal et al., 2016), en base a la posibilidad de aconsejar una preparación diferente si tuviera actividad antiviral.

En la decocción de cúrcuma (Dcur), a 5,3 gr de rizomas triturados se le agregaron 100 mL de H₂O_d y se calentó hasta llegar a ebullición (98 °C) durante 5 min. La solución se dejó reposar durante 1 h, se filtró y se reservó el filtrado. Al MV residual se le añadieron otros 100 mL de H₂O_d, se llevó nuevamente a ebullición durante 5 min y se lo dejó reposar por 30 min. El filtrado de esta segunda extracción se juntó con el de la primera, para constituir el extracto acuoso obtenido por decocción. Se consideró el mismo argumento arriba mencionado en la decisión de preparar dos decocciones sucesivas a partir del MV, y se dejó menos tiempo debido a característica termolábil de los curcuminoides (González-Albadalejo et al., 2015; Mondal et al., 2016).

Tanto Dcur como la lcur se sometieron a un proceso de liofilización (Liofilizador Labconco LYPH LOCK 6), ya que es el mejor método para eliminar agua a fin de obtener extractos secos (consistencia de polvo).

El rendimiento de cada metodología de extracción se expresó como la cantidad de extracto seco (en gramos) obtenido cada 100 gr de MV desecado.

B.4.2- Extractos de “equinácea”

Las tinturas madres son soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas preparadas a partir de productos vegetales u otro origen. La proporción de principio activo presente en las diferentes tinturas es uniforme, pero varía según las normas establecidas para cada droga vegetal. Para la preparación de las tinturas se emplean, principalmente 2 métodos, lixiviación y maceración (Farmacopea Argentina ANMAT, 2015). Para la realización de este trabajo se eligió la maceración como método de preparación de la tintura madre.

Para obtener la tintura de “equinácea” (Tech), a 100 gr de partes áreas molidas se le agregaron 400 mL de disolvente (etanol-H₂O_d, 40:60), necesarios para cubrir la totalidad del MV. Se dejó macerar en una ampolla de decantación durante 3 días, con agitación manual frecuente y protegida de la luz. Transcurrido este tiempo, se colecta el extracto. El MV residual se prensó manualmente para eliminar el resto de extracto, el cual se filtró y se juntó con el extracto previamente colectado, y se envasó al resguardo de la luz y a baja temperatura (4 °C).

Con la Tech se procedió a evaporar primero el contenido de etanol (EtOH), usando un rotavapor a presión reducida y temperatura menor a 40 °C; posteriormente, el extracto acuoso remanente se liofilizó hasta sequedad.

Para la infusión de “equinácea” (lech), 100 gr de partes áreas molidas se extrajeron con 2 L de H₂O_d a punto ebullición y se dejó macerar con agitación manual esporádica en una ampolla de decantación durante 3 días, protegido de la luz y a baja temperatura (4 °C). Posteriormente, se filtró y se guardó a 4 °C. En el caso de esta especie vegetal, no se sometió el MV a dos infusiones sucesivas, pero se dejó más tiempo de extracción; en parte, debido a la imposibilidad de asistir todos los días al laboratorio.

La leche se concentró a sequedad mediante un proceso de liofilización (Liofilizador Labconco LYPH LOCK 6).

El rendimiento de cada metodología de extracción se expresó como la cantidad de extracto seco obtenido en gr por cada 100 gr de MV desecado.

B.5- Preparación de muestras para ensayos biológicos

A partir de cada extracto seco se prepararon soluciones stock a una concentración de 100 mg/mL. Para el caso de los metabolitos secundarios en estudio (compuestos químicos puros), las soluciones stock fueron de 29 mM para AUs y de 5 mM para PTN.

Cada compuesto químico y extracto seco de “equinácea” (Tech e leche) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO); mientras que los extractos secos de “cúrcuma” (Icur y Dcur) se disolvieron en H₂O con 10 % de DMSO. A partir de estas soluciones stock se realizaron las diluciones necesarias con medio de mantenimiento (MM) para llevar a cabo los ensayos de actividad biológica *in vitro*.

C- Ensayos para evaluación de actividad biológica

C.1- Evaluación de la citotoxicidad

Previo a la evaluación de la actividad antiviral y/o virucida *in vitro* de una muestra (preparada a partir de un extracto seco o de un metabolito secundario), la evaluación de su toxicidad sobre las células hospedadoras es de suma importancia. La citotoxicidad se define como una alteración en la estructura y en las funciones celulares básicas que llevan a la producción de un daño, el cual puede ser detectado a través de la proliferación o supervivencia celular, el mismo puede estimarse por medio de diferentes bioensayos *in vitro* con líneas o cultivos celulares primarios (Konigheim et al., 2012).

Para la realización de esta tesis, la evaluación de la citotoxicidad de las muestras en estudio comprendió 2 etapas: en una primera instancia, la observación de alteraciones estructurales (Efecto citopático, método cualitativo) y, en segundo lugar, la determinación de la viabilidad celular por un método colorimétrico (Captación de rojo neutro, método cuantitativo).

Estos métodos contribuyeron a determinar las concentraciones de las muestras que no produjeron toxicidad sobre las células hospedadoras, lo cual garantiza que el efecto sobre éstas se debe a la acción del virus y no a un efecto citotóxico provocado por los compuestos que forman la muestra.

C.1.1- Línea celular

Se emplearon cultivos de la línea celular Vero clon 76 (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops* L.), mantenidos en estufa a 37 °C (Sanyo, Incu Safe MCO 17 AC) con atmósfera húmeda conteniendo 5% CO₂.

C.1.2- Medio de Crecimiento

Medio de crecimiento (MC): constituido por Medio Esencial Mínimo (MEM) con aminoácidos no esenciales modificado por Dulbecco, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina (3 g/L) y sulfato de gentamicina (50 µg/mL) como antibiótico (ATB).

C.1.3- Medio de Mantenimiento

Medio de mantenimiento (MM): constituido por MEM con aminoácidos no esenciales modificado por Dulbecco, suplementado con 2% de SFB, 1% L-glutamina y 50 µg/mL de ATB.

C.1.4- Observación del efecto citopático

Este ensayo consiste en observar los cambios que producen las muestras sobre la morfología de las células, mediante la utilización de un microscopio óptico invertido (Olympus IX81, Olympus Corporation, Shinjuku) (Juan and Ribas, 1993). Estos cambios morfológicos se definen como efectos citopáticos (ECP) e incluyen: redondeamiento, retracción de membranas, lisis celular, presencia de gránulos en el citoplasma, cambios en la estructura del cultivo celular, pérdida de adhesión al sustrato (Juan and Ribas, 1993). Esta observación preliminar permitió estimar las concentraciones en las cuales comenzaron a ser tóxicas las muestras para las células hospedadoras.

El rango de concentraciones evaluadas fue diferente para cada muestra, dependiendo de la solubilidad de cada una (Tabla 1). Tanto para los extractos como para los metabolitos secundarios, se realizaron diluciones seriadas (factor $\frac{2}{3}$) a partir de la máxima concentración evaluada para cada caso, de manera que la cantidad de DMSO en las células sea \leq a 1% (concentración no citotóxica). Cada concentración se evaluó por triplicado (n=3).

Tabla 1: Intervalos de concentraciones de las muestras utilizadas en los ensayos de citotoxicidad.

Muestra	Intervalo de concentración
Dcur	1000 - 3,43 µg/mL
Icur	1000 - 3,43 µg/mL
Tech	1000 - 3,43 µg/mL
Iech	1000 - 3,43 µg/mL
AUs	174 - 0,60 µM
PTN	30 - 0,10 µM

Dcur: Decocción de “cúrcuma”, **Icur:** Infusión de “cúrcuma”, **Tech:** Tintura de “equinácea”, **Iech:** infusión de “equinácea”, **AUs:** ácido úsnico, **PTN:** parietina.

Se utilizaron monocapas de células Vero, preformadas durante 24 h, crecidas en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) que contenían 1×10^5 células/pocillo (≈ 95 % confluencia). Luego de descartar el MC, las células se trataron con cada concentración de cada muestra por triplicado.

Como control del sistema se dejaron pocillos con monocapa de células solo con MM con 1 % de DMSO (n=3), identificada como control celular (CC), que equivale al 100 % de viabilidad celular (VC).

Las placas con los tratamientos y sus respectivos CC se incubaron durante 3 días consecutivos a 37 °C y atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Diariamente, mediante microscopio óptico invertido, se observaron las monocapas celulares para detectar la aparición de cualquier alteración morfológica.

Se consideraron citotóxicas las concentraciones que produjeron alteraciones morfológicas como las previamente mencionadas (Ooi et al., 2004). Estos resultados permitieron determinar las máximas concentraciones que no produjeron efecto citopático, como a su vez constatar, posteriormente, los resultados obtenidos por el método colorimétrico cuantitativo.

C.1.5- Determinación de la viabilidad celular *in vitro* por método colorimétrico

Los ensayos colorimétricos permiten medir la viabilidad celular mediante la captación o formación de un colorante por parte de alguna organela celular; permitiendo evaluar, luego de la exposición de las células a la muestra de interés, la producción de efectos nocivos intracelulares (Juan and Ribas, 1993).

El método de captación de Rojo Neutro (RN), propuesto por Borenfreud y Puerner (1985), es uno de los ensayos colorimétricos más empleados para medir citotoxicidad. Está basado en la capacidad de las células viables de incorporar el RN como marcador supravital. Este colorante catiónico penetra las membranas celulares por difusión pasiva, concentrándose en organelas con membrana, principalmente lisosomas y endosomas. En consecuencia, la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables (Repetto et al., 2008).

Se utilizaron las mismas monocapas de células Vero que en el ensayo de ECP. Una vez cumplida la incubación de 72 h (y el periodo de observación para la determinación del ECP), se descartó el MM conteniendo las diferentes concentraciones de cada muestra y se agregó una solución de RN (50 µg/mL en MEM), que se incubó durante 3 h. Posteriormente, se descartó este colorante y las monocapas fueron lavadas 3 veces con una solución salina de fosfatos (PBS) estéril. A continuación, el colorante contenido en los lisosomas y endosomas de las células viables se extrajo con una solución de agua - etanol - ácido acético (50:49:1), durante 15 min con agitación continua a temperatura ambiente y protegido de la luz. La densidad óptica (DO) del colorante extraído se midió en un lector de microplacas (BioTek ELx800), realizando las lecturas a 540 nm. El porcentaje de viabilidad celular (%VC) se calculó según la siguiente fórmula:

$$\%VC = (DO_t / DO_c) \times 100$$

Dónde:

DOT: densidad óptica del cultivo celular tratado.

DOc: densidad óptica del cultivo celular control.

Con los valores obtenidos a partir de esta fórmula, se confeccionaron curvas de viabilidad (%VC) en función de las concentraciones testeadas ($\mu\text{g}/\text{mL}$ o μM).

A partir de estos gráficos se estimaron los valores de concentración que provocan daño celular evidente al 50 % y al 20 % de los cultivos celulares tratados, es decir la concentración citotóxica media (CC_{50}) y una concentración subtóxica (CC_{20}), como así también la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC), donde la viabilidad celular es mayor al 90 % (Borenfreud and Puerner, 1985).

La obtención de estos valores nos permitió posteriormente emplear intervalos de concentración no-tóxicos o sub-tóxicos en los ensayos de actividad antiviral *in vitro*.

C.2- Actividad virucida y antiviral *in vitro*

C.2.1- Cepa viral estudiada

Se utilizó como modelo viral el SARS-CoV-2 (hCoV-19/Argentina/PAIS-G0001/2020, GISAID, ID: EPI_ISL_499083), cepa aislada durante un brote en la ciudad de Córdoba por el Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” (InViV) de la Fac. Cs. Médicas (FCM) de la UNC.

C.2.2- Determinación del título del stock viral

Ciertos virus son capaces de formar placas de lisis cuando replican en determinados sistemas de cultivo, y están recubiertos por un medio semisólido. Este medio limita la difusión de viriones producidos durante la replicación, provocando que la infección viral quede restringida a las células vecinas. Esto ocasiona la formación de una zona de lisis celular denominada placa de lisis. De esta manera, cada placa se considera iniciada por una partícula viral (del Barrio Alonso et al., 2008). Debido a que el modelo viral bajo estudio es capaz de producir placas de lisis, la titulación de los stocks virales se realizó utilizando la técnica de unidades formadoras de placas (UFP) bajo agarosa en células Vero (Earley et al., 1967).

Para ello, una monocapa confluyente de células Vero (48 h de incubación en placas de 12 pocillos, $5,2 \times 10^7$ células/pocillo, ≈ 95 % confluencia) se infectó con 100 μL de cada dilución seriada (factor 10) realizada a partir del stock viral ($n=3$) y se incubó durante 1 h (37 °C con 5% CO_2 en atmósfera húmeda). Transcurrida la etapa de absorción, se cubrió la monocapa con una solución semisólida constituida por partes iguales de agarosa al 1 % y MM de doble concentración (2X). Una vez solidificada esta capa, las células se mantuvieron a 37 °C con 5% CO_2 en atmósfera húmeda durante 4 días. Posteriormente, las monocapas de células se fijaron con formol al 10 % durante 2 horas y las placas de lisis se revelaron con una solución de cristal violeta al 1 %. De esta manera, se pudo cuantificar el número de placas de lisis o UFP. El título viral se expresa como el número de UFP presentes en la dilución anterior, donde ya no hay placa de lisis, por el logaritmo de dicha dilución. A partir del stock se calcularon las diluciones correspondientes para tener 100 UFP por pocillo en los ensayos posteriores.

C.2.3- Actividad antiviral *in vitro*

Este ensayo tiene como objetivo evaluar si alguna de las muestras presenta capacidad de actuar sobre la replicación del modelo viral bajo estudio. La actividad antiviral de una muestra (extracto o compuesto químico) puede ser medida mediante su capacidad para reducir el número de UFP, con respecto al control viral (Del Barrio Alonso et al., 2008).

Las monocapas de células Vero, preformadas en placas de cultivo de 24 pocillos con $\approx 95\%$ confluencia ($4,8 \times 10^7$ células/pocillo), se infectaron con 100 UFP/pocillo del modelo viral. Luego de 1 h de incubación a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 , se lavó con una solución de PBS estéril para eliminar las partículas virales que no fueron capaces de adherirse a la membrana celular. A continuación, se cubrió la monocapa celular con medio semisólido (constituido por partes iguales de agarosa al 1% y MM 2X), el cual contenía concentraciones decrecientes seriadas (1:2) a partir de la CC_{20} de cada muestra, con excepción de los extractos de “cúrcuma” (Icur y Dcur), que se realizaron a partir de $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$. Cada muestra, se ensayó por triplicado. Los controles del sistema ($n=3$) fueron: 1) control viral (CV) células infectadas sin tratar; 2) control de tratamiento (Ct) células sin infectar y tratadas con la máxima concentración a ensayar (CC_{20} o $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$), según corresponda); y 3) control celular (CC), células sin infectar y sin tratar.

Luego de incubar las células con cada tratamiento y sus respectivos controles ($37\text{ }^\circ\text{C}$ con atmósfera del 5% de CO_2) durante 4 días, las células se fijaron con formol al 10% durante 2 h. Las placas de lisis se revelaron con una solución de cristal violeta al 1% . De esta manera, el número de UFP fue cuantificado y obtenido el porcentaje de inhibición (% I) de cada muestra (extracto o sustancia pura) en base a los valores obtenidos en los CV (100%), y en función de la concentración ensayada. Cuando fue posible, se obtuvo la concentración efectiva 50 (CE_{50}), siendo la concentración de la muestra que inhibe el 50% de las partículas virales.

C.2.4- Evaluación de la actividad virucida *in vitro*

Este ensayo se realizó para determinar si las muestras tienen capacidad para inactivar los viriones, previo a su ingreso a las células hospedadoras (capacidad virucida). La acción inactivante directa de una muestra (extracto o compuesto químico) sobre las partículas virales puede ser evaluada mediante el tratamiento de suspensiones virales de título conocido.

El efecto virucida conlleva a una disminución brusca en el título infectivo residual de la suspensión tratada con la muestra, con respecto a suspensiones virales no tratadas (control viral, CV) (Del Barrio and Parra; 2000, Fernandez et al., 2003; Yang et al., 2005; Del Barrio Alonso et al., 2008).

El efecto virucida se determinó utilizando la prueba de reducción de UFP bajo agarosa en células Vero. Para ello, se mezclaron $100\text{ }\mu\text{L}$ del stock viral (4×10^6 UFP/mL) con $100\text{ }\mu\text{L}$ de una concentración de muestra (tratamiento) que corresponde a la CC_{50} en el caso de los extractos de “equinácea” y de AUs; en cambio, para PTN se utilizó una concentración de $30\text{ }\mu\text{M}$ y para los extractos de “curcuma” $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$. Esta mezcla se incubó 1 h a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en atmósfera con 5% de CO_2 . El CV consistió en una mezcla de $100\text{ }\mu\text{L}$ del stock viral con $100\text{ }\mu\text{L}$ de MM.

Luego, a partir de cada mezcla (virus con cada tratamiento y CV) se realizaron diluciones seriadas (factor 10) y cada dilución se agregó por triplicado sobre una capa confluyente de células Vero ($4,8 \times 10^7$ células/pocillo, ≈ 95 % confluencia). Tras 1 h de incubación a 37 °C con 5 % CO₂ para permitir el ingreso del virus a la célula hospedadora (absorción viral), se agregó una solución semisólida, constituida por partes iguales de agarosa al 1 % y MM 2X.

Posterior a un período de incubación de 4 días (37 °C con 5 % CO₂), las células fueron fijadas con formol al 10 % durante 2 h y las placas de lisis se revelaron con una solución de cristal violeta al 1 %. Se cuantificó el número de placas y la infectividad viral residual se determinó mediante el ensayo de reducción de UFP (Cheng et al., 2008). Los extractos o metabolitos secundarios que causaron disminuciones ≤ 2 logaritmos en comparación con el título del CV, se consideraron sin actividad virucida (Andrei et al., 1985; Vanden Berghe et al., 1986; Zanon et al., 1999; Konigheim et al., 2012).

C.2.5- Análisis estadístico

Todas las concentraciones de cada muestra se evaluaron por triplicado. Los valores se expresaron como media \pm error estándar ($\bar{x} \pm SE$) de 2 experimentos independientes. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software estadístico computacional Origin 8.5. Los valores de CC₅₀, CC₂₀, MCNC y CE₅₀ se obtuvieron a partir de las curvas dosis-respuesta, generadas a partir del análisis de regresión no lineal (Sigmoidal Origin, $R^2 > 0.9$).

Resultados y Discusión

A- Búsqueda bibliográfica

A.1- Fuentes naturales con potencial efecto antiviral sobre coronavirus

Los resultados respecto a la búsqueda de información relacionada a las fuentes naturales con potencial efecto antiviral sobre SARS-CoV fueron marcadamente diversos en torno al origen, encontrándose tanto especies vegetales como macrohongos y líquenes (Tabla 2 y 3).

La principal distinción observada durante la búsqueda bibliográfica fue el repertorio de ensayos antivirales sobre *Betacoronavirus* registrados en artículos científicos, siendo éste ampliamente superior en el caso de las especies vegetales, y casi nulo para las especies de macrohongos y líquenes. En efecto, el desarrollo del estudio bibliográfico fue orientando, en el caso de las plantas, sobre su actividad sobre *Betacoronavirus*; mientras que en el caso de los taxones fúngicos, a sus registros de actividad antiviral sobre virus envueltos, con genoma constituido por ARN monocatenario no retrotranscrito, es decir, virus con estructura y ciclo de replicación similares a los coronavirus (CoV), como parámetro de selección.

Basado en los criterios de búsqueda, en el caso de las especies vegetales se obtuvieron un total de 36 taxones botánicos sobre SARS-CoV, de los cuales 29 corresponden a plantas con flores (angiospermas), 5 plantas vasculares con semilla desnuda (“gimnospermas”) y 2 plantas vasculares sin semilla (“monilofitas”). La mayor parte de las especies utilizadas son de origen asiático, referencia que concuerda con las zonas geográficas de los brotes epidémicos de SARS-CoV y MERS-CoV (The Plant List).

Además de extractos acuosos y orgánicos bioactivos, los principales metabolitos a los que se le atribuyen su actividad pertenecen a familias químicas muy diversas, encontrando principalmente flavonoides, terpenoides, alcaloides, antraquinonas, aceites esenciales, diarilheptanoides y lignanos.

Los modelos virales (*Betacoronavirus*) principalmente empleados para estudiar la bioactividad fueron SARS-CoV, HCoV-OC4 y MERS-CoV, siendo SARS-CoV el más vastamente escogido (más del 70 % de los estudios analizados). Ésta acentuada selección es debida a que tanto SARS-CoV como MERS-CoV son los agentes etiológicos causantes de los brotes epidemiológicos ocurridos en el 2002 en China y 2012 en la Península Arábiga, respectivamente; a los cuales se les atribuye un gran número de muertes y afectados (Hilgenfeld and Peiris, 2013).

Las metodologías utilizadas para estudiar cada mecanismo de acción variaron en gran medida entre cada estudio. Cada mecanismo de acción, identificado en los trabajos científicos, fue categorizado con una letra (A, B, C, D y E) y asignado a cada extracto o metabolito secundario de los taxones seleccionados en las Tablas 2 y 3.

Los principales mecanismos de acción examinados fueron la inhibición en la replicación viral (A), en menor frecuencia la acción virucida (B), la inhibición de la actividad enzimática (C), interacción entre la proteína S (proteína de la espícula) y la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2) (D), junto a otros pocos mecanismos acción aislados (E).

Entre los trabajos donde se examina la inhibición enzimática como mecanismo antiviral, los blancos enzimáticos más utilizados fueron cisteína proteasa similar a la 3-quimotripsina (3CLpro) y la proteasa similar a la papaína (PLpro). SARS-CoV y SARS-CoV-2 comparten una gran homología en la secuencia de aminoácidos de estas enzimas (96 % con 3CLpro y 83 % con PLpro), siendo a su vez los pliegues tridimensionales y la estructura del sitio activo altamente conservados en todo el género (Ferreira and Rabeh, 2020; Morse et al., 2020). Esta similitud conformacional en las enzimas claves para el ciclo replicativo, las convierte en uno de los blancos más interesantes en la búsqueda de agentes antivirales, siendo los compuestos capaces de inhibir estas enzimas en SARS-CoV y otros CoV relacionados, potentes candidatos terapéuticos sobre SARS-CoV-2 (Anand et al., 2003; Chen et al., 2020).

Además de los mecanismos antes mencionados, se observó que hay otros mecanismos de acción menos examinados, pero con gran potencial para inhibir la patogénesis de SARS-CoV-2. Uno de ellos es la inhibición de la interacción entre la proteína S (proteína de la espícula) y la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2), la cual tendría como efecto inhibir la adhesión de las partículas virales a la membrana celular y, por ende, evitar la internalización de éstas a la célula (Tang et al., 2020). Este mecanismo fue asignado en la Tabla 2 como D. Es propicio detenerse en este mecanismo de acción, ya que algunos autores proponen ciertos productos naturales inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE o "ACE1") como potenciales candidatos a inhibir la internalización o la replicación de SARS-CoV-2 en las células hospedadoras (Tabla 2). Esta aseveración es, por un lado, riesgosa ya que, según varios estudios (Fang et al., 2020; Zhou et al., 2020) cuando se bloquea el receptor ACE se observa un aumento de la expresión de ACE2, lo que podría favorecer un aumento en la tasa de infección por SARS-CoV-2 y por ende, un agravamiento de la enfermedad; y otro lado, esta aseveración es desacertada ya que, como mencionamos previamente, SARS-CoV-2 interacciona con la ACE2 para ingresar a la célula hospedadora, no con ACE, las cuales son proteínas distintas (Gaddam et al., 2014).

Considerando la magnitud de la actividad antiviral, los mecanismos de acción propuestos y los antecedentes de toxicidad, se pueden destacar los siguientes taxones (Tabla 2): *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. (Cibotiaceae), *Dioscorea polystachya* Turcz. (Dioscoreaceae), *Pyrosia lingua* (Thunb.) Farw. (Polypodiaceae), como potenciales fuentes de agentes antivirales. El extracto metanólico del rizoma de *C. barometz* demostró una potente actividad antiviral sobre SARS-CoV con un índice de selectividad > 59. El índice de selectividad (IS) se define como el cociente entre la CC_{50} y la CE_{50} ; por lo tanto, mientras mayor es el valor de IS, mejor es el antiviral desde el punto de vista de su seguridad e inocuidad. A su vez, este extracto de *C. barometz* demostró inhibir la actividad de la enzima 3CLpro SARS-CoV con un valor de concentración inhibitoria media (IC_{50}) de $39 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ (Wen et al., 2011). Por su parte, el extracto metanólico de la raíz de *D. polystachya* también demostró una potente actividad antiviral sobre SARS-CoV con un $IS > 62$ y demostró inhibir la actividad de la enzima 3CLpro SARS-CoV con un $IC_{50} = 44 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ (Wen et al., 2011). Por otro lado, el extracto clorofórmico de las hojas de *P. lingua* demostró actividad antiviral sobre SARS-CoV con un $IS > 59$ (Li et al., 2005). Posteriores estudios fitoquímicos permitirían aislar e identificar potenciales agentes antivirales presentes en los extractos de estas especies vegetales.

Teniendo en cuenta los mismos criterios citados anteriormente, de este estudio bibliográfico se distinguen los siguientes metabolitos secundarios (Tabla 2, Figura 7): licorina,

emodina, savinina, y [8 β -hydroxyabieta-9(11),13-dien-12-one]] como posibles agentes antivirales sobre SARS-CoV-2.

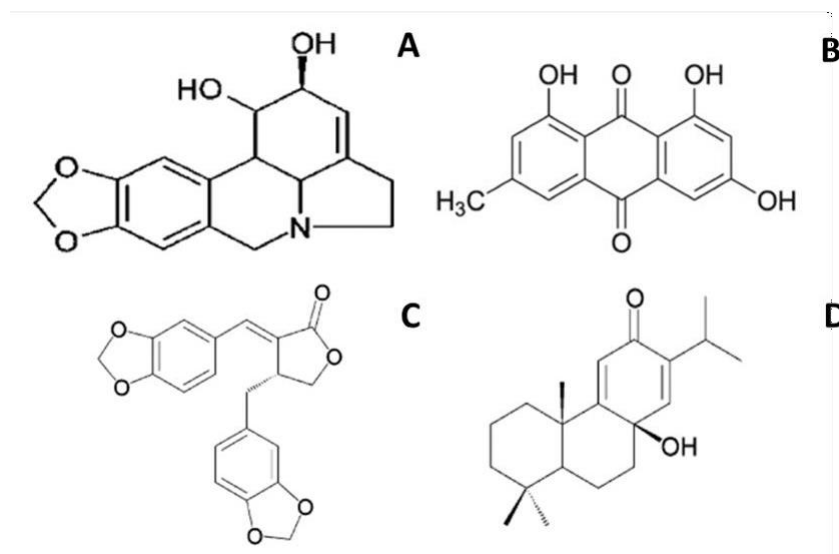


Figura 7: Estructura química de los metabolitos secundarios con mayor potencial actividad antiviral sobre SARS-CoV-2 hallados en el estudio bibliográfico: Licorina (A), Emodina (B), Savinina (C) y [8 β -hydroxyabieta-9(11),13-dien-12-one]] (D).

Licorina es un alcaloide derivado de la norbeladina (Fig. 7A) aislado principalmente de *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. (Amaryllidaceae) y de otras especies de la familia Amaryllidaceae (Tabla 2). Este metabolito presentó actividad antiviral sobre diversos betaCoV: SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-OC43 y MHV-A59, como también sobre otros géneros y especies de virus no relacionados filogenéticamente (*Flavivirus*, HIV-1, Virus Influenza, *Enterovirus*, entre otros), por lo que este metabolito secundario presenta un amplio espectro antiviral (Chen et al., 2004; Li et al., 2005; Cao et al., 2013; Shen et al., 2019). En el caso de SARS-CoV, el virus filogenéticamente más relacionado a SARS-CoV-2, licorina demostró una potente actividad antiviral con un IS = 954, el mayor valor de IS hallado en este estudio bibliográfico (Li et al., 2005).

Emodina es un derivado antraquinónico (Fig. 7B) presente en varias familias botánicas (Polygonaceae, Asphodelaceae, Fabaceae, entre otros), siendo uno de los principales metabolitos responsables de la actividad biológica de varias especies de los géneros *Rheum* L. (Polygonaceae) y *Polygonum* L. (Polygonaceae), utilizadas en Medicina Tradicional China (TCM) (Dong et al., 2016). Emodina demostró ser capaz de actuar sobre dos mecanismos claves en la replicación de CoV: por un lado, demostró inhibir la interacción entre la proteína S de SARS-CoV y el receptor ACE2, siendo este el compuesto químico natural más potente hallado en esta revisión bibliográfica (Ho et al., 2007). Este mecanismo de acción dilucidado en emodina es promisorio ya que, además de tratarse de una interacción específica entre proteína viral-receptor, la proteína S de SARS-CoV comparte un 75 % de homología en la secuencia de aminoácidos respecto a la proteína S de SARS-CoV-2 (Lam-Cabanillas et al., 2021; Mousavizadeh and Ghasemi 2021). A su vez, este metabolito demostró inhibir la actividad de la proteína 3a de SARS-CoV y HCoV-OC43, canal iónico que modula el egreso de las partículas virales de la célula huésped (Lu et al., 2006; Schwarz et al., 2011). Por otro

lado, debido a su capacidad de interaccionar con los componentes estructurales de las membranas biológicas y a sus antecedentes de agente virucida *in vitro* sobre una gran variedad de virus envueltos, emodina podría ejercer acción virucida sobre SARS-CoV-2, mecanismo de acción aún no estudiado en *Betacoronavirus* (Andersen et al., 1991; Alves et al., 2004; Batista et al., 2019). La variedad de blancos terapéuticos en los cuales esta antraquinona demostró ser activa, la convierten en un potencial agente antiviral y virucida sobre SARS-CoV-2.

Savinina (Lignano, Fig. 7C) y [8 β -hydroxyabieta-9(11),13-dien-12-one] (Diterpenoide tipo abietano, Fig. 7D) son dos metabolitos aislados del duramen de *Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl. (Cupressaceae), aunque savinina también se encuentra en diversas familias de plantas con flores (Araliaceae, Aristolochiaceae, Fabaceae, entre otras) (Che et al., 1984; Cho et al., 2001; Li et al., 2019). Ambos metabolitos demostraron una potente actividad antiviral sobre SARS-CoV con un IS > 667 para savinina y IS > 510 en el caso del diterpenoide. Adicionalmente, savinina demostró ser inhibidor competitivo de 3CLpro SARS-CoV con un IC₅₀ = 25 μ M y una constante de disociación (K_i) de 8,2 (Wen et al., 2007).

Debido al potencial que presentan estos 4 metabolitos como antivirales sobre SARS-CoV-2, futuros estudios preclínicos y clínicos permitirían seguir evaluando su bioactividad y eficacia en el contexto de COVID-19.

Hasta marzo de 2021, se hallaron solo 2 reportes de productos naturales derivados de plantas evaluados sobre SARS-CoV-2. Un extracto de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) y un producto comercial a base de extractos de *Echinacea purpurea* (L.) Moench (Asteraceae) (Signer et al., 2020; Nair et al., 2021).

A. annua es una hierba originaria de China, donde se la usa tradicionalmente para tratar la fiebre. Actualmente se extraen diversos compuestos de esta planta, siendo la artemisinina (lactona sesquiterpénica) el metabolito secundario de mayor interés terapéutico, utilizado como antiparasitario, junto a sus derivados semisintéticos, para tratar la malaria (Bora and Sharma, 2011). Nair y colaboradores (2021) demostraron que varios productos naturales derivados de *A. annua* son capaces de inhibir la replicación de SARS-CoV-2, entre ellos el extracto acuoso de las hojas y artemisinina. La mayoría de los derivados semisintéticos de artemisinina no evidenciaron actividad antiviral, y los que sí la presentaron, resultaron ser altamente tóxicos en los ensayos de citotoxicidad. Si bien artemisinina demostró actividad antiviral, no fue el metabolito más potente (inhibió el 50 % de virus a una concentración de 70 μ M: IC₅₀). Además, la eficacia antiviral de los extractos (IC₅₀ = 11,8 μ M) no se encontró correlacionada con el contenido de artemisinina, sugiriendo la existencia de otros metabolitos responsables de la actividad antiviral (Nair et al., 2021). Estos resultados apoyan la importancia de los estudios fitoquímicos no sólo en especies vegetales no indagadas, sino también en plantas ya documentadas, en la búsqueda de agentes terapéuticos.

En el caso de *E. purpurea*, Signer y colaboradores (2020) examinaron la acción virucida sobre SARS-CoV-2 de un preparado comercial, que consiste en una mezcla de 2 extractos hidroalcohólicos (65 % etanol), el de partes aéreas sumado al de raíces, en una proporción 95:5. Debido a la presencia de actividad virucida del preparado (50 μ l/mL provocó una disminución total del título residual infectivo), se postuló que éste podría ser un tratamiento profiláctico eficaz contra SARS-CoV-2 (Signer et al., 2020).

Tabla 2: Lista de especies vegetales con potencial capacidad para inhibir la replicación de SARS-CoV-2

Nombre Científico	Parte usada	Metabolitos/ Extractos	Blanco viral	Mecanismo de acción	Referencia
<i>Alnus japonica</i> (Thunb.) Steud. (Betulaceae)	Corteza	Diarylheptanoides	PLpro SARS-CoV	C	(Park et al., 2012)
<i>Aloe</i> spp. (Asphodelaceae)	Hojas	Aloe-emodina	3CLpro SARS-CoV	C	(Lin et al., 2005)
<i>Artemisia annua</i> L. (Asteraceae)	Planta completa	Extracto etanólico	SARS-CoV	A	(Li et al., 2005)
	Hojas	Extracto acuoso Artemisinina	SARS-CoV-2	A	(Nair et al., 2021)
<i>Berberis</i> spp. (Berberidaceae)	Raíces	Berbamina	MERS-CoV HCoV-OC43 MHV-A59	A	(Shen et al., 2019)
<i>Broussonetia papyrifera</i> (L.) L'Hér. ex Vent. (Moraceae)	Raíz	Polifenoles	PLpro SARS-CoV, 3CLpro SARS-CoV	C	(Park et al., 2017)
<i>Cassia tora</i> L. (Fabaceae)	Semillas	Extracto etanólico	SARS-CoV	A	(Wen et al., 2011)
<i>Chamaecyparis obtusa</i> (Siebold & Zucc.) Endl. (Cupressaceae)	Duramen	Terpenoides y lignanos (Savinina, [8 β -hydroxyabieta- 9(11),13- dien-12-one])	SARS-CoV	A	(Wen et al., 2007)
			3CLpro SARS-CoV	C	

<i>Cibotium barometz</i> (L.) J. Sm. (Cibotiaceae)	Rizoma	Extracto etanólico	SARS-CoV 3CLpro	A C	(Wen et al., 2011)
<i>Citrus</i> spp. (<i>Rutaceae</i>)	Fruto, hojas	Herbacetina, Rhoifolina, Pectolarina, Hesperina	3CLpro SARS-CoV	C	(Li et al., 2005, Jo et al., 2020)
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Fruto (Exocarpo)	Extracto etanólico	MHV, Genes TRPs	A, E	(Ulasli et al., 2014)
<i>Cryptomeria japonica</i> (Thunb. ex L. f.) D. Don (Cupressaceae)	Duramen	Terpenoides	SARS-CoV	A	(Wen et al., 2007)
<i>Curcuma longa</i> L. (Zingiberaceae)	Rizoma	Curcumina	SARS-CoV 3CLpro SARS-CoV	A C	(Wen et al., 2007)
<i>Dioscorea polystachya</i> Turcz. (Dioscoreaceae)	Raíz	Extracto etanólico	SARS-CoV 3CLpro SARS-CoV	A C	(Wen et al., 2011)
<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench (Asteraceae)	Planta completa	Extracto hidroalcohólico	SARS-CoV-2 SARS-CoV MERS-CoV	B	(Signer et al., 2020)
<i>Gentiana scabra</i> Bunge (Gentianaceae)	Rizoma	Extracto etanólico	SARS-CoV	A	(Wen et al., 2011)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (Fabaceae)	Raíz	Glicirricina	SARS-CoV	A	(Cinatl et al., 2003)

<i>Holarrhena antidysenterica</i> (L.) Wall. ex A. DC. (Apocynaceae)	Corteza	Connesina	MERS-CoV HCoV-OC43 MHV-A59	A	(Shen et al., 2019)
<i>Houttuynia cordata</i> Thunb. (Saururaceae)	Planta entera	Extracto acuoso	3CLpro SARS-CoV, RdRp SARS-CoV	C	(Lau et al., 2008)
<i>Isatis indigotica</i> Fortune (Brassicaceae)	Raíz	Extracto acuoso	3CLpro SARS-CoV	C	(Lin et al., 2005)
<i>Juniperus formosana</i> Hayata (Cupressaceae)	Duramen	Terpenoides	SARS-CoV 3CLpro SARS-CoV	A C	(Wen et al., 2007)
<i>Juniperus oxycedrus</i> L. (Cupressaceae)	Conos	Aceite esencial	SARS-CoV	A	(Loizzo et al., 2008)
<i>Laurus nobilis</i> L. (Lauraceae)	Fruto	Aceite esencial	SARS-CoV	A	(Loizzo et al., 2008)
<i>Lindera aggregata</i> (Sims) Kosterm. (Lauraceae)	Raíz	Extracto etanólico	SARS-CoV	A	(Li et al., 2005)
<i>Lycoris radiata</i> (L'Hér.) Herb. (Amaryllidaceae)	Corteza	Extracto etanólico Licorina	SARS-CoV SARS-CoV MERS-CoV HCoV-OC43 MHV-A59	A A	(Li et al., 2005) (Chen et al., 2004, Li et al., 2005, Shen et al., 2019)

<i>Papaver somniferum</i> L. (Papaveraceae)	Fruto	Papaverina	MERS-CoV HCoV-OC43 MHV-A59	A	(Shen et al., 2019)
<i>Paulownia tomentosa</i> (Thunb.) Steud. (Paulowniaceae)	Fruto	Flavonoides geranilados	PLpro SARS-CoV	C	(Cho et al., 2013)
<i>Peganum harmala</i> L. (Nitrariaceae)	Semillas	Harmina	MERS-CoV HCoV-OC43 MHV-A59	A	(Shen et al., 2019)
<i>Polygonum multiflorum</i> Thunb. (Polygonaceae)	Raíz	Extracto acuoso, Emodina	HCoV-OC43, Viroporina 3a SARS-CoV y HCoV-OC43	A, C	(Ho et al., 2007)
		Emodina	Proteína S SARS-CoV, ACE2	D	(Schwarz et al., 2011)
<i>Psoralea corylifolia</i> L. (Fabaceae)	Semillas	Flavonoides	PLpro SARS-CoV	C	(Kim et al., 2014)
<i>Pyrrosia lingua</i> (Thunb.) Farw. (Polypodiaceae)	Hojas	Extracto clorofórmico	SARS-CoV	A	(Li et al., 2005)
<i>Rheum officinale</i> Baill. (Polygonaceae)	Raíz	Extracto acuoso, Emodina	HCoV-OC43 Viroporina 3a SARS-CoV y HCoV-OC43	A, C	(Ho et al., 2007)
		Emodina	Proteína S SARS-CoV, ACE2	D	(Schwarz et al., 2011)

<i>Rhodiola kirilowii</i> (Regel) Maxim. (Crassulaceae)	NE	Luteolina	SARS-CoV	A	(Yi et al., 2004)
<i>Rhus chinensis</i> Mill. (Anacardiaceae)	NE	Tetra- <i>O</i> -galloyl- β - <i>D</i> -glucosa	SARS-CoV	A	(Yi et al., 2004)
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi (Lamiaceae)	Raíz	Baicalina	SARS-CoV	A	(Chen et al., 2004)
	Raíz	Scutellarina	Helicasa SARS-CoV	C	(Yu et al., 2012)
<i>Taxillus chinensis</i> (DC.) Danser (Loranthaceae)	Tallo Hojas	Extracto etanólico	SARS-CoV	A	(Wen et al., 2011)
<i>Thuja orientalis</i> L. (Cupressaceae)	Conos	Aceite esencial	SARS-CoV	A	(Loizzo et al., 2008)
<i>Toona sinensis</i> (A. Juss.) M. Roem. (Meliaceae)	Hojas	Extracto acuoso	SARS-CoV	A	(Chen et al., 2008)

Mecanismos de acción: A: Inhibición de la replicación viral, B: Acción virucida, C: Inhibición enzimática, D: Inhibición de la interacción entre proteína de la espícula (S) y ACE2, E: Otro.

Abreviaturas: 3CLpro: Cisteína proteasa similar a la 3-quimotripsina, ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2, MHV: Coronavirus murino, NE: no especificado, PLpro: proteasa similar a la papaína, Proteína S: proteína de la espícula, RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN, TRPs: canales iónicos de potencial del receptor transitorio.

Tabla 3: Lista de especies de macrohongos y líquenes con potencial capacidad para inhibir la replicación de SARS-CoV-2.

Nombre científico	Parte usada	Metabolitos/ Extractos	Blanco viral	Mecanismo de acción	Referencia
<i>Agaricus bisporus</i> (J.E. Lange) Imbach (Agaricaceae)	Cuerpo fructífero	Extracto acuoso	HCV Proteasa HCV.	A C	(Gallego et al., 2019)
<i>Cladonia</i> spp. (Cladoniaceae)	Talo, Micobionte	Ácido úsnico	IAV, JUNV, TCRV	A	(Fazio et al., 2007; Sokolov et al., 2012)
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst. (Ganodermataceae)	Cuerpo fructífero	Extracto acuoso	RdRp SARS-CoV	C	(Fung et al., 2011)
<i>Ganoderma pfeifferi</i> Bres. (Ganodermataceae)	Cuerpo fructífero	Lanostanos	IAV	C	(Mothana et al., 2003)
<i>Hericium erinaceus</i> (Bull.) Pers. (Hericiaceae)	Cuerpo fructífero	Extracto acuoso Extracto AcEt	DENV-2	A	(Ellan et al., 2019)
<i>Lecanora</i> spp. (Lecanoraceae)	Talo, Micobionte	Ácido úsnico	IAV, JUNV, TCRV	A	(Fazio et al., 2007; Sokolov et al., 2012)
<i>Lignosus rhinocerotis</i> (Cooke) Ryvardeen (Polyporaceae)	Cuerpo fructífero	Extracto acuoso Extracto AcEt	DENV-2	A	(Ellan et al., 2019)
<i>Parmelia</i> spp. (Parmeliaceae)	Talo, Micobionte	Ácido úsnico	IAV, JUNV, TCRV	A	(Fazio et al., 2007; Sokolov et al., 2012)

<i>Pleurotus giganteus</i> (Berk.) S.C. Karunarathna & K.D. Hyde (Pleurotaceae)	Cuerpo fructífero	Extracto acuoso Extracto AcEt	DENV-2	A	(Ellan et al., 2019)
<i>Ramalina</i> spp. (Ramalinaceae)	Talo, Micobionte	Ácido úsnico	IAV, JUNV, TCRV	A	(Fazio et al., 2007; Sokolov et al., 2012)
		Parietina	JUNV, TCRV	B	(Fazio et al., 2007)
		Dépsidos	RSV	A	(Lai et al., 2013)
<i>Schizophyllum commune</i> Fr. (Schizophyllaceae)	Cuerpo fructífero	Extracto acuoso Extracto AcEt	DENV-2	A	(Ellan et al., 2019)
<i>Telochistes</i> spp. (Teloschistaceae)	Talo, Micobionte	Ácido úsnico	IAV, JUNV, TCRV	A	(Fazio et al., 2007; Sokolov et al., 2012)
		Parietina	JUNV, TCRV	B	(Fazio et al., 2007)
<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd (Polyporaceae)	Cuerpo fructífero	Extracto acuoso	RdRp SARS-CoV	C	(Fung et al., 2011)
<i>Usnea</i> spp. (Parmeliaceae)	Talo, Micobionte	Ácido úsnico	IAV, JUNV, TCRV	A	(Fazio et al., 2007; Sokolov et al., 2012)
<i>Xanthoria</i> spp. (Teloschistaceae)	Talo	Parietina	JUNV, TCRV.	B	(Fazio et al., 2007)

Mecanismos de acción: A: Inhibición de la replicación viral, B: Acción virucida, C: Inhibición enzimática

Abreviaturas: AcEt: acetato de etilo DENV-2: Virus Dengue serotipo 2, HCV: Virus de la Hepatitis C, IAV: Virus Influenza A, JUNV: Virus Junín, RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN, RSV: Virus respiratorio sincitial, TCRV: Virus Tacaribe.

En el caso de los macrohongos y líquenes, debido al escaso repertorio de ensayos antivirales hallados sobre CoV, el relevo bibliográfico se amplió a virus envueltos, con genoma constituido por ARN monocatenario no retrotranscrito (en similitud estructural y replicativa a betaCoV).

Los modelos virales más empleados corresponden a virus de las familias Flaviviridae (virus Dengue tipo 2: DENV-2 y Hepatitis C: HCV), Arenaviridae (virus Junín: JUNV y virus Tacaribe: TCRV) y Orthomyxoviridae (virus influenza A: IAV), siendo los blancos de acción estudiados variables entre cada modelo viral y estudio propiamente dicho.

Como se muestra en la Tabla 3, se detectaron 14 taxones: 7 macrohongos y 7 líquenes, con actividad antiviral sobre virus que comparten alguna característica con betaCoV. Solo 2 taxones de macrohongos fueron probados contra betaCoV: *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. (Ganodermataceae) y *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (Polyporaceae). Ambas especies fueron reportadas en el mismo estudio, en el cual solo se han ensayado extractos acuosos y su actividad inhibitoria sobre la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de SARS-CoV.

La actividad antiviral registrada en *G. lucidum* sobre betaCoV y otros virus, ha sido atribuida en varias ocasiones a un grupo de metabolitos secundarios denominado lanostanos (triterpenos policíclicos), estructuralmente relacionados a las curcubitacinas (los núcleos básicos de estos metabolitos son isómeros estructurales). Estos metabolitos secundarios están presentes en numerosas familias de plantas vasculares: Curcubitaceae, Brassicaceae, Scrophulariaceae, Rosaceae, entre otras. Asimismo, estos compuestos presentan un extenso repertorio de estudios fitoquímicos y farmacológicos por su amplia diversidad estructural y bioactividad (Ahmed, 2006; Mukherjee et al., 2013; Salehi et al., 2019). Adicionalmente, si bien el repertorio es menor en comparación a las curcubitacinas, existen estudios donde se registra la actividad antiinflamatoria, antioxidante, antiviral y antiparasitaria de lanostanos provenientes de especies del género *Ganoderma* (Mothana et al., 2003; Adams et al., 2010; Wang et al., 2019; Su et al., 2020). En virtud de estos hallazgos, junto a la similitud estructural mencionada, futuros estudios químicos y farmacológicos podrían esclarecer el potencial biológico de estos triterpenoides en COVID-19.

No se halló ningún reporte de preparados o compuestos químicos derivados de macrohongos o líquenes evaluados sobre SARS-CoV-2.

Esta gran disparidad con la evaluación de las especies vegetales se asocia principalmente con la mayor diversidad y abundancia que comprende las plantas vasculares, en sintonía con el mayor registro etnomedicinal y farmacológico de las mismas (Cámara-Leret et al., 2014; Cheng et al., 2016).

Además de los extractos acuosos y orgánicos, los principales metabolitos secundarios identificados con actividad antiviral sobre virus con alguna característica similar a betaCoV, provenientes de hongos y líquenes (Tabla 3), fueron: lanostanos y dépsidos (polifenoles conformados por anillos aromáticos monocíclicos unidos por enlace éster). Adicionalmente, en el caso de los líquenes, se registraron 2 compuestos químicos puros con actividad antiviral: ácido úsnico (derivado del dibenzofurano) y parietina (derivado antraquinónico).

Si bien los preparados y compuestos de origen fúngico con efecto antiviral sobre CoV son más escasos, es llamativa la presencia de ciertos metabolitos secundarios estructuralmente particulares, que en general son inusuales en las plantas vasculares. Como resultado de este trabajo, se puede afirmar que este es el caso del ácido úsnico y de varios dépsidos, los cuales solo han podido ser aislados únicamente de especies de líquenes (Moreira et al., 2015, Calcott et al., 2018). La presencia de metabolitos secundarios únicos se atribuye a las características biológicas que particularizan a los líquenes, organismos simbióticos que presentan la capacidad de desarrollarse bajo presiones bióticas y abióticas extremas, tales como altas radiaciones UV, bajas temperaturas, salinidad, riesgo de desecación, entre otras (Tian et al., 2017; Calcott et al., 2018). Los metabolitos secundarios serían una de las tantas adaptaciones que contribuyeron a que estos organismos tengan una historia evolutiva en ambientes hostiles para la mayoría de las especies biológicas. Por lo tanto, el estudio químico de los líquenes atrae continuamente en pos de la dilucidación de nuevas estructuras químicas, lo cual es sumamente prometedor en la búsqueda de nuevos fármacos (Tian et al., 2017; Solárová et al., 2020).

A.2- Antecedentes científicos de *Curcuma* spp. y *Echinacea* spp.

Debido a las múltiples propiedades biológicas de “cúrcuma” y “equinácea”, el grupo de Farmacognosia fue consultado respecto a sus usos como plantas medicinales para el tratamiento de COVID-19. En consecuencia, se procedió a relevar información científica que permita analizar el potencial terapéutico de estas plantas en el marco de la enfermedad producida por SARS-CoV-2.

A.2.1- *Curcuma* spp.

El número de trabajos científicos encontrados respecto a *Curcuma* en combinación con los otros términos de búsqueda: “antiviral”, “immunomodulatory”, “anti-inflammatory” y “ethnobotany”, es sumamente extenso y variable según la base de datos. Se superaron los 80.000 resultados en la base de datos Google Scholar, aproximadamente 8.000 en ScienceDirect y 2400 para PubMed. Al analizar los trabajos obtenidos, se observó que, si bien las bases de datos compartían gran número de artículos en común, en el caso de Google Scholar muchos de los artículos resultaron imprecisos o no eran investigaciones que versaban sobre los términos de búsqueda empleados. Por lo tanto, si bien se tuvieron en cuenta las tres bases de datos, el análisis de la búsqueda se circunscribió primordialmente a los resultados aportados por las bases de datos PubMed y ScienceDirect, debido a la mayor precisión de los resultados de búsqueda obtenidos.

Para las 3 bases de datos (Google Scholar, PubMed y ScienceDirect), la mayor cantidad de trabajos se obtuvo cuando se combinó el nombre generico *Curcuma* con el término “anti-inflammatory”, encontrándose artículos desde 1971 en relación con la actividad antiinflamatoria de *Curcuma*. Desde esa fecha, la cantidad de artículos publicados (obtenidos con las 4 combinaciones de términos) aumentó constantemente, llegando a sus mayores números de publicaciones entre los años 2017 y 2020. Si bien el año 1971 fue la fecha de publicación más antigua arrojada en esta búsqueda, los artículos científicos hallados respecto a la etnobotánica de *Curcuma* (“*Curcuma*” combinado a “ethnobotany”) distinguen la

presencia de registros etnobotánicos y etnomedicinales a fechas muy anteriores (1790) al citado año.

Como consecuencia del estudio bibliográfico de esta planta medicinal, se elaboró un trabajo de divulgación científica (Anexo I), el cual fue enviado para su publicación en la revista BIFASE (Boletín Farmacéutico Bonaerense). En este momento, se encuentra en proceso de edición para su posterior publicación.

A.2.2- *Echinacea* spp.

En el caso de *Echinacea*, si bien la cifra de trabajos encontrados es amplia, la cantidad fue menor respecto a *Curcuma*: aproximadamente 35.000 en Google Scholar, 2500 en ScienceDirect y 300 en PubMed. La interpretación acerca de la imprecisión de las bases de datos a la hora de arrojar los resultados fue análoga a la de *Curcuma*. Si bien se tuvieron en cuenta los resultados de las 3 bases de datos, el énfasis se puso en el análisis de los resultados de búsqueda aportados por las bases de datos PubMed y ScienceDirect.

La mayor cantidad de resultados de *Echinacea* se obtuvieron cuando se combinó con el término “antiinflammatory” (21.000 en Google Scholar, 1395 en ScienceDirect y 117 en PubMed). Únicamente en PubMed se halló mayor cantidad de trabajos cuando se combinó con el término “antiviral”; sin embargo, esta diferencia estuvo dada sólo por 8 resultados.

El artículo más antiguo hallado fue publicado en 1973 con respecto a la actividad antiviral de *Echinacea*. Si bien la cantidad de publicaciones fue aumentando luego de ese primer registro (1973), el número de publicaciones presenta un comportamiento sostenido en el tiempo desde el 2002 hasta el 2020. En la búsqueda bibliográfica de este género, los artículos científicos hallados respecto a la etnobotánica (“*Echinacea*” combinado a “ethnobotany”), distinguen la presencia de registros etnobotánicos y etnomedicinales anteriores (1762) al año 1973.

A continuación, se resaltan los aspectos más importantes encontrados en la búsqueda bibliográfica sobre el género *Echinacea*.

Echinacea Moench es un género perteneciente a la familia Asteraceae, el cual comprende 10 especies aceptadas, originarias de América del Norte (The Plant List, Flora of North America) (Fig. 8). Conocidas con el nombre común (vernáculo) “black sampson” y “coneflower”. Las tres especies principalmente utilizadas con fines medicinales son: *E. angustifolia* (DC.) Hell., *E. pallida* (Nutt.) Nutt. y *E. purpurea* (L.) Moench (Barrett, 2003; Barnes et al., 2005).

Los primeros registros etnobotánicos de *Echinacea* spp. se remontan a la década del 1700 por parte de los nativos de América del Norte y colonos europeos. Entre algunos de sus variados usos etnomedicinales, estas especies se utilizaban para tratar resfriados, reumatismos, enfermedades inflamatorias de la piel, dolor dental, infecciones, parasitosis, mordeduras de ofidios, entre otros (Shemluck, 1982; Flannery, 1999; OMS, 1999).

En el presente, *Echinacea* spp. son cultivadas en todo el mundo por ser una de las plantas medicinales con mayor consumo popular (Parsons et al., 2018). Generalmente se consumen las partes aéreas frescas o secas y las raíces secas, en preparados como tinturas madres,

tés (infusiones), comprimidos, espráis. Los suplementos dietarios a base de material vegetal o de extractos de *Echinacea*, desde hace varios años, son uno de los suplementos con mayor número de ventas en Estados Unidos, Alemania e Inglaterra; y con una amplia comercialización en todo el hemisferio occidental (Barnes et al., 2005; Hudson and Vimalanathan, 2011; Parsons et al., 2018).



Figura 8. *Echinacea. purpurea* (L.) Moench

Dependiendo de la especie, el órgano vegetal y el método de extracción, los principales metabolitos que caracterizan a *Echinacea* son: compuestos fenólicos (ácido cicórico, ácido clorogénico, equinacósido, cynarina, entre otros), alquilamidas (amidas alifáticas o aromáticas unidas a un ácido graso insaturado), aceites esenciales, polisacáridos, glicoproteínas, alcaloides, entre otros (Figs. 9 y 10).

Echinacea spp. son plantas medicinales conocidas popularmente como inmunoestimulantes, y a la fecha existen numerosos trabajos que caracterizan las propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales, antioxidante, entre otras (Barrett, 2003; Barnes et al., 2005).

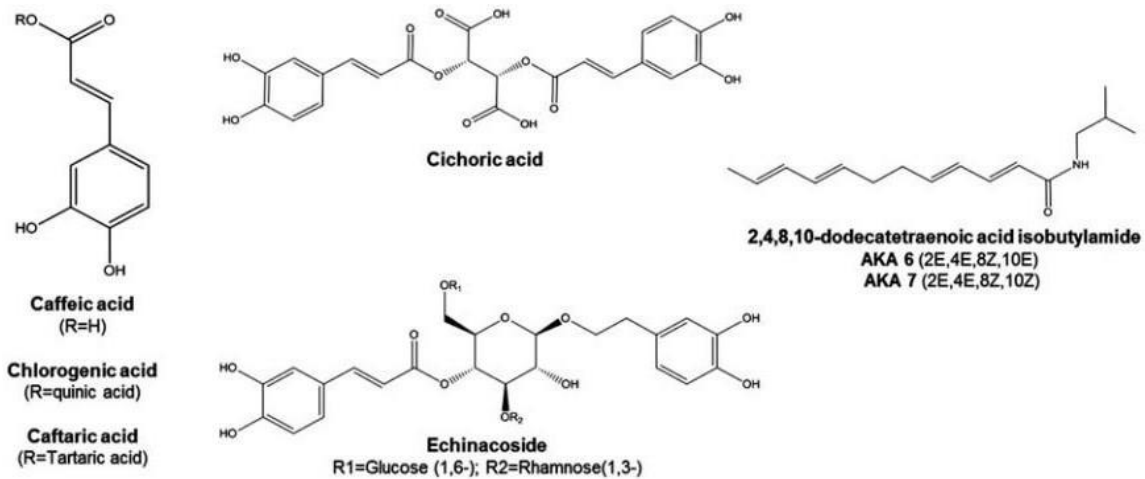


Figura 9: Estructura química de los principales metabolitos secundarios de *Echinacea* spp. (Adaptada de Parsons et al., 2018).

	<i>Purpurea</i>	<i>Angustifolia</i>	<i>Pallida</i>	<i>Paradoxa</i>
FLOWERHEADS	CADs Alkylamides	CADs Alkylamides Echinacoside	CADs Alkylamides Echinacoside	Alkylamides Echinacoside
STEMS	Alkylamides Cichoric acid	Alkylamides Cichoric acid	?	?
LEAVES	Cichoric acid Caftaric acid Cynarin	Cichoric acid Caftaric acid Cynarin	Cichoric acid Alkylamides	Alkylamides Echinacoside
ROOTS	Alkylamides Cynarin	Echinacoside Cynarin	Echinacoside Alkylamides	Echinacoside CADs Alkylamides

Figura 10. Localización de compuestos bioactivos en *E. purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida* y *E. paradoxa*. Los compuestos en negrita y subrayados en rojo están presentes en altas concentraciones; las cursivas y subrayadas en azul indican compuestos encontrados en trazas (Adaptado de Parsons et al., 2018).

Extractos y metabolitos secundarios aislados de *Echinacea* spp. son capaces de modular mecanismos que subyacen la inmunidad innata. Fracciones polares y polisacáridos aislados de *E. purpurea* han demostrado estimular la activación, fagocitosis y la actividad bactericida intracelular de macrófagos, como a su vez, un aumento en la síntesis de interleuquinas (ILs), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), óxido nítrico (NO) e interferones (IFN), que actúan como mediadores durante la respuesta inmune (Luettig et al., 1989; Fu et al., 2017). La activación leucocitaria por parte de *E. purpurea* también se registró en células dendríticas (Células presentadoras de antígenos) (Li et al., 2017) y células natural killers (NK) (See et al., 1997). En contraste, ciertos autores observaron una disminución de ciertas ILs proinflamatorias, tales como IL-6 e IL-8, en líneas celulares infectadas experimentalmente con diferentes modelos virales, luego de ser tratadas con un extracto etanólico de *E. purpurea* rico en compuestos fenólicos (Sharma et al., 2009).

Por otro lado, alquilamidas presentes en fracciones de polaridad baja en *Echinacea* spp. demostraron inhibir la síntesis de TNF- α , ciclooxigenasa 2 (COX-2) y 5-lipooxigenasa (5-LOX). Estas dos últimas enzimas son esenciales en la síntesis de mediadores proinflamatorios derivados del ácido araquidónico, y actualmente son un blanco terapéutico en la búsqueda de fármacos antiinflamatorios. Por otro lado, favorece la síntesis de IL-10, citocina con características antiinflamatorias (Müller-Jakic et al., 1994; Kumar et al., 2005; Hinz et al., 2007; Chicca et al., 2009). En paralelo, ciertas alquilamidas demostraron aumentar la expresión de Receptor cannabinoide tipo 2 (CB2), el cual participa en las respuestas inflamatorias, inmunológicas y en diferentes estadios fisiopatológicos, teniendo un papel importante en el dolor agudo y crónico, como así también en cáncer (Raduner et al., 2006; Chicca et al., 2009). La sensibilidad de estas moléculas por las alquilamidas le otorga potencialidad como inmunoestimulantes y antiinflamatorios.

Respecto a su actividad como antiviral, diferentes especies de *Echinacea* han demostrado ser activas sobre diversos virus: Virus Influenza A (IAV), RSV, Virus Herpes Simple tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2), virus de la estomatitis vesicular (VSV) e incluso varios CoV (Taylor et al., 2005; Sharma et al., 2009; Schneider et al., 2010; Signer et al., 2020). En contraste, *Echinacea* spp. ha demostrado ser poco activo o inactivo sobre virus no envueltos, como Rhinovirus, Adenovirus, Poliovirus y Calicivirus felino, indicando que el mecanismo de acción podría tener como blanco componentes de la membrana de las partículas virales (Taylor et al., 2005; Sharma et al., 2009).

Como ya se mencionó anteriormente, existe un solo artículo publicado en el cual se ensaya un preparado comercial a base de *E. purpurea* sobre SARS-CoV-2 (Signer et al., 2020).

Ciertos compuestos puros (ácido cicórico, equinacósido, entre otros) han demostrado tener actividad antiviral aisladamente (Cheminat et al., 1988; Binns et al., 2002; Barnes et al., 2005). Sin embargo, varios autores señalan una mayor actividad antiviral o virucida de extractos respecto a los metabolitos aislados de los mismos, demostrando la presencia de varios metabolitos responsables de la bioactividad, o un efecto sinérgico en los extractos de *Echinacea* spp. (Barnes et al., 2005; Taylor et al., 2005; Hudson and Vimalanathan, 2011).

La OMS como otros entes oficiales avalan la administración vía oral de jugos obtenidos por prensado de partes aéreas de *E. purpurea* y tinturas de raíces de *E. pallida*, como tratamiento o complemento a la terapia convencional en infecciones del tracto respiratorio y

urinario. A su vez, preparaciones semisólidas que incluyen jugos obtenidos de partes aéreas de *E. purpurea* se utilizan externamente como cicatrizante de heridas y como complemento o tratamiento de ulceraciones crónicas externas y otros cuadros inflamatorios de la piel (OMS, 1999; Commission E, 2020).

Las contraindicaciones para el consumo de *Echinacea* son alergia a las plantas de la familia Asteraceae y pacientes inmunocomprometidos (HIV, tuberculosis, colagenosis, esclerosis múltiple, atopia, entre otras) (OMS, 1999; Ardjomand-Woelkart and Bauer, 2016).

Gran número de culturas en todo el mundo han dependido históricamente de las plantas medicinales para la atención primaria de su salud, y muchas se valen de la mismas hasta la fecha. Hay muchas poblaciones, independiente de su origen geográfico y cultura, que prefieren el uso de productos naturales sin estandarizar en lugar de productos farmacéuticos convencionales para el tratamiento y la prevención de enfermedades (Jassim and Naji, 2003).

En virtud del gran número de ensayos preclínicos y clínicos respecto a la actividad terapéutica y toxicidad de *Curcuma longa* L. y *Echinacea* spp. (Percival, 2000; Barnes et al., 2005; Hudson and Vimalanathan, 2011; Schapowal et al., 2015; Soleimani et al., 2018), y en complemento con el amplio empleo de estas plantas en medicina tradicional, ambas son reconocidas por diferentes organizaciones y sistemas de salud alrededor de todo el mundo por su uso como terapia alternativa o complemento a la terapia convencional de diferentes enfermedades (OMS, 1999; Commission E, 2000; FDA, 2016). En ambos casos, los efectos adversos registrados fueron leves a moderados, y la relación entre el tratamiento con curcumina (principal metabolito secundario que se puede obtener de forma pura a partir de *Curcuma*) o *Echinacea* spp. y la aparición de los efectos adversos no pudo ser demostrada. El período máximo de farmacovigilancia registrado en ensayos clínicos es de 6 meses (Ardjomand-Woelkart and Bauer, 2016; Soleimani et al., 2018).

Si bien estas especies son reconocidas por su potencial terapéutico y medicinal, los resultados preclínicos y clínicos de *Echinacea* spp. son más dificultosos de interpretar y relacionar en comparación a los de *C. longa*, principalmente debido a la variabilidad de las preparaciones utilizadas. Las mismas varían según la especie de *Echinacea*, el órgano utilizado y el método de extracción aplicado, los cuales son muy cambiantes entre los estudios de las especies medicinales de este género. Esta imprecisión es prácticamente nula en el caso de *C. longa*, debido a que la actividad biológica de interés está focalizada principalmente en curcumina.

Otro aspecto en el cual existe una notoria diferencia es en cuanto a los conocimientos farmacocinéticos y farmacodinámicos de los metabolitos bioactivos de estas plantas. Aunque existen estudios en este aspecto de *Echinacea* spp., estos son escasos y acotados a un bajo número de metabolitos (Barnes et al., 2005). En cambio, los antecedentes respecto de curcumina y otros curcuminoides son notablemente mayores. Esta clase de estudios sobre los curcuminoides lograron identificar una serie de características limitantes al momento de ejercer su efecto biológico. Su escasa biodisponibilidad oral, debido a la insuficiente solubilidad en disolventes acuosos y al rápido metabolismo que sufren en los diferentes órganos, conduce a una pobre absorción y una rápida eliminación sistémica (Liu et al., 2016). Para superar este obstáculo, se han desarrollado numerosas estrategias, desde el diseño de análogos semisintéticos, el uso de adyuvantes, preparación de nanoportadores,

nanopartículas, micelas y liposomas, hasta procesos de microencapsulación, que han mejorado su biodisponibilidad y hasta su bioactividad (Prasad et al., 2014).

Como se ha mencionado previamente, *E. purpurea* demostró diversas propiedades inmunomoduladoras relevantes, tales como activación de células inmunitarias y el aumento o disminución de mediadores inflamatorios. Este atributo es un aspecto vital a la hora de considerarlas dentro del marco terapéutico para COVID-19, debido al rol crucial que cumplen los mecanismos inmunitarios y el perfil inflamatorio en el desarrollo de la enfermedad (síndrome de liberación de citoquina). Actualmente se conoce que esta respuesta inflamatoria sistémica es desencadenada por diversas enfermedades infecciones y autoinmunes, y a su vez, también puede ser gatillada por diversos fármacos oncológicos o inmunoterapias, los cuales actúan sobre blancos inmunológicos que pueden terminar desencadenando una hipercitoquinemia debido a la masiva activación células inmunes y al daño celular (Shimabukuro-Vornhagen et al., 2018). Estas respuestas inmuno-inflamatorias son más agudas en personas inmunocomprometidas, las cuales pueden acarrear enfermedades hacia fenotipos más graves (como es el caso de COVID-19) (Shimabukuro-Vornhagen et al., 2018; Cervera et al., 2020). Debido al compromiso inmunitario que subyace a esta enfermedad, la inclusión de estas plantas bioactivas como tratamiento o coadyuvante previamente tendría que ser evaluada en pacientes con COVID-19 para valorar su seguridad y eficacia, más allá de su respaldo en el uso en infecciones respiratorias.

B- Actividad biológica in vitro

B.1- Rendimiento de los extractos

En la Tabla 4 se presenta el rendimiento de cada extracto obtenido a partir de *C. longa* y *Echinacea* spp., los cuales se evaluaron en cuanto su citotoxicidad y efecto antiviral sobre SARS-CoV-2.

Tabla 4: Rendimiento de extractos de *C. longa* (“cúrcuma”) y *Echinacea* spp. (“equinácea”)

Extracto seco	Material Vegetal inicial (g)	Rendimiento (%P/P)
Dcur	5,3 ± 0,2	14,29
Icur	5,0 ± 0,2	13,66
Tech	100,0 ± 0,2	21,69
Iech	100,0 ± 0,2	23,63

Dcur: Decocción de “cúrcuma”, **Icur:** Infusión de “cúrcuma”, **Tech:** Tintura de “equinácea”, **Iech:** infusión de “equinácea”.

A pesar de que el objetivo de este trabajo no fue establecer las mejores condiciones extracción, se pueden realizar algunas conclusiones respecto a los rendimientos para los extractos secos obtenidos.

En “cúrcuma”, el rendimiento (% P/P) de los extractos obtenidos por infusión y decocción fueron similares, a pesar de que en la decocción se utiliza agua a una mayor temperatura de extracción. Esta similitud en los rendimientos podría explicarse por el tiempo de contacto que estuvo el MV y solvente (agua) en la decocción, apenas 5 min debido a la característica termolábil de los curcuminoides en general (González-Albadalejo et al., 2015; Mondal et al., 2016). En cambio, en la infusión el disolvente estuvo en contacto con el MV un total de 90 min.

Para “equinácea” los rendimientos de la infusión y de la tintura también fueron similares, a pesar de que en estas metodologías de extracción se usan distintos disolventes (agua y solución hidroalcohólica, respectivamente) y diferentes volúmenes. Dado que no se hicieron modificaciones en los diferentes parámetros de extracción (no era objetivo de este estudio) es muy difícil arriesgar una posible explicación. Seguramente la capacidad de disolución de los disolventes y los volúmenes utilizados están involucrados.

B.2- Evaluación de la citotoxicidad *in vitro*

Esta evaluación se realiza para conocer el rango de concentraciones a utilizar para evaluar el efecto antiviral. Dicho rango, no debe ser tóxico para las células hospedadoras.

B.2.1- Observación del efecto citopático

Se observó durante 3 días el efecto citopático (ECP) que producían diferentes concentraciones de cada extracto o metabolito (Tabla 1) sobre una monocapa de células Vero.

Los extractos de “cúrcuma” no produjeron ECP observable por microscopía óptica en ninguna de las concentraciones ensayadas (1000 - 3,43 µg/mL). Por ello, se decidió evaluar concentraciones mayores a 1000 µg/mL (5000 – 17 µg/mL) y, aun así, no se observó ECP. Sin embargo, cabe destacar que a concentraciones superiores a 1000 µg/mL, los extractos comenzaron a precipitar (Fig. 11). Por lo tanto, se puede estimar cualitativamente que “cúrcuma” no resultó ser citotóxica en el sistema celular utilizado y en las concentraciones evaluadas.

En cambio, los extractos de “equinácea” y los metabolitos secundarios (PTN y AUs) sí produjeron algún ECP, siendo el tipo o grado de afección dependiente de la concentración.

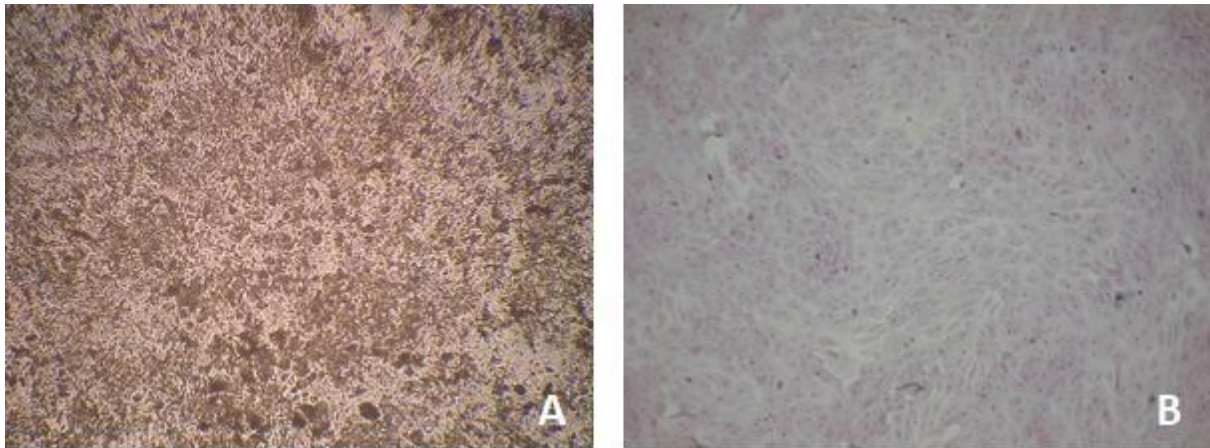


Figura 11: A- Imágenes del precipitado producido por los extractos de “cúrcuma” a altas concentraciones ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$). B- Células Vero sin tratamiento, sólo con medio de mantenimiento (100 % viabilidad celular).

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio Carl Zeiss modelo Primo Vert, equipado con una cámara para microscopía digital Carl Zeiss modelo AxioCam 208, a un aumento de 200X.

En el caso de “equinácea”, tanto el extracto acuoso obtenido por infusión (lech) como el extracto hidroalcohólico de la tintura (Tech) provocaron retracción celular a partir de las 48 h, efecto que progresó hasta las 72 h de tratamiento (Fig. 12 A). Este ECP (72 h) se observó para concentraciones $\geq 296,30 \mu\text{g/mL}$ para la lech y $\geq 444,44 \mu\text{g/mL}$ para la Tech. Estos valores no son parámetros válidos para indicar que un extracto es menos citotóxico que otro, debido a que es necesario evaluar la viabilidad celular (VC). Sin embargo, son valores a tener en cuenta para establecer el inicio de una acción tóxica sobre las células hospedadoras.

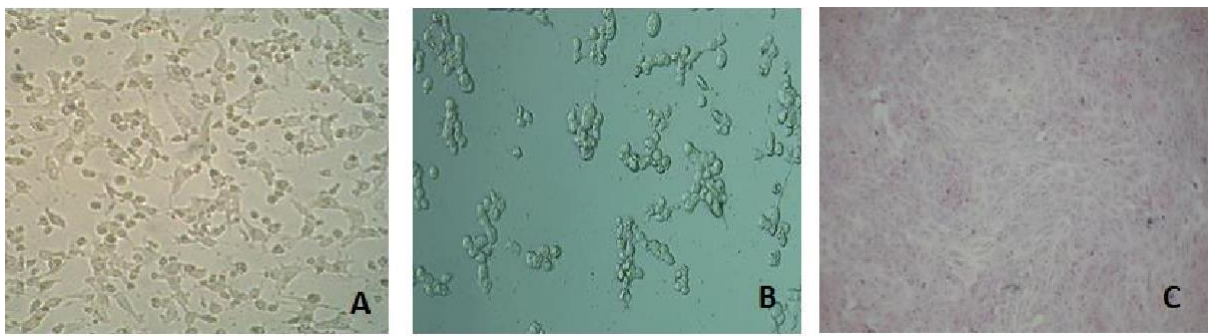


Figura 12: Imágenes de efectos citopáticos producidos a las 72 h de tratamiento. A- Retracción de las membranas celulares producida por la infusión de “equinácea” ($296,30 \mu\text{g/mL}$). B- Redondeamiento celular y pérdida de la estructura de la monocapa celular, producido por el ácido úsnico ($1,76 \mu\text{M}$). C- Células Vero sin tratamiento sólo con medio de mantenimiento (100% VC).

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio Carl Zeiss modelo Primo Vert, equipado con una cámara para microscopía digital Carl Zeiss modelo AxioCam 208, a un aumento de 200X.

Respecto a los metabolitos, el ácido úsnico (AUs) demostró una marcada citotoxicidad a las 24 h de incubación a partir de una concentración de $174 \mu\text{M}$, comenzado con

redondeamiento celular que fue progresando conforme al paso de los días, observándose cambios en la estructura de la monocapa (aglomerados celulares) a las 48 y 72 horas (Fig. 12 B). Por otro lado, parietina (PTN) también provocó redondeamiento celular, pero a diferencia del AUs sólo a la máxima concentración ensayada (30 μM) y a las 72 h de incubación.

B.2.2- Evaluación de la viabilidad celular

A partir de los resultados obtenidos mediante el método colorimétrico de captación de rojo neutro (RN) se calcularon los porcentajes de viabilidad celular (%VC) para cada extracto y metabolito secundario. Con estos valores se realizaron las curvas de viabilidad celular en función de la concentración (Fig. 13 A-D). Dado que los extractos de *C. longa* no fueron citotóxicos, no se muestran sus gráficos.

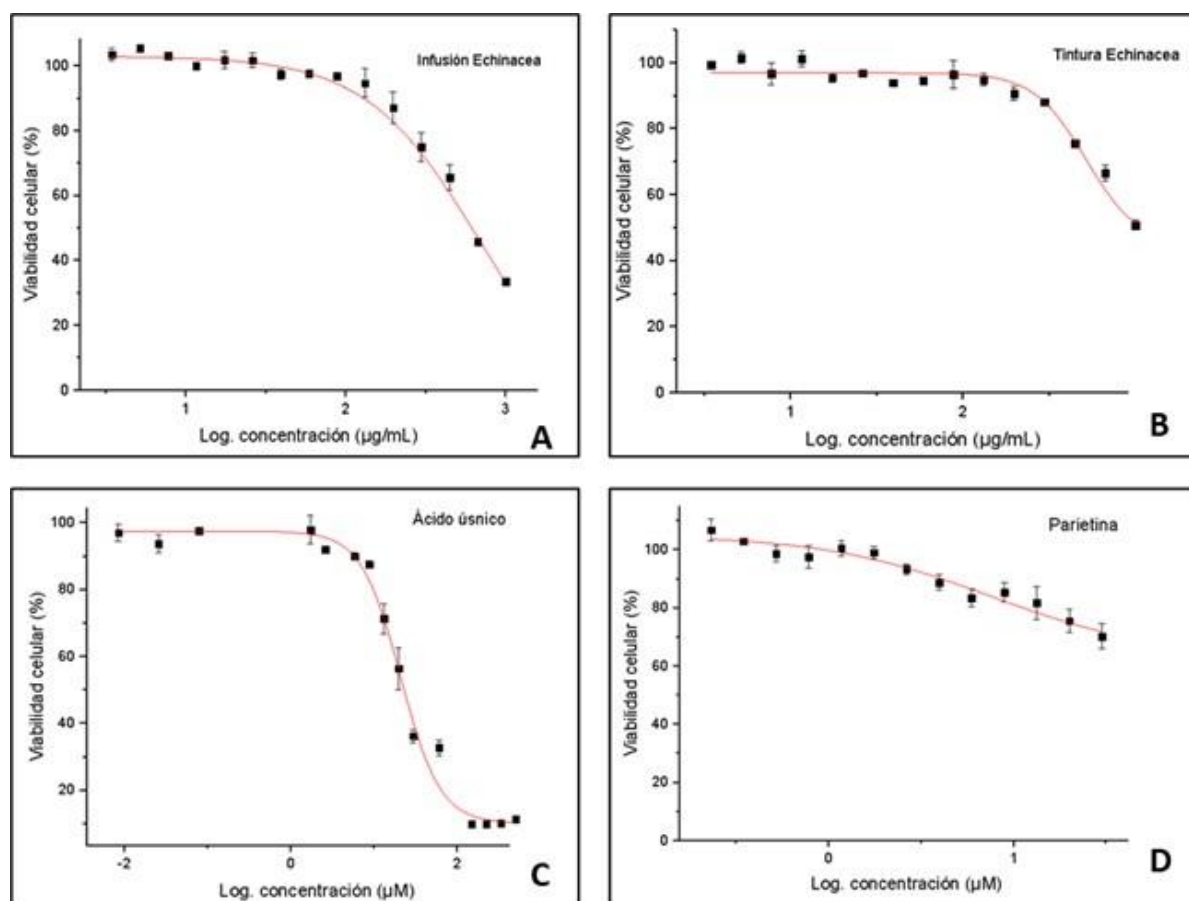


Figura 13: Curvas de viabilidad celular en función de la concentración. A- Infusión de *Echinacea* spp. B- Tintura de *Echinacea* spp. C- Ácido úsnico. D- Parietina. El análisis regresión lineal para todas las curvas dio un valor de ($R^2 > 0,95$).

Las barras representan el error estándar, obtenido a partir de dos experimentos independientes (n=3).

En la Tabla 5, se muestran los valores estimados para la concentración que provoca daño al 50 % de las células tratadas (Concentración Citotóxica media: CC_{50}), la que provoca un

20 % de daño celular (Concentración Citotóxica 20 o subtóxica: CC₂₀) y la concentración que produce menos del 90 % de daño celular (Máxima concentración no citotóxica: MCNC).

Tabla 5. Valores de concentración citotóxica 50 % (CC₅₀), al 20 % (CC₂₀) y Máxima concentración no citotóxica (MCNC) de los extractos secos y metabolitos secundarios sobre la línea celular Vero, obtenidos por el método colorimétrico de captación de RN.

Extractos secos /Metabolitos secundarios	CC ₅₀	CC ₂₀	MCNC
Dcur	≥ 1000 µg/mL	≥ 1000 µg/mL	≥ 1000 µg/mL
Icur	≥ 1000 µg/mL	≥ 1000 µg/mL	≥ 1000 µg/mL
Tech	671,99 ± 0,18 µg/mL	376,31 ± 0,88 µg/mL	236,15 ± 5,52 µg/mL
Iech	579,56 ± 2,01 µg/mL	204,88 ± 0,02 µg/mL	111,54 ± 0,86 µg/mL
AUs	20,78 ± 1,99µM	9,74 ± 0,88 µM	6,26 ± 0,71 µM
PTN	≥ 30 µM	10,75 ± 0,94 µM	3,00 ± 0,58 µM

Dcur: Decocción de “cúrcuma”, **Icur:** Infusión de “cúrcuma”, **Tech:** Tintura de “equinácea”, **Iech:** infusión de “equinácea”, **AUs:** ácido úsnico, **PTN:** parietina.

Los valores se expresan como promedio de 2 experimentos independientes (n = 3) ± error estándar.

La obtención del valor de CC₅₀ nos permite obtener una valoración de la toxicidad de los extractos y metabolitos secundarios ensayados, de esta manera valores altos de CC₅₀ implican una baja toxicidad, mientras que valores bajos, una alta toxicidad.

Para ambos extractos de “cúrcuma” (Tabla 5), los valores de CC₅₀ no pudieron obtenerse debido a que todas las concentraciones ensayadas exhibieron %VC mayores al 90 % (curvas no mostradas). Por lo tanto, estos resultados junto con los obtenidos en la evaluación del ECP, determinan que los extractos de “cúrcuma” resultaron ser los menos tóxicos. En forma similar, Kim y colaboradores (2009) observaron ausencia de citotoxicidad cuando realizaron el ensayo de reducción de bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) para determinar la VC sobre la línea HepG, tratadas con un extracto acuoso (decocción) de “cúrcuma” (Kim et al., 2009).

Para “equinácea”, la citotoxicidad obtenida para cada extracto fue dosis dependiente (Fig. 13 A y B). Observando los valores de CC₅₀, CC₂₀ y MCNC en la Tabla 5, podemos decir que la infusión resultó ser más tóxica (valores menores) que la tintura. Además, existe concordancia entre el ECP producido por los extractos de “equinácea” (método cualitativo) y los resultados obtenidos por el método colorimétrico (método cuantitativo), donde la infusión provocó ECP en concentraciones más bajas que las observadas para la tintura.

Generalmente, los extractos alcohólicos/hidroalcohólicos de drogas naturales suelen presentar una citotoxicidad más vigorosa respecto a los extractos acuosos del mismo material

vegetal, debido a la gran diversidad de compuestos químicos que es capaz de solubilizar el etanol (Villar del Fresno, 1999). Es difícil dar una explicación sobre la mayor citotoxicidad del extracto acuoso de “equinácea” respecto a la tintura, sin realizar el análisis químico (cuali y cuantitativo) de ambos extractos. *Echinacea* spp. presentan varios grupos de metabolitos secundarios solubles en agua con reporte de bioactividad (derivados del ácido cinámico, flavonoles y flavanonas) (Senica et al., 2019; Coelho et al., 2020), pero no podemos atribuir la citotoxicidad a un grupo de metabolitos en particular sin un estudio químico previo de los extractos.

No hay que perder el objetivo del ensayo de citotoxicidad, que es establecer el rango de concentraciones que se puede utilizar para evaluar el efecto antiviral de una muestra, en este caso los extractos de “equinácea”, descartando cualquier acción sobre la célula hospedadora.

Es propicio aclarar que la mayor concentración ensayada de PTN fue 30 μM , decisión basada en antecedentes de nuestro grupo de trabajo, debido a que observamos que a concentraciones superiores tiende a precipitar en el medio biológico de ensayo. Este hecho contribuyó a no poder obtener un valor de CC_{50} para PTN, ya que ninguna concentración ensayada produjo una disminución en la viabilidad del 50 %. Previamente, nosotros demostramos que PTN a una concentración de 352,0 μM genera un 80 % de VC, pero con observación de un precipitado (Comini et al., 2017).

Respecto a la toxicidad de los metabolitos (Tabla 5), AUs demostró ser marcadamente más citotóxico ($\text{CC}_{50} = 20,78 \pm 1,99 \mu\text{M}$) respecto a PTN ($\text{CC}_{50} \geq 30 \mu\text{M}$). Fazio y colaboradores (2007) evaluaron la citotoxicidad de estos metabolitos en la misma línea celular (Vero), mediante el método colorimétrico de MTT, obteniendo valores de CC_{50} de 65,1 μM para AUs y 347,0 μM para PTN. Si bien los valores de CC_{50} no se pueden comparar con los obtenidos en esta tesina debido al uso de diferentes ensayos, ambos resultados concuerdan en la mayor toxicidad encontrada para el AUs respecto a PTN.

B.3- Determinación del título del stock viral

Siguiendo la metodología propuesta (Earley et al., 1967) el título del stock de la cepa de SARS-CoV-2 utilizada fue de 4×10^6 UFP/mL (Fig. 14).

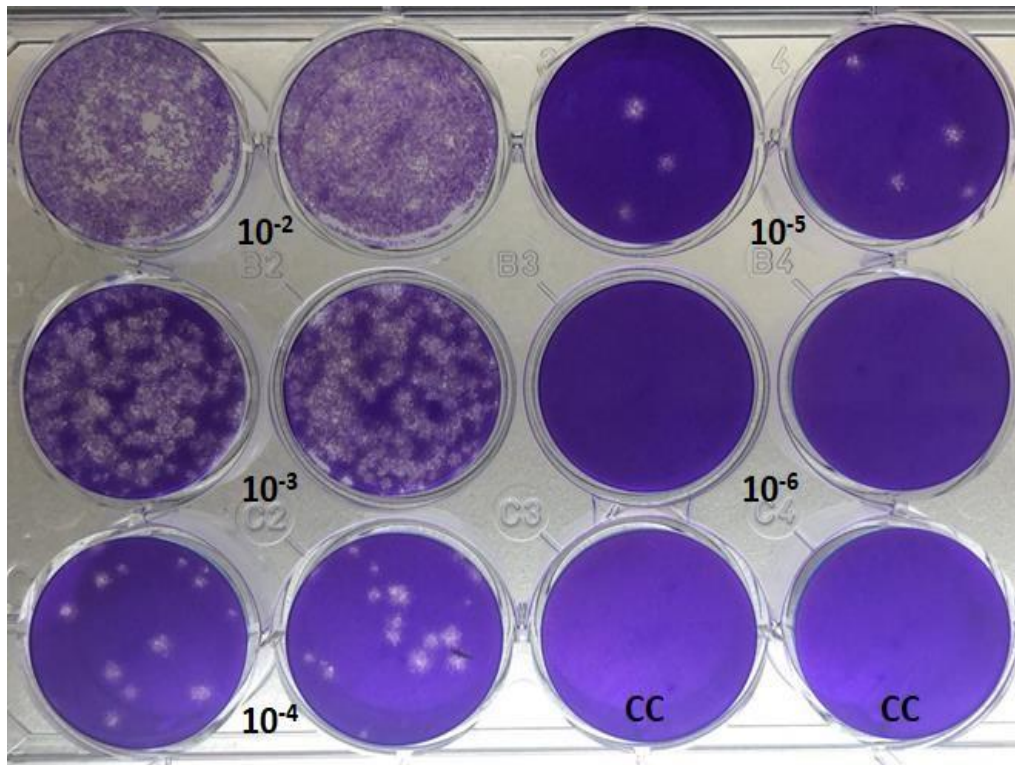


Figura 14: Titulación del stock del SARS-CoV-2. Mediante la metodología de unidades formadoras de placa. La monocapa de células Vero se tiñe de color violeta, debido a que el cristal-violeta es un colorante vital que tiñe células vivas; por lo tanto, cada punto blanco corresponde a una unidad formadora de placa (UFP). 10^{-2} - 10^{-6} : cada una de las diluciones factor 10 realizadas a partir del stock. CC: control celular.

B.4. Actividad antiviral *in vitro*

Para realizar una primera valoración de la actividad de los extractos y metabolitos en cuanto a su capacidad de actuar sobre el ciclo de replicación del virus en estudio, una vez que el mismo ya ingresó a la célula hospedadora, se determinó la capacidad de los extractos y metabolitos ensayados para reducir el número de unidades formadoras de placas de lisis (UFP), con respecto al control viral (CV: célula infectada sin tratar).

El análisis de los resultados de la actividad antiviral *in vitro* de los extractos y metabolitos sobre la cepa de SARS-CoV-2, demostró una baja o nula actividad (Tabla 6). En la Fig. 15, se muestra como ejemplo una imagen de los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antiviral de PTN.

Konigheim y colaboradores (2012) sugieren que las muestras que exhiben valores menores al 50 % de inhibición no se consideran extractos o compuestos con actividad antiviral; por lo tanto, los extractos y compuestos evaluados en esta tesina no tendrían actividad antiviral sobre el SARS-CoV-2.

Tabla 6: Actividad antiviral de los extractos de “cúrcuma” y “equinácea” y de los metabolitos secundarios ácido úsnico y parietina a la CC_{20} sobre SARS-CoV-2

Extractos secos/ Metabolitos secundarios	SARS-CoV-2	
	N° UFP tratamiento (%I)	N° UFP control viral
Dcur	58 ± 3 (38,9 ± 5,2 %)	95 ± 2
Icur	62 ± 2 (36,7 ± 3,2 %)	98 ± 3
Tech	76 ± 3 (22,4 ± 3,9 %)	98 ± 5
Iech	65 ± 2 (31,6 ± 3,1 %)	95 ± 5
AUs	52 ± 2 (45,8 ± 3,8 %)	96 ± 4
PTN	72 ± 3 (22,6 ± 4,2 %)	93 ± 2

Dcur: Decocción de “cúrcuma”, **Icur:** Infusión de “cúrcuma”, **Tech:** Tintura de “equinácea”, **Iech:** infusión de “equinácea”, **AUs:** ácido úsnico, **PTN:** parietina. **UFP:** unidades formadoras de placa. **%I:** porcentaje de inhibición.

Los valores se expresan como promedio de 2 experimentos independientes (n=3) ± desviación estándar.

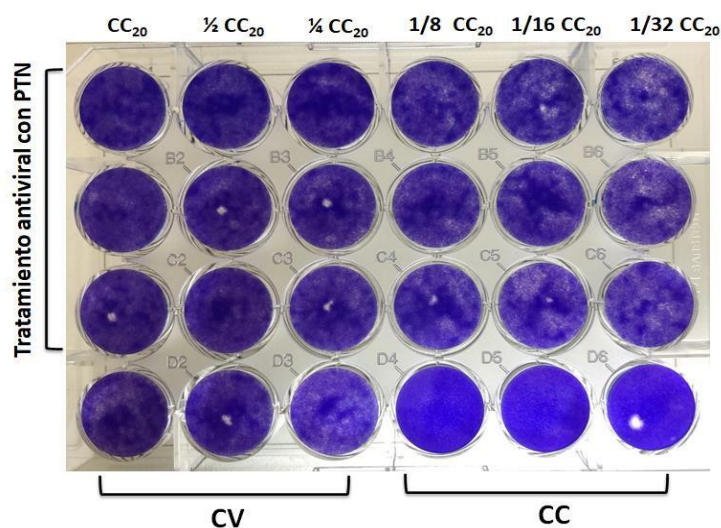


Figura 15: Resultado de la evaluación de la actividad antiviral de parietina a diferentes concentraciones sobre SARS-CoV-2. Mediante el método de reducción de unidades formadoras de placa (UFP), con diluciones a partir de su CC_{20} (10,75 μ M). La monocapa de células Vero se tiñe de color violeta, debido a que el cristal-violeta es un colorante vital que tiñe células vivas; por lo tanto, cada punto blanco corresponde a una UFP. **CC:** control celular, células sin tratar y sin infectar. **CV:** control viral, células infectadas sin tratar.

B.5. Evaluación de la actividad virucida *in vitro*

La evaluación de la actividad virucida de los extractos y metabolitos sobre la cepa de SARS-CoV-2 mostró baja o nula actividad (Tabla 7), debido a que ningún tratamiento provocó disminuciones de UFP ≥ 2 logaritmos con respecto al control viral, según lo establecido por Konigheim y colaboradores (2012). En la Fig. 16, se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos de la actividad virucida para la Tech.

Tabla 7. Actividad virucida de los extractos y metabolitos sobre SARS-CoV-2

Extractos secos/ Metabolitos secundarios	SARS-CoV-2	
	Nº UFP tratamiento	Nº UFP control viral
Dcur	$17 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6 \pm 1 \times 10^7$
Icur	$14 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6 \pm 1 \times 10^7$
Tech	$7 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5 \pm 1 \times 10^7$
Iech	$16 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6 \pm 1 \times 10^7$
AUs	$16 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6 \pm 1 \times 10^7$
PTN	$3,0 \times 10^5 \pm 1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6 \pm 1 \times 10^7$

Dcur: Decocción de “cúrcuma”, **Icur:** Infusión de “cúrcuma”, **Tech:** Tintura de “equinácea”, **Iech:** infusión de “equinácea”, **AUs:** ácido úsnico, **PTN:** parietina. **UFP:** unidades formadoras de placa. Los valores se expresan como promedio de 2 experimentos independientes (n=3) \pm desviación estándar.

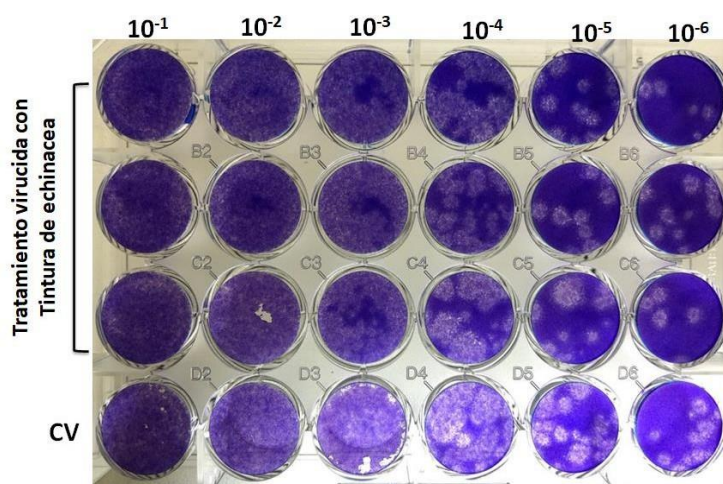


Figura 16: Resultado de la evaluación de la actividad virucida de la tintura de “equinácea” sobre SARS-CoV-2. Mediante el método de reducción de unidades formadoras de placa (UFP) a su CC_{50} ($671,99 \mu\text{g/mL}$). La monocapa de células Vero se tiñe de color violeta, debido a que el cristal-violeta, es un colorante vital que tiñe células vivas; por lo tanto, cada punto blanco corresponde a una UFP. **CV:** control viral (virus + MM). **10^{-1} - 10^{-6} :** cada una de las diluciones factor 10 realizadas a partir de las mezclas de tratamiento (Virus + Tech) y **CV:** control viral (virus + MM).

Este es el primer reporte de ensayos para determinar la actividad antiviral y virucida de extractos acuosos de *Curcuma longa*, parietina (PTN), ácido úsnico (AUs) como así de extractos acuosos de *Echinacea* spp. sobre SARS-CoV-2 hasta la fecha.

Por el lado de *Curcuma* spp., existen muy pocos antecedentes acerca del potencial virucida de este género, siendo los únicos dos reportes con curcumina, el principal metabolito del género, sobre modelos de virus no envueltos, es decir, no presentan bicapa lipídica externa (Wu et al., 2015; Li et al., 2020). La envoltura viral es una estructura fundamental para tener en cuenta cuando se evalúa actividad virucida, debido a la interacción molecular particular que se produce entre los componentes estructurales externos del virus y la muestra de interés. Por consiguiente, se puede desarrollar un mecanismo de acción activo o ineficiente, dependiendo si el modelo viral corresponde a un virus desnudo (interacción directa con los componentes de la nucleocápside viral) o envuelto (interacción directa con los componentes de la bicapa lipídica) (Taylor et al., 2005).

Respecto a la actividad antiviral de *C. longa*, solo se halló un reporte acerca de la bioactividad de extractos acuosos. Kim y colaboradores (2009) probaron la actividad de una decocción (3 h de ebullición) a partir rizomas de *C. longa* sobre virus de la hepatitis B (HBV), el cual es un virus ADN bicatenario retrotranscrito, envuelto, el cual es genómica y replicativamente no similar al SARS-CoV-2.

La mayor parte de los estudios asocian la bioactividad (incluida la actividad antiviral) de *C. longa* a la curcumina. Se trata de un compuesto hidrófobo ($\log P \cong 3.0$), relativamente insoluble en agua y soluble en ciertos solventes polares (DMSO, metanol, etanol, entre otros); por lo que su presencia en extractos acuosos podría estar en trazas o concentraciones muy bajas. Además, este metabolito es fotosensible y termolábil, presentando descomposición a partir de los 70°C; por lo que su extracción a partir del MV a altas temperaturas podría degradar su contenido (González-Albadalejo et al., 2015; Mondal et al., 2016). Sin embargo, ciertos autores (Nada et al., 2012; Kawasaki et al., 2015) registraron mediante HPLC la presencia de curcumina tanto en infusión como decocción de rizomas de *C. longa*. En función de estos antecedentes, sería interesante purificar la curcumina y evaluar su actividad antiviral sobre SARS-CoV-2.

En el caso *Echinacea* spp., existen mayor cantidad de reportes acerca de su actividad antiviral, incluso sobre SARS-CoV-2. El mecanismo de acción más importante según los autores de estos trabajos sería la acción virucida que ejercen los extractos sobre las partículas virales; siendo este mecanismo eficaz en virus envueltos e ineficiente en virus desnudos (sin envoltura) (Taylor et al., 2005; Sharma et al., 2009; Signer et al., 2020). Una de las variables más importante en el análisis de la bioactividad del género *Echinacea* es la especie utilizada, además del órgano vegetal empleado. Los estudios donde ensayan la actividad virucida y antiviral de *Echinacea* (Taylor et al., 2005; Sharma et al., 2009; Signer et al., 2020) coinciden con la utilización de una única especie: *E. purpurea* (realizando extractos con la planta entera). En consecuencia, debido a la variabilidad fitoquímica entre las especies de *Echinacea* (Fig. 10), es dificultoso correlacionar la baja o nula actividad de nuestros extractos con los de reportes previos, ya que se hace necesario realizar un estudio químico cuali y cuantitativo de los extractos ensayados en este trabajo. Si bien, esto estaba previsto para los extractos que resultaran bioactivos, sería interesante realizarlo para proponer modificaciones en la preparación de los extractos (infusión y tintura) a partir de *E. purpurea*,

con el propósito de indagar la posibilidad de obtener un producto antiviral para COVID-19, a partir de esta especie vegetal.

El único reporte presente acerca de la actividad antiviral y virucida de PTN es Fazio y colaboradores (2007), que utiliza como modelo viral al JUNV y TCRV, ambos virus ARN-envueltos. Respecto a la actividad antiviral, estos autores informaron que PTN es inactiva para ambos virus, inclusive a la máxima concentración probada, esto es 200 μM , valor de concentración mayor que el probado en este estudio. En torno a la actividad virucida, obtuvieron un valor de IC_{50} (concentración necesaria para inactivar el 50% de las partículas virales) de 9,7 μM y 20 μM para JUNV y TCRV, respectivamente. Si bien JUNV y TCRV, pertenecen a otra familia de virus (arenavirus), diferente a la de SARS-CoV-2, no se conoce el mecanismo de acción específico, ni los blancos moleculares por los cuales PTN ejerce su actividad virucida. Por lo tanto, esta antraquinona podría tener una selectividad mayor sobre los componentes moleculares de estos arenavirus, que sobre SARS-CoV-2 debido a la falta de efecto observado en nuestro estudio en un rango de concentraciones que incluye a las ensayadas por este autor.

El AUs es un metabolito con estructura química bastante singular, el cual presenta un mayor repertorio de estudios científicos respecto a su actividad biológica y citotoxicidad en comparación a PTN (Luzina and Salakhutdinov, 2018). Debido a esta diversa bioactividad, hasta el día de la fecha existen varios derivados semisintéticos a partir de AUs (Luzina and Salakhutdinov, 2018; Shi et al., 2020), como también diferentes estrategias de vehiculización, ya que es poco soluble en agua (micelas, nanoportadores, nanopartículas, entre otros) para mejorar su bioactividad (Si et al., 2016; Dos Santos et al., 2018; Khan et al., 2020).

Este compuesto exhibió actividad antiviral *in vitro* frente a diversos tipos de virus como: HSV-1, Virus Influenza, JUNV, TCRV; incluso presenta reportes de ensayos clínicos sobre su eficacia frente a infecciones causadas por virus, como por ejemplo el virus de papiloma humano (HPV). La inactividad observada en este trabajo para el AUs sobre SARS-CoV-2, podría encontrarse relacionada a 2 razones: 1) a las concentraciones probadas, ya que la máxima concentración ensayada fue la CC_{20} (9,74 μM) y 2) a la pureza del AUs (81,3 \pm 0,5 %) que, si bien no es baja, puede que la presencia de otros compuestos esté interfiriendo con la actividad antiviral. Para evaluar esta última interpretación, el AUs debería someterse a un nuevo proceso de purificación para poder aumentar su pureza.

CONCLUSIONES

Los resultados de la búsqueda bibliográfica mostraron una gran variedad de especies vegetales (36 taxones), incluidos sus principales metabolitos secundarios, que han sido ensayados en cuanto a su actividad antiviral sobre *Betacoronavirus* (betaCoV). La mayoría de las investigaciones se centran en SARS-CoV y MERS-CoV, por ser los responsables de infecciones epidémicas previas con significativo porcentaje de letalidad.

Se destacan 3 especies vegetales: *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. (Cibotiaceae), *Dioscorea polystachya* Turcz. (Dioscoreaceae) y *Pyrrosia lingua* (Thunb.) Farw. (Polypodiaceae) por presentar extractos activos sobre SARS-CoV y baja citotoxicidad.

Respecto a los metabolitos secundarios, provenientes de especies vegetales, se distinguen 4 compuestos químicos con diferente estructura: emodina, savinina, licorina y [8 β -hydroxyabieta-9(11),13-dien-12-one)]. Se trata de metabolitos secundarios aislados de algunas de las especies listadas en este trabajo (Tabla 2), con acción sobre algún betaCoV.

En consecuencia, este trabajo permitió identificar especies vegetales y compuestos químicos que podrían ser investigados con mayor profundidad para proponerlos como posibles fuentes de compuestos antivirales (Drogas vegetales) o como agentes antivirales (metabolitos secundarios), y que deberían evaluarse en cuanto a su actividad antiviral o virucida sobre SARS-CoV-2.

Las investigaciones sobre macrohongos y líquenes con efecto antiviral sobre CoV son escasas. Hasta el momento sólo 2 especies de macrohongos se han ensayado sobre SARS-CoV-1: *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. (Ganodermataceae) y *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (Polyporaceae). Sin embargo, al ampliar la búsqueda a virus ARN envueltos con características similares a betaCoV, se amplió el número de especies con potencial efecto inhibitorio sobre estos virus, las cuales deberían ser indagadas en su accionar sobre SARS-CoV-2.

Entre los metabolitos secundarios de macrohongos y líquenes, se destacan como prometedores agentes antivirales, lanostanos, dépsidos y ácido úsnico debido a su acción inhibitoria sobre betaCoV u otros virus ARN envueltos.

Respecto al análisis bibliográfico, sobre los géneros *Curcuma* L. (Zingiberaceae) y *Echinacea* Moench (Asteraceae), se puede concluir que las especies con mayor cantidad de estudios químicos y biológicos (antiinflamatorio, inmunomodulador, antiviral) son: *Curcuma longa* L., especialmente los rizomas y *Echinacea purpurea* (L.) Moench de la cual se utiliza la planta entera. Por lo tanto, estas especies podrían tener efecto sobre la fisiopatogenia de la enfermedad por SARS-CoV-2. Sin embargo, son necesarios estudios experimentales para evaluar su eficacia sobre SARS-CoV-2 y realizar ensayos farmacológicos más profundos para determinar su seguridad en humanos.

En este contexto, se propuso verificar el uso sugerido por el acervo popular de *C. longa* ("cúrcuma") y *Echinacea* spp. ("equinácea") como agentes terapéuticos/preventivos de COVID-19. En el caso de *C. longa* se evaluó la actividad antiviral y virucida *in vitro* de infusión y decocción; mientras que para *Echinacea* spp., se ensayó infusión y tintura. Estos

preparados no mostraron actividad antiviral/virucida sobre SARS-CoV-2 *in vitro*; por lo tanto, no se logró demostrar el uso popular propuesto para estas especies, respecto de COVID-19.

Sin embargo, en base a la investigación bibliográfica realizada en relación con *C. longa* pudimos determinar que es mejor ensayar los curcuminoides purificados, especialmente curcumina, teniendo presente la posibilidad de utilizar diferentes estrategias de vehiculización, para subsanar los problemas de su escasa biodisponibilidad.

Si bien la investigación bibliográfica realizada indica que parietina (PTN) y ácido úsnico (AUs) son compuestos activos sobre virus ARN-envueltos (similitud con betaCoV) y, por tanto, con potencial acción sobre SARS-CoV-2, no se demostró la capacidad para inhibir a este virus *in vitro* a las concentraciones ensayadas.

Finalmente, es importante destacar que este es el primer reporte hasta la fecha, relacionado con la investigación de la actividad antiviral y virucida *in vitro* de extractos acuosos de *Curcuma longa*, *Echinacea* spp., parietina (PTN) y ácido úsnico (AUs) sobre SARS-CoV-2.

PROYECCIONES

- Aislar curcumina y otros curcuminoides para investigar su potencial efecto antiviral/virucida.
- Evaluar la bioactividad de preparados comerciales a base de *E. purpurea*, que son promocionados para la prevención de COVID-19, sobre variantes nuevas de SARS-CoV-2.
- Evaluar la actividad antiviral/virucida *in vitro* de una muestra de *E. purpurea* fehacientemente identificada sobre SARS-CoV-2.
- Purificar el ácido úsnico para descartar la interferencia de otros compuestos en la actividad antiviral/virucida.
- Buscar estrategias para vehiculizar parietina, para resolver el problema de su solubilidad, lo cual nos permitirá evaluar su efecto antiviral/virucida a mayores concentraciones.
- Indagar nuevas especies (vegetales, macrohongos y líquenes) autóctonas de Argentina, con antecedentes de actividad antiviral, como potenciales fuentes de metabolitos con acción sobre SARS-CoV-2.

Bibliografía

- Adams, M., Christen, M., Plitzko, I., Zimmermann, S., Brun, R., Kaiser, M., Hamburger, M., 2010. Antiplasmodial lanostanes from the *Ganoderma lucidum* mushroom. *J. Nat. Prod.* 73, 897–900. <https://doi.org/10.1021/np100031c>
- Ahmed, S., 2006. LAS CUCURBITÁCEAS IMPORTANCIA ECONÓMICA, BIOQUÍMICA Y MEDICINAL. Universidad Nacional de Colombia.
- Alves, D.S., Pérez-Fons, L., Estepa, A., Micol, V., 2004. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. *Biochem Pharmacol.* 68:549–61. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.04.012>.
- Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J.R., Hilgenfeld, R., 2003. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* 300, 1763–1767. <https://doi.org/10.1126/science.1085658>.
- Andersen, D.O., Weber, N.D., Wood, S.G., Hughes, B.G., Murray, B.K., North, J.A., 1991. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Res.* 16:185–196. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(91\)90024-I](https://doi.org/10.1016/0166-3542(91)90024-I).
- Andrei, G.M., Coto, C.E., de Torres, R.A., 1985. [Assays of cytotoxicity and antiviral activity of crude and semipurified extracts of green leaves of *Melia azedarach* L]. *Rev. Argent. Microbiol.* 17, 187–194.
- Angeletti, S., Benvenuto, D., Bianchi, M., Giovanetti, M., Pascarella, S., Ciccozzi, M., 2020. COVID-2019: The role of the nsp2 and nsp3 in its pathogenesis. *J. Med. Virol.* 92, 584–588. <https://doi.org/10.1002/jmv.25719>
- Ardjomand-Woelkart, K., Bauer, R., 2016. Review and Assessment of Medicinal Safety Data of Orally Used Echinacea Preparations. *Planta Med.* 82, 17–31. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1558096>
- Barnes, J., Anderson, L.A., Gibbons, S., Phillipson, J.D., 2005. Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 929–954. <https://doi.org/10.1211/0022357056127>
- Barrett, B., 2003. Medicinal properties of Echinacea: a critical review. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 10, 66–86. <https://doi.org/10.1078/094471103321648692>.
- Batista, M.N., Braga, A.C.S., Campos, G.R.F., Souza, M.M., Matos, R.P.A., Lopes, T.Z., Candido, N.M., Lima, M.L.D., Machado, F.C., de Andrade, S.T.Q., et al., 2019. Natural Products Isolated from Oriental Medicinal Herbs Inactivate Zika Virus. *Viruses.* 11:49. <https://doi.org/10.3390/v11010049>.
- Binns, S.E., Hudson, J., Merali, S., Arnason, J.T., 2002. Antiviral activity of characterized extracts from echinacea spp. (Heliantheae: Asteraceae) against herpes simplex virus (HSV-I). *Planta Med.* 68, 780–783. <https://doi.org/10.1055/s-2002-34397>
- Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B.E., Liu, W.-C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R., Jordan, T.X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T.T., Schwartz, R.E., Lim, J.K., Albrecht, R.A., tenOever, B.R., 2020. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* 181, 1036-1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
- BMJ, 2021. Prophylaxis against covid-19: living systematic review and network meta-analysis., 373: 949. <https://doi.org/10.1136/bmj.n949>.
- Bora, K.S., Sharma, A., 2011. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharm. Biol.* 49, 101–109. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.497815>.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 24(2-3):119-24. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3).
- Cao, Z., Yang P., Zhou, Q., 2013. Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Sci. China Chem.* 56:1382–1391. <https://doi.org/10.1007/s11426-013-4967-9>.
- Calcott, M.J., Ackerley, D.F., Knight, A., Keyzers, R.A., Owen, J.G., 2018. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chem. Soc. Rev.* 47, 1730–1760. <https://doi.org/10.1039/c7cs00431a>
- Cámara-Leret, R., Paniagua-Zambrana, N., Balslev, H., Macía, M.J., 2014. Ethnobotanical Knowledge Is Vastly Under-Documented in Northwestern South America. *PLOS ONE* 9, e85794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085794>.
- Catanzaro, M., Corsini, E., Rosini, M., Racchi, M., Lanni, C., 2020. Immunomodulators Inspired by Nature: A Review on Curcumin and Echinacea. *Molecules.* 23, 2778. <https://doi.org/10.3390/molecules23112778>.

- Cervera, R., Espinosa, G., Ramos-Casals, M., Hernández-Rodríguez, J., Prieto-González, S., Espígol-Frigolé, G., Cid, M., 2020. Respuesta Inmunoinflamatoria en la COVID-19. Editorial Médica Panamericana.
- Che, C.T., Almed, M.S., Kang, S.S., Waller, D.P., Bengel, A.S., Martin, A., Rajamahendran, P., Bunyapraphatsara, J., Lankin, D.C., Cordell, G.A., Soejarto, D.D., Wijesekera, R.O.B., Fong, H.H.S., 1984. Studies on Aristolochia III. Isolation and biological evaluation of constituents of Aristolochia indica roots for fertility-regulating activity. *J. Nat. Prod.* 47:331–341. <https://doi.org/10.1021/np50032a017>.
- Cheminat, A., Zawatzky, R., Becker, H., Brouillard, R., 1988. Caffeoyl conjugates from Echinacea species: Structures and biological activity. *Phytochemistry* 27, 2787–2794. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80664-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80664-2)
- Chen, C.-J., Michaelis, M., Hsu, H.-K., Tsai, C.-C., Yang, K.D., Wu, Y.-C., Cinatl, J., Doerr, H.W., 2008. Toona sinensis Roem tender leaf extract inhibits SARS coronavirus replication. *J. Ethnopharmacol.* 120, 108–111. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.048>
- Chen, F., Chan, K.H., Jiang, Y., Kao, R.Y.T., Lu, H.T., Fan, K.W., Cheng, V.C.C., Tsui, W.H.W., Hung, I.F.N., Lee, T.S.W., Guan, Y., Peiris, J.S.M., Yuen, K.Y., 2004. In vitro susceptibility of 10 clinical isolates of SARS coronavirus to selected antiviral compounds. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 31, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.03.003>
- Chen, Y.W., Yiu, C.-P.B., Wong, K.-Y., 2020. Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CL pro) structure: virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates. *F1000Research* 9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22457.2>
- Cheng, H.-Y., Lin, L.-T., Huang, H.-H., Yang, C.-M., Lin, C.-C., 2008. Yin Chen Hao Tang, a Chinese prescription, inhibits both herpes simplex virus type-1 and type-2 infections in vitro. *Antiviral Res.* 77, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.08.012>
- Cheng, V.C.C., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Yuen, K.Y., 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 660–694. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-07>
- Cheng, Y.-T., Yang, C.-C., Shyur, L.-F., 2016. Phytomedicine-Modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy. *Pharmacol. Res.* 114, 128–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.10.022>
- Chicca, A., Raduner, S., Pellati, F., Strompen, T., Altmann, K.-H., Schoop, R., Gertsch, J., 2009. Synergistic immunopharmacological effects of N-alkylamides in Echinacea purpurea herbal extracts. *Int. Immunopharmacol.* 9, 850–858. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.03.006>
- Cho, J.K., Curtis-Long, M.J., Lee, K.H., Kim, D.W., Ryu, H.W., Yuk, H.J., Park, K.H., 2013. Geranylated flavonoids displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the fruits of Paulownia tomentosa. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 3051–3057. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.027>
- Cho, J.Y., Park, J., Kim, P.S., Yoo, E.S., Baik, K.U., Park, M.H., 2001. Savinin, a lignan from Pterocarpus santalinus inhibits tumor necrosis factor- α production and T cell proliferation. *Biol. Pharm. Bull.* 24 (2), 167–171. <https://doi.org/10.1248/bpb.24.167>
- Choudhary A.K., Rahi S., 2018. Organic cultivation of high yielding turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivars: a viable alternative to enhance rhizome productivity, profitability, quality and resource-use efficiency in monkey-menace areas of north-western Himalayas. *Industrial Crops & Products.* <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.044>
- Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H., Doerr, H.W., 2003. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet Lond. Engl.* 361, 2045–2046. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13615-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13615-x)
- Coelho, J., Barros, L., Dias, M.I., Finimundy, T.C., Amaral, J.S., Alves, M.J., Calheta, R.C., Santos, P.F., Ferreira, I.C.F.R., 2020. Echinacea purpurea (L.) Moench: Chemical Characterization and Bioactivity of Its Extracts and Fractions. *Pharm. Basel Switz.* 13. <https://doi.org/10.3390/ph13060125>
- Comini, L.R., Morán Vieyra, F.E., Mignone, R.A., Páez, P.L., Mugas, M.L., Königheim, B.S., Cabrera, J.L., Nuñez Montoya, S.C., Borsarelli, C.D., 2017. Parietin: an efficient photo-screening pigment in vivo with good photosensitizing and photodynamic antibacterial effects in vitro. *Photochem. Photobiol. Sci.* 16(2):201-210. <https://doi.org/10.1039/c6pp00334f>
- Commission E, 2000. Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs. American Botanical Council.
- Cui, J., Li, F., Shi, Z.-L., 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- del Barrio Alonso, G., Álvarez Rodríguez, Á.L., Valdés García, S.M., Parra Fernández, F., 2008. Metodología de pesquisa preclínica de actividad anti-herpesvirus a partir de productos

- naturales. *Rev. Cuba. Farm.* 42, 0–0.
- del Barrio, G., Parra, F., 2000. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *J. Ethnopharmacol.* 72, 317–322. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00228-2](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00228-2).
- Dong, X., Fu, J., Yin, X., Cao, S., Li, X., Lin, L., Huyiligeqi, H., Ni, J., 2016. Emodin: A Review of Its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. *Phytother. Res.* 30:1207–1218. <https://doi.org/10.1002/ptr.5631>.
- Dos Santos, M.R., Alcaraz-Espinoza, J.J., da Costa, M.M., de Oliveira, H.P., 2018. Usnic acid-loaded polyaniline/polyurethane foam wound dressing: preparation and bactericidal activity. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 89, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.03.019>
- Earley, E., Peralta, P.H., Johnson, K.M., 1967. A plaque neutralization method for arboviruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 125, 741–747. <https://doi.org/10.3181/00379727-125-32194>
- Ellan, K., Thayan, R., Raman, J., Hidari, K.I.P.J., Ismail, N., Sabaratnam, V., 2019. Anti-viral activity of culinary and medicinal mushroom extracts against dengue virus serotype 2: an in-vitro study. *BMC Complement. Altern. Med.* 19, 260. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2629-y>
- Fang, L., Karakiulakis, G., Roth, M., 2020. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *Lancet Respir. Med.* 8, e21. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30116-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30116-8)
- Farmacopea Argentina. 7ma edición: Volumen I, Monografía 1050: Formas farmacéuticas. ANMAT
- Fazio, A., Adler, M., Bertoni, M., Sepúlveda, C., Damonte, E., Maier, M., 2007. Lichen Secondary Metabolites from the Cultured Lichen Mycobionts of *Teloschistes chrysophthalmus* and *Ramalina celastri* and their Antiviral Activities. *Z. Für Naturforschung C J. Biosci.* 62, 543–9. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-813>
- Federación Farmacéutica Internacional (FIP), 2020. Brote de Coronavirus 2019-nCoV: Información y directrices para los farmacéuticos y el personal de farmacia. Sitio web: www.fip.org/coronavirus. Visto: 1 de mayo de 2021.
- Fernández Romero, J., Del Barrio Alonso, G., Romeu Alvarez, B., Gutierrez, Y., Valdés, V., Parra, F., 2003. In vitro antiviral activity of *Phyllanthus orbicularis* extracts against herpes simplex virus type 1. *Phytotherapy Research*, 17(8), 980-982. 10.1002/ptr.1300.
- Ferreira, J.C., Rabeh, W.M., 2020. Biochemical and biophysical characterization of the main protease, 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro) from the novel coronavirus SARS-CoV 2. *Sci. Rep.* 10, 22200. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79357-0>
- Flannery, M.A., 1999. From rudbeckia to echinacea: the emergence of the purple cone flower in modern therapeutics. *Pharm. Hist.* 41, 52–59.
- Flora of China. Sitio web: <http://flora.huh.harvard.edu/china/>. Visto el: 30 de noviembre de 2020.
- Flora of North America. Sitio web: http://dev.floranorthamerica.org/Main_Page. Visto el: 30 de noviembre de 2020.
- Food and Drug Administration (FDA), 2016. GRAS Notices No. 686. Sitio web: <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&sort=GRNo&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=curcuma>. Visto el 19 de marzo, 2021.
- Fu, A., Wang, Y., Wu, Y., Chen, H., Zheng, S., Li, Y., Xu, X., Li, W., 2017. Echinacea purpurea Extract Polarizes M1 Macrophages in Murine Bone Marrow-Derived Macrophages Through the Activation of JNK. *J. Cell. Biochem.* 118, 2664–2671. <https://doi.org/10.1002/jcb.25875>
- Fung, K.P., Leung, P.C., Tsui, K.W.S., Wan, C.C.D., Wong, K.B., Waye, M.Y.M., Au, W.N.S., Wong, C.K., Lam, W.K.C., Lau, B.S.C., 2011. Immunomodulatory activities of the herbal formula Kwan Du Bu Fei Dang in healthy subjects: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Hong Kong Med. J. Xianggang Yi Xue Za Zhi* 17 Suppl 2, 41–43.
- Gaddam, R.R., Chambers, S., Bhatia, M., 2014. ACE and ACE2 in inflammation: a tale of two enzymes. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 13, 224–234. <https://doi.org/10.2174/1871528113666140713164506>
- Gallego, P., Rojas, A., Falcón, G., Carbonero-Aguilar, P., García-Lozano, M., Gil-Gómez, A., Grande, L., Cremades, O., Romero-Gomez, M., Bautista Palomas, J.D., Campo, J.A., 2019. Water-soluble extracts from edible mushrooms (*Agaricus bisporus*) as inhibitors of the hepatitis C viral replication. *Food Funct.* 10. <https://doi.org/10.1039/C9FO00733D>
- González-Albadalejo, J., Sanz, D., Claramunt, R., Lavandera, J.-L., Alkorta, I., Elguero, J., 2015. Curcumin and curcuminoids: Chemistry, structural studies and biological properties 81, 278–310.
- Google Scholar. Sitio web: <https://scholar.google.com/>. Visto el: 31 de marzo de 2021.
- Gorbalenya, A.E., Baker, S.C., Baric, R.S., de Groot, R.J., Drosten, C., Gulyaeva, A.A., Haagmans, B.L., Lauber, C., Leontovich, A.M., Neuman, B.W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L.L.M.,

- Samborskiy, D.V., Sidorov, I.A., Sola, I., Ziebuhr, J., Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 5, 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- Hensel, A., Bauer, R., Heinrich, M., Spiegler, V., Kayser, O., Hempel, G., Kraft, K., 2020. Challenges at the Time of COVID-19: Opportunities and Innovations in Antivirals from Nature. *Planta Med.* 86, 659–664. <https://doi.org/10.1055/a-1177-4396>
- Hilgenfeld, R., Peiris, M., 2013. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Antiviral Res.* 100, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.08.015>
- Hinz, B., Woelkart, K., Bauer, R., 2007. Alkamides from Echinacea inhibit cyclooxygenase-2 activity in human neuroglioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 441–446. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.073>
- Ho, T.-Y., Wu, S.-L., Chen, J.-C., Li, C.-C., Hsiang, C.-Y., 2007. Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Res.* 74, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.04.014>
- Hudson, J., Vimalanathan, S., 2011. Echinacea—A Source of Potent Antivirals for Respiratory Virus Infections. *Pharmaceuticals* 4. <https://doi.org/10.3390/ph4071019>
- Jassim, S. a. A., Naji, M.A., 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.* 95, 412–427. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x>
- Jo, S., Kim, S., Shin, D.H., Kim, M.-S., 2020. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 35, 145–151. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1690480>
- John Hopkins University. Coronavirus Resource Center. Sitio web: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Visto: 1 de mayo de 2021
- Juan, M. del C.R., Ribas, D.L., 1993. Utilización de las pruebas de citotoxicidad in vitro en la valoración de los efectos de los contaminantes ambientales. *Bol. Intexter Inst. Investig. Text. Coop. Ind.*
- Kawasaki, K., Muroyama, K., Yamamoto, N., Murosaki, S., 2015. A hot water extract of *Curcuma longa* inhibits adhesion molecule protein expression and monocyte adhesion to TNF- α -stimulated human endothelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 1654–1659. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1039480>
- Khan, F., Yu, H., Kim, Y.-M., 2020. Bactericidal Activity of Usnic Acid-Chitosan Nanoparticles against Persister Cells of Biofilm-Forming Pathogenic Bacteria. *Mar. Drugs* 18. <https://doi.org/10.3390/md18050270>
- Kim, D.W., Seo, K.H., Curtis-Long, M.J., Oh, K.Y., Oh, J.-W., Cho, J.K., Lee, K.H., Park, K.H., 2014. Phenolic phytochemical displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the seeds of *Psoralea corylifolia*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 29, 59–63. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.753591>
- Kim, H.J., Yoo, H.S., Kim, J.C., Park, C.S., Choi, M.S., Kim, M., Choi, H., Min, J.S., Kim, Y.S., Yoon, S.W., Ahn, J.K., 2009. Antiviral effect of *Curcuma longa* Linn extract against hepatitis B virus replication. *J. Ethnopharmacol.* 124, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.046>
- Konigheim, B., Comini, L., Grasso, S., Aguilar, J., Marioni, J., Contigiani, M., Núñez Montoya, S., 2012. Determination of Non-Toxic and Subtoxic Concentrations of Potential Antiviral Natural Anthraquinones. *Lat. Am. J. Pharm.* 31, 51–56.
- Kumar V., Abbas A., Nelson F., 2005. *Pathologic Basis of Disease*. Elsevier, Saunders Company.
- Lai, D., Odimegwu, D.C., Esimone, C., Grunwald, T., Proksch, P., 2013. Phenolic compounds with in vitro activity against respiratory syncytial virus from the Nigerian lichen *Ramalina farinacea*. *Planta Med.* 79, 1440–1446. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1350711>
- Lam-Cabanillas, E., León-Risco, A., León-Risco, K., Llamas-Hoyos, G., López-Zavaleta, R., Luzuriaga-Tirado, E., Mendoza-Blas, A., Huamán-Saavedra, J., Lam-Cabanillas, E., León-Risco, A., León-Risco, K., Llamas-Hoyos, G., López-Zavaleta, R., Luzuriaga-Tirado, E., Mendoza-Blas, A., Huamán-Saavedra, J., 2021. Bases moleculares de la patogénesis de Covid-19 y estudios in silico de posibles tratamientos farmacológicos. *Rev. Fac. Med. Humana* 21, 417–432. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v21i1.3327>
- Lau, K.-M., Lee, K.-M., Koon, C.-M., Cheung, C.S.-F., Lau, C.-P., Ho, H.-M., Lee, M.Y.-H., Au, S.W.-N., Cheng, C.H.-K., Lau, C.B.-S., Tsui, S.K.-W., Wan, D.C.-C., Waye, M.M.-Y., Wong, K.-B., Wong, C.-K., Lam, C.W.-K., Leung, P.-C., Fung, K.-P., 2008. Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata*. *J. Ethnopharmacol.* 118, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.03.018>
- Li, F., 2016. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu. Rev. Virol.* 3, 237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
- Li, S., Chen, C., Zhang, H., Guo, H., Wang, H., Wang, L., Zhang, X., Hua, S., Yu, J., Xiao, P., 2005.

- Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral Res.* 67, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.02.007>
- Li, X., Geng, M., Peng, Y., Meng, L., Lu, S., 2020. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J. Pharm. Anal.* 10, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>.
- Li, X.J., Kim, K.W., Oh, H., Liu, X.Q., Kim, Y.C., 2019. Chemical constituents and an antineuroinflammatory lignan, savinin from the roots of *Acanthopanax henryi*. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* <https://doi.org/21:1856294>.
- Li, Y., Wang, J., Liu, Y., Luo, X., Lei, W., Xie, L., 2020. Antiviral and virucidal effects of curcumin on transmissible gastroenteritis virus in vitro. *J. Gen. Virol.* 101, 1079–1084. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001466>
- Li, Y., Wang, Y., Wu, Y., Wang, B., Chen, X., Xu, X., Chen, H., Li, W., Xu, X., Xiaogang, 2017. Echinacea pupurea extracts promote murine dendritic cell maturation by activation of JNK, p38 MAPK and NF- κ B pathways. *Dev. Comp. Immunol.* 73, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.002>
- Lin, C.-W., Tsai, F.-J., Tsai, C.-H., Lai, C.-C., Wan, L., Ho, T.-Y., Hsieh, C.-C., Chao, P.-D.L., 2005. Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of *Isatis indigotica* root and plant-derived phenolic compounds. *Antiviral Res.* 68, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.07.002>
- Liu, W., Zhai, Y., Heng, X., Che, F.Y., Chen, W., Sun, D., Zhai, G., 2016. Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *J. Drug Target.* 24, 694–702. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2016.1157883>.
- Loizzo, M.R., Saab, A.M., Tundis, R., Statti, G.A., Menichini, F., Lampronti, I., Gambari, R., Cinatl, J., Doerr, H.W., 2008. Phytochemical analysis and in vitro antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species. *Chem. Biodivers.* 5, 461–470. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890045>.
- Lu, W., Zheng, B.J., Xu, K., Schwarz, W., Du, L., Wong, C. K. L., et al., 2006. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (33), 12540–12545. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605402103>.
- Luetdig, B., Steinmüller, C., Gifford, G.E., Wagner, H., Lohmann-Matthes, M.L., 1989. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 669–675. <https://doi.org/10.1093/jnci/81.9.669>
- Luzina, O.A., Salakhutdinov, N.F., 2018. Usnic acid and its derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000-2017). *Expert Opin. Ther. Pat.* 28, 477–491. <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1472239>
- Ministerio de Sanidad Gobierno de España. (2020). Manejo clínico del COVID-19: tratamiento médico. Sitio web: https://www.semg.es/images/2020/Coronavirus/20200319_Protocolo_manejo_clinico_tto_COVID-19.pdf . Visto el: 1 de mayo de 2021.
- Mondal, S., Ghosh, S., Moulik, S., 2016. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV-visible and steady-state fluorescence spectral study. *J. Photochem. Photobiol. B* 158. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004>
- Moreira, A.S.N., Braz-Filho, R., Mussi-Dias, V., Vieira, I.J.C., 2015. Chemistry and Biological Activity of *Ramalina* Lichenized Fungi. *Molecules* 20, 8952–8987. <https://doi.org/10.3390/molecules20058952>
- Morse, J.S., Lalonde, T., Xu, S., Liu, W.R., 2020. Learning from the Past: Possible Urgent Prevention and Treatment Options for Severe Acute Respiratory Infections Caused by 2019-nCoV. *ChemBiochem* 21, 730–738. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000047>
- Mothana, R. a. A., Awadh Ali, N.A., Jansen, R., Wegner, U., Mentel, R., Lindequist, U., 2003. Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*. *Fitoterapia* 74, 177–180. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00305-2](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00305-2)
- Mousavizadeh, L., Ghasemi, S., 2021. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 54, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.022>
- Mugas, M.L., Calvo, G., Marioni, J., Céspedes, M., Martínez, F., Sáenz, D., Di Venosa, G., Cabrera, J.L., Montoya, S.N., Casas, A., 2021. Photodynamic therapy of tumour cells mediated by the natural anthraquinone parietin and blue light. *J. Photochem. Photobiol. B* 214, 112089. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112089>
- Mukherjee, P.K., Nema, N.K., Maity, N., Sarkar, B.K., 2013. Phytochemical and therapeutic potential of cucumber. *Fitoterapia* 84, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.10.003>
- Müller-Jakic, B., Breu, W., Pröbstle, A., Redl, K., Greger, H., Bauer, R., 1994. In vitro inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by alkaloids from *Echinacea* and *Achillea* species. *Planta Med.* 60, 37–40. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959404>

- Nada, A.S., Hawas, A.M., Amin, N.E.-D., Elnashar, M.M., Abd Elmageed, Z.Y., 2012. Radioprotective effect of *Curcuma longa* extract on γ -irradiation-induced oxidative stress in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90, 415–423. <https://doi.org/10.1139/y2012-005>
- Nair, M.S., Huang, Y., Fidock, D.A., Polyak, S.J., Wagoner, J., Towler, M.J., Weathers, P.J., 2021. *Artemisia annua* L. extracts inhibit the in vitro replication of SARS-CoV-2 and two of its variants. *J. Ethnopharmacol.* 274, 114016. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114016>
- Naqvi, A.A.T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I.K., Singh, A., Atif, S.M., Hariprasad, G., Hasan, G.M., Hassan, M.I., 2020. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1866, 165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 83, 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Ooi, L.S.M., Wang, H., Luk, C.-W., Ooi, V.E.C., 2004. Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *J. Ethnopharmacol.* 94, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.004>
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 1999. WHO monographs on selected medicinal plants -Vol. 1, pp.115-124. WHO Sitio web: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42052>.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2020. COVID-19: cronología de la actuación de la OMS. 1 de mayo de 2021. Sitio web: <https://www.who.int/es/news/item/27-04-2020-who-timeline---covid-19>. Visitado el: 1 de mayo de 2021.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2020. Uso no indicado de medicamentos contra la COVID-19. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/commentaries/detail/off-label-use-of-medicines-for-covid-19>. Visitado el: 1 de mayo de 2021.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2020. What are the symptoms of COVID-19? Disponible en: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novelcoronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-acoronaviruses>. Visitado el: 1 de mayo de 2021.
- Ottogalli, M.E., Rodríguez, P.E., Frutos, M.C., Moreno, L.B., Ghiotto, L.M., Cuffini, C.G., Cámara, J.A., Adamo, M.P., Valinotto, L.E., Cámara, A., 2021. Circulation of human coronaviruses OC43 and 229E in Córdoba, Argentina. *Arch. Virol.* 166, 929–933. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04914-x>
- Park, J.-Y., Jae Jeong, H., Hoon Kim, J., Min Kim, Y., Park, S.-J., Kim, D., Hun Park, K., Song Lee, W., Bae Ryu, Y., 2012. Diarylheptanoids from *Alnus japonica* Inhibit Papain-Like Protease of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 2036–2042. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00623>
- Park, J.-Y., Yuk, H.J., Ryu, H.W., Lim, S.H., Kim, K.S., Park, K.H., Ryu, Y.B., Lee, W.S., 2017. Evaluation of polyphenols from *Broussonetia papyrifera* as coronavirus protease inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32, 504–515. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1265519>
- Parsons, J.L., Cameron, S.I., Harris, C.S., Smith, M.L., 2018. Echinacea biotechnology: advances, commercialization and future considerations. *Pharm. Biol.* 56, 485–494. <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1501583>
- Pastrian-Soto, G., Pastrian-Soto, G., 2020. Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *Int. J. Odontostomatol.* 14, 331–337. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>
- Percival, S.S., 2000. Use of echinacea in medicine. *Biochem. Pharmacol.* 60, 155–158. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00413-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00413-x)
- Prasad, S., Gupta, S.C., Tyagi, A.K., Aggarwal, B.B., 2014. Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnol. Adv.* 32, 1053–1064. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.004>
- PubMed. Sitio web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>. Visto: 31 de marzo de 2021.
- Raduner, S., Majewska, A., Chen, J.-Z., Xie, X.-Q., Hamon, J., Faller, B., Altmann, K.-H., Gertsch, J., 2006. Alkylamides from Echinacea are a new class of cannabinomimetics. Cannabinoid type 2 receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects. *J. Biol. Chem.* 281, 14192–14206. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601074200>
- Red Argentina de Centros de Información de Medicamentos (RACIM). (2020). FICHA TÉCNICA RACIM: ivermectina. Sitio web: <http://cime.fcq.unc.edu.ar/wp-content/uploads/sites/15/2021/02/RACIM-Ivermectina-ficha-t%C3%A9cnica-v.3-01-02-21.pdf>. Visto el: 1 de mayo de 2021.
- Red Argentina de Centros de Información de Medicamentos (RACIM), 2020. USO DE DEXAMETASONA Y OTROS CORTICOESTEROIDES EN COVID-19. Sitio web:

- <http://cime.fcq.unc.edu.ar/wp-content/uploads/sites/15/2020/10/Alerta-Dexametasona-y-corticoesteroides-en-COVID-19-v.14-10.pdf> . Visto el: 1 de mayo de 2021.
- Red Argentina de Centros de Información de Medicamentos (RACIM), 2020. FICHA TÉCNICA RACIM: VITAMINA D. Sitio web: <http://cime.fcq.unc.edu.ar/wp-content/uploads/sites/15/2020/12/RACIM-Vitamina-D-versi%C3%B3n-2-18.11.2020.pdf> . Visto el: 1 de mayo de 2021
- Red Argentina de Centros de Información de Medicamentos (RACIM), 2021. RACIM en pandemia COVID-19. Centro de Información de Medicamentos (CIME) Facultad de Ciencias Químicas (UNC). Sitio web: <http://cime.fcq.unc.edu.ar/racim-en-pandemia-covid-19/> . Visto el: 1 de mayo de 2021.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Rohaim, M.A., El Nagggar, R.F., Clayton, E., Munir, M., 2021. Structural and functional insights into non-structural proteins of coronaviruses. *Microb. Pathog.* 150, 104641. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104641>
- Salehi, B., Capanoglu, E., Adrar, N., Catalkaya, G., Shaheen, S., Jaffer, M., Giri, L., Suyal, R., Jugran, A.K., Calina, D., Docea, A.O., Kamiloglu, S., Kregiel, D., Antolak, H., Pawlikowska, E., Sen, S., Acharya, K., Selamoglu, Z., Sharifi-Rad, J., Martorell, M., Rodrigues, C.F., Sharopov, F., Martins, N., Capasso, R., 2019. Cucurbits Plants: A Key Emphasis to Its Pharmacological Potential. *Mol. Basel Switz.* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24101854>
- Schapowal, A., Klein, P., Johnston, S.L., 2015. Echinacea reduces the risk of recurrent respiratory tract infections and complications: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Adv. Ther.* 32, 187–200. <https://doi.org/10.1007/s12325-015-0194-4>
- Schneider, S., Reichling, J., Stintzing, F.C., Messerschmidt, S., Meyer, U., Schnitzler, P., 2010. Anti-herpetic properties of hydroalcoholic extracts and pressed juice from *Echinacea pallida*. *Planta Med.* 76, 265–272. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1186137>
- Schwarz, S., Wang, K., Yu, W., Sun, H., Schwarz, W., 2011. Emodin inhibits current through SARS-associated coronavirus 3a protein. *Antiviral Res.* 90, 64–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.02.008>
- ScienceDirect. Sitio web: <https://www.sciencedirect.com/>. Visto el: 31 de marzo de 2021.
- See, D.M., Broumand, N., Sahl, L., Tilles, J.G., 1997. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology* 35, 229–235. [https://doi.org/10.1016/s0162-3109\(96\)00125-7](https://doi.org/10.1016/s0162-3109(96)00125-7)
- Senica, M., Mlinsek, G., Veberic, R., Mikulic-Petkovsek, M., 2019. Which Plant Part of Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) Should be Used for Tea and Which for Tincture? *J. Med. Food* 22, 102–108. <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0026>
- Sharma, M., Anderson, S.A., Schoop, R., Hudson, J.B., 2009. Induction of multiple pro-inflammatory cytokines by respiratory viruses and reversal by standardized Echinacea, a potent antiviral herbal extract. *Antiviral Res.* 83, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.04.009>
- Shemluck, M., 1982. Medicinal and other uses of the Compositae by Indians in the United States and Canada. *J. Ethnopharmacol.* 5, 303–358. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(82\)90016-2](https://doi.org/10.1016/0378-8741(82)90016-2)
- Shen, L., Niu, J., Wang, C., Huang, B., Wang, W., Zhu, N., Deng, Y., Wang, H., Ye, F., Cen, S., 2019. High-Throughput Screening and Identification of Potent Broad-Spectrum Inhibitors of Coronaviruses. *J. Virol.* 93. <https://doi.org/10.1128/JVI.00023-19>
- Shi, C.-J., Peng, W., Zhao, J.-H., Yang, H.-L., Qu, L.-L., Wang, C., Kong, L.-Y., Wang, X.-B., 2020. Usnic acid derivatives as tau-aggregation and neuroinflammation inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 187, 111961. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111961>
- Shimabukuro-Vornhagen, A., Gödel, P., Subklewe, M., Stemmler, H.J., Schlößer, H.A., Schlaak, M., Kochanek, M., Böll, B., von Bergwelt-Baildon, M.S., 2018. Cytokine release syndrome. *J. Immunother. Cancer* 6, 56. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0343-9>
- Si, K., Wei, L., Yu, X., Wu, F., Li, X., Li, C., Cheng, Y., 2016. Effects of (+)-usnic acid and (+)-usnic acid-liposome on *Toxoplasma gondii*. *Exp. Parasitol.* 166, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.021>
- Signer, J., Jonsdottir, H.R., Albrich, W.C., Strasser, M., Züst, R., Ryter, S., Ackermann-Gäumann, R., Lenz, N., Siegrist, D., Suter, A., Schoop, R., Engler, O.B., 2020. In vitro virucidal activity of Echinaforce®, an *Echinacea purpurea* preparation, against coronaviruses, including common cold coronavirus 229E and SARS-CoV-2. *Virol. J.* 17, 136. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01401-2>
- Silveira, D., Prieto-Garcia, J.M., Boylan, F., Estrada, O., Fonseca-Bazzo, Y.M., Jamal, C.M.,

- Magalhães, P.O., Pereira, E.O., Tomczyk, M., Heinrich, M., 2020. COVID-19: Is There Evidence for the Use of Herbal Medicines as Adjuvant Symptomatic Therapy? *Front. Pharmacol.* 11, 581840. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.581840>
- Snijder, E.J., Decroly, E., Ziebuhr, J., 2016. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Adv. Virus Res.* 96, 59–126. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.008>
- Sokolov, D.N., Zarubaev, V.V., Shtro, A.A., Polovinka, M.P., Luzina, O.A., Komarova, N.I., Salakhutdinov, N.F., Kiselev, O.I., 2012. Anti-viral activity of (-)- and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 7060–7064. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.084>
- Solárová, Z., Liskova, A., Samec, M., Kubatka, P., Büsselberg, D., Solár, P., 2020. Anticancer Potential of Lichens' Secondary Metabolites. *Biomolecules* 10. <https://doi.org/10.3390/biom10010087>
- Soleimani, V., Sahebkar, A., Hosseinzadeh, H., 2018. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. *Phytother. Res. PTR* 32, 985–995. <https://doi.org/10.1002/ptr.6054>
- Soy, M., Keser, G., Atagündüz, P., Tabak, F., Atagündüz, I., Kayhan, S., 2020. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clin. Rheumatol.* 39, 2085–2094. <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05190-5>
- Su, H.-G., Peng, X.-R., Shi, Q.-Q., Huang, Y.-J., Zhou, L., Qiu, M.-H., 2020. Lanostane triterpenoids with anti-inflammatory activities from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 173, 112256. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112256>
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A.C.K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., Gao, G.F., 2016. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 24, 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Tang, T., Bidon, M., Jaimes, J.A., Whittaker, G.R., Daniel, S., 2020. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res.* 178, 104792. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104792>
- Taylor, I., Taylor, F., Croup, F., Vimalanathan, S., Kang, L., Amiguet, V., Livesey, J., Arnason, J., Hudson, J., 2005. *Echinacea purpurea*. Aerial Parts Contain Multiple Antiviral Compounds. *Pharm. Biol.* 43, 740–745. Sitio web: <http://www.theplantlist.org/>. Visto el: 30 de octubre de 2020.
- The Plant List. Sitio web: <http://www.theplantlist.org/>. Visto el: 30 de octubre de 2020.
- Tian, Y., Li, Y.-L., Zhao, F.-C., 2017. Secondary Metabolites from Polar Organisms. *Mar. Drugs* 15. <https://doi.org/10.3390/md15030028>
- Ulasli, M., Gurses, S.A., Bayraktar, R., Yumrutas, O., Oztuzcu, S., Igci, M., Igci, Y.Z., Cakmak, E.A., Arslan, A., 2014. The effects of *Nigella sativa* (Ns), *Anthemis hyalina* (Ah) and *Citrus sinensis* (Cs) extracts on the replication of coronavirus and the expression of TRP genes family. *Mol. Biol. Rep.* 41, 1703–1711. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3019-7>
- Vanden Berghe, D.A. (University of A. (Belgium) F. of M., Vhetinck, A.J., Van Hoof, L., 1986. Plant products as potential antiviral agents. *Bull. Inst. Pasteur Fr.*
- Wang, C., Liu, X., Lian, C., Ke, J., Liu, J., 2019. Triterpenes and Aromatic Meroterpenoids with Antioxidant Activity and Neuroprotective Effects from *Ganoderma lucidum*. *Mol. Basel Switz.* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24234353>
- Villar del Fresno, A., 1999. *Farmacognosia general*. Madrid, España: Editorial Síntesis S.A.
- Wang, P., Nair, M.S., Liu, L., Iketani, S., Luo, Y., Guo, Y., Wang, M., Yu, J., Zhang, B., Kwong, P.D., Graham, B.S., Mascola, J.R., Chang, J.Y., Yin, M.T., Sobieszczyk, M., Kyratsous, C.A., Shapiro, L., Sheng, Z., Huang, Y., Ho, D.D., 2021. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature* 593, 130–135. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>
- Wen, C.-C., Kuo, Y.-H., Jan, J.-T., Liang, P.-H., Wang, S.-Y., Liu, H.-G., Lee, C.-K., Chang, S.-T., Kuo, C.-J., Lee, S.-S., Hou, C.-C., Hsiao, P.-W., Chien, S.-C., Shyur, L.-F., Yang, N.-S., 2007. Specific plant terpenoids and lignoids possess potent antiviral activities against severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Med. Chem.* 50, 4087–4095. <https://doi.org/10.1021/jm070295s>
- Wen, C.-C., Shyur, L.-F., Jan, J.-T., Liang, P.-H., Kuo, C.-J., Arulselvan, P., Wu, J.-B., Kuo, S.-C., Yang, N.-S., 2011. Traditional Chinese medicine herbal extracts of *Cibotium barometz*, *Gentiana scabra*, *Dioscorea batatas*, *Cassia tora*, and *Taxillus chinensis* inhibit SARS-CoV replication. *J. Tradit. Complement. Med.* 1, 41–50. [https://doi.org/10.1016/s2225-4110\(16\)30055-4](https://doi.org/10.1016/s2225-4110(16)30055-4)
- Wu, J., Hou, W., Cao, B., Zuo, T., Xue, C., Leung, A.W., Xu, C., Tang, Q.-J., 2015. Virucidal efficacy of treatment with photodynamically activated curcumin on murine norovirus bio-accumulated in oysters. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 12, 385–392.

- <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.06.005>
- Yang, C.-M., Cheng, H.-Y., Lin, T.-C., Chiang, L.-C., Lin, C.-C., 2005. Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection in vitro. *Antiviral Res.* 67, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.02.008>
- Ye, Z.-W., Yuan, S., Yuen, K.-S., Fung, S.-Y., Chan, C.-P., Jin, D.-Y., 2020. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int. J. Biol. Sci.* 16, 1686–1697. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45472>
- Yi, L., Li, Z., Yuan, K., Qu, X., Chen, J., Wang, G., Zhang, H., Luo, H., Zhu, L., Jiang, P., Chen, L., Shen, Y., Luo, M., Zuo, G., Hu, J., Duan, D., Nie, Y., Shi, X., Wang, W., Han, Y., Li, T., Liu, Y., Ding, M., Deng, H., Xu, X., 2004. Small molecules blocking the entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into host cells. *J. Virol.* 78, 11334–11339. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11334-11339.2004>
- Yu, M.-S., Lee, J., Lee, J.M., Kim, Y., Chin, Y.-W., Jee, J.-G., Keum, Y.-S., Jeong, Y.-J., 2012. Identification of myricetin and scutellarein as novel chemical inhibitors of the SARS coronavirus helicase, nsP13. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 4049–4054. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.081>
- Zanon, S.M., Ceriatti, F.S., Rovera, M., Sabini, L.J., Ramos, B.A., 1999. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 41, 59–62.
- Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., Guan, L., Wei, Y., Li, H., Wu, X., Xu, J., Tu, S., Zhang, Y., Chen, H., Cao, B., 2020. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet* 395, 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
- Zou, X., Chen, K., Zou, J., Han, P., Hao, J., Han, Z., 2020. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front. Med.* 14, 185–192. <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0>

ANEXO I

Monografía de divulgación científica basada en el estudio bibliográfico de *C. longa*

Autores: Tomás I. Gomez, Juliana Marioni, María L. Mugas, Susana C Nuñez-Montoya
Filiación: Farmacognosia, Dpto. Cs. Farmacéuticas, Fac. Cs. Químicas, Universidad Nacional Córdoba e Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), CONICET.

CÚRCUMA

Nombre científico: *Curcuma longa* L.

Familia: Zingiberaceae

Nombres vulgares:

Español: “cúrcuma”, “azafrán de raíz”,

Inglés: “turmeric”

(Soheil et al., 2014)

Parte usada: La droga vegetal, es decir, la parte de la planta usada, es el rizoma (Soheil et al., 2014).

Origen: Sur, sudeste de Asia

Descripción botánica

Hierba perenne erguida de 1 m de altura (Fig.1). Rizoma principal robusto, carnoso, cilíndrico, casi ovoide (unos 3 cm de diámetro y 4 cm de largo), ramificado, aromático, de superficie rugosa, de color marrón en el exterior y naranja en el interior; raíces tiburosas en las puntas. Rizoma lateral, ligeramente curvado (1 cm x 2–6 cm) (Fig. 2). Raíces tuberosas. Brotes aéreos frondosos (pseudotallo). Hojas uniformemente verdes, oblongas o elípticas, pecioladas, de hasta 50 cm de largo y 7–25 cm de ancho, base atenuada, ápice poco acuminado, pecíolo y vaina escasa a densamente pubescentes. Inflorescencias terminales en pseudotallos; pedúnculo 12-20 cm; espiga cilíndrica, de 10 a 15 cm de largo y de 5 a 7 cm de diámetro; brácteas blanca o blanca con la mitad superior de color verde claro, ovadas u oblongas, de 3-5 cm de largo, ápice obtuso, cada una de las cuales subtiende flores, bractéolas de hasta 3,5 cm de largo. Flores de color amarillo pálido de unos 5 cm de largo; cáliz blanco, tubular, de 0,8-1,2 cm, puberulento, ápice de 3 dientes desiguales; corola blanca, tubular en forma de embudo, de 3 cm, extremidad trilobulada de 1-1,5 cm, el central más grande, ápice mucronado; estambres laterales, petaloides, más cortos que el labelo; Labelo amarillento con banda central amarilla, obovada, de 1,2-2 cm. Ovario puberulento. Cápsula elipsoide (Wu et al. 2000; WHO 1999).

Semillas ovoides, marrones, no viables. La producción de semilla difícilmente ocurre debido a la incompatibilidad y la esterilidad del polen. Únicamente ocurre reproducción

vegetativa por esquejes a partir del rizoma. Número básico de cromosomas ($2n = 3x = 63$). El individuo triploide es deficiente en la segregación meiótica, disminuyendo la probabilidad de formación de gametos viables y limitando el mejoramiento genético convencional por hibridación (Leong-Skornikova et al. 2007).



Figura 1: Exomorfología de *Curcuma longa* L.



Figura 2: Rizoma de *C. longa*

Distribución y hábitat

Curcuma L. es uno de los géneros más grandes de la familia Zingiberaceae. Se han descrito 153 nominaciones científicas de especies en el género, pero solo 93 son nombres de especies aceptados (The Plant List 2021).

Es un género ampliamente distribuido en el sur y sudeste de Asia, especialmente en regiones tropicales, con algunas especies en Australia y el Pacífico Sur (Papua Nueva Guinea). En el continente asiático se encuentra en la zona del trópico, desde India, sur de China hasta sudeste de Asia. La mayor biodiversidad está ubicada en India y Tailandia, con por lo menos 40 especies informadas para estos países, seguidos por Burma, Bangladesh, Indonesia y Vietnam (Leong-Skornickova et al. 2007; Sirirugsa et al. 2007).

Historia: Etnobotánica, etnomedicina y uso actual

La mayor parte de los reportes y documentos respecto a los usos populares de “cúrcuma” se originaron en Asia, donde tiene un uso ancestral asociado a ritos religiosos y prácticas culturales. Las evidencias etnobotánicas indican que el principal uso era como colorante (textil, de materiales y como cosmético), condimento y en medicina (Valeyudhan et al. 2012).

En algunas culturas (hindú) y religiones (budismo), la “cúrcuma” se considera símbolo de pureza; por lo que se usa en ceremonias religiosas y sociales. Se utiliza una pasta hecha con rizomas frescos de “cúrcuma” en diferentes etapas de la vida de la persona. En el nacimiento para bendecir a los bebés recién nacidos, pidiendo por su longevidad y protección. Es habitual también en las ceremonias de matrimonio, siendo utilizada para purificar las prendas textiles de la pareja. También se utiliza para bañar estatuas y monumentos de sus dioses como modo de purificación (Valeyudhan et al. 2012).

Probablemente el uso más ancestral es como colorante, específicamente como pigmento amarillo, en diferentes formas de arte primitivo. Incluso ahora, el polvo de “cúrcuma” se usa para teñir prendas u otros materiales como cerámicas, máscaras. También se usaba en la preparación de alimentos, no sólo para dar color (por ejemplo, para preparar arroz amarillo), sino para conferir el sabor característico de la “cúrcuma” (amargo, picante y astringente) (Valeyudhan et al. 2012).

Existe una utilización muy amplia de la “cúrcuma” en la medicina popular (no respaldada por datos experimentales o ensayos clínicos), desde el tratamiento del asma, furúnculos, tos, mareos, hemorragias, picaduras de insectos, tiña, cálculos urinarios, lactancia lenta, trastornos biliares y diabetes, hasta como cicatrizante, laxante, antihelmíntico, alexitérico y emoliente; incluso con uso documentado en la medicina Ayurvédica y Unani en el tratamiento de úlceras pépticas, dolor e inflamación por artritis reumatoidea, de amenorrea, dismenorrea, diarrea, epilepsia, dolor y enfermedades de la piel, sarna, ictericia, y hematomas (WHO 1999; Valeyudhan et al. 2012).

En general, el rizoma es usado en forma de polvo para preparar una pasta de uso externo o se administra en forma oral con agua, también se prepara la decocción de rizomas o se consume como jugo (prensado del rizoma fresco) (Singh et al. 2012).

Entre los diversos usos en la etnomedicina de diferentes regiones de Asia se pueden citar como antiviral, antibacteriano, antiparasitario, antiinflamatorio, digestivo, anticancerígeno y para el tratamiento de afecciones gastrointestinales y dérmicas, dolor abdominal, resfriados, artritis, envenenamiento por ofidios y arácnidos, entre algunos de sus diversos usos (Valeyudhan et al. 2012; Singh et al. 2012; Ahmed 2016) También son aprovechadas otros órganos de la planta como las hojas, para tratar la malaria e ictericia (Razafindraibe et al. 2013).

El uso etnomedicinal de “cúrcuma” no solo se circunscribe al continente asiático. En países sudamericanos, tales como Perú y Colombia, se utiliza para tratar la malaria, bronquitis, trastornos digestivos, diabetes, colesterol alto, artritis, infecciones de riñón y como estimulante circulatorio, fortalecedor del sistema inmune, cicatrizante, anticancerígeno y condimento (Odone et al. 2013, Bussmann et al. 2018).

En la actualidad, los rizomas de “cúrcuma”, después de su procesamiento (aclarado, curado, secado, pulido y pulverizado) se utilizan como condimentos, colorantes y estimulantes aromáticos en varios medicamentos, preparaciones de curry en polvo, y específicamente como colorantes en las industrias farmacéutica y alimentaria, incluyendo la confitería (Choudhary y Rahi 2018). Por lo cual, su cultivo posee importancia económica.

Actualmente, se cultiva ampliamente en múltiples regiones, siendo India el principal productor con aproximadamente el 82% del cultivo mundial de “cúrcuma”, seguido por China (8%), Myanmar (4%), Nigeria (3%) y Bangladesh (3%). India también es el principal exportador de “cúrcuma”, proveyendo a Estados Unidos, Reino Unido, Japón, Singapur, Malasia, Sudáfrica, Australia, entre otros, dirigiendo más del 50 % del comercio mundial (Choudhary y Rahi 2018).

Generalmente, “cúrcuma” crece bien en suelos sueltos y arenosos en áreas sombreadas. Se puede cultivar en diversos climas tropicales, desde el nivel del mar hasta 1500 m de altitud, en un rango de temperatura de 20 a 30 °C, con una precipitación anual de 1500 mm o más en condiciones de lluvia natural o de riego (Sirirugsa et al. 2007; Choudhary y Rahi 2018).

Fitoquímica

El polvo del rizoma de *C. longa* está compuesto en un 69,4 % por carbohidratos, 6,3 % de proteína, 5,1 % de grasa, 3,1 % de minerales, 3-6% de curcuminoides y otros metabolitos secundarios en porcentajes menores, con un alto porcentaje de humedad (13,1%) (Chattopadhyay et al. 2004; Prasad et al. 2014). Entre los metabolitos secundarios encontramos una gran cantidad de flavonoides, fenoles (ácido ferúlico, ácido vainílico, vainillina) y sesquiterpenos, y moderada cantidad de taninos, esteroides (β -sitosterol, stigmasterol), alcaloides, saponinas (Abdel-Lateef et al. 2016, Chen et al. 2010).

El aceite esencial (AE) se obtiene por destilación por arrastre con vapor de agua de los rizomas, es de color amarillo pálido a amarillo anaranjado (con un 6 % de rendimiento), compuesto por α -felandreno (1%), sabineno (0,6%), cineol (1%), borneol (0,5%), zingibereno (25%) y sesquiterpenos (53%) (Fig. 3) (WHO 1999; Chattopadhyay et al. 2004; Prasad et al. 2014).

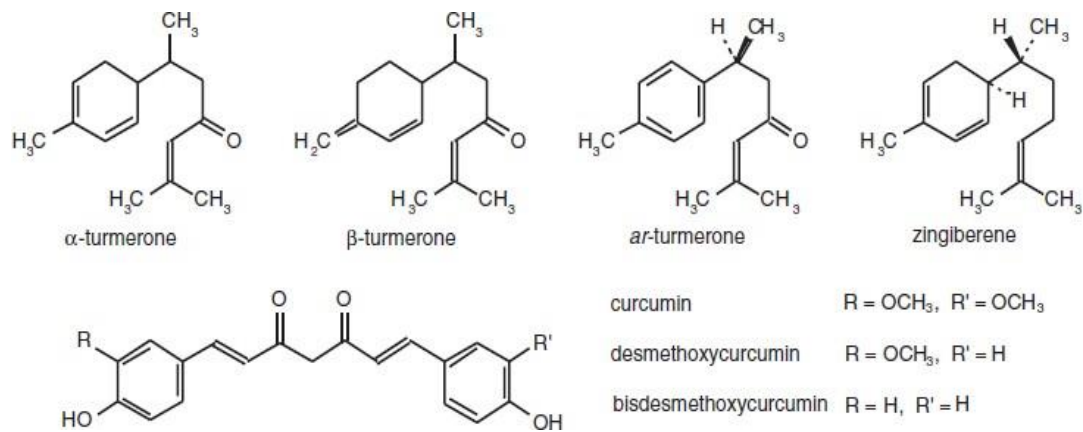


Figura 3: Estructura química de los principales metabolitos secundarios de *C. longa*.

El AE se puede obtener de hojas frescas y secas, flores frescas, raíces secas y rizomas frescos y secos de “cúrcuma”, siendo los rizomas los que presentan mayor rendimiento. En los AE de hojas y flores predominan los monoterpenos, mientras que los de raíces y rizomas contienen principalmente sesquiterpenos. Los principales principios volátiles del aceite de rizoma son α - y β -turmerona y ar-turmerona (Fig. 3). Según el análisis químico de los AE de “cúrcuma” por diferentes autores, se podría concluir que la composición depende principalmente del origen geográfico y de la parte de la planta utilizada, entre otros factores (Stanojevic et al. 2015).

Los principios colorantes son curcuminoides (diarylheptanoides, 2-6% en rizoma), responsables del color amarillo. El principal curcuminoides presente es la curcumina (Fig. 3), representa un 80-77%, seguido por demetoxicurcumina en 12-17% y bisdemetoxicurcumina en 3-8%, junto a otros diarylheptanoides en porcentajes menores (WHO 1999, Prasad et al. 2014, Stanojevic et al. 2015).

Actividad farmacológica

Debido al amplio espectro de usos populares que se le atribuyen a esta planta, se han realizado numerosas investigaciones para corroborar dichos efectos biológicos, con más de 6000 artículos científicos que abarcan experimentos *in vitro* como en modelos animales (*in vivo*).

Se ha demostrado que el polvo de “cúrcuma” es un buen cicatrizante sobre heridas y posee acción antiinflamatoria. Varios de sus extractos han manifestado efecto antiinflamatorio, hipolipémico, antitumoral, antibacteriano, antifúngico, antiprotozoario y antifertilidad, y acción sobre úlcera péptica, dispepsia y flatulencia (WHO 1999; Chattopadhyay et al. 2004).

La actividad farmacológica de esta droga vegetal se atribuye a su principal curcuminoides, la curcumina. Se ha demostrado el efecto antiinflamatorio y antifatulento de este metabolito secundario (WHO 1999), y su actividad antimicrobiana de amplio espectro, que incluye efecto antibacteriano, antiviral, antifúngico y antipalúdico (Soheil et al. 2014).

Además, se ha informado su efecto reductor del colesterol, hipoglucémico, antioxidante, anticoagulante, antitumoral y anticancerígeno (Prasad et al. 2014).

Entre los usos respaldados por ensayos clínicos se destaca como principal, el tratamiento de la dispepsia ácida, flatulenta o atónica, tanto con la droga vegetal como con curcumina. Este efecto se atribuye a que disminuye la secreción gástrica y aumenta el contenido de mucina en el jugo gástrico, además estimula la producción de moco en la pared gástrica (WHO 1999).

También hay datos disponibles que muestran que el polvo en cápsulas orales alivia síntomas como disnea, tos y esputo, mejora la inflamación en artritis reumatoidea, y alivia problemas menstruales (Chattopadhyay et al. 2004).

La evidencia clínica indica que la curcumina tiene efecto cardioprotector y reductor de lípidos, acción protectora sobre algunas enfermedades de la piel (dermatitis, esclerodermia, psoriasis y carcinogénesis cutánea) y propiedades antidiabéticas y anticancerígenas. Incluso se ha reportado sus efectos protectores en diversas enfermedades como úlcera péptica, esclerosis múltiple, Alzheimer, fibrosis quística, entre otras (Prasad et al. 2014). Los datos clínicos respaldan el uso de curcumina como antiinflamatorio en diferentes procesos como la artritis, reuma y enfermedad inflamatoria intestinal (WHO 1999, Prasad et al. 2014).

En consecuencia, la cúrcuma y su principal metabolito (curcumina) han encontrado aplicaciones en una gran variedad de afecciones como anemia, aterosclerosis, diabetes, edema, hemorroides, hepatitis, histeria, indigestión, inflamación, enfermedades urinarias, cicatrización de heridas y hematomas, psoriasis, anorexia, tos, trastornos hepáticos, reumatismo, sinusitis, entre otras (Chattopadhyay et al. 2004).

En el último año se ha mencionado “cúrcuma” y en especial, su principio activo, la curcumina, como una opción terapéutica para el manejo de la infección COVID-19, debido a que han demostrado efecto antiviral sobre una gran variedad de virus, incluyendo otros coronavirus (CoV). Además, por su importante efecto antiinflamatorio tendrían acción sobre uno de los principales procesos que desencadena la infección con este nuevo virus denominado SARS-CoV-2. A continuación se desarrolla los avances científicos en cuanto a la actividad antiinflamatoria y antiviral de curcumina que apoyan el potencial uso de esta droga vegetal en COVID-19.

Actividad Antiinflamatoria

La inflamación tiene un rol primordial en el desarrollo y evolución de enfermedades que padece el ser humano, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales, neurodegenerativas, infecciosas, metabólicas y autoinmunes. (Liu et al. 2017). La inflamación es una respuesta a una injuria a nivel celular o tisular debido a agentes externos o intrínsecos que desencadenan un proceso molecular y celular que se manifiestan como cambios en la dinámica metabólica y alteraciones a nivel macroscópico en órganos.

El proceso inflamatorio involucra varios mecanismos interrelacionados: vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, reclutamiento (quimiotaxis) y activación leucocitaria, fiebre, angiogénesis, entre otros. Estos mecanismos se desarrollan y desencadenan a través de los mediadores de inflamación, los cuales tienen un papel fundamental en el progreso y resolución del proceso inflamatorio. Es por ello que son ampliamente estudiados en la

búsqueda de fármacos antiinflamatorios. Entre los mediadores encontramos derivados del ácido araquidónico (AA), citoquinas (CK, “cytokine”), aminas vasoactivas, óxido nítrico (ON), radicales libres, neuropéptidos y otras proteínas (Kumar et al. 2005).

Se ha visto que curcumina inhibe la liberación de AA de la membrana celular mediante la inhibición de la fosforilación de la fosfolipasa A2 (cPLA2), necesaria para liberar AA de la membrana celular y sintetizar prostaglandinas (PGs) y otros mediadores proinflamatorios (Hong et al. 2004).

A su vez, se ha demostrado que curcumina también actúa en una etapa posterior del metabolismo de los eicosanoides, inhibiendo la expresión de la enzima ciclooxigenasa 2, tanto *in vitro* (Hong et al. 2004) como *in vivo* (Yuan et al. 2018). Esta enzima es uno de los blancos principales en la búsqueda de fármacos antiinflamatorios, ampliamente utilizados en enfermedades con cuadros de inflamación crónica o recurrente tales como osteoartritis, artritis reumatoidea, artritis psoriásica y dolor agudo en general, ya que cataliza la síntesis de PGs a partir del AA liberado de las membranas celulares. En paralelo, curcumina demostró tener capacidad de inhibir la función catalítica de la 5-lipooxigenasa (Prasad et al. 2004), la cual participa en la síntesis de leucotrienos a partir de AA.

Curcumina, además, actúa inhibiendo la expresión de diferentes mediadores proinflamatorios proteicos, tales como las interleucinas (ILs) IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), el cual está asociado a nefropatías, resistencia a la insulina, obesidad, entre otras enfermedades inflamatorias (Derosa et al. 2016; Hashem et al. 2008; Fahey et al. 2007).

La expresión de los mediadores proinflamatorios está sujeta a diferentes redes de señalización celular. Curcumina es capaz de inhibir la actividad de varias proteínas señalizadoras, como el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (Bharti et al. 2015; Farhangi et al. 2015).

Actividad Antiviral

La actividad antiviral de curcumina y sus derivados abarca una diversidad de virus sumamente amplia, incluyendo virus ADN y ARN, desnudos o envueltos.

Entre los virus ADN, presentó eficacia frente virus Herpes Simple Tipo 1 y 2 (HSV-1, HSV-2) (Ferreira et al. 2015; Kutluay et al. 2008), virus Herpes Humano 8 (HHV-8) o Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (44- curcumina kaposi), virus de la Hepatitis B (HBV) (Kim et al. 2009), Adenovirus Humano (HadV) (Jennings y Parks 2020) y virus de Papiloma Humano (HPV), incluyendo HPV-16, estrechamente ligado al desarrollo de cáncer de cuello uterino en el ser humano (Maher et al. 2011; do Bonfim et al. 2020).

Dentro de los virus ARN, presentó actividad frente al virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Ferreira et al. 2015; Sui et al. 1993; Mazumder et al. 1995), virus de la Hepatitis C (HCV) (Chen et al. 2012), virus Zika (ZIKV) (Mounce et al. 2017), virus Chikungunya (CHIKV) (Mounce et al. 2017) y todos los tipos de virus Dengue (DENG, 1-4) (Nabila et al. 2020).

Curcumina y sus derivados han demostrado actuar sobre diferentes etapas del ciclo de replicación viral, tales como: la adhesión del virus a los receptores de membrana, el ingreso a

la célula hospedadora (Mounce et al. 2017; von Rhein et al. 2016), como también en la replicación del genoma viral y posterior egreso del virus de la célula (Ferreira et al. 2015; Sui et al. 1993; Mazumder et al. 1995). Además, se ha reportado para curcumina su capacidad virucida *per se* (Wu 2015; Li et al. 2020).

Uno de los mecanismos de acción de curcumina estaría relacionado con la inhibición de la enzima inosina 5'-monofosfato (IMPDH) deshidrogenasa, la cual es esencial para la síntesis de purinas y es actualmente un blanco importante en la búsqueda de fármacos antivirales (Dairaku et al. 2010). Complementariamente, este compuesto natural regula la expresión de diferentes mediadores inflamatorios e inmunitarios que actúan durante la infección viral, como interferones (IFN), citoquinas y otras proteínas (Derosa et al. 2016; Hashem et al. 2008; Fahey et al. 2007).

Uno de los agentes etiológicos más estudiados es el virus Influenza A (IAV). En diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* con ratones infectados con cepas H1N1 de IAV, el tratamiento con curcumina demostró inhibir la replicación del IAV y disminuir las CK y enzimas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , metaloproteinasas de matriz (MMPs) 2 y 9; como así también minimizar el daño pulmonar causado por la infección (Dai et al. 2018; Lai et al. 2020; Xu y Liu 2017; Han et al. 2017).

Esta actividad antiviral e inmunomoduladora de curcumina está estrechamente relacionada con su capacidad de regular diferentes cascadas de señalización, como es el caso de la infección por IAV, inhibiendo las rutas de señalización mediadas por las proteínas TLR2/4, p38/JNK MAPK y NF- κ B (Dai et al. 2018; Xu y Liu 2017), las cuales están involucradas en la internalización y replicación de IAV.

Estos hallazgos, sumados a su actividad antioxidante, indican que la curcumina tiene potencial terapéutico contra la replicación de IAV y la consecuente inflamación pulmonar (Dai et al. 2018; Lai et al. 2020; Xu y Liu 2017; Han et al. 2017).

Además, presentó actividad antiviral e inmunomoduladora sobre otros virus respiratorios como el virus Respiratorio Sincitial Humano (HRSV) (Obata et al. 2013), reovirus I/L (Avasarala et al. 2013), HadV, inclusive sobre el coronavirus causante del brote de Síndrome Respiratorio Agudo Severo originado el 2002 en Gaudong, China (SARS-CoV) (Wen et al. 2007).

Curcumina y COVID-19

Trabajos previos evidenciaron que curcumina logró inhibir la replicación de una gran diversidad de virus ARN envueltos, incluyendo SARS-CoV (Wen et al. 2007), filogenéticamente relacionado con el nuevo coronavirus responsable de la pandemia en 2020 (SARS-CoV-2). La disminución de la actividad enzimática de la proteasa 3CL, necesaria para la replicación del genoma SARS-CoV, sería uno de los mecanismos de acción antiviral. Estudios de docking molecular demostraron que curcumina tiene la capacidad de interactuar con el receptor humano ACE2, la proteasa Mpro y la proteína RBD de la espícula de SARS-CoV-2 (Utomo et al. 2020; Khaerunnisa et al. 2020; Roshdy et al. 2020), por lo que la estructura de la envoltura viral, como los procesos de internalización y replicación del virus en la célula hospedadora podrían alterarse. Estos resultados apuntan a la potencial actividad antiviral y virucida de curcumina contra este virus.

La infección por SARS-CoV-2 tiene la capacidad de desatar una respuesta inmunológica de carácter aberrante y con aspectos particulares. Estudios con modelos animales de infección por SARS-CoV-2 y perfiles transcriptómicos de células de pacientes con COVID-19, caracterizaron esta respuesta con una baja concentración de interferones tipo I y III y un aumento en la expresión de CK L-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1, que se tradujo en una reducción de la respuesta antiviral innata acoplada a una fuerte reacción inflamatoria (Blanco-Melo et al. 2020). Esta hiperactivación leucocitaria y aumento de la expresión de CK se la designa como síndrome de liberación de citoquinas (CRS, “cytokine release syndrome”). El CRS está implicado en el deterioro de tejidos y órganos, y conduce a la enfermedad hacia fenotipos clínicos graves, predisponiendo el aumento de la inflamación, edema, disnea y hasta fibrosis pulmonar (Blanco-Melo et al. 2020; Soi et al. 2020; Cervera et al. 2020).

Numerosos estudios preclínicos y clínicos notifican la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora de curcumina y sus derivados. En un ensayo aleatorizado, doble ciego, placebo-controlado (RCT) realizado en pacientes con complicaciones pulmonares crónicas derivadas de la intoxicación por mostaza sulfurada; la suplementación con curcuminoides resultó en una mejora de los valores espirométricos, como también en una disminución de los niveles plasmáticos de IL-6, IL-8, TNF α , TGF- β , sustancia P, hs-CRP, CGRP y MCP-1. Estos resultados indican que la suplementación con curcumina disminuye el perfil inflamatorio sistémico acompañado de una significativa mejoría en la función pulmonar (Panahi et al. 2015).

Distintos ensayos *in vitro* e *in vivo* con modelos animales de infección por IAV o reovirus, el tratamiento con curcumina demostró una significativa mejora del daño pulmonar, reflejado en la disminución de los siguientes indicadores: engrosamiento, exudado y destrucción de las paredes alveolares, fibrosis intra-alveolar e intersticial, hemorragia e infiltrados leucocitarios en los espacios alveolares, índice pulmonar, niveles de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , TGF- β , MCP-1 y leucocitos liberadores de CK (macrofragos, monocitos y linfocitos) (Dai et al. 2018; Avasarala et al. 2013). En consecuencia, la reducción de todos estos parámetros culminaría en una disminución del perfil inflamatorio local a nivel pulmonar y alveolar (Dai et al. 2018; Lai et al. 2020; Xu y Liu 2017; Han et al. 2017; Avasarala et al. 2013). Estos hallazgos fueron acompañados de una disminución del título viral y un aumento en la tasa de supervivencia de los animales (Dai et al. 2018).

Uno de los mecanismos más importantes que explica la actividad antiinflamatoria de curcumina es la supresión del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB). Este factor gatilla una respuesta inflamatoria rápida en la línea de células alveolares de tipo 2 (iAT2s) en la infección por SARS-CoV-2, contribuyendo a la posterior muerte celular (Huang et al. 2020). Curcumina bloquea la fosforilación por parte de la I κ B α kinasa (IKK), necesaria para la señalización por ejercida por NF-kB, lo que culmina en la inhibición de la expresión CK (IL-1, IL-6, IL-8, TNF), COX-2, LOX-5, iNOS, factores de adhesión y enzimas claves en la modulación de la respuesta inflamatoria (Jobin et al. 1999; Aggarwal 2004).

Por otro lado, los radicales libres y el estrés oxidativo asociado presentan un rol fundamental en la señalización y homeostasis celular, siendo, a su vez, determinantes del desarrollo fisiopatológico de todo tipo de enfermedades inflamatorias, metabólicas e infecciosas, como cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, cardiomiopatías, incluyendo COVID-19 (Zhang et al. 2016; Forrester et al. 2018; Laforge et al. 2020).

Tanto los extractos como diversos metabolitos presentes en el rizoma de *C. longa* han demostrado actividad antioxidante (Wahyuni et al. 2018; Barzegar y Moosavi-Movahedi 2011).

En simultáneo se reportó que curcumina estimula la expresión del factor de transcripción Nrf2, mediador clave en la ruta de señalización que estimula la producción de enzimas antioxidantes como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px), Hemo oxigenasa 1 (HO-1), NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), glutatión S-transferasa alfa 3 (GSTA3) y demás antioxidantes (Dai et al. 2018; Zhang et al. 2016).

Las enzimas antioxidantes actúan como un arsenal de defensas contra el daño oxidativo, previniendo la desnaturalización y descomposición de macromoléculas, incluyendo lípidos, proteínas y los ácidos nucleicos (ADN y ARN) (Zhang et al. 2016; Forrester et al. 2018). Además de prevenir directamente el daño de los componentes celulares, intervienen en la regulación de otros mediadores, como es el caso de HO-1. Esta enzima demostró que puede interactuar directamente con el factor de transcripción IRF3 y producir un aumento de la expresión de IFN- β (Dai et al. 2018; Tzima et al. 2009), interferón que sufre una reducción de su expresión en COVID-19 (Blanco-Melo et al. 2020). Este efecto se podría traducir en un aumento de la respuesta innata viral frente a la infección por SARS-CoV-2 y otros patógenos virales.

Se conoce que varias especies de radicales libres favorecen la transcripción de NF-kB a través de la regulación de la fosforilación y ubiquitinación de diferentes proteínas (Schoonbroodt et al. 2000; Takada et al. 2003), por lo que la limitación de los radicales libres por parte de las enzimas antioxidantes podría actuar adicionalmente o en sinergia con la capacidad de inhibir la fosforilación de NF-kB por parte de curcumina, actuando en conjunto en la disminución de la expresión de NF-kB.

Estos estudios que respaldan la actividad antiviral, antiinflamatoria y antioxidante de curcumina y sus derivados, los proyectan como potenciales agentes terapéuticos y preventivos frente a COVID-19.

Seguridad y toxicidad

Actualmente, Cúrcuma (tanto el polvo del rizoma como los extractos orgánicos) ha sido categorizado como GRAS (“generally recognized as safe”) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), aprobando su uso como especia, saborizante y colorante alimentario. En paralelo, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) estableció una ingesta diaria admisible (ADI) de curcumina de 3 mg/kg pc/día, basándose en la ausencia de efectos adversos y/o genotoxicidad reportados en bioensayos realizados por entes oficiales. Posteriormente, esta acción fue respaldada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Prasad et al 2014, FDA 2016).

La ingesta media de “cúrcuma” por parte de los asiáticos varía entre 0,5 a 1,5 g/día/persona, dosis que no produce síntomas tóxicos (Chattopadhyay et al. 2004).

La seguridad de los curcuminoides como agente terapéutico o coadyuvante fue evaluada en diversos tipos de ensayos (Soleimani et al. 2017; Chuengsamarna et al. 2014;

Hanai et al. 2006). Los ensayos clínicos en humanos indican que la curcumina es bien tolerada cuando se administra en dosis de 1 a 12 g/día (Chattopadhyay et al. 2004; Lao et al. 2006).

Se han reportado como efectos adversos dermatitis alérgica y reacciones de fotosensibilización (WHO 1999; Prasad et al. 2014)

El uso de “cúrcuma” está contraindicado en caso de obstrucción biliar (WHO 1999).

En líneas generales, *C. longa* y curcumina son consideradas como seguras por un amplio repertorio de estudios preclínicos y clínicos (FDA 2016; Soleimani et al. 2017; Chuengsamarn et al. 2014; Hanai et al. 2006). Es necesario realizar más estudios para poder garantizar su seguridad en mujeres embarazadas, lactantes, adultos mayores y evaluar la interacción con otros fármacos o drogas vegetales.

Consideraciones finales

La “cúrcuma” se ha utilizado desde tiempos ancestrales con diversas aplicaciones biológicas, que motivaron la investigación científica sobre sus posibles aplicaciones terapéuticas.

Aunque se han realizado un sin número de estudios con extractos y polvo de rizoma de *C. longa*, que incluyen ensayos *in vitro*, preclínicos y clínicos, todavía no se han desarrollado fármacos, sólo se encuentran formando parte de suplementos dietarios aprobados en numerosos países, incluso la curcumina como sustancia pura o mezcla de curcuminoides.

Dado que la curcumina se puede obtener en forma pura, sería preferible desarrollar nuevos medicamentos a partir de este compuesto en virtud de la amplia gama de efectos biológicos que ha demostrado. Sin embargo, el potencial terapéutico de curcumina está limitado debido a su escasa biodisponibilidad oral e insuficiente solubilidad en disolventes acuosos que conducen a una pobre absorción, un metabolismo rápido y una rápida eliminación sistémica. Para superar este obstáculo, se han desarrollado numerosas estrategias, desde el diseño de análogos semisintéticos, el uso de adyuvantes, preparación de nanoportadores, nanopartículas, micelas y liposomas, hasta procesos de microencapsulación, que han mejorado su bioactividad y biodisponibilidad, así como una mayor absorción celular en comparación con la curcumina (Soheil et al. 2014, Prasad et al. 2014).

Curcumina es un compuesto natural antioxidante que, por sus efectos antivirales, antiinflamatorios e inmunomoduladores se postula como un posible fármaco para el tratamiento de COVID-19. Sin embargo, es necesario llevar a cabo extensos estudios sobre sus efectos farmacológicos, mecanismos de acción, farmacodinamia, farmacocinética, toxicidad, y principalmente ensayos clínicos.

Referencias bibliográficas

Abdel-Lateef E, Mahmoud F, Hammam O, El-Ahwany E, El-Wakil E, Kandil S, Taleb H, El-Sayed M, Hassenein H (2016). Bioactive chemical constituents of *Curcuma longa* L. rhizomes extract inhibit the growth of human hepatoma cell line (HepG2). Acta Pharm. 66: 387–398.

Aggarwal BB (2004). Nuclear factor- κ B: The enemy within. Cancer Cell. 6(3):203-208.

Ahmed HM (2016). Ethnopharmacobotanical study on the medicinal plants used by herbalists in Sulaymaniyah Province, Kurdistan, Iraq. *J Ethnobiol Ethnomed.* 12:8.

Avasarala S, Zhang F, Liu G, Wang R, London SD, London L (2013). Curcumin Modulates the Inflammatory Response and Inhibits Subsequent Fibrosis in a Mouse Model of Viral- induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *PLoS One.* 8(2):e57285.

Barzegar A, Moosavi-Movahedi AA (2011). Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical-Scavenging Activity of Curcumin. *PLoS One.* 6(10):e26012.

Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB (2015). Curcumin (Diferuloylmethane) Inhibits Constitutive and IL-6-Inducible STAT3 Phosphorylation in Human Multiple Myeloma Cells. *J Immunol.* 171(7):3863-3871.

Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu W, et al (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell.* 181(5):1036-1045.

Bussmann RW, Paniagua Zambrana NY, Romero C, Hart RE (2018). Astonishing diversity—the medicinal plant markets of Bogotá, Colombia. *J Ethnobiol Ethnomed.* 14:43

Cervera R, Espinosa G, Ramos-Casals M, Hernández-Rodríguez J, Prieto-González S, Espígol-Frigolé G, Cid MC (2020). Respuesta Inmunoinflamatoria en la COVID-19. *Editorial Médica Panamericana.*

Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK (2004). Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Current Science.* 87(1): 44-53.

Chen J, Tsai C, Hwang T, Shieh P, Chen J, Sung P (2010). Sesquiterpenes from the rhizome of *Curcuma longa* with inhibitory activity on superoxide generation and elastase release by neutrophils. *Food Chem.* 119:974–980.

Chen M, Lee M, Chuang J, Li Y, Ning S, Chen J, Liu Y (2012). Curcumin inhibits HCV replication by induction of heme oxygenase-1 and suppression of AKT. *Int J Mol Med.* 30:1021-1028.

Choudhary AK, Rahi S (2018). Organic cultivation of high yielding turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivars: a viable alternative to enhance rhizome productivity, profitability, quality and resource-use efficiency in monkey–menace areas of north-western Himalayas. *Industrial Crops & Products.* 124:495–504.

Chuengsamarn S, Rattanamongkolgulb S, Phonratc B, Tungtrongchitr R, Jirawatnotai S (2014). Reduction of atherogenic risk in patients with type 2 diabetes by curcuminoid extract: a randomized controlled trial. *J Nutr Biochem.* 25(2):144-150.

Daia J, Gua L, Sua Y, Wanga Q, Zhaoa Y, Chena X, Denga H, Lib W, Wanga G, Lia K (2018). Inhibition of curcumin on influenza A virus infection and influenzal pneumonia via oxidative stress, TLR2/4, p38/JNK MAPK and NF- κ B pathways. *I Immunopharmacol.* 54: 177-187.

Dairaku I, Han Y, Yanaka N, Kato N (2010). Inhibitory Effect of Curcumin on IMP Dehydrogenase, the Target for Anticancer and Antiviral Chemotherapy Agents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(1):185–187.

Derosa G, Maffioli P, Simental-Mendia LE, Bo S, Sahebkar A (2016). Effect of Curcumin on Circulating Interleukin-6 Concentrations: a Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Pharmacol Res.* 111:394-404.

do Bonfim CM, Monteleoni LF, Calmon CF, et al (2020). Antiviral activity of curcumin-nanoemulsion associated with photodynamic therapy in vulvar cell lines transducing different variants of HPV-16. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 48(1):515-524.

Farhangi B, Alizadeh AM, Khodayari H, Khodayari S, Dehghan MJ, Khori V, Heidarzadeh A, Khaniki M Sadeghizadeh M, Najafi F (2015). Protective effects of dendrosomal curcumin on an animal metastatic breast tumor. *Eur J Pharmacol.* 758:188-196.

Ferreira VH, Nazli A, Dizzel SE, Mueller K, Kaushic C (2015). The Anti-Inflammatory Activity of Curcumin Protects the Genital Mucosal Epithelial Barrier from Disruption and Blocks Replication of HIV-1 and HSV-2. *PLoS One.* 10(4):e0124903.

Food and Drug Administration (FDA) (2016). GRAS Notices No. 686. Sitio web: https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=curcuma Acceso: 19 de marzo, 2020.

Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circul Res.* 122(6):877–902.

Han S, Xu J, Guo X, Huang M (2017). Curcumin ameliorates severe influenza pneumonia via attenuating lung injury and regulating macrophage cytokines production. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 45(1):84-93.

Hanai H, Iida T, Takeuchi K, et al (2006). Curcumin Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis: Randomized, Multicenter, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 4(12):1502-1506.

Hashem RM, Soliman HM, Shaapan SF (2008). Turmeric-based diet can delay apoptosis without modulating NF- κ B in unilateral ureteral obstruction in rats. *J Pharm Pharmacol.* 60(1):83-89.

Hong J, Bose M, Ju J, Ryu J, Chen X, Sang S, Lee m, Yang CS (2004). Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related β -diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A2, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis.* 25(9):1671-1679.

Huang j, Hume AJ, Abo KM, et al (2020). SARS-CoV-2 Infection of Pluripotent Stem Cell-Derived Human Lung Alveolar Type 2 Cells Elicits a Rapid Epithelial-Intrinsic Inflammatory Response. *Cell Stem Cell.* 27(6):962-973.

Jennings MR, Parks RJ (2020). Antiviral Effects of Curcumin on Adenovirus Replication. *Microorganisms.* 8(10):1524.

Jobin C, Bradhman CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA, Balfour Sartor R (1999). Curcumin Blocks Cytokine-Mediated NF- κ B Activation and Proinflammatory Gene Expression by Inhibiting Inhibitory Factor I- κ B Kinase Activity. *J Immunol.* 163:3474-3483.

Khaerunnisa S, Kurniawan H, Awaluddin R, Suhartati S, Soetjipto S (2020). Potential Inhibitor of COVID-19 Main Protease (Mpro). *Preprints.* 2020030226.

Kima HJ, Yoo HS, Kima JC, et al (2009). Antiviral effect of *Curcuma longa* Linn extract against hepatitis B virus replication. *J Ethnopharmacol.* 124:189-196.

Kumar V, Abbas AK, Nelson F (2005). *Pathologic Basis of Disease.* Elsevier, Saunders Company.

- Kutluay SB, Doroghazi J, Roemer ME, Triezenberg SJ (2008). Curcumin inhibits herpes simplex virus immediate-early gene expression by a mechanism independent of p300/CBP histone acetyltransferase activity. *Virology*. 373:239–247.
- Laforge M, Elbim C, Frère C, et al (2020). Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nature Reviews Immunol*. 20:515–516.
- Lai Y, Yan Y, Liao S, et al (2020). 3D-quantitative structure–activity relationship and antiviral effects of curcumin derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 neuraminidase. *Arch Pharm Res*. 43: 489–502.
- Leong-Skornickova J, Sida O, Jarolimova V, Sabu M, Fer T, Travnicek P, Suda J (2007). Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae). *Ann Bot Lond*. 100:505–526.
- Li H, Zhong C, Wang Q, Chen W, Yuan Y (2019). Curcumin Is an APE1 Redox Inhibitor and Exhibits an Antiviral Activity Against KSHV Replication and Pathogenesis. *Antivir Res*. 167:98-103.
- Li Y, Wang J, Liu Y, Luo X, Lei W, Xie L (2020). Antiviral and virucidal effects of curcumin on transmissible gastroenteritis virus in vitro. *J Gen Virol*. 101(10):1079-1084.
- Liu CH, Abrams ND, Carrick DM, et al (2017). Biomarkers of chronic inflammation in disease development and prevention: challenges and opportunities. *Nat Immunol*. 18(11):1175-1180.
- Maher DM, Bell MC, O'Donnell EA, Gupta BK, Jaggi M, Chauhan SC (2011). Curcumin Suppresses Human Papillomavirus Oncoproteins, Restores p53, Rb, and PTPN13 Proteins and Inhibits Benzo[a]pyrene-Induced Upregulation of HPV E7. *Mol Carcinog*. 50(1):47-57.
- Mazumder A, Raghavan K, Weinstein J, Kohn KW, Pommier Y (1995). Inhibition of Human Immunodeficiency virus type-1 Integrase by Curcumin. *Biochem Pharmacol*. 49(8): 1165-1170.
- Mounce BC, Cesaro T, Carrau L, Vallet T, Vignuzzi M (2017). Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. *Antiviral Res*. 142:148-157.
- Nabila N, Suada NK, Denis D, et al (2020). Antiviral Action of Curcumin Encapsulated in Nanoemulsion against Four Serotypes of Dengue Virus. *Pharm Nanotechnol*. 8(1):54-62.
- Obata K, Kojima T, Masaki T, et al (2013). Curcumin Prevents Replication of Respiratory Syncytial Virus and the Epithelial Responses to It in Human Nasal Epithelial Cells. *PLoS One*. 8(9):e70225.
- Odonne G, Valadeau C, Alban-Castillo J, Stien D, Sauvain M, Bourdy G (2013). Medical ethnobotany of the Chayahuita of the Paranapura basin (Peruvian Amazon). *J Ethnophar*. 146:127-153.
- Panahi Y, Ghanei M, Bashiri S, Hajhashemi A, Sahebkar A (2015). Short-term Curcuminoid Supplementation for Chronic Pulmonary Complications due to Sulfur Mustard Intoxication: Positive Results of a Randomized Double-blind Placebo-controlled Trial. *Drug Res*. 65:567–573.
- Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB (2014). Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnol Adv*. 32(6):1053-1064.
- Razafindraibe M, Kuhlman AR, Rabarison H, et al (2013). Medicinal plants used by women from Agnalazaha littoral forest (Southeastern Madagascar). *J Ethnobiol Ethnomed*. 9:73
- Roshdy WH, Rashed HA, Kandeil A, et al (2020). EGYVIR: An immunomodulatory herbal extract with potent antiviral activity against SARS-CoV-2. *PLoS One*. 15(11):e0241739.

Satya Prasada N, Raghavendraa R, Lokesh BR, Akhilender Naidua K (2004). Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 70(6):521-528.

Schmidt BM, Ribnický DM, Lipsky PE, Raskin I (2007). Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. Nat Chem Biol. 3(7):360-366.

Schoonbroodt S, Ferreira V, Best-Belpomme M, Boelaert JR, Legrand-Poels S, Korner M, Piette J (2000). Crucial Role of the Amino-Terminal Tyrosine Residue 42 and the Carboxyl-Terminal PEST Domain of I κ B α in NF- κ B Activation by an Oxidative Stress. J Immunol. 164:4292-4300.

Singh AG, Kumar A, Tewari DD (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Terai forest of western Nepal. J Ethnobiol Ethnomed. 8:19.

Sirirugsa P, Larsen K, Maknoi C (2007). The Genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae): Distribution and Classification with Reference to Species Diversity in Thailand. Gard Bull Singapore. 59 (1&2):203-220.

Soleimani V, Sahebkar A, Hosseinzadeh H (2018). Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. Phytother Res. 32(6):985-995.

Soy M, Keser G, Atagündüz P, Tabak F, Atagündüz I, Kayhan S (2020). Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. Clin Rheumatol. 39(7):2085-2094.

Stanojević JS, Stanojević LP, Cvetković DJ, Danilović BR (2015). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Turmeric Essential Oil (*Curcuma longa* L.). Adv Tech. 4(2):19-25.

Sui Z, Salto R, Li J, Craik C, Ch-tiz de Montellano PR (1993). Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 Proteases by Curcumin and Curcumin Boron Complexes. Bioorg Med Chem. 1(6): 415-422.

Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB (2003). Hydrogen Peroxide Activates NF-B through Tyrosine Phosphorylation of IB and Serine Phosphorylation of p65. J Biol Chem. 278(26):24233–24241.

The Plant List (2021). *Curcuma* L. Sitio web:

<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Zingiberaceae/Curcuma/>. Acceso: 19 de marzo, 2020.

Tzima S, Victoratos P, Kranidioti K, Alexiou M, Kollias G (2009). Myeloid heme oxygenase-1 regulates innate immunity and autoimmunity by modulating IFN- β production. J Exp Med. 206(5):1167-1179.

Velayudhan KC, Dikshit N, Abdul Nizar M (2012). Ethnobotany of turmeric (*Curcuma longa* L.). Indian J of Traditional Knowledge. 11(4):607-614.

von Rhein C, Weidner T, Henß L, Martin J, Weber C, Sliva K, Schnierle BS (2016). Curcumin and Boswellia serrata gum resin extract inhibits chikungunya and vesicular stomatitis virus infections in vitro. Antiviral Res. 125:51-57.

Wahyuni DSC, Artanti AN, Rinanto Y (2018). Quantitative analysis of Curcuminoid collected from different location in Indonesia by TLC-Densitometry and its antioxidant capacity. IOP Conference Series Materials Science and Engineering. 349(1):012015.

Wen C, Kuo Y, Jan J, et al (2007). Specific Plant Terpenoids and Lignoids Possess Potent Antiviral Activities against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. J Med Chem. 50:4087-4095.

World Health Organization Geneva (1999). WHO monographs on selected medicinal plants -Vol. 1, pp. 115-124. WHO Sitio web: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42052>.

Wu ZY, Raven PH (2000). Flora of China Vol. 24 (Flagellariaceae through Marantaceae): pp 361. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. Sitio web: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200028370.

Wua J, Houc W, Caoa B, Zuo T, Xuea C, Leung AW, Xu C, Tang Q (2015). Virucidal efficacy of treatment with photodynamically activated curcumin on murine norovirus bio-accumulated in oysters. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 12(3): 385-392.

Xu Y, Liu L (2017). Curcumin alleviates macrophage activation and lung inflammation induced by influenza virus infection through inhibiting the NF- κ B signaling pathway. *Influenza Other Respir Viruses.* 11(5):457-463.

Yromo RY, Ikawati M, Meiyanto E (2020). Revealing the Potency of Citrus and Galangal Constituents to Halt SARS-CoV-2 Infection . Preprints. 2020030214.

Yuan J, Liu R, Ma Y, Zhang Z, Xiel Z (2018). Curcumin Attenuates Airway Inflammation and Airway Remodeling by Inhibiting NF- κ B Signaling and COX-2 in Cigarette Smoke-Induced COPD Mice. *Inflammation.* 41(5):1804-1814.

Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2016:4350965.