

Actividad antiviral contra el SARS-CoV-2 empleando extractos de *Ficus Carica* y *Plectranthus amboinicus* / Antiviral activity against SARS-CoV-2 using extracts of *Ficus Carica* and *Plectranthus amboinicus*.

RESUMEN

El SARS-CoV-2 es el responsable de la enfermedad COVID-19, que ha causado más de 765 millones de casos y 6,9 millones de muertes en todo el mundo. Hasta la fecha no se ha desarrollado un tratamiento específico. Una estrategia para diseñar medicamentos antivirales específicos contra el SARS-CoV-2 es inhibir enzimas claves implicadas en el ciclo viral, como las proteasas 3CLpro y PLpro. En este estudio se evaluó la capacidad de extractos seleccionados de las plantas de la higuera (*Ficus carica*) y el orégano orejón (*Plectranthus amboinicus*) para inhibir la infección de SARS-CoV-2 en células Vero E6. Los resultados mostraron que los extractos de la higuera inhibieron significativamente la replicación viral al reducir el número de copias virales determinadas mediante qRT-PCR y disminución en las unidades formadoras de placas mediante ensayos de reducción de placas líticas, mientras que los extractos de orégano orejón no mostraron una inhibición significativa en estos ensayos. Además, se evaluó el potencial viricida de los extractos de la higuera cuyos resultados sugieren que estos extractos podrían interactuar con la glicoproteína de la espiga evitando su internalización a la célula. En conclusión, los extractos de *F. carica* tienen considerable actividad antiviral, pudiendo ser consecuencia de la afectación de diferentes etapas del ciclo de replicación, lo que sugiere su potencial como fuente de compuestos antivirales contra el SARS-CoV-2.

Palabras claves: COVID-19, SARS-CoV-2, Vero E6, *Ficus carica*, *Plectranthus amboinicus*, PLpro, 3CLpro

Abstract

SARS-CoV-2 is responsible for the disease COVID-19, which has caused more than 765 million cases and 6.9 million deaths worldwide. To date, no specific treatment has been developed. One strategy to design specific antiviral drugs against SARS-CoV-2 is to inhibit key enzymes involved in the viral cycle, such as the 3CLpro and PLpro proteases. In this study, the ability of selected extracts of fig tree (*Ficus carica*) and oregano orejón (*Plectranthus amboinicus*) plants to inhibit SARS-CoV-2 infection in Vero E6 cells was evaluated. The results showed that fig tree extracts significantly inhibited viral replication by reducing the number of viral copies determined by qRT-PCR and decreased plaque-forming units by lytic plaque reduction assays, while oregano extracts did not showed significant inhibition in these assays. In addition, the viricidal potential of the fig extracts was evaluated, the results of which suggest that these extracts could interact with the spike glycoprotein, preventing its internalization into the cell. In conclusion, extracts from *F. carica* have considerable antiviral activity, which may be a consequence of affecting different stages of the replication cycle, suggesting their potential as a source of antiviral compounds against SARS-CoV-2.

INTRODUCCIÓN

A finales del 2019 se detectó un nuevo tipo de coronavirus denominado SARS-CoV-2 causante de la enfermedad COVID-19 (Hu y col., 2021) causando más de 765 millones de infectados y entre 6,9 y 20 millones de muertes, de acuerdo con actualizaciones epidemiológicas de la Organización Mundial para la Salud (OMS, 2023). El SARS-CoV-2 pertenece al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, género *Betacoronavirus* y subgénero *Sarbecovirus*. El tamaño de su genoma es de aproximadamente 30 kb (Kim y col., 2020; Wang y col., 2020). La glicoproteína de la espiga (S), situada en la membrana del coronavirus comprende dos regiones funcionales S1 y S2. La región S1 contiene el dominio N-terminal (NTD) y el dominio de unión al receptor (RBD) que interactúa con ACE2, presente en la membrana de la célula hospedadora (Wang, 2020). La región S2 es responsable de la fusión virus célula, cuya unión a ACE2 por RBD es el primer paso en la infección por el virus (Hanson y col., 2020).

La proteasa TMPRSS2 en la célula huésped activa la proteína S al hidrolizar el enlace peptídico en los sitios S1/S2, dando lugar a cambios conformacionales que facilitan que el virus se fusione con la membrana del huésped y entre al citoplasma (Glowacka y col., 2011; Hoffmann y col., 2020). Una vez el SARS-CoV-2 ha internalizado libera su ARN genómico en el interior de la célula en donde se replica y es co-traducido por la maquinaria celular, el gen *ORF1ab* es traducido a dos poliproteínas, pp1a y pp1ab, las cuales son escindidas en unidades funcionales por dos cisteínas proteasas, PLpro (proteasa similar a la papaína) codificada por *nsp3* formando nsp1 a nsp3 y Mpro [del inglés *Main protease*, también conocida como proteasa similar a 3 quimi tripsina (3CLpro)] codificada por *nsp5* formando nsp4 a nsp16, incluida la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP). Estas proteínas no estructurales formadas participan en la transcripción, replicación del ARN viral, morfogénesis de los viriones, interferencia con la síntesis de proteínas del huésped y evasión inmune (Yadav y col., 2021). Por lo que es posible diseñar y desarrollar fármacos antivirales específicos para el SARS-CoV-2 al dirigirlos a enzimas y proteínas claves implicadas en la replicación viral, entre ellas las proteasas 3CLpro y PLpro, nsp12 y RdRP (Elshabrawy, 2020).

Actualmente la Administración de alimentos y drogas de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó el medicamento Veklury (remdesivir) y autorizó el uso de emergencia de los fármacos Paxlovid (nirmatrevir y ritonavir) y Lagevrio (molnupiravir), el uso de estos medicamentos es recomendado en pacientes con formas leves o moderadas de COVID-19 que presentan un riesgo mayor de hospitalización (FDA, 2023; OMS, 2022). También se encuentran aprobados por la FDA pero solo para pacientes adultos hospitalizados con COVID-19 Actemra (Tocilizumab) y Olumiant (baricitinib) (FDA, 2023). El fármaco remdesivir se desarrolló originalmente para el tratamiento del virus del ébola, este inhibe la replicación de una amplia gama de coronavirus humanos y animales *in vitro*, en el SARS-CoV-2 inhibe la RdRP (Santoro y Carafoli, 2021). Por otro lado, el medicamento Paxlovid está compuesto por nirmatrelvir un inhibidor irreversible de Mpro (3CLpro) ocasionando que no se puedan escindir las poliproteínas pp1a y pp1b claves en la replicación viral (Vangeel y col., 2022), además presenta ritonavir usado para mantener y aumentar la concentración del inhibidor de proteasa en el plasma (Moyle y Back, 2001). El molnupiravir es otro medicamento antiviral que se dirige contra la RdRP

del SARS-CoV-2 inhibiendo su replicación (Lee y col., 2021), Fountain-Jones y colaboradores (2022) encontraron evidencias de que el tratamiento con monupiravir puede estar conduciendo a potenciales variantes que podrían prolongar la pandemia, ya que este medicamento al estar dirigido contra la RdRP induce mutaciones en el genoma viral. Al mismo tiempo hay que tomar en cuenta consideraciones como costos de producción, distribución, interacción con otros medicamentos, efectos adversos en los pacientes (Conti y col., 2022) y que proteasas clave como 3CLpro están bajo una fuerte presión selectiva en la población humana que probablemente contribuirán a una resistencia a los medicamentos (Flynn y col., 2022), por lo tanto, se mantiene la búsqueda de nuevos inhibidores capaces de bloquear la actividad antiviral del SARS-CoV-2, en este sentido el objetivo de este trabajo es determinar el potencial inhibitorio, de extractos de las plantas *Ficus carica* y *Plectranthus amboinicus*, sobre la replicación del SARS-CoV-2 *in vitro*, como primer paso en el proceso de purificación biodirigida de la o las moléculas con actividad antiviral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Todos los cultivos y ensayos con el virus se realizaron en el laboratorio de bioseguridad nivel 3 (BSL3) del *Laboratorio de Virología Molecular* (LVM) del IVIC, de acuerdo con las condiciones establecidas en bioseguridad en los laboratorios microbiológicos y biomédicos.

- **Virus:** Se empleó el aislado viral de SARS-CoV-2 linaje B.1.1.33 (Bolívar 6AV) previamente aislado y purificado a partir de un paciente positivo a COVID-19 y almacenado a -80°C en el LVM del IVIC.
- **Extractos de plantas:** Los extractos empleados se prepararon a partir del macerado de las hojas de cada planta y se obtuvieron con solventes de distinta polaridad, estos fueron suministrados por el *Laboratorio de Productos Naturales* de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. El extracto seco de las hojas de la planta de *P. amboinicus* fue extraído con diclorometano y se denominó PA-D. Los extractos secos de las hojas de la planta *F. carica* se denominaron FC-D al obtenido con diclorometano y FC-M al obtenido con metanol. Se disolvieron los extractos secos en DMSO, a partir de estos se tomaron alícuotas para obtener las concentraciones de interés para los ensayos realizados.
- **Línea celular:** Se dispuso de la línea celular Vero E6 (N° ATCC CRL-1586), las cuales fueron transformadas para expresar en su membrana ACE2, utilizadas en el LVM del IVIC. Esta línea celular se cultivó en medio RPMI 1640 con L-Glutamina y 1% de antibiótico y antimicótico, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). El cultivo celular se realizó en condiciones de esterilidad en una campana de seguridad biológica clase II y fue mantenido en incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

Actividad citotóxica.

La viabilidad celular ante concentraciones crecientes de los extractos de interés se evaluó según los protocolos descritos por Mosmann (1983) y Ortega y colaboradores (2017). En resumen, se sembraron, en placas de 96 pocillos 20.000 cel/pozo incubando en atmósfera de CO₂ al 5 % toda la noche, al día siguiente se les cambió y se añadió medio fresco con las concentraciones de extractos a evaluar y posterior a 24 horas de incubación se determinó el efecto mediante el uso del ensayo de viabilidad basado en MTT (Sigma-Aldrich, USA)

Evaluación de la actividad antiviral

En placas de 96 pocillos pre-sembradas el día anterior con 20.000 cel/pozo se evaluó el efecto antiviral de las siguientes concentraciones de todos los extractos: 5, 10, 25, 50, 100, 200 y 400 µg/ml. De manera simultánea a la adición de los compuestos a las células se añadió el inóculo viral a una multiplicidad de infección de 0,01, El conjunto se incubó durante 1 h a 37°C y 5% CO₂, tiempo después del cual se retiró el medio y cada pozo se lavó dos veces con buffer salino fosfato (PBS), para retirar los virus no internalizados, posteriormente se añadió medio fresco con las concentraciones de extractos correspondientes manteniendo así la presión del extracto natural durante las siguientes 72 horas antes de hacer las mediciones mediante la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real (qRT-PCR), con la ayuda del estuche comercial 2019-nCoV (Sansure Biotech, Changsha, China), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Adicionalmente se realizó el mismo ensayo, pero esta vez en placas de 24 pocillos utilizando 200.000 cel/pozo, pero posterior al paso de lavado el medio de cultivo conjuntamente con los extractos naturales se añadió en presencia de carboximetil celulosa. En este caso la determinación de los efectos antivirales se determinó por conteo de placas líticas posterior a la fijación con formaldehído y tinción con cristal violeta (Ortega y col, 2019)

Análisis de datos estadísticos

Se realizó análisis descriptivo de los datos obtenidos de cada ensayo. Se realizó varianza de una vía (ANOVA) para determinar si existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas de los extractos, valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos, se realizó post test de Dunnett de múltiples comparaciones. Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 9, valores de IC50 se determinaron mediante análisis de regresión no lineal usando un modelo sigmoideal. El índice de selectividad (IS) se calculó según la tasa CC50/IC50.

RESULTADOS

Citotoxicidad de los extractos PA-D, FC-D y FC-M en células Vero E6.

Se obtuvo que empleando los extractos de la higuera (FC-D y FC-M) y el orégano orejón (PA-D) en concentraciones que van de 5 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas en las células Vero E6, la viabilidad celular obtenida fue superior al 85%. En la figura 1, se muestra porcentaje de viabilidad celular según concentración de los extractos FC-D, FC-M y PA-D. $\text{CC}_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$.

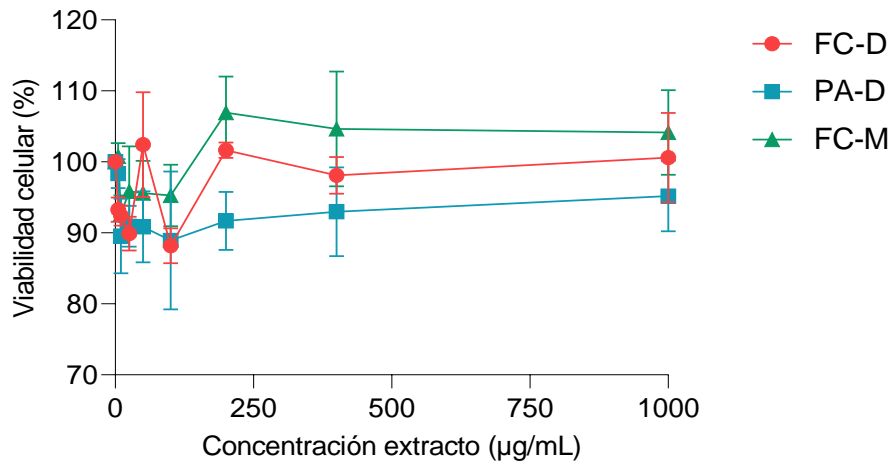


Figura 1. Citotoxicidad de los extractos empleados de *Ficus carica* y *Plecthrantus amboinicus* en Vero E6. Viabilidad de Vero E6 transcurridas 24 horas del tratamiento con los extractos (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se muestra la media \pm SEM ($n=4$, $p > 0,05$).

Efecto de los extractos FC-D, FC-M y PA-D ante la infección con SARS-CoV-2 en las células Vero E6 y su evaluación mediante qRT-PCR.

Se procedió a evaluar la eficacia antiviral de los extractos determinando el número de copias de ARN viral en el sobrenadante celular mediante qRT-PCR. En la figura 2 se obtuvo una correlación en la reducción del número de copias virales y la dosis empleada de los extractos FC-D ($r = -0,95$, $p = 0,0003$) y FC-M ($r = -0,94$, $p = 0,0004$). Con PA-D no se obtuvo esta correlación dosis respuesta ($r = -0,55$, $p = 0,151$). Se realizó ANOVA indicando que en los extractos de la higuera hay diferencias significativas entre las medias del número de copias de cada concentración evaluada ($p < 0,0001$). Un test post hoc de Dunnet mostró que tanto el extracto FC-D y FC-M difieren significativamente del control de infección a partir de la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figura 3).

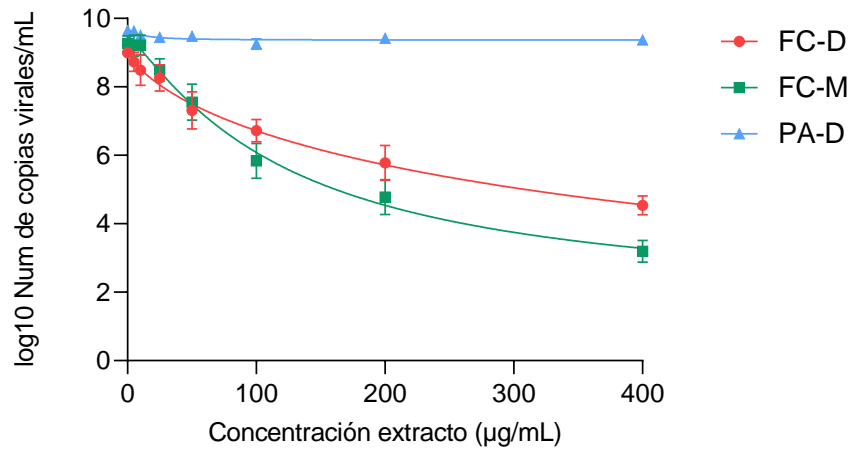


Figura 2. Log10 de Número de copias virales vs Concentración de los extractos FC-D, FC-M y PA-D. Se muestra la media \pm SEM (n=4).

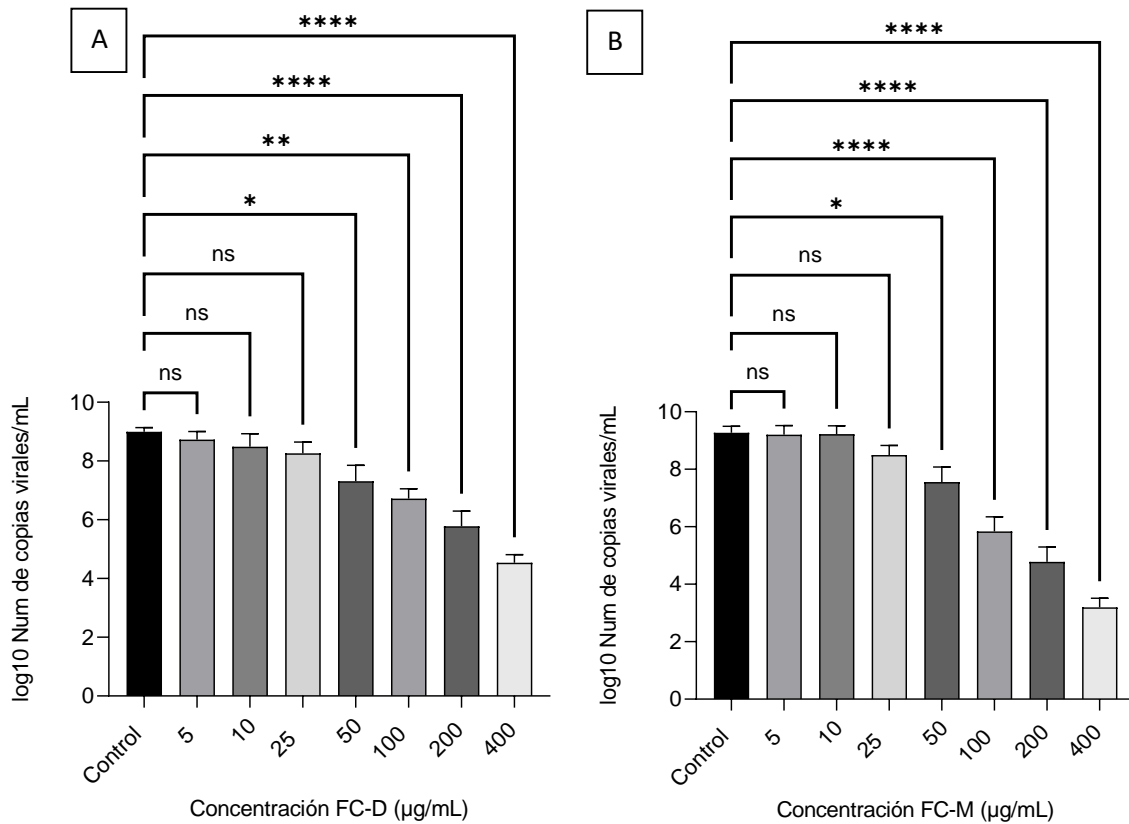


Figura 1. Reducción en el número de copias virales/mL de SARS-CoV-2 Bolívar 6AV en células Vero E6 en co-tratamiento con los extractos de la higuera, FC-D y FC-M (5 a 100 µg/mL). Se muestra la media \pm SEM (n=4).

Partiendo de estos datos se determinó el porcentaje de inhibición viral siendo referencia las células infectadas sin extracto (figura 4). FC-D y FC-M presentaron IC50 de 23,01 $\mu\text{g/mL}$ y 24,76 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, PA-D no presentó IC50 con las concentraciones empleadas (tabla 2). Por otro lado, el porcentaje de inhibición de PA-D es menor a 50% en concentraciones de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ contra el SARS-CoV-2 Bolívar 6AV.

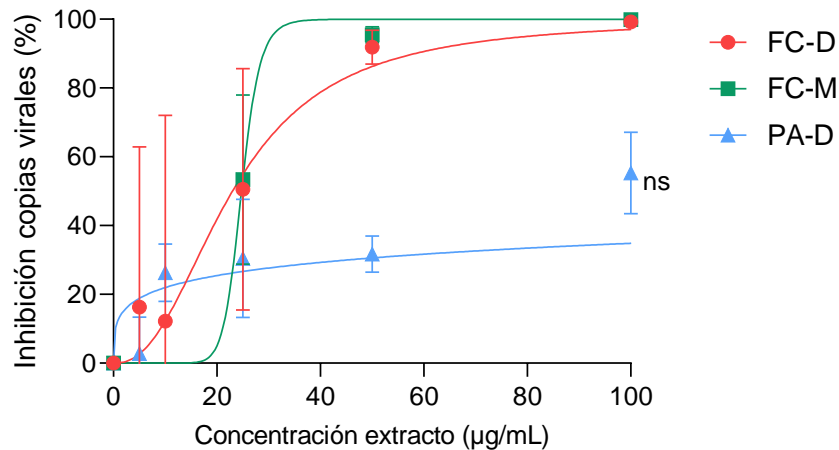


Figura 2. Porcentaje de inhibición del aislado viral SARS-CoV-2 Bolívar 6AV al emplear los extractos de *F. carica*, FC-D y FC-M y *P. amboinicus* PA-D a distintas concentraciones. ns: no significativo.

Tabla 1. IC50 e IS obtenidos en el ensayo de infección empleando qRT-PCR.

Extracto	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	Índice de selectividad (IS)
FC-D	23,01	>43,46
FC-M	24,76	>40,38
PA-D	No determinada	No aplica

Efecto de los extractos FC-D, FC-M y PA-D ante la infección con SARS-CoV-2 en las células Vero E6 y su evaluación mediante placas líticas.

Transcurridas 72 horas del tratamiento virus y extracto, se expresó el porcentaje de inhibición viral como la diferencia entre el tratamiento y el control positivo, en la tabla 3 se aprecia una reducción de la replicación viral del SARS-CoV-2 en células Vero E6 empleando los extractos de *F. carica*. Mientras que para el extracto PA-D de *P. amboinicus*, no se detectó inhibición de las placas formadas respecto al control la inhibición viral a 100 $\mu\text{g/mL}$ fue de $7,1 \pm 14,1\%$. En la tabla 4, se muestra resumen de IC50 e IS.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición \pm SEM obtenido el ensayo de reducción de placas líticas empleando los extractos de la higuera (FC-D y FC-M) y del orégano orejón (PA-D). (Co-tratamiento).

Concentración del extracto ($\mu\text{g/mL}$)	FC-D	FC-M	PA-D
5	21,7 \pm 3,2	10,6 \pm 2,0	2,9 \pm 7,5
10	34,7 \pm 21,6	25,8 \pm 14,3	10,8 \pm 14,5
25	46,7 \pm 21,7	34,7 \pm 13,2	11,6 \pm 15,7
50	63,1 \pm 1,3	47,0 \pm 27,2	10,4 \pm 10,6
100	91,3 \pm 2,0	67,1 \pm 1,1	7,1 \pm 14,1

Tabla 4. IC50 e IS obtenidos en el ensayo de reducción de placas líticas (Co-tratamiento).

Extracto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Índice de selectividad (IS)
FC-D	22,37	44,70
FC-M	49,33	20,27
PA-D	No determinada	No aplica

Efecto de los extractos FC-D y FC-M ante el SARS-CoV-2 (Pre-tratamiento).

En la tabla 5 se muestran los resultados de inhibición en la formación de placas líticas al pre-tratar al virus con los extractos de la higuera. En la figura 5 se muestran las UFP/mL obtenidas, al realizar el test post hoc de Dunnet se obtuvo diferencias significativas entre las concentraciones empleadas y el control de infección.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición \pm SEM obtenido el ensayo de reducción de placas líticas empleando los extractos de la higuera (FC-D y FC-M) (Pre-tratamiento).

Concentración del extracto ($\mu\text{g/mL}$)	FC-D	FC-M
5	81,7 \pm 2,4	82,7 \pm 7,5
30	96,9 \pm 1,5	87,4 \pm 15,0
100	99,4 \pm 0,8	92,6 \pm 4,7

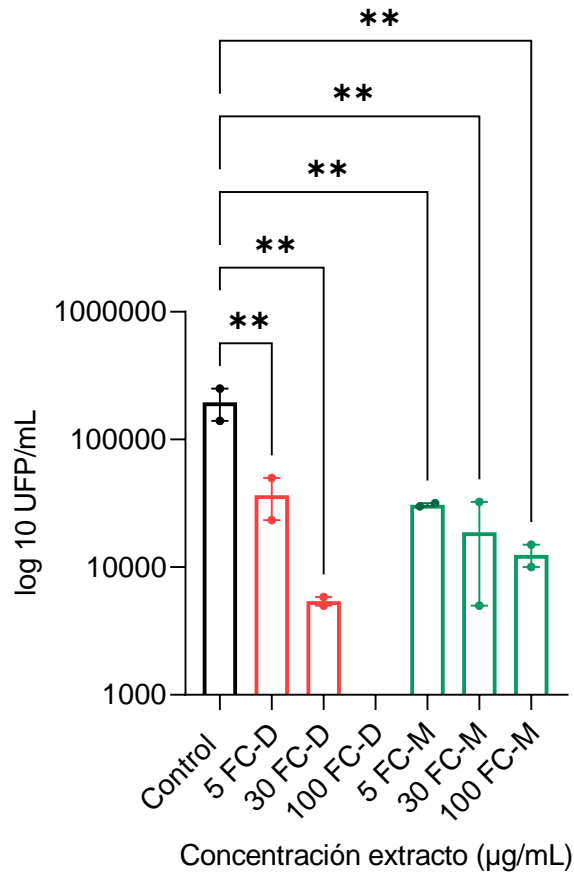


Figura 53. Reducción en el número de UFP/mL de SARS-CoV-2 Bolívar 6AV en células Vero E6. El virus antes de incubarlo con las células se trató previamente con los extractos de la higuera, FC-D y FC-M (5 a 100 µg/mL).

DISCUSIÓN

La infección por el SARS-CoV-2 es, en la actualidad, una de las principales enfermedades virales a nivel mundial. Para encontrar fármacos antivirales efectivos es importante continuar la búsqueda de compuestos activos, una fuente importante de nuevas moléculas con bioactividad son las plantas. Las plantas del orégano y la higuera tienen amplio uso en distintas afecciones. De acuerdo con la Organización Internacional para la Estandarización (ISO 10993:5-2009), la viabilidad superior al 80%, encontrada en este trabajo, es indicativo que las concentraciones empleadas de los extractos no son tóxicas en esta línea celular. Resultados similares de citotoxicidad con extractos de *Ficus* con CC50 > 1000 µg/mL fueron obtenidos por Yarmolinsky y colaboradores (2004) y Lazreg y colaboradores (2011). Se obtuvo que a concentraciones crecientes de los extractos FC-D y FC-M la viabilidad celular superó el 100%, probablemente por la presencia de fitoquímicos que estimulan el crecimiento y división celular en células Vero E6, Lazreg y colaboradores (2011) observaron el mismo efecto en la viabilidad celular, pero en extractos metanólicos del látex de *F. carica*.

La actividad antiviral evaluada mediante qRT-PCR, considerada el estándar de oro para el diagnóstico de las infecciones con SARS-CoV-2, arrojó que los extractos de la higuera indujeron una reducción significativa en el número de copias del ARN viral de una manera dependiente de la concentración, presentando FC-D, IC₅₀ = 23,01 µg/mL y FC-M, IC₅₀ = 24,76 µg/mL con un índice de selectividad (IS) de 43,46 y 40,38, respectivamente. A pesar de que esta técnica aporta alta sensibilidad y especificidad solo detecta el material genético del virus y no proporciona información directa sobre la capacidad infecciosa del mismo. Por lo que, para confirmar estos resultados, se realizó el ensayo de reducción de placas líticas y así confirmar la presencia de virus infecciosos y no residuales, a pesar de ser una técnica altamente laboriosa, sigue siendo útil para cuantificar las UFP (Baer y Kehn-Hall, 2014). Se obtuvo que FC-D presentó un IC₅₀ = 22,37 µg/mL similar al obtenido mediante qRT-PCR sin embargo, FC-M presentó IC₅₀ = 49,33 µg/mL casi el doble al ensayo anterior, con un IS de 44,70 y 20,27 respectivamente. Estos resultados indican que FC-D presenta un mejor perfil farmacológico al ser más eficiente y seguro contra el SARS-CoV-2 en células Vero E6 al tener un mayor IS, también implica que el principio activo es más afín a la polaridad aprótica del diclorometano, aunque no se descarta presencia en los extractos metánolicos, que bien pudiera ser un compuesto o combinaciones de estos, los que estén ejerciendo la actividad antiviral. De acuerdo con Vaya y Mahmood (2006), los flavonoides que están en mayor cantidad en extractos etanólicos de las hojas de *Ficus carica*, son quercetina (630.8 ± 26.3 mg/Kg de extracto) y luteolina (680.8 ± 28.4 mg/Kg de extracto), ambos con muy baja solubilidad en agua.

Varios estudios reportan propiedades antivirales de la quercetina y luteolina, uno de estos correspondiente a Wu y colaboradores (2015), muestran que la quercetina presenta actividad inhibitoria en la etapa temprana de la infección por influenza al interactuar con la glicoproteína hemaglutinina haciendo que no ocurra la fusión célula-virus. Basado en esto la quercetina podría estar uniéndose directamente a la glicoproteína de la espiga e inhibir la interacción con ACE2, interrumpiendo así la interfaz de reconocimiento viral-huésped y evitando la entrada del SARS-CoV-2 a la célula. Otro estudio realizado por Mamouni y colaboradores (2018), encontraron que una formulación estandarizada de luteolina, quercetina y kaempferol, de manera sinérgica inhibían significativamente la expresión de TMPRSS2. Resultados recientes sugieren que la combinación de quercetina con curcumina, en pacientes con COVID-19 en etapas tempranas, pueden resultar en una rápida negativización en comparación al grupo control (Ujjan y col., 2023)

En el ensayo de pre-tratamiento, al incubar el virus con los extractos de la higuera antes de emplearlo en las células fue determinante ya que evidenció que los extractos de la higuera causan inactivación y/o destrucción viral al reducir la formación de placas líticas respecto al control de infección, de hecho, FC-D presento inhibición superior al 99% contra el SARS-CoV-2 Bolívar 6AV en la concentración de 100 µg/mL, siendo estadísticamente significativa la inhibición en la replicación viral en ambos extractos de *F. carica* a partir de concentraciones de 5 µg/mL.

Khaerunnisa y colaboradores (2020) realizando ensayos *in silico* con quercetina sugieren que esta podría inhibir a la 3CLpro. Por otro lado, Abdizadeh y colaboradores (2020), muestran que la cumarinas en *F. carica* son potentes inhibidores de la proteasa 3CLpro del SARS-CoV-2. Otro posible blanco al que los compuestos presentes en *F.*

carica podrían afectar es la enzima RdRP, estudios realizados de *docking* molecular por Munafò y colaboradores (2022) reportan una mayor actividad inhibitoria de la luteína y quercetina ante la RdRP que los IC50 reportados ante 3CLpro. Un punto importante a considerar es que a pesar de ser la quercetina y la luteolina las principales moléculas encontradas en extractos de *Ficus carica*, existen otros compuestos que pudieran ser los responsables parciales de la actividad antiviral aquí descrita.

Se sugiere que la inhibición causada por los extractos, podría ser consecuencia de la afectación de diferentes etapas del ciclo de replicación, por lo que las actividades de estos compuestos prevendrían la infección viral además de que esta actividad inhibitoria sería independiente de la variante del SARS-CoV-2.

Respecto al extracto PA-D de *Plectranthus amboinicus* no se detectó actividad antiviral al no disminuir significativamente la cantidad de número de copias de ARN viral ni al reducir la formación de placas líticas.

CONCLUSIONES

La búsqueda de compuestos bioactivos contra diversas enfermedades y/o patógenos es una constante de muchos laboratorios y de la industria farmacéutica. En este trabajo se demuestra la actividad antiviral contra SARS-CoV-2, *in vitro*, de extractos de orgánicos de la planta *Ficus carica*, nuestros resultados concuerdan con trabajos previos donde se demostró que extractos de esta planta no mostraron toxicidad *in vitro*, por otro lado la actividad antiviral de este extracto podría ser consecuencia de la presencia de varias moléculas como quercetina, luteolina, cumarinas, entre otras, que podrían ser las responsables de la actividad antiviral, sin embargo se requieren más ensayos para determinar cuál o cuáles son las moléculas con dicha actividad contra SARS-CoV-2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdizadeh, R., Hadizadeh, F., & Abdizadeh, T. (2022). *In silico* analysis and identification of antiviral coumarin derivatives against 3-chymotrypsin-like main protease of the novel coronavirus SARS-CoV-2. *Molecular diversity*, 26(2), 1053–1076.

Baer, A., y Kehn-Hall, K. (2014). Viral concentration determination through plaque assays: Using traditional and novel overlay systems. *Journal of Visualized Experiments*, 93.

Center for Drug Evaluation, & Research. (2023). *Coronavirus* (COVID-19). U.S. Food and Drug Administration; FDA. Recuperado el 15 de marzo de 2023, de <https://www.fda.gov/drugs/emergency-preparedness-drugs/coronavirus-covid-19-drugs>

Conti, V., Sellitto, C., Torsiello, M., Manzo, V., De Bellis, E., Stefanelli, B., Bertini, N ... Filippelli, A. (2022). Identification of Drug Interaction Adverse Events in Patients With COVID-19: A Systematic Review. *JAMA Netw Open*, 5(4):e227970.

Elshabrawy, H. A. (2020). SARS-CoV-2: An update on potential antivirals in light of SARS-CoV antiviral drug discoveries. *Vaccines*, 8(2), 335.

Flynn, J., Samant, N., Schneider-Nachum, G., Barkan, D., Yilmaz, N., Schiffer, C., Moquin, S., Dovala, D., Bolon, D. (2022). Comprehensive fitness landscape of SARS-CoV-2 Mpro reveals insights into viral resistance mechanisms. *eLife*, 11, e77433.

Fountain-Jones, N. M., Vanhaeften, R., Williamson, J., Maskell, J., Chua, I.-L. J., Charleston, M., & Cooley, L. (2022). Antiviral treatments lead to the rapid accrual of hundreds of SARS-CoV-2 mutations in immunocompromised patients. *En medRxiv* (p. 2022.12.21.22283811)

Glowacka, I., Bertram, S., Müller, MA., Allen, P., Soilleux, E., Pfefferle, S., Steffen, I., Tsegaye, TS., He, Y., Gnirss, K., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2011). Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol*.85(9):4122-34.

Hanson, Q., Wilson, K., Shen, M., Itkin, Z., Eastman, R., Shinn, P., & Hall, M. (2020). Targeting ACE2-RBD interaction as a platform for COVID-19 therapeutics: Development and drug-repurposing screen of an AlphaLISA proximity assay. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 3(6), 1352–1360.

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.e8.

Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(3), 141-154.

ISO 10993-5:2009. (2022). ISO. <https://www.iso.org/standard/36406.html>. Recuperado el 23 de marzo de 2023.

Khaerunnisa, S., Kurniawan, H., Awaluddin, R., Suhartati, S., & Soetjipto, S. (2020). Potential inhibitor of COVID-19 main protease (Mpro) from several medicinal plant compounds by molecular docking study. *En Preprints*.

Kim, D., Lee, JY., Yang, JS., Kim, JW., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, 181(4), 914–921.e10.

Lazreg, H. (2011). In vitro antiviral activities of Jrani capri fig latex and its related terpenes. *African Journal of Microbiology Research*, 5(32), 5812–5818.

Lee, C., Hsieh, C & Ko, W. (2021). Molnupiravir a novel oral anti-SARS-CoV-2 agent. *Antibiotics*. 10(11): 1294.

Mamouni, K., Zhang, S., Li, X., Chen, Y., Yang, Y., Kim, J., Bartlett, M. G., Coleman, I. M., Nelson, P. S., Kucuk, O., & Wu, D. (2018). A novel flavonoid composition targets androgen receptor signaling and inhibits prostate cancer growth in preclinical models. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 20(8), 789–799.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63.

Moyle, G., & Back, D. (2001). Principles and practice of HIV-protease inhibitor pharmacoenhancement: HIV-protease inhibitor pharmacoenhancement. *HIV Med*, 2(2), 105–113.

Munafò, F., Donati, E., Brindani, N., Ottonello, G., Armirotti, A., & De Vivo, M. (2022). Quercetin and luteolin are single-digit micromolar inhibitors of the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase. *Scientific Reports*, 12(1), 10571

Organización Mundial para la Salud. (2023). Coronavirus Disease (COVID-2019) Weekly epidemiological update on COVID-19. Recuperado el 30 de marzo de 2023, de <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---30-march-2023>

Organización Mundial para la Salud. (2022). WHO recommends highly successful COVID-19 therapy and calls for wide geographical distribution and transparency from originator. Recuperado el 29 de agosto de 2022, de <https://www.who.int/news/item/22-04-2022-who-recommends-highly-successful-covid-19-therapy-and-calls-for-wide-geographical-distribution-and-transparency-from-originator>

Ortega, JT., Suárez, Al., Serrano, ML., Baptista, J., Pujol, FH & Rangel, HR. (2014). The role of the glycosyl moiety of myricetin derivatives in anti-HIV-1 activity in vitro. *AIDS Res Ther.* 14(1):57

Santoro, M & Carafoli, E. (2021). Remdesivir: From Ebola to COVID-19. *Biochem Biophys Res Commun*, 538, 145–150.

Ujjan, I. D., Khan, S., Nigar, R., Ahmed, H., Ahmad, S., & Khan, A. (2022). The possible therapeutic role of curcumin and quercetin in the early-stage of COVID-19-Results from a pragmatic randomized clinical trial. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1023997.

Vangeel, L., Chiu, W., De Jonghe, S., Maes, P., Slechten, B., Raymenants, J., André, E., Leyssen, P., Neyts, J., & Jochmans, D. (2022). Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. *Antiviral Research*, 198(105252).

Vaya, J., & Mahmood, S. (2006). Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *BioFactors (Oxford, England)*, 28(3–4), 169–175.

Wang, M.Y., Zhao, R., Gao, L.J., Gao, X.F., Wang, D.P., & Cao, J.M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. 587269.

Wu, W., Li, R., Li, X., He, J., Jiang, S., Liu, S., & Yang, J. (2015). Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. *Viruses*, 8(1), 6.

Yadav, R., Chaudhary, J. K., Jain, N., Chaudhary, P. K., Khanra, S., Dhamija, P., Sharma, A., Kumar, A., & Handu, S. (2021). Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells (Basel, Switzerland)*, *10*(4), 821.

Yarmolinsky, L., Zaccai, M., Ben-Shabat, S., Mills, D., & Huleihel, M. (2009). Antiviral activity of ethanol extracts of *Ficus binjamina* and *Lilium candidum in vitro*. *New Biotechnology*, *26*(6), 307–313