**CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EXTRACTOS DE CHILES (*Capsicum* spp)**

**CYTOTOXICITY AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF PEPPER EXTRACTS (*Capsicum* spp)**

**RESUMEN**

En este trabajo se evaluaron la citotoxicidad y la actividad antiviral en contra del virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1) de extractos de chile Jalapeño, Serrano, Guajillo, Ancho, Pimiento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*.) y Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), así como de los fenilpropanoides, ácidos fenólicos y flavonoides puros que fueron identificados por HPLC-MS en los extractos de chile. La concentración que causa el 50 % de toxicidad en células Vero fue determinada (CC50) así como el potencial antiviral de los extractos de chiles y de los compuestos puros, expresado como la concentración inhibitoria del 50 % (CI50) en contra de los efectos citopáticos en células Vero infectadas con el virus. El índice de selectividad fue calculado como la relación de CC50 entreCI50. El extracto de Pimiento mostró las más baja citotoxicidad (CC50= 9.82 ± 0.06 mg/mL) y la más alta actividad antiviral (IC50= 0.56 ± 0.02 mg/mL), con el mayor índice de selectividad de 17.5. Los extractos de chile Ancho y Guajillo mostraron también una alta capacidad antiviral. El extracto de chile Habanero presentó la mayor citotoxicidad y el menor índice de selectividad. Los compuestos fenólicos presentes en los extractos también mostraron actividad antiviral, lo que sugiere que pueden ser estos compuestos los responsables de la actividad antiviral de los chiles.

*Palabras clave*: *Capsicum* spp., citotoxicidad, actividad antiviral, compuestos fenólicos.

**SUMMARY**

In this work cytotoxicity and antiviral activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) were evaluated for the pepper extracts of Jalapeño, Serrano, Guajillo, Ancho and Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*.) and Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), as well as for pure phenylpropanoids and flavonoids previously identified in the peppers. The concentration causing 50% toxicity in Vero cells was also determined (CC50). The antiviral potential of pepper extracts and pure compounds was expressed as the concentration required to achieve 50 % protection against cytopathic effects in Vero cells (IC50) infected with HSV-1. The selective index was calculated as the ratio of the CC50 to IC50.  The Sweet Pepper extract showed the lowest cytotoxicity (CC50= 9.82 ± 0.06 mg/mL) and the highest antiviral activity (IC50= 0.56 ± 0.02 mg/mL), with the highest selective index of 17.5. High antiviral capacities were also observed for Ancho and Guajillo. The Habanero pepper extract presented the highest cytotoxicity and the lowest selective index. Phenolic compounds also showed antiviral activity and are probably responsible for the antiviral properties of pepper extracts.

*Key words*: *Capsicum* spp, cytotoxicity, antiviral activity, phenolic compounds.

**INTRODUCCIÓN**

Los chiles contienen una serie de fitoquímicos como: compuestos fenólicos, carotenoides, clorofilas, capsaicinoides, además de vitaminas C, A y E (Wahyuni et al., 2011). Los chiles han sido estudiados por presentar actividades biológicas, Oboh & Batista (2007) estudiaron la capacidad antioxidante de extractos acuosos de chile Tepin (*Capsicum annuum*) y Habanero (*Capsicum chinense*) rojo y verde. Los extractos de chile Tepin presentaron la mayor inhibición de la peroxidación lipídica-inducida por Fe2+ debido probablemente a la capacidad de quelación del Fe2+ por su alto contenido de compuestos fenólicos.

Dorantes et al. (2000) evaluaron el efecto de tres variedades de chile sobre la inhibición de bacterias patógenas, los extractos presentaron efecto inhibitorio sobre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus y* *Salmonella* Typhimurium, Moreno-Limón et al (2012) reportaron un efecto antifúngico de extractos etanólicos de chili piquín (*Capsicum annuum* L. var. *aviculare*) contra *Aspergillus flavus.*

Por otro lado, el virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1), perteneciente a la familia *Herpesviridae,* es un virusde ADN lineal de doble cadena de 152 Kpb, envuelto, que causa una de las principales infecciones virales en humanos y puede provocar complicaciones como encefalitis y conjuntivitis (Roizman et al*.,* 2007). Aunque existen compuestos antivirales como el aciclovir, penciclovir y valaciclovir, la emergencia de la resistencia de algunas cepas virales, particularmente en personas inmuno-comprometidas y neonatos, ha conducido a la investigación de algunos extractos y agentes anti-herpéticos alternativos. Considerando que los extractos de algunas variedades de *Capsicum* spp. han mostrado actividad antibacteriana y antifúngica, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la citotoxicidad y la actividad antiviral contra herpes simplex tipo 1 de extractos de seis variedades de chile.

**MATERIALES Y METODOS**

Los compuestos ácido gálico, ácido caféico, luteolina, ácido *para*-cumárico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido *trans*-cinámico, kaempferol, rutina, quercetina, suero fetal bovino y 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-. 2,5 difenil bromuro de tetrazolio (MTT) fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, USA).

**Obtención de los extractos**

Las variedades de los chiles estudiados fueron: Jalapeño, Serrano, Guajillo, Ancho, Pimiento (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*.) y Habanero (*Capsicum chinense* Jacq*)*. Los chiles fueron lavados y los pedúnculos se eliminaron; posteriormente todos los chiles fueron liofilizados (Freezone 18, Labconco Co., Kansas City, MO). 100 g de cada uno de los chiles se molieron con 400 mL de etanol- agua (80:20) en un homogenizador (Termomix, Mexico), después se agitaron durante 15 min a 60 °C, posteriormente la mezcla se centrifugó a 10000 rpm por 15 min. El sobrenadante fue colectado y filtrado con papel Whatman No. 1. Los extractos fueron sometidos a evaporación para remover el etanol a 50 ºC en un rotavapor (Büchi R-205, Switzerland). Finalmente los extractos fueron liofilizados y guardados a -20 ºC hasta su uso.

**Línea celular**

Las células Vero (células de riñon de mono verde africano ATCC® CCL-81) fueron sembradas y mantenidas en medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 0.59 % de solución buffer HEPES (4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinaetansulfónico), 0.37 % de bicarbonato de sodio, 2 mM de piruvato de sodio y 10 % de suero fetal bovino, e incubadas a 37 ºC en atmosfera de 5% CO2.

**Virus herpes simplex tipo 1**

Para la evaluación de la actividad antiviral se utilizó el virus herpes simplex tipo 1 (cepa viral de referencia KOS, ATCC® VR-1493).

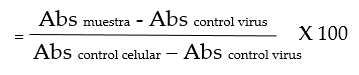
**Ensayo de citotoxicidad para determinar CC50**

Para determinar la citotoxicidad de los extractos de chile y los compuestos fenólicos se realizó el siguiente procedimiento: 1.5 × 104 células/pozo de células Vero fueron sembradas en una microplaca de 96 pozos, y se incubaron durante 24 h a 37 ºC en una atmosfera de 5% de CO2. Una vez transcurridas las 24 horas, el medio fue retirado y sustituido por medio de cultivo adicionado con los extractos o compuestos fenólicos. Fueron evaluadas cinco concentraciones diferentes para los extractos (0.5, 1, 5, 10 y 15 mg/mL) y compuestos fenólicos (0.05, 0.1. 0.2, 0,4 y 0.8 mg/mL).

Se realizaron seis replicas para cada concentración. La microplaca se dejó en incubación 24 h a 37 ºC en atmosfera de 5% de CO2. Como control positivo se agregaron 10 µL de buffer de lisis (incluido en el kit CytoTox 96®) a los pozos asignados como control de células lisadas y se incubó a 37º C por 45 minutos. Se utilizó el kit CytoTox 96® Promega G-1780, Madison, WI, USA. El kit mide la enzima lactato deshidrogenasa que es liberada durante la lisis celular. El ensayo por medio de un acoplamiento enzimático da como resultado la conversión de una sal de tetrazolio a formazan (color rojo). La cantidad de color formado es proporcional al número de células lisadas. Se tomaron 50 µL de cada sobrenadante y se traspasaron a microplaca. Se agregaron 50 µL/pozo del -Substrate Mix- del kit de Cytotox 96 y se incubó 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Se agregaron 50 µL/pozo de la -Stop Solution- del kit y se incubó por 1 h. La absorbancia fue leída a 490 nm. La concentración citotóxica se informa como la concentración que causa el 50% de muerte celular (CC50) esto derivado de una regresión no lineal a partir de las concentraciones evaluadas.

**Ensayo de actividad antiviral para determinar CI50**

La actividad antiviral fue evaluada empleando el ensayo colorimétrico MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) de acuerdo a lo descrito por Savi, Barardi, & Simões (2006). En una microplaca de 96 pozos se sembraron: 1.5 × 104 células/pozo por 24 h a 37ºC en una atmosfera de 5% de CO2. Posteriormente el medio fue eliminado y cinco concentraciones (que previamente se evaluaron para dar una viabilidad de 80% o más), de extractos o compuestos fenólicos, se añadieron al igual que 100 TCID50 (dosis infectivas del 50 % de cultivo celular del virus). Los ensayos se realizaron con seis réplicas de cada concentración. La microplaca se dejó en incubación a 37 ªC en atmosfera de 5 % de CO2 por 72 horas. Después el medio fue retirado, 100 µL de una solución de MTT (1 mg/mL) fue agregada a cada pozo y la microplaca fue incubada durante 4 h a 37 º C; la solución de MTT se eliminó y se añadieron 100 µL de dimetilsulfoxido para disolver los cristales de formazán. La absorbancia fue determinada usando un lector de placas a 540 nm. El porcentaje de inhibición de la infección fue calculada en base a la siguiente relación:



Donde:

Abs muestra: Corresponde a la absorbancia de la muestra evaluada (células, virus y muestra)

Abs control: Absorbancia del control viral de VHS-1 (células infectadas con el virus)

Abs control celular: Absorbancia del control células (células no infectadas)

Aciclovir fue utilizado como control positivo. La concentración inhibitoria al 50 % fue determinada por medio de una regresión no lineal obtenida a partir de la relación dosis-respuesta.

**Índice de selectividad**

El índice de selectividad fue calculado con base a la relación de la concentración citotóxica al 50 % y la concentración inhibitoria al 50 % (CC50/CI50)

**Modo de acción de los extractos y compuestos**

Con objeto de investigar en qué etapa del ciclo replicativo del virus actúan los extractos o compuestos fenólicos, se consideraron 3 posibles modos de acción de acuerdo a lo descrito por Schnitzler et al. (2010) , quienes estudiaron extractos de propóleo como antivirales. Los modos de acción investigados fueron: 1) pretratamiento celular, en el cual las células Vero se incubaron con el extracto o compuestos durante 1 h previo a la infección viral, 2) pretratamiento viral o, en el cual el extracto o compuestos fueron incubados junto con el virus durante 1 h previo a la infección viral, 3) en la fase de replicación del virus, donde se agregaron los extractos o compuestos post-infección. En todos los casos el porcentaje de inhibición fue determinado a partir del ensayo colorimétrico de MTT.

**Efecto del tiempo de adición de los extractos**

Otro de los aspectos que se consideraron en el presente trabajo fue el efecto de la adición de los extractos y compuestos a diferentes tiempos después de la infección (0.5, 1, 1.5, 2, 4 y 24 h) de acuerdo a lo descrito por Chiang, Chiang, Liu, & Lin (2003). Después de 72 h el porcentaje de inhibición se determinó por el ensayo colorimétrico MTT previamente descrito.

**Identificación de compuestos fenólicos por HPLC-MS-ESI**

Los extractos fueron analizados utilizando un equipo de Cromatografía Líquida de Ultra-Alta Resolución marca Ultimate 3000 (Dionex Corp, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas. El análisis cromatógrafico se llevó a cabo por medio de una columna C18 fase inversa (longitud de 250 × 4.6 mm de diámetro y 5 μm de diámetro de partícula) a un flujo de 0.3 mL/min usando un volumen de inyección de 20 μL. La fase móvil consistió en: fase A (agua/ ácido fórmico 99:1 v/v) y fase B (acetonitrilo) con el siguiente gradiente: 10-60 % (B) de 0 a 10 min; 60-90 % (B) de 10-15 min, 90-10% (B) de 15-17 min; y 10 % (B) de 17-19 min. Los extractos fueron disueltos en metanol grado HPLC y filtrados en una membrana de 0.45 µm. El análisis de masas fue realizado en un espectrómetro de masas marca Bruker micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) con ionización por electrospray, con una temperatura de la fuente de 200 °C y un flujo del gas de 11 L/min. El análisis de masa varió de 50 to 3000 m/z. Los compuestos fenólicos fueron analizados en modo negativo (ESI-). Las masas fueron procesadas usando el software Bruker Compass Data Analysis 4.0.

**Análisis estadístico**

Los resultados se reportan como el promedio de las réplicas ± su desviación estándar. Para el análisis de los resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA), las pruebas Tukey y Dunnet fueron usadas para comparar el promedio entre grupos usando el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 6.0.

**RESULTADOS**

En el **Cuadro 1** se presentan los resultados de la concentración de extractos de *Capsicum* que causa el 50 % de muerte en células Vero (CC50). El extracto de chile habanero presentó los valores más altos de citotoxicidad con una CC50=1.60 ± 0.04 mg/mL; los extractos de chile Guajillo y Ancho presentaron valores intermedios (CC50 = 7.42 ± 0.06 y 6.38 ± 0.09 mg/mL, respectivamente). El extracto de Pimiento fue el mejor tolerado por las células Vero, presentando una citotoxicidad de CC50=9.82 ± 0.06 mg/mL. La citotoxicidad de los otros extractos de chiles estudiados fueron: para el Jalapeño 2.06 ± 0.08 mg/mL y para el Serrano 2.11 ± 0.08 mg/mL.

Con respecto a la actividad antiviral, en el **Cuadro 1** se muestran los resultados obtenidos de la concentración de extractos de chile que causan el 50% de inhibición del virus en el cultivo celular. El extracto de Pimiento presentó la mejor actividad antiviral con una CI50 =0.56 ± 0.03 mg/mLy un índice de selectividad de 17.5. El extracto de chile Guajillo presentó una CI50= 1.03 ± 0.02 mg/mL, con índice de selectividad de 7.2, seguido por el extracto de chile Ancho (CI50=1.15 ± 0.02 mg/mL, IS=5.5), Jalapeño (IS=0.9), Serrano (IS=0.9), y Habanero (IS=0.5).

Los resultados del modo de acción de los extractos se presentan en la **Figura 1**. Cuando las células Vero fueron pre-tratadas con extractos antes de la infección viral, el extracto de Pimiento presentó una inhibición del 52 %, el extracto de chile Guajillo de 31.1%, Ancho de 18.3%, Jalapeño de 17.4 %, Habanero de 14.8 % y Serrano de 10.1 %. Cuando el virus se inoculó durante una hora con cada extracto de chile y después se añadió a las células se incrementó la inhibición, el extracto de Pimiento presentó un porcentaje de inhibición de 98.2, Guajillo 96.4%, Ancho, 93.3 % Serrano 32.7 %, Jalapeño 29.1 % y Habanero 24.2 %. En la fase de replicación no se presentó un efecto antiviral significativo en ningún extracto de chile evaluado.

Con respecto a la adición de extractos de *Capsicum* a diferentes tiempos después de la infección se observó que fueron efectivos cuando se añadían a las 0.5, 1.0, 1.5, y 2 h post-infección; empleando las concentraciones de 0.9, 1.8 y 3.6 mg/mL de los extractos más eficientes, que fueron Pimiento, Guajillo y Ancho. Con la menor concentración probada 0.9 mg/mL, el extracto de Pimiento presentó una inhibición del 92.3 %, a diferencia de los extractos de chile Guajillo y Ancho presentaron una inhibición de 52 % y 48.3 %, respectivamente. Cabe destacar que los extractos de los tres chiles en la concentración más alta de 3.6 mg/mL, inhibieron al 100 % el virus herpes simplex tipo 1 (**Figura 2)**. Los extractos de Guajillo y Ancho alcanzan un efecto inhibitorio mayor del 80 % con una concentración de 1.8 mg/mL. En los tres casos después de las dos horas post-infección no se observa ningún efecto de los extractos de chiles, sobre la inhibición del virus VHS-1.

Con objeto de identificar los compuestos responsables de la actividad antiviral, presentes en los extractos de *Capsicum* se empleó cromatografía HPLC-MS. En el **Cuadro 2** se presentan los compuestos identificados para cada extracto. Los compuestos identificados en el extracto de Pimiento (el cual presentó la mejor actividad antiviral), fueron: ácido *t*-cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido caféico, quercetina, luteolina, kaempferol y rutina. Se observa que los ácidos caféico y ferúlico, así como los flavonoides kaempferol y quercetina fueron identificados en los 6 extractos analizados.

La citotoxicidad y la actividad antiviral de los fenólicos y flavonoides identificados se muestran en el **Cuadro 3.**  La luteolina presentó la citotoxicidad más baja (CC50 = 0.38 ± 0.02 mg/mL), seguido de la quercetina (CC50 = 0.33 ± 0.03 mg/mL) y ácido *trans*-cinámico (CC50 = 0.23 ± 0.01 mg/mL). Los dos compuestos que presentaron la mejor actividad antiviral fueron el ácido *t*-cinámico, el cual presentó la mayor actividad con una CI=0.015 ± 0.003 mg/mL e índice de selectividad de 15.4, seguido por la quercetina con una CI50 = 0.034 ± 0.003 mg/mL y un índice de selectividad de 9.7.

Con el fin de aportar datos sobre el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos en la inhibición del virus, se ensayaron diferentes condiciones para la actividad antiviral. Como en el caso de los extractos, los compuestos se añadieron: 1) en pretratamiento celular, 2) pretratamiento del virus y 3) replicación. En el caso de pretratamiento celular los ácidos fenólicos presentaron una inhibición de 18.5% para ácido *t*-cinámico, los flavonoides, como rutina presentaron 15.2% y quercetina 58.6 %. El ácido *trans*-cinámico y la quercetina presentan una actividad significativa contra el virus herpes simplex cuando se incubaron en contacto directo con el virus (pretratamiento virus). Una inhibición del 92.3 % presentó el ácido *t*-cinámico y quercetina del 95.2 %. Cuando los compuestos se añadieron en la fase de replicación, no se observó ningún efecto **(Figura 3)**.

**DISCUSIÓN**

La infección de VHS-1 es una de las principales enfermedades virales a nivel mundial, la resistencia de algunas cepas a los fármacos de referencia ha llevado al estudio de otros compuestos con la propiedad de inhibir la infección. Extractos de plantas y sus partes (hoja, fruto, tallo, raíz) han sido evaluados sobre diferentes virus ya sea de ADN o ARN reportando efectos promisorios como alternativa de tratamiento. Como primer paso se evaluó la citotoxicidad de los 6 extractos de chile, esta prueba es determinante ya que con los resultados obtenidos se conoce la concentración no tóxica para las células y que puede ser utilizada en la evaluación de actividad antiviral.

La citotoxicidad de los extractos de los chiles Pimiento, Guajillo y Ancho fue menor que la obtenida para 8 extractos de plantas, que reportan un valor de CC50 en el intervalo de 0.61 (*Sloanea guianensis*) y 3.00 (*Glycine max*) mg/mL en células Vero (Müller et al., 2007). Suárez et al. (2010) estudiaron la citotoxicidad de extractos de pulpa de manzana, en el caso de extractos acetónicos se reportó una CC50=5.5 mg/mLy para extractos metanólicos una CC50= 7.3 mg/mL. Comparativamente, los extractos de Pimiento, Guajillo y Ancho presentaron una menor citotoxicidad que los extractos de semilla de soya y de pulpa de manzana.

Los índices de selectividad obtenidos en este trabajo para los extractos de Ancho, Guajillo, y Pimiento son similares a los reportados para otras plantas; como son: *Alamanda schottii* (hoja) IS=2.6, *Alamanda schottii* (flores) IS=2.4, *Sloanea guianensis* IS=4.4*,* y *Moringa oleifera* IS= 8.8 (Lipipun et al., 2003; Müller et al., 2007). Además un índice de selectividad semejante ha sido reportado por Suárez et al. (2010) para el caso de los extractos metanólicos de pulpa de manzana, que presentaron un índice de selectividad de 9.5 (en herpes simplex tipo 1) y 11.6 (en herpes simplex tipo 2). Cabe destacar que el extracto de chile pimiento comparativamente con todos los ejemplos anteriores mostró el mejor índice de selectividad como antiviral contra el virus del herpes simplex.

Los extractos de Pimiento, Ancho y Guajillo presentaron una actividad significativa contra el VHS cuando se incuban en contacto directo con el virus (**Figura 1**). En el primer caso, los extractos parecen modificar la capacidad del virus para penetrar en las células huésped. Schnitzler et al. (2010) investigaron el efecto de extractos de propóleos (acuosos y etanólicos) contra herpes y obtuvieron un efecto antiviral cuando VHS-1 se incubó con los extractos antes de ser inoculado en las células, tampoco encontraron efectos significativos cuando se añadieron los extractos después de la penetración viral. A los compuestos identificados por HPLC-MS también se les realizaron ensayos de citotoxicidad y de actividad antiviral, siendo el ácido *trans*-cinámico y la quercetina los que presentaron mejores índices de selectividad, seguidos por luteolina, ácido ferúlico, kaempferol y rutina **(Figura 3)**. Gravina et al. (2011) estudiaron *in vitro* la actividad antiviral de quercetina, morina y de ácido *trans*-cinámico contra el virus herpes equino tipo 1 (EHV-1). La quercetina mostró actividad virucida y presentó efecto en el ciclo replicativo a las primeras horas de la infección, los autores sugirieron que este compuesto tiene un efecto sobre receptores de las células mediante su desestabilización o actuando como un inhibidor competitivo para el virus.

Se observó que los compuestos estudiados tuvieron efecto antiviral en el pretratamiento viral y no tuvieron efecto en la etapa de replicación del virus, a diferencia del aciclovir, el cual fue utilizado como testigo positivo. Este hecho puede explicarse por la diferencia en la estructura molecular de los antivirales. El aciclovir es un análogo de nucleósido, y su mecanismo antiviral implica la inhibición de la ADN polimerasa, en la fase de replicación. En cambio, la actividad antiviral de los compuestos fenólicos, parece deberse a la capacidad de estos compuestos para unirse a las proteínas y formar complejos. La capacidad de los compuestos fenólicos para unirse a proteínas ha sido previamente estudiada; el grupo fenólico es un excelente donante de hidrógeno, que forma enlaces de hidrógeno con los grupos carboxilo de las proteínas (Ozdal, Capanoglu, & Altay, 2013). Formica & Regelson, (1995) encontraron que la actividad antiviral de quercetina también se relaciona con su capacidad para unirse a proteínas virales e interferir con la síntesis de ácido nucleico viral.

**CONCLUSIÓN**

El índice de selectividad del extracto de Pimiento fue el más alto entre los extractos evaluados, además los extractos de Guajillo y Ancho mostraron una efectividad similar a la de extractos de otras plantas con efectos antivirales reportados anteriormente en la literatura. Se demostró que los compuestos quercetina y ácido *t*-cinámico presentes en los extractos fueron los más eficaces contra la infección del virus del herpes simplex tipo 1. Los resultados sugieren que estos compuestos, así como los tres extractos de chile (Pimiento, Ancho y Guajillo) potencialmente pueden ser usados ​​como agentes antivirales contra VHS-1.

**AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de posgrado otorgada. Al Instituto Politécnico Nacional por las becas COFFA y EDI. A la SIP-IPN por el apoyo derivado de los proyectos 20181349, 20160927 y 20171016.

Chiang, L. C., Chiang, W., Liu, M. C., & Lin, C. C. (2003). In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *52*(2), 194–8. http://doi.org/10.1093/jac/dkg291

Dorantes, L., Colmenero, R., Hernandez, H., Mota, L., Jaramillo, M. E., Fernandez, E., & Solano, C. (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal of Food Microbiology*, *57*(1–2), 125–128. http://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00216-6

Formica, J. ., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of Quarcetin and Related Bioflavonoids. *Food, Chemistry and Toxicology*, *33*(12), 1061–1080.

Gravina, H. D., Tafuri, N. F., Silva Júnior, A., Fietto, J. L. R., Oliveira, T. T., Diaz, M. A. N., & Almeida, M. R. (2011). In vitro assessment of the antiviral potential of *trans*-cinnamic acid, quercetin and morin against equid herpesvirus 1. *Research in Veterinary Science*, *91*(3), e158-62. http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.11.010

Lipipun, V., Kurokawa, M., Suttisri, R., Taweechotipatr, P., Pramyothin, P., Hattori, M., & Shiraki, K. (2003). Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, *60*(3), 175–180. http://doi.org/10.1016/S0166-3542(03)00152-9

Moreno-Limón, S., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Ávila, M. L., Hernández-Piñero, J. L., & Núñez-González, M. a. (2012). Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín (*Capsicum annuum* L. var. aviculare) sobre el crecimiento in vitro de *Aspergillus flavus*. *Polibotánica*, *34*, 171–184.

Müller, V., Chávez, J. H., Reginatto, F. H., Zucolotto, S. M., Niero, R., Navarro, D., Simões, C. M. O. (2007). Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. *Phytotherapy Research PTR*, *21*(10), 970–974. http://doi.org/10.1002/ptr

Oboh, G., & Batista, J. (2007). Polyphenols in red pepper [ *Capsicum annuum* var . aviculare ( Tepin )] and their protective effect on some pro-oxidants induced lipid peroxidation in brain and liver, 239–247. http://doi.org/10.1007/s00217-006-0410-1

Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, *51*(2), 954–970. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009

Roizman, B., Knipe, D.M., Whitley, R.J. 2007. Herpes simplex viruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Fields Virology, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 2501–2601

Savi, L. A, Barardi, C. R. M., & Simões, C. M. O. (2006). Evaluation of antiherpetic activity and genotoxic effects of tea catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(7), 2552–2557.

Schnitzler, P., Neuner, A., Nolkemper, S., Zundel, C., Nowack, H., Sensch, K. H., & Reichling, J. (2010). Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds, *24*, 20–28. http://doi.org/10.1002/ptr

Suárez, B., Álvarez, Á. L., García, Y. D., Barrio, G. Del, Lobo, A. P., & Parra, F. (2010). Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food Chemistry*, *120*, 339–342. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.073

Wahyuni, Y., Ballester, A.-R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., & Bovy, A. G. (2011). Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry*, *72*(11–12), 1358–70. http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.03.016

