



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud
División de Estudios de Postgrado e Investigación
Facultad de Odontología, Ciencias Odontológicas Básicas

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTI TR VIH-1 Y ANTI CANDIDIALES DE *Heteropterys brachiata*

TESIS

Que para optar por el grado de:
Maestría en Ciencias

Presenta

Biol. Getsemaní Sinaí Villanueva Amador

Tutor

Dr. Luis Alberto Gaitán Cepeda
Lab. Patología Clínica y Experimental,
Div. Estudios de Posgrado e Investigación.
Fac. de Odontología, UNAM.

Co-tutor:

Dra. Maira Estrella Huerta Reyes
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas, Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social

Asesor

Dr. Luis Octavio Sánchez Vargas
Laboratorio de Bioquímica y Microbiología Oral, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Ciudad de México, Noviembre 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca para mis estudios con el número de CVU 928551 y Número de Becario de Nivel Maestría: 726153

Se agradece el apoyo y recursos para la realización de este trabajo mediante el PROYECTO IMSS número: FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/104 y con título “EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTI TR VIH-1 Y ANTICANDIDALES DE *HETEROPTERYS BRACHIATA*”

A la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas, Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social y la Dra. Maira Estrella Huerta Reyes

Al Laboratorio de Patología Clínica y Experimental, DEPeI, Facultad de Odontología, UNAM y al Dr. Luis Alberto Gaitán Cepeda

Al Laboratorio de Bioquímica y Microbiología Oral, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí y al Dr. Luis Octavio Sánchez Vargas

DEDICATORIAS

"Following enormous conjecture in the press, I wish to confirm that I have been tested HIV positive and have Aids, I felt it correct to keep this information private in order to protect the privacy of those around me. However, the time has now come for my friends and fans around the world to know the truth, and I hope everyone will join with me, my doctors and all those worldwide in the fight against this terrible disease,"

Freddie Mercury (Farrokh Bulsara), 1991

Para cada persona que atravesó esta temible noticia.

*"Oh yes I'm the great pretender (ooh ooh)
Pretending I'm doing well (ooh ooh)
My need is such I pretend too much
I'm lonely but no one can tell"*

Fragmento, The Great Pretender-Queen

Para aquellos quienes, como yo, hemos tenido que poner una máscara para poder sobrellevar problemas y callar las injusticias.

A Lilia, quien siempre ha creído en mi inteligencia y nunca ha dudado de lo mucho que puedo lograr.

A Orlando, quien ha estado a mi lado en todas las circunstancias y con quien comparto mi pasión por la Biología, y nuestro amor por Ikal Taiyari.

A Karla, porque es mi hermana gemela y entre las dos hemos logrado superar adversidades, agradezco cada momento el haberte conocido en la carrera. Siempre tendremos el café de media noche y metro Bellas Artes.

A Joselyne, quien ha compartido su gran sabiduría y que su hermandad siempre se ha sostenido desde la prepa. Por las reflexiones y largas caminatas por Coyoacán, siempre tendremos un Puente que nos espera y abraza.

A Zeltzin, la más mágica que me ha sacado de las peores crisis y sin quien, no estaría viva.

A Ikal Taiyari, tu me arrastraste a este lugar y sigo en la tranquila espera de saber qué más veniste a hacer conmigo.

A todxs y cada unx de mis alumnxs de la Facultad de Ciencias, por cada uno de sus cuestionamientos, sonrisas, risas y realimentación, ustedes me motivan a querer superarme y ser mejor profesora.

A la danza y la música, que me mantienen con los pies en la tierra.

Mi más ferviente amor a cada persona y entidad mencionada.

A mis tutores, el Dr Gaitán y la Dra Maira, sin quienes no hubiera podido desarrollarme en esta importante época de mi vida. Sin su apoyo y comprensión, nunca hubiera logrado hacer esta superación académica.



ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
I. MARCO TEÓRICO.....	8
1. EPIDEMIOLOGÍA.....	8
2. BIOLOGÍA VIRAL.....	9
2.1. Infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).....	9
2.2. Descripción del VIH.....	10
2.3. Ciclo Viral del VIH.....	11
2.4. Tratamiento del VIH/SIDA.....	12
3. BIOLOGÍA DE <i>CANDIDA</i> SPP.....	13
3.1. Tratamiento de Candidiasis.....	14
4. PRODUCTOS NATURALES COMO CANDIDATOS TERAPÉUTICOS EN VIH Y ANTI CANDIDIALES.....	15
4.1. Metabolismo Secundario.....	15
4.2. Familia Malpighiaceae.....	16
4.2.1 Género <i>Heteropterys</i> spp.....	18
4.2.1.1. <i>Heteropterys brachiata</i>	19
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
III. HIPÓTESIS.....	22
IV. JUSTIFICACIÓN.....	22
V. OBJETIVO GENERAL.....	23
1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
VI. METODOLOGÍA.....	24
1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE <i>HETEROPTERYS BRACHIATA</i>	24
1.1. Preparación del Material Vegetal.....	24
2. EVALUACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE <i>HETEROPTERYS BRACHIATA</i> EN ENSAYOS BIOLÓGICOS PARA DETERMINAR SUS POSIBLES PROPIEDADES ANTIRETROVIRALES Y ANTIFÚNGICAS.....	26
2.1. Evaluación de la Inhibición de TR VIH-1 del Extracto Metanólico de <i>Heteropterys brachiata</i>	26
2.1.1 Elementos del kit.....	26
2.1.2 Procedimiento.....	27
2.2. Evaluación del Efecto del Extracto Metanólico de <i>Heteropterys brachiata</i> sobre Cepas de <i>Candida albicans</i>	31

2.2.1	Preparación de las soluciones madre y sus respectivas diluciones.....	31
2.2.2	Preparación del inóculo.....	32
2.2.3	Llenado de placas de microtitulación.....	32
2.2.4	Lectura de las placas de microtitulación.....	33
2.3.	Análisis Químico del Extracto Metanólico de <i>Heteropterys brachiata</i>	34
2.3.1	Alcaloides.....	34
2.3.2	Flavonoides.....	34
2.3.3	Saponinas.....	34
2.3.4	Taninos.....	34
VII.	RESULTADOS.....	36
1.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE <i>HETEROPTERYS BRACHIATA</i> 36	
1.1.	Preparación del Material Vegetal.....	36
2.	EVALUACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE <i>HETEROPTERYS BRACHIATA</i> EN ENSAYOS BIOLÓGICOS PARA DETERMINAR SUS POSIBLES PROPIEDADES ANTIRETROVIRALES Y ANTIFÚNGICAS.....	37
2.1.	Evaluación de la Inhibición de TR VIH-1 del Extracto Metanólico de <i>Heteropterys brachiata</i>	37
2.2.	Evaluación del Efecto del Extracto Metanólico de <i>Heteropterys brachiata</i> Sobre Cepas de <i>Candida albicans</i>	38
2.3.	Análisis Químico del Extracto Metanólico de <i>Heteropterys brachiata</i>	40
VIII.	DISCUSIÓN.....	41
IX.	CONCLUSIÓN.....	50
X.	REFERENCIAS.....	52
	APÉNDICE I.....	60

RESUMEN

Desde la década de 1980 más de 40 millones de personas han sido infectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) reconocido como el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Las infecciones oportunistas relacionadas a SIDA son la principal causa de morbilidad y mortalidad asociada a infección por VIH a nivel mundial, siendo las infecciones micóticas orales una de las más prevalentes.

Contar con un medicamento que presente doble efecto farmacológico, anti TR de VIH-1 y anticandidal, representaría una mejor opción terapéutica. Por estas razones, el presente estudio evaluó las propiedades anti candidiales y anti TR VIH-1 del extracto metanólico de la especie vegetal *Heteropterys brachiata* (Malpighiaceae) (*Hb* MeOH), el cual es un recurso natural nacional. Así mismo, se realizó el análisis químico cualitativo para la identificación de los principales metabolitos secundarios en plantas: alcaloides, saponinas, flavonoides y taninos.

Se obtuvo la inhibición del *Hb* MeOH sobre la TR VIH-1 utilizando el kit Lenti RT® Activity Assay (Cavidi Tech). A una concentración del 1% del *Hb* MeOH, la inhibición de TR fue de 38.8 ± 1.5 , al 0.1% de 25.8 ± 0.6 y al 0.01% de 12.5 ± 1.0 .

Se demostró que las cepas de *Candida albicans* ATCC® 90028 mostraron sensibilidad al *Hb* MeOH. De acuerdo al NCCLS, si el porcentaje de inhibición es mayor al 50% se considera que es sensible. La mínima sensible, 61%, estuvo a una concentración de 2.5 mg/ml y la mayor inhibición, 98%, a 10 mg/ml.

El presente estudio constituye el primer reporte de la presencia de alcaloides, saponinas y taninos en la especie *H. brachiata*. Un amplio número de manuscritos han reportado que dichos metabolitos presentan actividades anti candidiales y anti VIH, por lo que será necesario realizar estudios *ex profeso* para determinar el blanco de acción.

Finalmente, nuestros resultados señalan que el extracto metanólico de *Heteropterys brachiata* posee propiedades anti TR VIH-1 y anti candidales, por ello puede considerarse como futuro candidato para la terapia de SIDA debido a su doble efecto farmacológico, que podría impactar en el apego al tratamiento, la disminución del costo de los tratamientos y la disminución de la mortalidad asociada a VIH.

ABSTRACT

Since the 1980s more than 40 million people have been infected with the Human Immunodeficiency Virus (HIV) recognized as the causative agent of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Opportunistic infections related to AIDS are the main cause of morbidity and mortality associated with HIV infection worldwide, with oral fungal infections being one of the most prevalent in patients.

Having a drug that has a double pharmacological effect, anti RT HIV-1 and anti candidal, would represent a better therapeutic option. For these reasons, the present study evaluated the anti candidal and anti RT HIV-1 properties of the methanolic extract of the plant species *Heteropterys brachiata* (Malpighiaceae) (*Hb* MeOH), which is a national natural resource. Likewise, a qualitative chemical analysis was carried out to identify the main secondary metabolites in plants, such as alkaloids, saponins, flavonoids and tannins.

Hb MeOH inhibition on RT HIV-1 was obtained using the Lenti RT® Activity Assay kit (Cavidi Tech). At a concentration of 1% *Hb* MeOH, the inhibition of RT was 38.8 ± 1.5 , at 0.1% it was 25.8 ± 0.6 and at 0.01% it was 12.5 ± 1.0 .

Candida albicans ATCC® 90028 strains were shown to display sensitivity to *Hb* MeOH. According to the NCCLS, if the inhibition percentage is greater than 50%, it is considered to be sensitive. The lowest sensitive, 61%, was at a concentration of 2.5 mg/ml and the highest inhibition, 98%, was at a concentration of 10 mg/ml.

The present study constitutes the first report of the presence of alkaloids, saponins and tannins metabolites in *H. brachiata*. A large number of manuscripts have reported that these metabolites have anti candidal and anti HIV activities, so in the future it will be necessary to carry out studies specifically to determine the target of action.

Finally, our results indicate that the methanolic extract of *Heteropterys brachiata* has anti RT HIV-1 and anti candidal properties, therefore it can be considered as a future candidate for AIDS therapy due to its double pharmacological effect, which could impact adherence to treatment, the decrease in the cost of treatments and eventually decrease the mortality associated with HIV.

I. MARCO TEÓRICO

1. EPIDEMIOLOGÍA

En 1981, médicos de la región de Los Ángeles en Estados Unidos de Norteamérica, reportaron varios casos de formas inusuales de neumonía por *Pneumocystis carinii*, que se relacionó con una incidencia inusual de cáncer de vasos sanguíneos llamada sarcoma de Kaposi. Las personas afectadas eran hombres jóvenes que tenían sexo con hombres y mostraban pérdida de la función inmunitaria. El virus responsable se identificó posteriormente y se nombró como el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) reconocido como el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (1, 2).

De acuerdo a los cálculos de ONUSIDA, desde el comienzo de la epidemia al cierre de 2018, alrededor de 74,9 millones (58,3 millones–98,1 millones) de personas se han infectado con VIH; 32,0 millones (23,6 millones–43,8 millones) de personas han fallecido a causa de enfermedades oportunistas relacionadas con el SIDA y, aproximadamente 36.7 millones de personas viven con VIH alrededor del mundo. De igual forma, los datos revelan que en 2016, México tenía 12 000 (11 000 - 14 000) nuevas infecciones y que 4 200 (3300 - 5300) eran muertes relacionadas con SIDA. Hubo 220 000 (200 000 - 240 000) personas que viven con el VIH en 2016, entre las cuales el 60% (48% - 69%) accedieron a la terapia antirretroviral (TAR). Entre las mujeres embarazadas que viven con el VIH, el 58% (51% - 64%) accedieron al tratamiento o la profilaxis para evitar la transmisión del VIH a sus hijos. Se estima que <500 (<200 - <500) niños se infectaron recientemente con el VIH debido a la transmisión de madre a hijo. Entre las personas que viven con el VIH, aproximadamente el 50% (45% - 55%) había suprimido las cargas virales (3).

El VIH se ha extendido por diferentes rutas y partes del mundo. Por mencionar algunas regiones, en África sub-sahariana y partes del sur y el sureste de Asia el modo más común de transmisión es el sexo heterosexual. Mientras que, en Europa y Norteamérica, los hombres que tienen sexo con hombres y los usuarios de drogas inyectables que comparten agujas son las actividades de mayor riesgo y probables de contagio (4, 5).

En México, las poblaciones clave más afectadas por el VIH son profesionales del sexo, con una prevalencia del VIH del 7,0%; los hombres homosexuales y, hombres que tienen sexo con hombres, con una prevalencia del VIH del 17,3%; personas que se inyectan drogas, con una prevalencia del VIH del 2,5%; personas transgénero, con una prevalencia del VIH del 17.4%; presos, con una prevalencia del VIH del 0,7%. Asimismo, 2010, las nuevas infecciones por el VIH han disminuido en un 22% y las muertes relacionadas con el SIDA han disminuido en un 1% (3).

2. *BIOLOGÍA VIRAL*

2.1. Infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

La infección por VIH comienza cuando un fluido corporal de una persona que porta el virus, pasa directamente a la membrana mucosa o al torrente sanguíneo de una persona no infectada. Los fluidos corporales pueden ser vaginales, secreciones anales, semen, sangre y leche materna. El contacto entre fluidos corporales puede ocurrir durante las prácticas sexuales (homosexuales o heterosexuales) sin protección, transfusiones sanguíneas con sangre contaminada, prácticas médicas poco seguras, compartir agujas (entre los consumidores de drogas inyectables), parto natural y lactancia materna.

Existe un riesgo laboral pequeño entre los profesionales sanitarios, el personal de laboratorio y posiblemente otras personas que manipulan muestras sanguíneas o fluidos de personas con VIH. Estudios realizados indican que el riesgo de transmisión es de aproximadamente 0.3%, después de una punción cutánea con una aguja o un instrumento cortante contaminados con la sangre de una persona con VIH (4, 6).

2.2. Descripción del VIH

El virus del VIH es parte de los retrovirus, es un parásito intracelular incapaz de replicarse por sí mismo, por lo que requiere secuestrar la maquinaria enzimática, materiales químicos y energía de las células que infecta (ver figura 1). Dichas células generalmente son las células del sistema inmunológico, principalmente linfocitos T cooperadores y los macrófagos. Es necesario que las células presenten el receptor CD4+ y el correceptor CCR5, o CXCR4, para que el VIH se pueda acoplar a la superficie de la membrana celular. Una vez adentro, el virus hace copias de sí mismo, matando a las células hospedantes (4, 3).

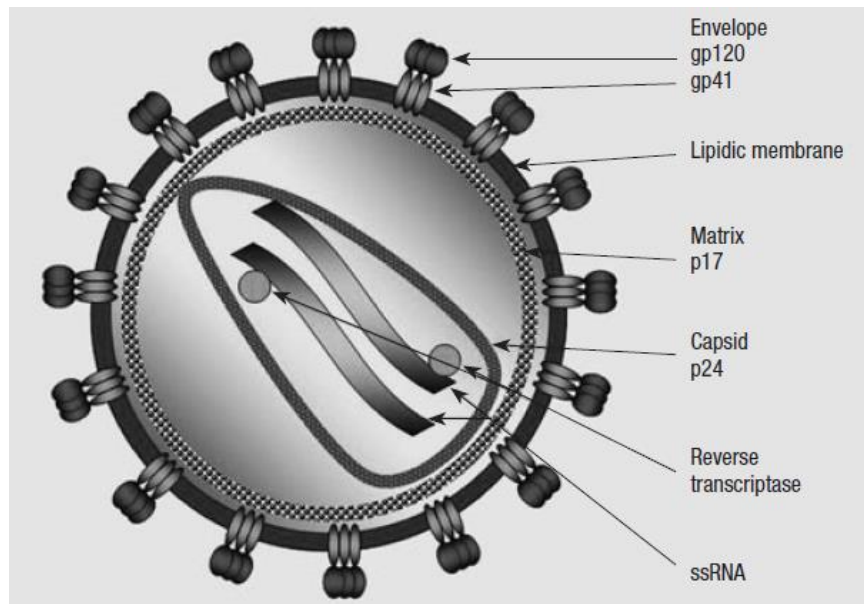


Fig. 1. Estructura del VIH. Se observa el virus del VIH en su forma de virión, mostrando las características de RNA y proteínas de superficie, así como la enzima Transcriptasa Inversa (7).

2.3. Ciclo Viral del VIH

El ciclo viral del VIH incluye una fase extracelular y una intracelular (ver figura 2). Durante la fase extracelular, también llamada fase infecciosa, el virus se llama virión o partícula vírica. El virión se mueve de una célula hospedante a otra y puede transmitirse de persona a persona. Durante la fase intracelular, o fase de replicación, el virus se replica. Para ingresar a la célula necesita acoplarse a dos receptores proteicos de superficie de la célula hospedante. Primero se adhiere al receptor CD4⁺ y después a un correceptor, CCR5. La adherencia a las proteínas de superficie, desemboca en la fusión de la envoltura del virión con la membrana celular de tal forma que el contenido del virión se vacía dentro de la célula hospedante. El contenido incluye el genoma viral, que consiste en dos copias de RNA monocatenario (ssRNA), así mismo las enzimas víricas transcriptasa reversa (TR) e integrasa (IN). La TR retrotranscribe las moléculas de RNA a DNA complementario (cDNA), mientras que la IN fusiona el cDNA con el genoma nuclear. Una vez que el genoma viral se ha infiltrado, la RNA polimerasa de la célula transcribe el genoma viral a un RNA mensajero viral (mRNA). De tal manera que los ribosomas celulares, traduzcan el mRNA viral las proteínas virales. De las anteriores, la enzima proteasa (PR) del VIH escinde precursores en proteínas virales maduras, permitiendo que los nuevos viriones maduren (4, 7).

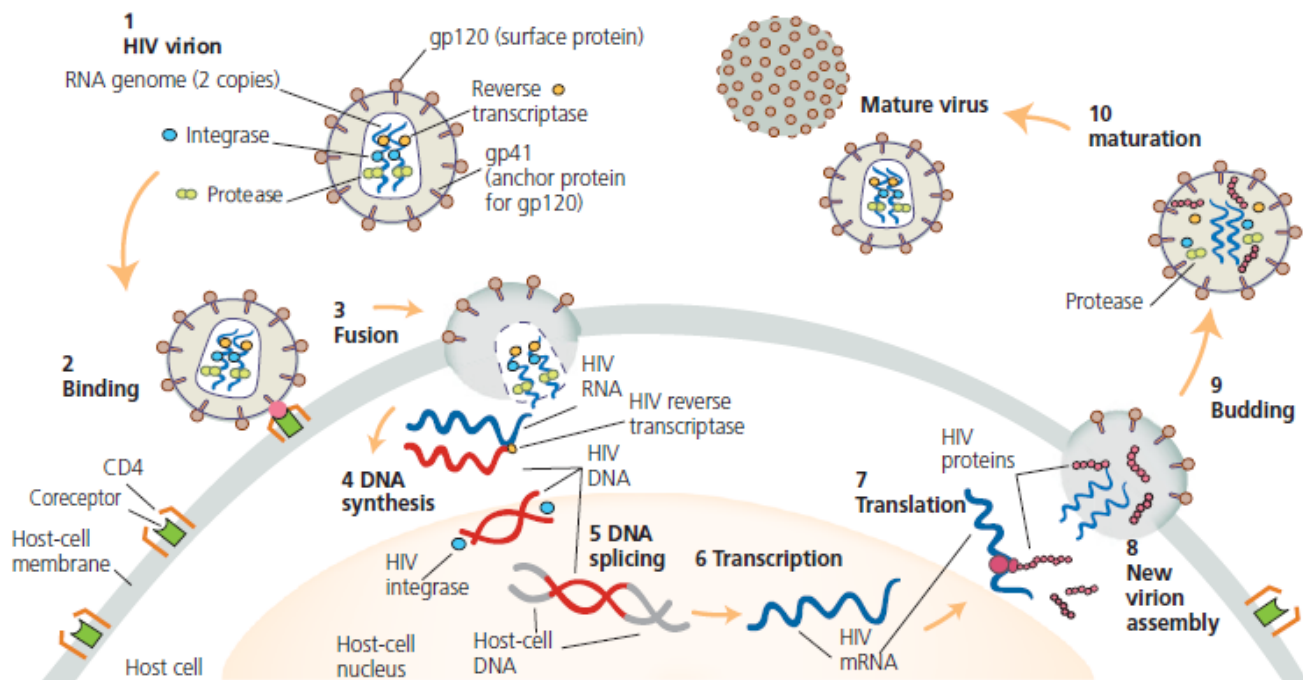


Fig. 2. Ciclo infeccioso del VIH. 1. La forma extracelular, conocida como virión, encuentra una célula hospedante. 2. La proteína de superficie gp120 del VIH se une primero a CD4, luego a un coreceptor (generalmente CCR5; a veces CXCR4) en la superficie de la célula huésped. 3. El virión del VIH se fusiona con la célula hospedante; el RNA y enzimas del VIH ingresan al citoplasma de la célula huésped. 4. La transcriptasa reversa del VIH sintetiza el DNA del VIH a partir de la plantilla de RNA del VIH. 5. La enzima integrasa del VIH empalma el genoma del ADN del VIH en el genoma de la célula huésped. 6. El genoma de DNA del VIH se transcribe en mRNA del VIH por la RNA polimerasa de la célula huésped. 7. mRNA del VIH se traduce en proteínas precursoras del VIH por los ribosomas de la célula huésped. 8. Una nueva generación de viriones se ensambla en la membrana de la célula huésped. 9. Nuevos viriones brotan de la membrana de la célula huésped. 10. La enzima proteasa (PR) del VIH escinde precursores en proteínas virales maduras, permitiendo que los nuevos viriones maduren (4).

2.4. Tratamiento del VIH/SIDA

La terapia antirretroviral (TAR) está basada en la combinación de fármacos que tienen como blanco de acción las enzimas virales responsables de la replicación y maduración del virus como la TR, PR e IN. A pesar de que ha provisto una significativa reducción en la morbilidad y mortalidad de los pacientes VIH/SIDA, la erradicación del virus no se ha

logrado hasta el momento (8). La TAR ha producido un aumento considerable de la esperanza de vida para los individuos infectados con VIH, los tratamientos antirretrovirales han ido de la paliación de la enfermedad a un manejo crónico del padecimiento.

3. BIOLOGÍA DE *CANDIDA* SPP.

Reyes-Montes (9) reporta que en las últimas décadas, se ha incrementado la incidencia de infecciones fúngicas a nivel mundial. Las micosis causadas por *Aspergillus* (hongos filamentosos) y *Candida* (levaduras), son los agentes causales más frecuentes. Cabe destacar que *Candida* es la causa principal de micosis a nivel global, especialmente por perturbaciones de la microbiota normal (por ejemplo, tratamiento con antibióticos), en pacientes neutropénicos, pacientes con neoplasias tratadas con inmunosupresores, pacientes sometidos a cirugía o trasplante de órganos, recién nacidos prematuros y pacientes con VIH/SIDA (10, 11, 9)

En el caso de los pacientes infectados con VIH/SIDA, la candidiasis orofaríngea (OPC) es la infección oportunista más común, que se encuentra en hasta el 90% de los casos. La probabilidad de infección está fuertemente influenciada por la potencia del sistema inmune innato (10). Las personas con VIH/SIDA están predispuestas a episodios recurrentes de OPC, que aumentan en frecuencia y gravedad con la progresión al SIDA (11).

El género *Candida* incluye más de 200 especies (9) y en el caso de *Candida albicans*, es la especie más común. Es un patógeno oportunista, obligatorio de animales de sangre caliente. *C. albicans* se adapta eficazmente a una gran variedad de nichos de hospedantes, incluida la disponibilidad de nutrientes en estos nichos (10). *C. albicans* normalmente prospera como un organismo comensal relativamente inofensivo en la microbiota urogenital, de la piel, la cavidad oral y el tracto gastrointestinal, de la mayoría de las personas sanas. *C. albicans* junto a otras especies de levadura, colonizan las cavidades bucales en 40% a 60% de las personas sanas (12).

La presencia de *Candida* en las cavidades orales de pacientes con VIH/SIDA predice el posterior desarrollo de candidiasis oral (12). Cuando hay factores predisponentes locales

o generales, *Candida* puede causar infecciones orales agudas o crónicas. Clínicamente, las lesiones orales se clasifican, eritematosa (atrófica) hiperplásica y queilitis angular (11, 12). La diferencia en la prevalencia de especies en pacientes con VIH/SIDA está relacionada con la ubicación geográfica. En algunos países, *C. parapsilosis* es la segunda especie más común, mientras que en otros países, *C. glabrata* es la segunda más frecuente después de *C. albicans* (11).

Es de suma importancia tomar en cuenta la resistencia a antifúngicos y cómo también cambia entre las especies de *Candida*. En 2005, Sánchez-Vargas (13) para dilucidar el estado de acarreadores orales de *Candida* y los patrones de susceptibilidad antimicótica en México, investigaron mediante un estudio prospectivo de 3 años, una población de 111 adultos infectados con VIH / SIDA y 201 personas no infectadas por VIH en el Hospital General de México, en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, y las Clínicas de Odontología en la Facultad de Odontología (UNAM). Sanchez *et. al.*, reportaron que la mayoría de los casos de candidiasis oral eran causados por *C. albicans* (63.7% de los aislamientos); así mismo, mostraron que el 18.7% de los aislamientos fueron resistentes por lo menos a un antifúngico azol (ketoconazol e itraconazol fueron los menos activos). Se destacó también que la mayoría de los aislamientos resistentes fueron *C. glabrata* de pacientes sin infección por VIH y *C. albicans* de pacientes infectados con VIH/SIDA (13).

3.1. Tratamiento de Candidiasis

Así resulta claro que el control de la carga viral y la supresión de enfermedades oportunistas, son puntos clave para el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de VIH-1. Consecuentemente, se espera que durante el desarrollo de estas nuevas terapias, se contemple un estado de salud integral para estos pacientes, donde los fármacos antirretrovirales y antifúngicos, se administren de manera simultánea en pacientes con una severa inmunosupresión, con el inminente enfrentamiento a cepas resistentes, y con el alto resto de padecer los efectos secundarios de dichos fármacos.

Entre las alternativas que han aportado nuevas entidades químicas anti VIH se encuentran los productos naturales, donde un vasto número de metabolitos provenientes de plantas han demostrado poseer propiedades anti VIH (14, 15).

4. PRODUCTOS NATURALES COMO CANDIDATOS TERAPÉUTICOS EN VIH Y ANTI CANDIDIALES

Desde el inicio de la historia humana, las plantas medicinales han estado presentes en todas las culturas (16). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud cualquier planta que contenga una sustancia que pueda usarse con fines terapéuticos o que sea precursora de un nuevo fármaco químico semisintético se denomina plantas medicinales (17).

En este sentido, las plantas medicinales continúan desempeñando un papel muy significativo como fuente de moléculas que conducen a un proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos (16, 18) aún con los avances en el campo de la síntesis química de las drogas y los antibióticos (17). Dichas moléculas se les llama productos naturales o fitocompuestos y son parte del metabolismo de la planta. Estimaciones internacionales apuntan que solo aproximadamente el 15% de las especies de plantas que existen en el mundo, han sido estudiadas respecto de sus propiedades farmacológicas hasta hoy (19, 20).

4.1. Metabolismo Secundario

La suma de todos los procesos bioquímicos que tienen lugar en un organismo se llama metabolismo (16). De forma clásica, el metabolismo de las plantas se ha dividido como primario y secundario. Empero, hay que tomar en cuenta que tanto los metabolitos primarios como secundarios, comparten rutas de biosíntesis e intermediarios metabólicos (21). Los metabolitos primarios se encuentran universalmente en todas las plantas y tienen funciones que son necesarias para que las plantas sobrevivan. Las funciones que desempeñan los metabolitos secundarios son diversas, comúnmente se relacionan como mecanismos de defensa, adaptación al entorno y regulación de las rutas metabólicas primarias (16, 17). En contraste con los metabolitos primarios, la ausencia de los secundarios no resulta en la muerte

inmediata. Sin embargo puede significar la incapacidad de realizar interacciones ecológicas para su sobrevivencia y/o éxito reproductivo (22).

Los metabolitos secundarios, para su estudio se pueden clasificar de acuerdo a la ruta biosintética que los originan, distinguiéndose en fenoles, terpenos y compuestos nitrogenados (23). Los productos naturales proporcionan alrededor del 50% de las drogas modernas (24) (18) y prácticamente todos los metabolitos secundarios conocidos tiene algún tipo de actividad, e. g. actividad antibacteriana, antioxidante o anticancerígena, antiviral, antifúngica, antinoceptiva, entre otras. Por lo tanto, tratamientos para enfermedades como el SIDA y varias enfermedades mortales en la población humana también se puede encontrar en las plantas (16).

4.2. Familia Malpighiaceae

La familia Malpighiaceae pertenece a las Angiospermas o también denominadas plantas con flor, que presentan diversos hábitos o formas de vida, son plantas leñosas y la mayoría son lianas. Malpighiaceae se encuentra conformada aproximadamente por 75 géneros y 1300 especies de distribución en el continente americano. México es considerado como centro de origen y diversificación de dicha familia (25) debido al número de especies presentes registradas en territorio nacional hasta el último reporte, que es 23 géneros y 150 especies (26).

Las especies de la familia Malpighiaceae muestran una discreta importancia económica. Algunas de ellas se han utilizado como ornamentales, mientras que otras debido a sus frutos carnosos y comestibles son consumidas desde México hasta Brasil, como el caso de especies pertenecientes a los géneros *Byrsonima*, *Bunchosia* y *Malpighia* (27). Entre ellos, destaca *Malpighia emarginata*, conocida popularmente como “acerola”, cuyo contenido en los jugos de los frutos en diferentes estadios de madurez ha adquirido relevancia en la última década debido a su función como auxiliar en la reducción del estrés oxidativo generalizado, así como su efecto en el decremento de ciertas condiciones genotóxicas y obesogénicas debido a su alto contenido de vitamina C y rutina (28).

Otras especies de Malpighiaceae son conocidas por las propiedades exhibidas sobre el Sistema Nervioso Central, como el caso de *Banisteriopsis caapi*, especie reconocida por su

contenido de alcaloides, incluyendo N,N-DiMetilTryptamina (DMT), TetraHidroHarmina (THH), harmalina, y harmina. Debido a ello, esta especie es considerada como un potente alucinógeno y un ingrediente de la bebida sagrada y psicoactiva conocida como “Ayahuasca”, utilizada ampliamente en Sudamérica. Reportes recientes han dado a conocer los potenciales beneficios que esta especie pudiera presentar en el tratamiento del Parkinson, no obstante, hasta el momento, la evidencia disponible no resulta concluyente en términos de efectividad y eficacia en este padecimiento (29).

La especie *Galphimia glauca*, conocida popularmente en México como “calderona amarilla” o “estrellita” es utilizada tradicionalmente para “calmar los nervios” (30). De esta especie se han aislado e identificado los compuestos denominados galphiminas A-F (nor-seco-fridelanos), que han presentado propiedades ansiolíticas en modelos *in vivo* (31). Derivado de estos estudios, se elaboró un fitofármaco a base del extracto metanólico de *Galphimia glauca* y estandarizado en su contenido de galphimina B, ya que este compuesto mostró el desempeño más alto en los ensayos conductuales previos, respecto del resto de las galphiminas. Dicho fitofármaco se evaluó en un estudio clínico doble-ciego aleatorizado que comparó su eficacia, tolerabilidad y seguridad terapéutica con un medicamento ampliamente conocido, lorazepam, en pacientes con ansiedad generalizada. Como resultado, se observó que el efecto del fitofármaco es similar al del lorazepam, con la ventaja de ser efectivo desde la primera semana y sin los efectos colaterales del mismo (32). Así mismo, se investigó sobre los posibles efectos de toxicidad y genotoxicidad de los extractos estandarizados de *Galphimia glauca*, por lo que se evaluaron los extractos acuoso, etanólico y metanólico, sin encontrar evidencia alguna de efectos hepatotóxicos ni mutagénicos (33).

Byrsonima crassifolia es otra especie perteneciente a la familia Malpighiaceae y de amplia distribución en México, Centro y Suramérica. Se conoce popularmente como “nanche” y se ha reportado su uso en medicina tradicional en México desde tiempos prehispánicos para tratar malestares gastrointestinales, inflamaciones ginecológicas, así como para calmar los nervios (34, 35). Nuestro equipo de trabajo en reportó en el año 2011, los efectos antidepresivos del extracto metanólico de *Byrsonima crassifolia* en modelos conductuales *in vivo* a una dosis de 500 mg/kg, sin afectar el sistema locomotor. Los compuestos activos de dicho extracto fueron identificados y cuantificados como quercetina 3-O-xilósido (12 mg/kg), rutina (4.4 mg/kg), quercetina (1.4 mg/kg) y hesperidina (0.7

mg/kg), constituyendo así el primer reporte de dichos flavonoides para la especie. Así mismo, se determinó que el extracto era seguro en su administración vía oral a 2000 mg/kg (31). Adicionalmente, numerosas especies del género *Byrsonima* han sido estudiadas respecto de sus propiedades espasmogénicas, analgésicas, antihiperoglucemiantes, antidiarreicas, antihemorrágicas, antioxidantes y antiinflamatorias. Así mismo, algunos reportes se han enfocado en sus propiedades contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, mycobacterias, protozoarios y hongos, de acuerdo con los usos tradicionales reportados (36). Sin embargo, la información acerca de los posibles principios activos es aún escasa.

4.2.1 Género *Heteropterys* spp.

Heteropterys spp. es considerado como el género más grande de la familia Malpighiaceae con aproximadamente de 150 especies (37). Este género también ha sido estudiado respecto de sus propiedades neurofarmacológicas en especies presentes en México y Brasil, principalmente. De esta forma, el extracto de la especie brasileña *Heteropterys aphrodisiaca* mejoró el aprendizaje y los déficits de memoria en ratas ancianas en el ensayo de evitación pasiva y laberinto en forma de T, respectivamente. En el extracto de dicha especie se detectó la presencia de glicósidos, polifenoles, taninos, alcaloides, saponinas y derivados de antracenos como componentes mayoritarios (38). *Heteropterys aphrodisiaca* también mostró una potente actividad antioxidante *in vitro* e indujo un aumento en las actividades de superóxido dismutasa en ratas ancianas (39). En el caso de *Heteropterys glabra*, el extracto de etanol indujo una reducción en la actividad motora, así como alteraciones en los parámetros EEG (electroencefalograma) (40). La especie endémica de México, *Heteropterys cotinifolia* exhibió un efecto antidepresivo dependiente de la dosis en la prueba de nado forzado en ratones en un intervalo de dosis de 31 a 310 mg/kg, sin afectación sobre la actividad locomotora. Los compuestos mayoritarios fueron identificados como ácido clorogénico y rutina (41).

Otras especies de *Heteropterys* han mostrado propiedades contra diversos microorganismos, tal es el caso de *Heteropterys byrsonimifolia* cuyo extracto proveniente de las hojas, exhibió actividad antifúngica contra el hongo *Aspergillus ochraceus*, un hongo que afecta los granos de café, y por lo tanto con alto valor comercial. Del extracto activo se aislaron e identificaron

4 flavonoides, de los cuales la rutina presentó un efecto antifúngico potente (concentración mínima inhibitoria: MIC = 32.5 µg/mL), mientras que el resto de los flavonoides, guajaverina, quercetina 3-O- α -L-rhamnopiranosido y quercetina 3-O-robinobiosido, no mostraron actividad antifúngica (42). De la especie *Heteropterys tomentosa*, se aisló de las raíces el compuesto nitro-alifático 2, 3, 4, 6-tetra-O-(3-nitropropanoil)-O- β -D-glucopiranosido fue evaluado como antimicrobiano, antifúngico y antiviral. Respecto de las propiedades antimicrobianas, se probó contra *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, donde los MIC fueron de 250 y 500 µg/mL, respectivamente. Las propiedades antifúngicas se evaluaron sobre diferentes cepas de *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. tropicalis* donde la concentración mínima fungicida (MCF) fue de 250 µg µg/mL para cada cepa de *Candida* (43). En cuanto a las propiedades antivirales, fueron evaluadas contra Poliovirus tipo 1 (PV-1) y herpes bovino tipo 1 (BHV-1), donde los valores calculados fueron IC₅₀ = 22.01 µg/mL (índice de selectividad = 2.83) y 21.10 µg/mL (índice de selectividad = 2.95), respectivamente (44).

4.2.1.1. *Heteropterys brachiata*

Es de particular interés la especie *Heteropterys brachiata* (ver figura 3), que en México se conoce popularmente como 'Bejuco de Margarita', 'tsak tsaah' (Huasteco) o 'wayúum aak' (Maya) ya que se ha utilizado en la medicina tradicional principalmente para el tratamiento de trastornos nerviosos utilizando una cocción de la planta durante 4 a 5 días (45). Nuestro equipo de trabajo realizó un estudio de las actividades neurofarmacológicas del extracto metanólico de las partes aéreas de *H. brachiata* (*Hb* MeOH) a dosis de 500, 750, 1000 y 1500 mg/Kg en ratones ICR. No hubo muertes durante los 14 días de observación después de la I. P. aguda, cuyo tratamiento fue 2000 mg/kg de *Hb* MeOH en la prueba de natación forzada (FST). *Hb* MeOH produjo un efecto antidepresivo significativo en FST a dosis de 500 y 750 mg/kg, mientras que dosis de 500 a 1500 mg/kg exhibieron una clara actividad ansiolítica dependiente de la dosis en laberinto elevado más (EPM). A 500 mg/kg mostró una actividad anticonvulsiva significativa en convulsión inducida por pentilentetrazol (PTZt) y una ausencia de efecto sedante de la prueba de potenciación de pentobarbital (PTBt) (46). Los principales compuestos de *Hb* MeOH fueron el ácido clorogénico y el éster metílico del ácido clorogénico, como así como compuestos de tipo

terpeno menos abundantes. Por la relevancia de los conocimientos generados en ese estudio, los resultados fueron protegidos por patente (47). Otros grupos de investigación han reportado que dichos compuestos químicos purificados han exhibido propiedades antirretrovirales sobre las enzimas replicativas del VIH, donde el ácido clorogénico mostró actividad inhibitoria sobre la IN de VIH-1 (48), mientras que el metil éster del ácido clorogénico inhibió PR de VIH con una $IC_{50} \leq 40 \mu\text{g/ml}$ (49). Es importante destacar en este punto, que las propiedades anti TR de VIH-1 del extracto metanólico de *H. brachiata* siguen sin conocerse.

Por todas estas razones, en la presente contribución se estudiaron los metabolitos, productos naturales potencialmente útiles en la terapia anti VIH y anti-candidal, obtenidos a partir de *Heteropterys brachiata*. La investigación resulta de sumo interés al representar una potencial alternativa integral en los tratamientos anti-candidal y para VIH, sin causar efectos secundarios. Adicionalmente, otro de los aspectos a resaltar en la evaluación del extracto metanólico de *Heteropterys brachiata* que contiene ácido clorogénico y el metil éster del ácido clorogénico, es la posible ventaja económica que representaría el obtener un medicamento cuyos posibles compuestos activos no se requiere sean purificados para ejercer su efecto. Como es ampliamente conocido en la literatura científica especializada internacional, los extractos de plantas presentan efectos más pronunciados que los compuestos puros aislados del propio extracto; esto probablemente debido a las acciones múltiples o mezclas complejas de metabolitos que dan lugar a interacciones sinérgicas (50).

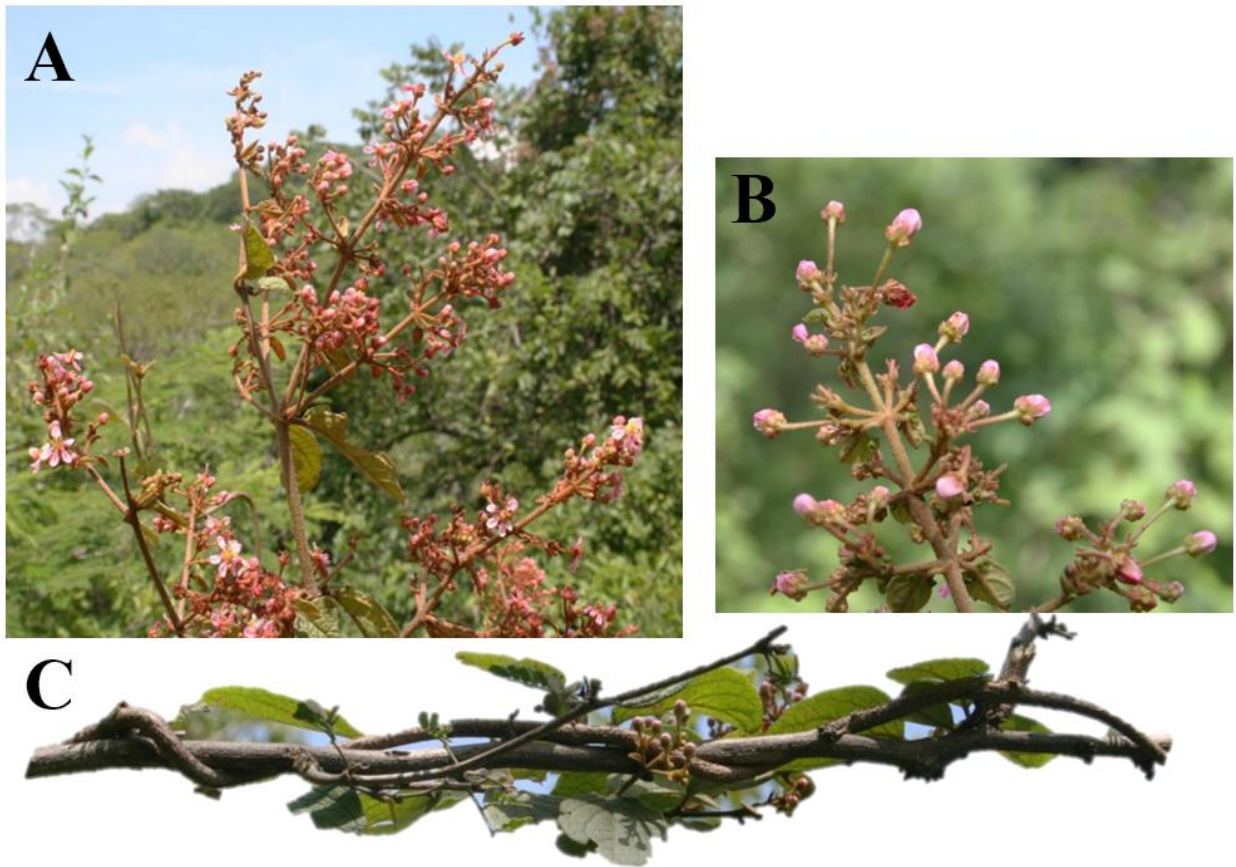


Fig. 3. *Heteropterys brachiata*, especie perteneciente a la familia Malpighiaceae. En **A**, se puede observar la planta en la zona de colecta, Quilamula, Huatla, Morelos. En **B**, se observa el detalle de las florecitas color rosa claro. En **C**, se muestra el hábito de vida de *H. brachiata*, el cual es tipo liana o bejuco, conformada por tallos creciendo en forma de enredadera.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que en el extracto de *Heteropterys brachiata* se ha detectado la presencia de los metabolitos ácido clorogénico y su metil éster, el presente proyecto propone la evaluación de las propiedades anti TR de VIH-1 y anti-candidal del extracto de *Heteropterys brachiata*. Esta especie se muestra como un candidato atractivo para ser considerado en un futuro como un potencial agente utilizable en los tratamientos anti VIH/SIDA, con un efecto integral que involucra aspectos antiretrovirales y antifúngicos. Por lo que se genera la siguiente pregunta ¿el extracto de *Heteropterys brachiata* tiene actividad anti TR de VIH-1 y anti-candidal?

III. HIPÓTESIS

El extracto metanólico de *Heteropterys brachiata* presentará efecto inhibitorio sobre la enzima TR VIH-1 y sobre *Candida albicans*.

IV. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los esfuerzos por el control y prevención de nuevos casos de infección por VIH, la prevalencia de pacientes VIH/SIDA no ha mostrado una disminución evidente. Las infecciones oportunistas relacionadas a SIDA son la principal causa de morbilidad y mortalidad asociada a infección por VIH a nivel mundial siendo las infecciones micóticas orales una de las más prevalentes. De esta manera, los fármacos anti retrovirales y antifúngicos disponibles en el mercado, tienen que administrarse de manera simultánea a pacientes con severa inmunosupresión, con la posibilidad de enfrentar cepas resistentes y con el riesgo de padecer los efectos secundarios de dichos fármacos. Por ello, contar con un medicamento que presente doble efecto farmacológico, anti TR de VIH-1 y anti-candidal, representaría una mejor opción terapéutica que indudablemente mejorará la adherencia, disminuirá el costo de los tratamientos, y eventualmente disminuirá la morbi-mortalidad asociada a infección por VIH. Los extractos vegetales parecen ser buenos candidatos para

cubrir este objetivo. Por las razones anteriormente mencionadas, la presente propuesta contempla el estudio de productos de *Heteropterys brachiata* que posean efectos biológicos duales que sean potencialmente útiles en la terapia de VIH/SIDA, a partir de un recurso natural nacional.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del extracto metanólico de la especie *Heteropterys brachiata* sobre la TR de VIH-1 y *Candida albicans* asociados a VIH/SIDA, así como posibles grupos de compuestos químicos presentes en el extracto activo.

1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Heteropterys brachiata* sobre la cepa de *Candida albicans*
- Calcular la concentración mínima inhibitoria (MIC₅₀) del extracto metanólico de *Heteropterys brachiata* sobre la cepa de *Candida albicans*
- Evaluar el efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Heteropterys brachiata* sobre la enzima TR de VIH-1
- Realizar un análisis químico cualitativo del extracto de *Heteropterys brachiata*

VI. METODOLOGÍA

1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HETEROPTERYS BRACHIATA

1.1. Preparación del Material Vegetal

Se colectó la planta *Heteropterys brachiata* en la localidad de Quilamula, Huatla, Morelos el día 4 de octubre de 2018. La determinación de la especie fue realizada por la Biol. Esther León. Así mismo, se ingresó un ejemplar de respaldo de *H. brachiata* al Herbario Nacional de México, Instituto de Biología, UNAM (MEXU), con número de folio IBUNAM:MEXU:1284338 (51).

Para comenzar con la preparación del extracto, las partes aéreas colectadas (tallos, hojas y frutos) se secaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 días. Una vez secas, se continuó con la molienda del material vegetal con un molino mecánico. Dicho material vegetal molido, se deceró con *n*-hexano por un periodo de 24 hrs. Después, se realizó la extracción sucesiva (3x) durante toda la noche con metanol al 100%. El volumen de extracción fue de 7.5 litros de disolvente por cada kilo de material vegetal.

El extracto obtenido, se filtró para retirar el material vegetal y el líquido se llevó a sequedad mediante el alto vacío, con el uso de un rotaevaporador marca Rotavapor® BUCHI R-100 (ver diagrama 1).

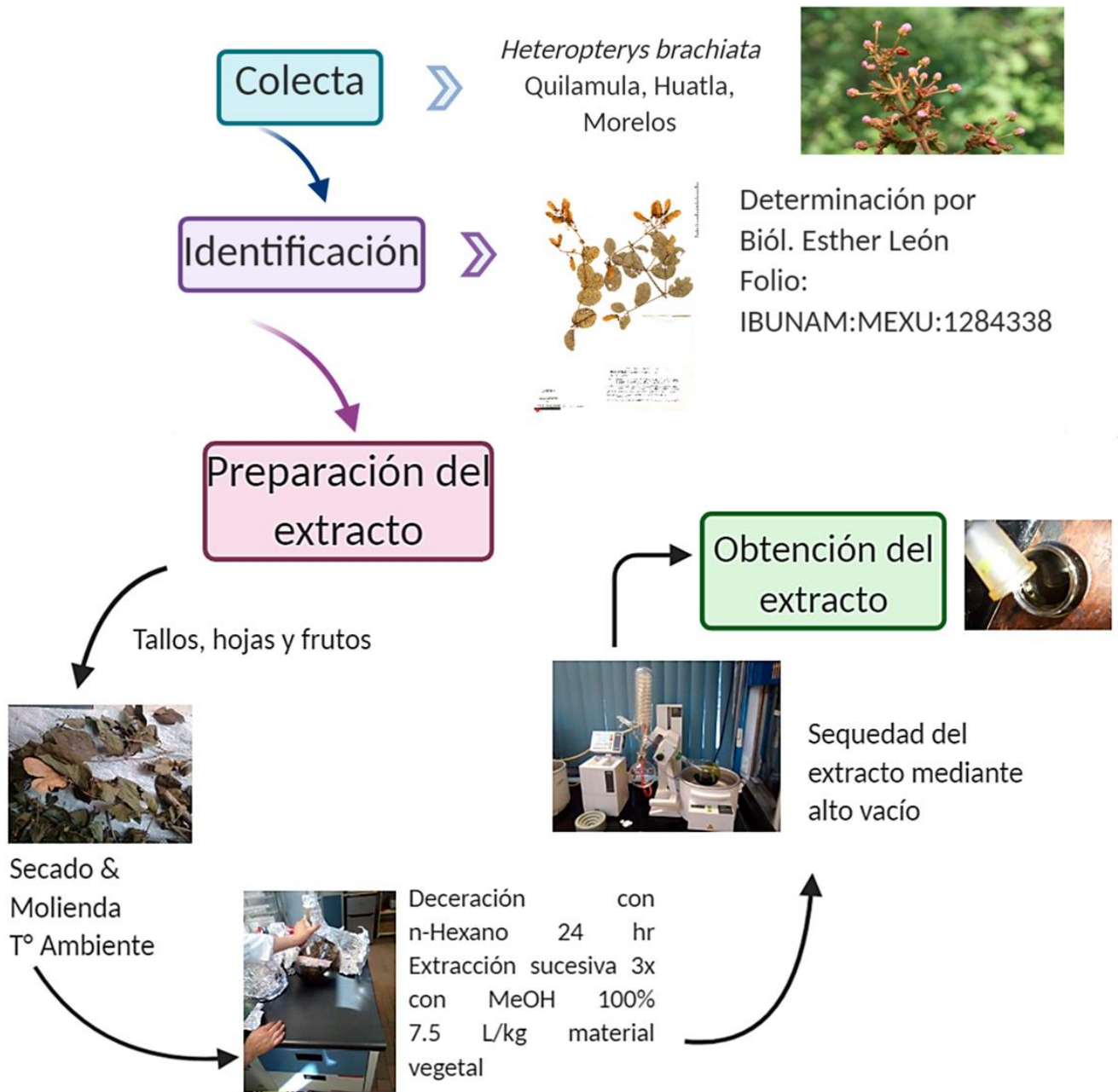


Diagrama 1. Se presenta el esquema general que se siguió para la obtención del extracto metanólico *H. brachiata*.

2. EVALUACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HETEROPTERYS BRACHIATA EN ENSAYOS BIOLÓGICOS PARA DETERMINAR SUS POSIBLES PROPIEDADES ANTIRETROVIRALES Y ANTIFÚNGICAS

2.1. Evaluación de la Inhibición de TR VIH-1 del Extracto Metanólico de *Heteropterys brachiata*

Se efectuó la evaluación de la inhibición de TR VIH-1 del extracto metanólico de *Heteropterys brachiata* (Hb MeOH). Para determinar el efecto de las diferentes concentraciones del extracto sobre la enzima transcriptasa reversa (TR), se realizó un ensayo colorimétrico no radiactivo utilizando el kit Lenti RT® Activity Assay (Cavidi Tech) (52).

Las concentraciones que se probaron fueron de 1%, 0.1% y 0.01% de Hb MeOH. Las distintas concentraciones se disolvieron en DMSO y fueron probadas por triplicado. Se utilizó Nevirapine (Viramune®), como control positivo por ser un fármaco comercial inhibidor de TR.

A continuación, se describe el protocolo del Kit Lenti RT (Cavidi Tech) para determinar la actividad inhibitoria sobre TR VIH-1.

2.1.1 Elementos del kit

- 2 placas de Poli A (96 pozos cada una)
- 1 frasco con amortiguador de dilución (B)
- 2 frascos con componentes de reacción de la TR (C1)
- 1 frasco con amortiguador de reconstitución (C2)
- 1 frasco con estándar TRr-VIH (D)
- 1 frasco con amortiguador de lavado concentrado (E)
- 2 frascos con anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (O)
- 1 frasco con tabletas del sustrato de la fosfatasa alcalina (P1)
- 1 frasco con amortiguador del sustrato de la fosfatasa alcalina (P2)
- 4 tapas de plástico adhesivo

2 tapas de plástico duro

2.1.2 Procedimiento

En el diagrama 2, se puede visualizar la estrategia general del ensayo.

a) Preparación del amortiguador de dilución

- Adicionar 30 ml del frasco B en un vaso de precipitados y adicionar 30 ml de agua destilada (solución 1)

b) Dilución de sustancias

Las concentraciones que se evaluaron fueron 1%, 0.1% y 0.01% :

- Adicionar 135 μ l de la solución 1 en cada pozo de las dos placas de preparación de las muestras (placas de 96 pozos)
- Adicionar 15 μ l de la sustancia por analizar en el pozo A1
- Adicionar 15 μ l de la segunda sustancia por analizar en el pozo A2 y así continuar con las demás sustancias hasta completar A12
- Transferir 15 μ l desde los pozos A1-A12 a los correspondientes pozos de la fila B
- Transferir 15 μ l desde los pozos B1-B12 a los correspondientes pozos de la fila C y así hasta continuar la fila G
- Esto se realiza en ambas placas
- La fila H se usa para controles

c) Preparación de la mezcla de reacción

- Adicionar 2 ml de amortiguador de reconstitución (C2) al frasco que contienen los componentes de reacción de la TR (C1). Regresar 200 μ l al frasco C2 (mezcla C1+C2).

d) Preparación de las placas de Poli A con las muestras

- Tomar las 2 placas de Poli A y adicionar 100 μ l de la mezcla de reacción (mezcla C1+C2) a cada pozo.
- Transferir 50 μ l de cada pozo de las placas de preparación de muestras a las placas de Poli A en el pozo correspondiente.

- Cubrir las placas con la tapa de plástico adhesivo e incubar a 33°C durante 30 min.
- e) Dilución del estándar TRr-VIH (D)
- Adicionar 1.5 ml de la solución 1 al frasco que contiene el liofilizado del estándar TRr-VIH (D). Mezclar vigorosamente.
 - En un vaso de precipitados adicionar 12 ml de la solución 1 y verter 1 ml de la TRr-VIH (D) resuspendida. Mezclar vigorosamente (solución 2)
- f) Inicio de la reacción de la TR
- Tomar las placas de Poli A de la incubadora y adicionar 50 µl de la solución 2 en todos los pozos excepto H12
 - Adicionar 50 µl del amortiguador de dilución en los pozos H8-H12
 - Sellar las placas con las tapas de plástico adhesivo e incubar a 33°C durante 3 h
- g) Preparación de la solución de lavado
- Adicionar 30 ml de Tritón X-100 en un litro de agua destilada (o la cantidad necesaria para que se disuelva) y agitar por 10 min.
 - Adicionar 10 ml del lavado concentrado (E) a un contenedor de 4 l.
 - Adicionar el Tritón X-100 disuelto al contenedor y ajustar el volumen a 4 l con agua destilada. Mezclar vigorosamente.
- h) Fin de la reacción de la TR
- Tomar las placas de Poli A de la incubadora y lavarlas 4 veces con la solución de lavado de Tritón X-100. Eliminar el exceso de agua colocándolas cara abajo sobre papel absorbente.
- i) Reconstitución del anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina (AP)
- Tomar los 2 frascos que contienen el anticuerpo (O) y adicionar 12 ml de una solución 1% v/v de Tritón X-100 a cada una. Mezclar vigorosamente de 10 a 15 minutos.
 - Tomar las placas recién lavadas y adicionar 100 µl del anticuerpo resuspendido a cada pozo en ambas placas.
 - Cubrir las placas con tapa de plástico adhesivo e incubarlas a 33°C durante 90 minutos con agitación constante.

j) Preparación del sustrato de la AP

- Adicionar las tabletas de AP (P1) al amortiguador (P2). Agitar ocasionalmente. Mantener en oscuridad y a temperatura ambiente. Dejar reposar por un tiempo mínimo de 20 minutos.

k) Eliminar el exceso de anticuerpo conjugado la AP

- Tomar las placas de Poli A de la incubadora y lavarlas con la solución de lavado de Tritón X-100 (aproximadamente 20 veces). Eliminar el exceso de agua colocándolas cara abajo sobre el papel absorbente.

l) Inicio de la reacción de la AP

- Adicionar 200 μ l del sustrato de la AP a cada uno de los pozos de ambas placas de Poli A.
- Cubrir las placas con las tapas de plástico duro e incubar a temperatura ambiente. Mantener en oscuridad y agitación constante.

m) Lectura de las placas

- Leer la absorbancia de ambas placas con un lector, utilizando un filtro de 405 nm, después de 15 min de reacción. Repetir la lectura en intervalos de tiempo hasta que la lectura de los pozos H1-H7 den valores de aproximadamente el 75% del valor máximo de actividad.

n) Procesar datos

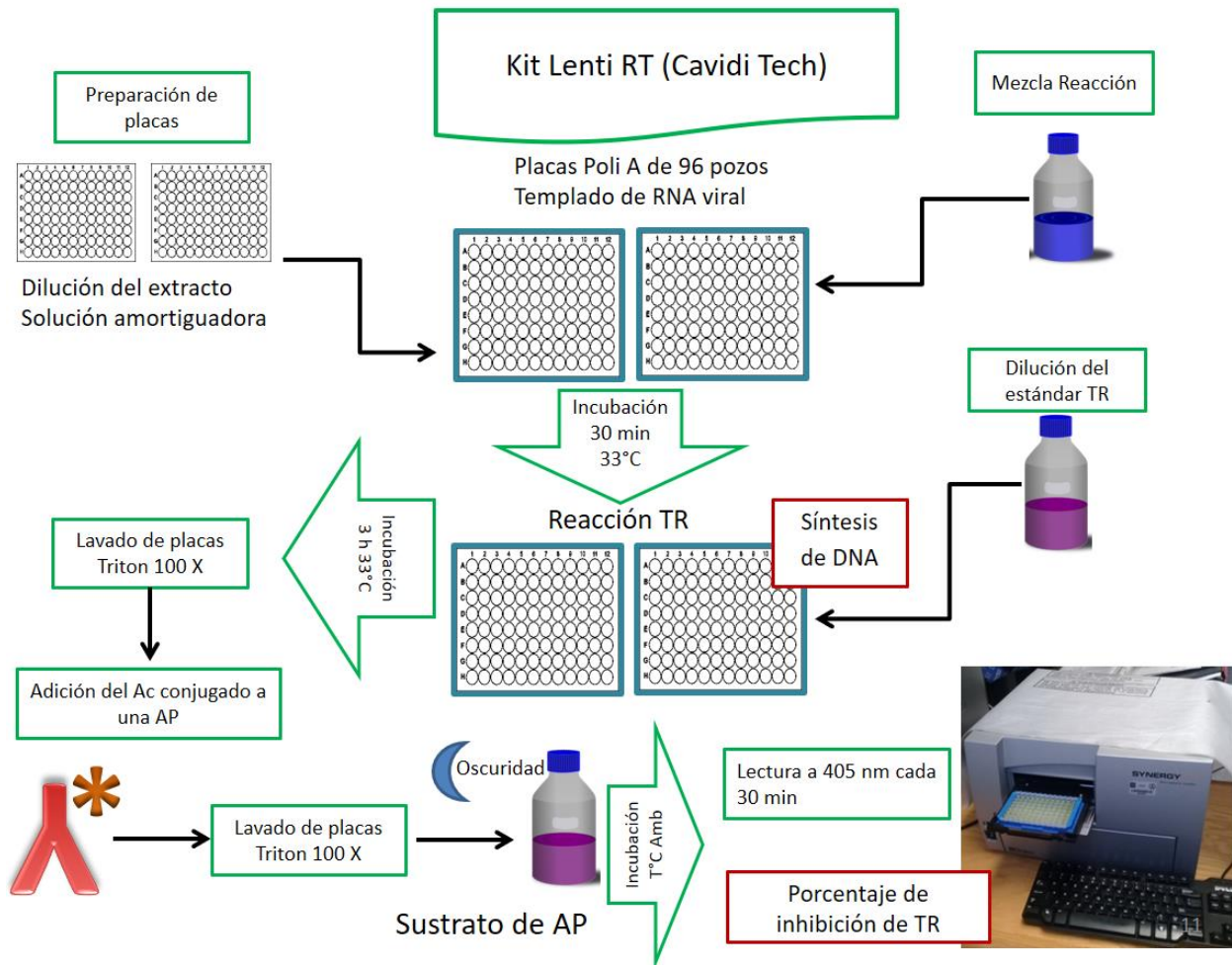


Diagrama 2. El kit Lenti RT® Activity Assay (Cavidi Tech), consta de una placa de poli A con un templado de RNA viral anclado en el fondo de cada pozo. Se agregaron la mezcla de reacción, amortiguadores y las diferentes concentraciones del extracto. Después se añadió la enzima TR, la cual sintetizó DNA en aquellos pozos donde no se inhibió la actividad enzimática. Luego se colocó un anticuerpo conjugado a una fosfatasa alcalina (AP), cuya actividad colorimétrica es proporcional a la actividad de la TR. El resultado se reportó en porcentaje de inhibición de TR. El resultado se reportó en porcentaje de inhibición de TR. Como control se utilizó Nevirapina (Viramune®) un fármaco comercial inhibidor de TR.

2.2. Evaluación del Efecto del Extracto Metanólico de *Heteropterys brachiata* sobre Cepas de *Candida albicans*

Se llevó a cabo la evaluación del efecto del extracto metanólico de *H. brachiata* sobre *Candida albicans*. Se siguió el Protocolo de pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngico del Comité Norteamericano de Estándares en Laboratorios Clínicos (NCCLS) (53). El ensayo fue el M 27-A3, método de microdilución para levaduras que contempla el uso de la cepa *Candida albicans* ATCC® 90028.

2.2.1 Preparación de las soluciones madre y sus respectivas diluciones

Se prepararon las soluciones madre a partir del extracto metanólico de *H. brachiata* (*Hb* MeOH), los estándares rutina, ácido clorogénico y quercitina, respectivamente. El fluconazol (FCA) (Flucosan®) sirvió como método de referencia, así como para la interpretación de sus puntos de corte. Las soluciones madre se prepararon 100 veces por arriba de la concentración final más alta a probar.

El *Hb* MeOH y los estándares, se disolvieron en DMSO. La solución madre del *Hb* MeOH quedó en 1 gr/mL, los estándares quedaron a 50 mg/mL de rutina, 1.75 mg/mL tanto en ácido clorogénico como en quercitina. El FCA se disolvió con agua inyectable (PiSA) y la solución madre quedó en 1 mg/mL.

La serie de concentraciones menores se trabajaron a partir de cada solución madre, disminuyendo la concentración a la mitad, respectivamente. Cada serie utilizó como diluyente DMSO o agua inyectable, según fuera el caso y se colocaron en tubos de 15 mL. Por ejemplo, para *Hb* MeOH inició en 1 g/ml, y se diluyó con DMSO para obtener las siguientes concentraciones menores: 500 mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml, 62.5 mg/ml, 31.2 mg/ml, 15.7 mg/ml, 7.8 mg/ml, 3.9 mg/ml, 1.9 mg/ml.

Seguidamente, se realizó una segunda serie de diluciones (1/50) tomando 100 µL de cada concentración menor y se transfirieron a un tubo que contenía 4.9 mL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco®), se agitaron vigorosamente con la ayuda de un vortex (Vortex-Genie 2 Scientific Industries SI™). Los tubos se reservaron hasta el llenado de las placas de microtitulación.

2.2.2. Preparación del inóculo

Para activar la cepa de *Candida albicans* ATCC® 90028, se incubó a 25°C por 24 horas en placas de agar sabouraud dextrosa con cloranfenicol (SDC) (CRITERION™, HardyDiagnostics) y luego se tomaron 5 colonias ≥ 1 mm de las placas cultivo para colocarlas en tubos con caldo nutritivo de extracto de levadura-peptona-dextrosa (YDP). Los tubos se agitaron durante 30 segundos, para después incubar a 37°C durante 48 horas.

Después de la incubación los tubos se centrifugaron a 500 rpm por 10 minutos para obtener un pellet celular. Los tubos se decantaron para retirar el caldo nutritivo y se les agregaron 5 mL de amortiguador fosfato salino (PBS) al 0.01 M. Se resuspendió el botón celular por agitación durante 1 minuto. Este lavado del inóculo se repitió 3 veces. La presencia de células fúngicas se verificó mediante la observación al microscopio óptico (Leica DM500, objetivo 40x).

Luego, se tomó una alícuota de 30 μ L para ajustar el inóculo a una densidad óptica de 1.5×10^3 UFC/mL, y se colocaron en un tubo nuevo con 700 μ L de PBS para tener un volumen total de 1 mL, se mezcló bien. Después, de este último se tomaron 630 μ L de inóculo y se agregaron a 62.370 mL de RPMI. El inóculo se reservó para el llenado de las placas de microtitulación con los tratamientos respectivos.

2.2.3 Llenado de placas de microtitulación

A partir de las segundas de diluciones, para cada concentración por cada tratamiento (*Hb* MeOH, estándares y FCA), se colocaron alícuotas en placas de microtitulación. Para ello, se vació el contenido de cada tubo a una cubeta para multicanal, respectivamente. Con ayuda de una micropipeta multicanal (8 canales) se tomaron de 100 μ L y se llenaron los pocillos de la columna número 2 (2A-2H) y así sucesivamente para todos los tubos. Las placas se rellenaron con 100 μ L del inóculo, dando un total de 200 μ L en cada pocillo. Con excepción de la fila A (1A-12A), donde no se colocó inóculo, ya que esta fila contenía 100 μ L del tratamiento correspondiente y 100 μ L de RPMI. La columna número 1 y 12 sirvieron como controles negativo y positivo de forma respectiva. La número 1 contenía 200 μ L de

medio RPMI y la número 12 con 100 μL de RPMI con 100 μL de inóculo. Las placas se incubaron a 37° C durante 24 h

2.2.4. Lectura de las placas de microtitulación

La lectura de las placas se hizo con un lector de placas microtiter a una longitud de 405 nm y se capturó con el SKANTI, SOFTWARE 3.1 Research Editor for Multiskan FC (Thermo Scientific). La inhibición se muestra como porcentaje de inhibición. En el siguiente diagrama se muestra la estrategia general.

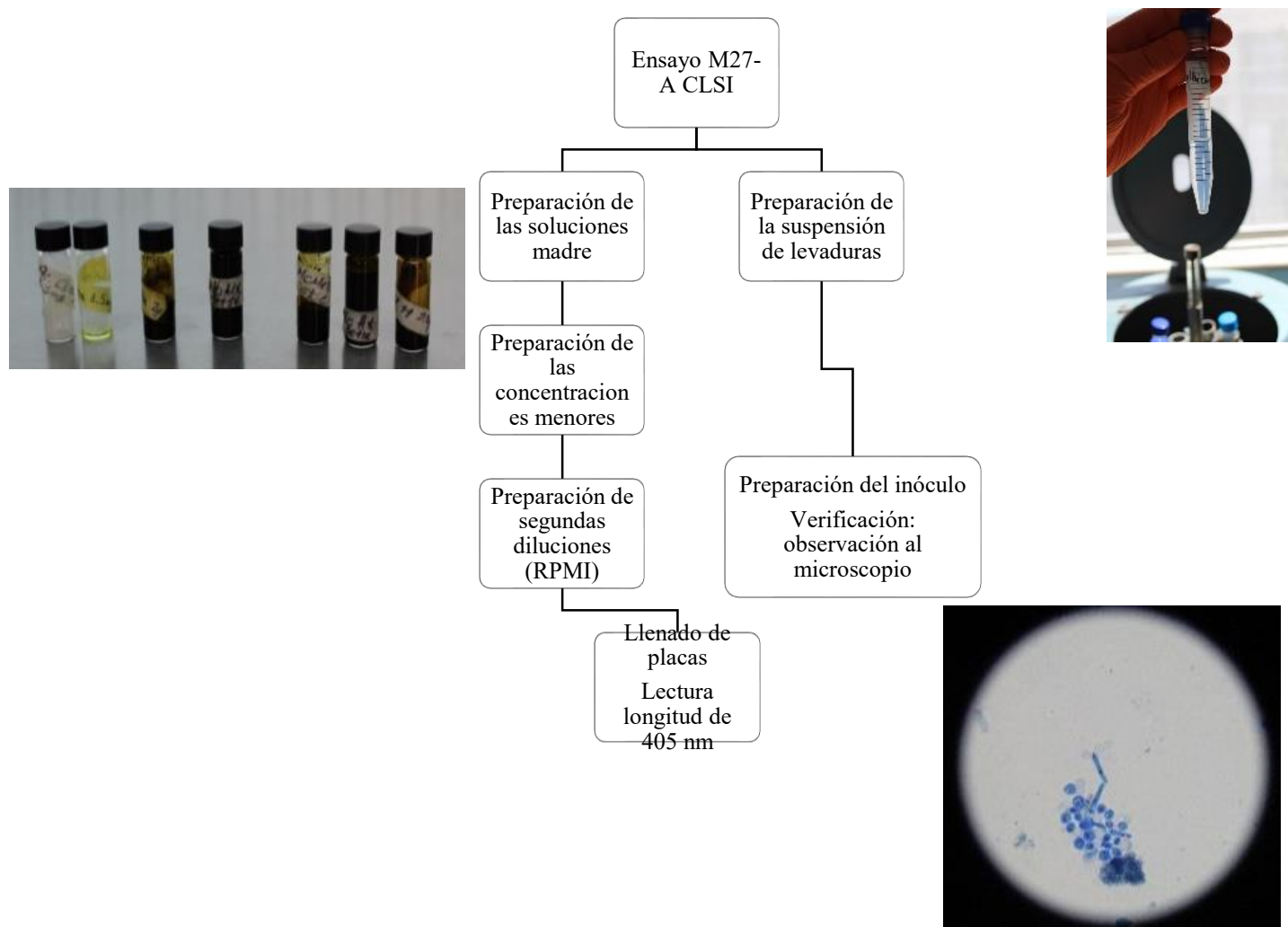


Diagrama 3. Estrategia general de la evaluación del efecto del extracto metanólico de *H. brachiata* sobre *Candida albicans*. Ensayo fue el M 27-A3, NCCLS.

2.3. Análisis Químico del Extracto Metanólico de *Heteropterys brachiata*

Se realizó el análisis químico cualitativo del extracto metanólico de *H. brachiata* (*Hb* MeOH), donde se buscó la presencia los principales metabolitos secundarios que se pueden encontrar en una planta: saponinas, alcaloides, flavonoides y taninos (54, 55, (56).

A continuación, se describe la metodología (ver diagrama 4),

2.3.1 Alcaloides

A 0.5 g del extracto *Hb* MeOH se le agregaron 5ml de una solución de HCl al 1%, se mezclaron y calentaron a baño María por 10 minutos. La mezcla se filtró y luego se le agregaron 10 gotas del reactivo de Dragendorff. La presencia de alcaloides se consideró positiva si se observaba un precipitado rojo ladrillo.

2.3.2 Flavonoides

Se agregaron 2 ml de NaOH al 1%, a 2 ml del extracto *Hb* MeOH, La presencia de flavonoides se consideró positiva si aparecía color amarillo

2.3.3. Saponinas

A 2 mL del *Hb* MeOH, se adicionaron 2 mL de agua destilada y se agitaron vigorosamente. Se dejó reposar por 2 minutos, la prueba se consideró positiva si se observaba la formación de una espuma persistente y estable.

2.3.4. Taninos

Se disolvieron 0.2 g del extracto *Hb* MeOH en una mínima cantidad de agua destilada. Después se filtró y se agregaron de 2-3 gotas de una solución de cloruro férrico (FeCl₃) al 10%. La prueba se consideró positiva si aparecía una coloración verde-negra o azul-negra en la solución.

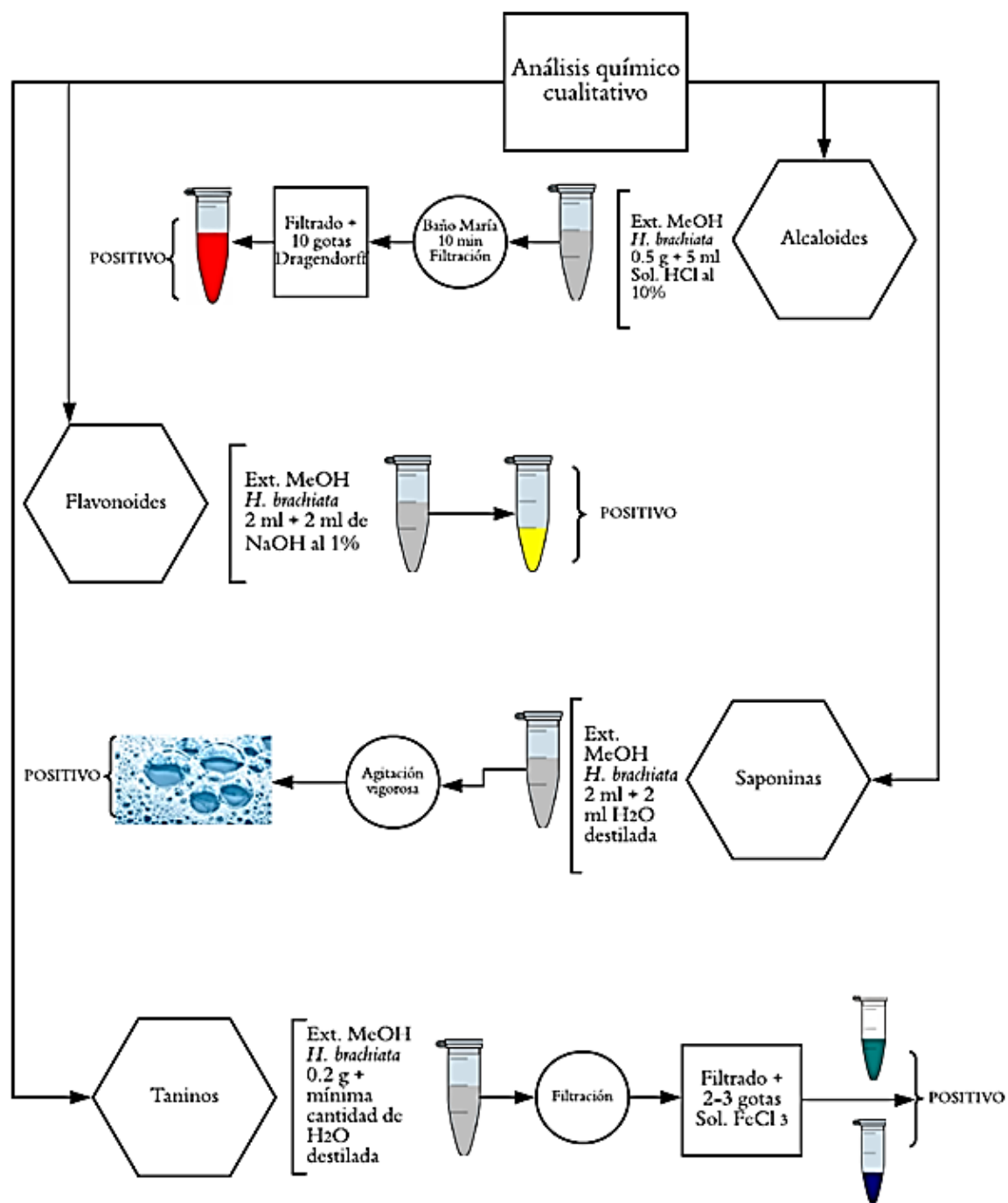


Diagrama 4. Presentación general del análisis químico cualitativo del extracto metanólico de *H. brachiata*.

VII. RESULTADOS

1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *HETEROPTERYS BRACHIATA*

1.1. Preparación del Material Vegetal

El peso del material vegetal seco y molido, fue de 2 200 kg, del cual se obtuvo el extracto metanólico de *Heteropterys brachiata* (Hb MeOH), a partir del cual, se realizaron el resto de los experimentos (ver figura 4).



Fig. 4. Extracto Metanólico de *Heteropterys brachiata*, al finalizar la sequedad mediante el alto vacío.

2. EVALUACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HETEROPTERYS BRACHIATA EN ENSAYOS BIOLÓGICOS PARA DETERMINAR SUS POSIBLES PROPIEDADES ANTIRETROVIRALES Y ANTIFÚNGICAS

2.1. Evaluación de la Inhibición de TR VIH-1 del Extracto Metanólico de *Heteropterys brachiata*

Con base a la estandarización del kit Lenti RT® Activity Assay (Cavidi Tech), se obtuvieron los resultados de la evaluación de la inhibición de TR VIH-1 del extracto metanólico de *H. brachiata*.

De acuerdo al kit, la actividad colorimétrica de la fosfatasa alcalina es proporcional a la actividad de la TR, por lo que el resultado se reportó en porcentaje de inhibición de la enzima. Las concentraciones que se ocuparon del extracto fueron: 1%, 0.1%, 0.01% (Tabla 1) y se usó como control se utilizó Nevirapina (Viramune®) un fármaco comercial inhibidor de TR.

Concentración del extracto MeOH	Porcentaje de Inhibición (%)
1%	38.8±1.5
0.1%	25.8±0.6
0.01%	12.5±1.0

Tabla 1. Resultados de la inhibición de la Transcriptasa Reversa de VIH-1 del extracto metanólico de *H. brachiata* (\pm S.D., n= 9, Nevirapina: 88.5% \pm 0.9)

2.2. Evaluación del Efecto del Extracto Metanólico de *Heteropterys brachiata* Sobre Cepas de *Candida albicans*

Se obtuvieron los porcentajes de inhibición del extracto metanólico de *H. brachiata* sobre cepas de *Candida albicans*.

En la tabla 2 se muestra el porcentaje de inhibición de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto metanólico de *H. brachiata*. Tomando en cuenta al NCCLS, que indica que si el porcentaje de inhibición es mayor al 50% se considera que es sensible el extracto metanólico de *H. brachiata* mostró sensibilidad. Donde la concentración de mayor inhibición, 98%, se presentó a una concentración de 10 mg/ml y la mínima sensible, 61%, fue a una concentración de 25 mg/ml.

[Hb MeOH]	10 mg/ml	5 mg/ml	2.5 mg/ml	1.25 mg/ml	625 µg/ml	312 µg/ml	157 µg/ml	78 µg/ml	39 µg/ml	19 µg/ml
% Inhibición	98 %	62 %	61 %	15 %	22 %	-30%	-18 %	-21%	-19 %	17 %

Tabla 2. Porcentajes de inhibición del extracto metanólico de *H. brachiata* sobre cepas de *Candida albicans*. En la fila superior, se muestra la concentración del extracto metanólico de *H. brachiata* (Hb MeOH) y en la fila inferior se muestra la inhibición de *C. albicans*, expresada como porcentaje de inhibición (% Inhibición).

En las tablas 3 y 4 se muestra el porcentaje de inhibición de *C. albicans* a diferentes concentraciones de los estándares ácido clorogénico, quercitina y rutina. A diferencia de del extracto MeOH que mostró sensibilidad, en los estándares no se alcanzó el mismo resultado.

Estándares	17.5 µg/ml	8.75 µg/ml	4.375 µg/ml	2.188 µg/ml	1.09 µg/ml	0.545 µg/ml	0.273 µg/ml	0.137 µg/ml	69 ng/ml	34.06 ng/ml
Ácido clorogénico	15 %	-11 %	12 %	4 %	-11 %	-10 %	2 %	-23 %	-5 %	5 %
Quercitina	9 %	13 %	29 %	35 %	17 %	23 %	24 %	8 %	15 %	10 %

Tabla 3. Se muestra en la fila superior la concentración de los estándares y en las filas inferiores se muestra la inhibición de *C. albicans*, expresada como porcentaje de inhibición (% Inhibición).

Estándares	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.125 mg/ml	62.5 µg/ml	31.25 µg/ml	15.75 µg/ml	7.81 µg/ml	3.91 µg/ml	1.96 µg/ml	0.977 µg/ml
Rutina	-4 %	61 %	35 %	25 %	22 %	20 %	30 %	35 %	31 %	19 %

Tabla 4. Se muestra en la fila superior la concentración del estándar y en la fila inferior se muestra la inhibición de *C. albicans*, expresada como porcentaje de inhibición (% Inhibición).

2.3. Análisis Químico del Extracto Metanólico de *Heteropterys brachiata*

Se llevó a cabo el análisis químico cualitativo del extracto metanólico de *H. brachiata*, donde se observó un resultado positivo para la detección de los siguientes grupos de metabolitos secundarios: alcaloides, saponinas y taninos (ver tabla 5).

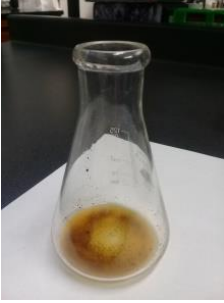
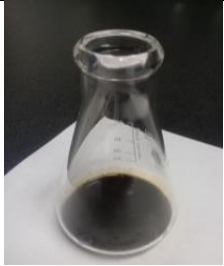


Grupo químico	Resultado	Observaciones	Fotografía
Alcaloides	+	Se observa color rojo ladrillo	
Flavonoides	-	Color verde a café oscuro	
Saponinas	+	Mucha espuma estable	
Taninos	+	Color negro verde	

Tabla 5. Resultados del Análisis Químico Cualitativo del extracto metanólico de *H. brachiata*

VIII. DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó las propiedades anti candidiales y anti TR VIH-1 del extracto metanólico de la especie vegetal *Heteropterys brachiata* (Malpighiaceae) (*Hb* MeOH), así como un estudio químico cualitativo para la identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios en plantas, tales como alcaloides, saponinas, flavonoides y taninos.

Respecto del análisis químico cualitativo para la detección de alcaloides en el extracto *Hb* MeOH, la presencia de este grupo químico se encuentra en coincidencia con reportes ya existentes en la literatura científica internacional para otras especies pertenecientes al mismo género *Heteropterys* spp. Tal es el caso de *H. aphrodisiaca* (57). Por lo tanto y hasta donde llega nuestro conocimiento, el presente estudio constituye entonces el primer reporte de la presencia de alcaloides en la especie objeto de estudio, *H. brachiata*.

Los alcaloides son un grupo de metabolitos secundarios que poseen nitrógeno en su estructura química y de los cuales se reconocen hoy día cerca de 20 diferentes clases de alcaloides, tales como pirrolinas, quinolizidinas, tropanos, piridinas, entre otros. La presencia de los alcaloides en las plantas se relaciona con funciones de defensa contra depredadores, especialmente vertebrados, insectos y artrópodos, debido principalmente a su sabor amargo; así mismo, los alcaloides se consideran como reguladores de crecimiento de las plantas, puesto que sus estructuras químicas son muy similares a importantes reguladores de crecimiento; también los alcaloides son considerados como reservorios de nitrógeno, debido a que en su estructura química poseen nitrógeno como distintivo de otros muchos metabolitos secundarios (58). Adicionalmente, los alcaloides son ampliamente reconocidos en el campo farmacológico debido principalmente a sus variadas y marcadas propiedades sobre Sistema Nervioso Central. A estas propiedades, se suman una amplia gama de propiedades farmacológicas diversas como por ejemplo, propiedades antitumorales, anti-asma, analgésicas, gastroprotectoras y anti VIH (59, 60). No obstante, son pocas las referencias de los posibles efectos anti candidiales de los alcaloides. Zielínska et al reportaron en 2019 la potente actividad antifúngica observada sobre *Candida albicans* cuando se evaluaron los alcaloides extraídos de *Chelidonium majus* (Papaveraceae) (61). Los alcaloides helerithrina y chelidonina, así como los extractos de brotes cultivados *in vitro* fueron capaces de inhibir

el 100% de unidades formadoras de colonias de *Candida albicans* (31.25, 62.5, and 500 mg/L, respectivamente). En este mismo estudio se observaron variaciones en los efectos inhibitorios sobre *Candida albicans* provocados por los alcaloides en su forma pura, respecto de mezclas de los mismos, por lo que la valoración estudio de estas propiedades antifúngicas provocadas por alcaloides, aún permanece bajo estudio. En otro reporte, el alcaloide denominado solacongestidina exhibió una potente actividad antifúngica (MIC= 0.8 µg/ml) sobre *Candida albicans*, mientras que los alcaloides solafloridina y verazina mostraron efectos antifúngicos sobre *C. albicans* (3.1 y 6.2 µg/ml, respectivamente). Adicionalmente, el alcaloide solacongestidina, prolongó el tiempo de supervivencia de los ratones infectados con *C. albicans* (62).

De esta manera, solo con observar este par de estudios, los alcaloides resultan un grupo interesante de metabolitos secundarios que han exhibido propiedades anti candidiales. En el presente trabajo, los efectos anticandidales observados quizás pudiesen estar relacionados con la presencia de alcaloides en el extracto *Hb* MeOH, sin embargo, más estudios son necesarios para la obtención de información más precisa.

Concerniente a las saponinas, la presencia de este grupo de compuestos químicos fue detectada en el presente trabajo en el extracto *Hb* MeOH y de acuerdo con la literatura internacional, también en otras especies del mismo género como *H. tomentosa* (63) y *H. aphrodisiaca* (57). Por lo tanto y hasta donde llega nuestro conocimiento, el presente estudio constituye entonces el primer reporte de la presencia de saponinas en la especie objeto de estudio, *H. brachiata*.

Las saponinas son un vasto grupo de glucósidos ampliamente distribuido en las plantas superiores. Una de las características más distintivas de las saponinas como grupo, son sus propiedades tensoactivas que les permiten disolverse en agua con facilidad para formar espuma al agitarse, por lo que han sido utilizadas como detergentes domésticos durante siglos. Esta propiedad, también les ha conferido la base de su nombre: saponinas, que viene del Latín “*sapo*” y que significa jabón (64). Las saponinas también se utilizan con mucha frecuencia en la industria farmacéutica debido a que algunas saponinas constituyen el punto de partida para la semisíntesis de fármacos esteroides. Un amplio número de saponinas son también empleadas en la industria cosmética, y debido a sus amplias y reconocidas

propiedades farmacológicas se utilizan en fitoterapia y son consideradas como la base activa de una amplia gama de plantas y/o productos medicinales (65). Particularmente, se considera que las saponinas son los compuestos clave en muchos productos medicinales orientales, como el caso del ginseng (66). Dentro de sus amplias propiedades farmacológicas exhibidas, un gran número de saponinas han mostrado efecto anticandidial. Solo por mencionar un par de ejemplos, citamos especies vegetales que si bien, no pertenecen al género objeto de estudio, *Heteropterys*, si pertenecen a la misma familia botánica: Malpighiaceae. En primer término, un conjunto de especies pertenecientes al género *Byrsonima* (*B. intermedia*, *B. fagifolia*, *B. basiloba*) que mostraron valores de MIC en un intervalo entre 6 y 9 mg/mL sobre *Candida albicans* (67), y en segundo término, la especie *Banisteriopsis anisandra*, cuyo extracto etanólico promovió una reducción significativa del crecimiento (215 mg/mL) de *Candida albicans*, muy similar a la mostrada por el ketoconazol, utilizado como control (68).

De esta manera, los estudios citados arriba, constituyen un antecedente para continuar estudiando a las saponinas como grupo químico en el extracto *Hb* MeOH y así poder establecer si dichas saponinas se encuentran relacionadas con los efectos anticandidales observados en el presente estudio.

Para el caso de los taninos, la presencia de este grupo químico fue detectada en el extracto *Hb* MeOH. Así mismo, reportes ya existentes en la literatura, revelan la presencia de taninos en otras especies del mismo género, como el caso de *H. tomentosa* (63) y *H. aphrodisiaca* (57). De esta forma y hasta donde llega nuestro conocimiento, el presente estudio constituye entonces el primer reporte de la presencia de taninos en la especie objeto de estudio, *H. brachiata*.

Los taninos son un grupo de metabolitos secundarios ampliamente sintetizados y distribuidos en un vasto número de especies vegetales. Entre sus funciones más importantes se encuentra su papel como reguladores del crecimiento en plantas, así como protección contra depredadores, debido a su carácter astringente que resulta poco agradable al paladar. A pesar de que a lo largo de la historia el concepto de tanino se ha modificado, hoy día se consideran como compuestos fenólicos, no nitrogenados, solubles en agua y no en alcohol ni disolventes orgánicos donde se contemplan a los taninos condensados, taninos hidrolizables

(proanthocianidinas) (69). Originalmente, los taninos fueron utilizados en la industria de pieles en los procesos de curtido, pero en la actualidad, sus usos se han diversificado y ampliado, de tal manera que son de gran interés en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia (70). Un amplio número de manuscritos acerca de taninos o de extractos y/o fracciones de plantas que han sido evaluados respecto de sus actividades anti candidiales, han sido reportados. Para propósitos de la presente discusión, mencionaremos solo algunos de ellos, donde las especies de plantas estudiadas pertenecen a la misma familia botánica, Malpighiaceae. El extracto etanólico de *Banisteriopsis laevifolia* mostró actividad anti-candidial en un intervalo de 31-63 µg/mL en distintas cepas de *Candida*: *C. krusei* y *C. parapsilosis* (71). Mientras que al igual que mencionamos con anterioridad para el caso de las saponinas, las especies del género *Byrsonima* (*B. intermedia*, *B. fagifolia*, *B. basiloba*) (67), así como *Banisteriopsis anisandra* (68) poseen propiedades anticandidales en la cepa *Candida albicans*. Así, el presente trabajo además de posiblemente constituir el primer reporte de la actividad anti-candidial de la especie *Heteropterys brachiata* respecto de su contenido de taninos, alienta a continuar el estudio de la especie para precisar la responsabilidad de los taninos en dichas propiedades anti-candidiales observadas.

Con relación a las propiedades anti TR VIH-1 observadas por el extracto *Hb* MeOH y bajo nuestro conocimiento, el presente trabajo constituye el primer reporte no sólo de la especie, sino también del género *Heteropterys* spp. Otras especies pertenecientes a la familia Malpighiaceae que han mostrado propiedades anti TR VIH-1, son por ejemplo, *Tetrapteris macrocarpa* (IC₅₀= 6-8 µg/ml) (49). Con referencia a los porcentajes de inhibición mostrados sobre TR VIH-1 del extracto *Hb* MeOH, éstos pueden considerarse de acción moderada (≥50%), de acuerdo con lo observado en otros extractos de plantas (72). Aun así, al igual que en el caso del presente estudio, no se pudo relacionar dicho efecto antiviral con algún metabolito en específico, por lo que estudios futuros son necesarios. Sin embargo, en la literatura existen una amplia cantidad de artículos que muestran que metabolitos pertenecientes a los grupos químicos de alcaloides (73), saponinas (74) y taninos (75) ya han sido identificados como inhibidores de TR VIH-1, aun así y como referimos con anterioridad, estos ejemplos citados son de extractos de otras plantas distintas al objeto del presente estudio.

Por otro lado, cabe destacar que ya se han reportado estudios en un número muy limitado de pacientes con SIDA (76, 77), apoyando el concepto de que algunos extractos de plantas o compuestos puros aislados de los extractos, poseen efectos anti VIH nos sólo *in vitro*, sino también *in vivo*. Por lo tanto, los extractos de plantas medicinales pueden considerarse como una excelente fuente de moléculas anti VIH-1 de relevancia clínica (78), donde el presente estudio pretende ser una contribución a la suma de dichos esfuerzos.

La pandemia causada por la infección por VIH está lejos de ser controlada y aún menos erradicada, actualmente en el mundo existen aproximadamente 37 millones de sujetos VIH+. Mientras no exista un mecanismo preventivo eficiente que disminuya la tasa de contagio, el objetivo principal de salud de estos sujetos es el control de la replicación viral usando drogas antirretrovirales. De esa forma el objetivo es que la enfermedad causada por la infección por VIH se comporte como una enfermedad crónica que, aunque incurable, sea controlable. En consecuencia, en este momento hay aproximadamente, 37 millones de sujetos que requieren tratamiento antirretroviral anti VIH (TAR-VIH). Los antirretrovirales disponibles y su combinación han dado lugar al denominado Tratamiento Antirretroviral Altamente Activo (TAAA). El TAAA ha logrado prolongar de manera importante la vida de los sujetos VIH+/SIDA, y en consecuencia mejorado sensiblemente su calidad de vida. Desafortunadamente el TAR-VIH produce numerosos y diversos efectos adversos que van desde leves hasta los que amenazan la vida. Además, su administración de por vida se asocia al desarrollo de resistencia del VIH a casi todos los antirretrovirales anti VIH. Además, un problema muy importante es que la TARV-VIH no está disponible para todos los pacientes. Se estima solo un 46% del total de sujetos VIH+/SIDA tienen acceso a la terapia o se encuentran bajo terapia antirretroviral (79). Por lo anterior se hace trascendente e imperativa la constante y continua búsqueda de drogas anti VIH seguras, eficientes y baratas y con efectos significativos contra el VIH. Las plantas medicinales constituyen una alternativa posible y probable. Estos nuevos compuestos pueden conducir a una nueva forma de TAR-VIH (80).

El presente trabajo mostró que el extracto metanólico de *H. brachiata* (*Hb* MeOH) tiene actividad moderada de inhibición de la TR-VIH, de acuerdo con lo observado en otros extractos de plantas (72). En nuestro conocimiento esta es la primera vez que se reporta esta

actividad para el extracto *Hb* MeOH, no sólo de la especie *H. brachiata*, sino también del género *Heteropterys* spp. Otras especies pertenecientes a la familia *Malpighiaceae* también han mostrado propiedades anti TR-VIH, como *Tetrapteris macrocarpa* (IC₅₀= 6-8 µg/ml) (49). A pesar de que nuestros objetivos no contemplaron relacionar el efecto antiviral con algún metabolito en específico, pudimos identificar grupos de metabolitos secundarios alcaloides, saponinas, flavonoides y taninos. A estos compuestos fitoquímicos (alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, glucósidos, taninos y saponinas) se les ha adjudicado actividad anti VIH y han sido extraídos de muy diferentes plantas e.g. *Artemisia annua*, *Garcinia edulis*, *Justicia gendarussa*, *Phyllanthus pulcher*, *Rhus chinensis*, *Smilax corbularia*, *Terminalia paniculata*, *Tuberaria lignosa*, *Sutherlandia frutescens*, *Calendula officinalis*, y *Sceletium tortuosum* (81, 82).

Diferentes componentes, principalmente enzimáticos, del VIH han sido blanco de los metabolitos de las plantas. *G. edulis* mostró actividad anti-proteasa VIH-1 a un valor IC₅₀ de 11.3 µg/mL; *C. officinalis* inhibe la fusión de VIH a una concentración de 500 µg/mL; los polisacáridos presentes en la *Hyssopus officinalis* producen inhibición en la replicación viral, al igual que los polifenoles extraídos de *P. sidoides*. El extracto de la pulpa de *Momordica balsamina* perteneciente a la familia de las Cucurbitaceae también es un potente inhibidor de la replicación viral (81). El kuwanon-L, aislado de *Morus nigra*, posee actividad anti-integrasa comparable a la observada con TAR-VIH (80). Diferentes especies de la familia Lamiaceae aparentemente presentan un efecto directo sobre las estructuras externas virales, siendo este efecto dosis-dependiente, por lo que se ha propuesto como una potencial terapia adjunta (80). De especial interés para el presente trabajo, se ha reportado efecto anti transcriptasa reversa del VIH (TR-VIH) por metabolitos de plantas. Especies del género *Rheum* (*R. palmatum* y *R. officinale*) inhiben la replicación de VIH inhibiendo TR-VIH; extractos metanólicos y de acetona de *C. officinalis* ≤10.3 µg/mL produce inhibición de la TR-VIH del ≥77.7% (81). Calanolides derivados de *Calophyllum lanigerum* tienen actividad in vitro anti-TR-VIH; la patenteiflorina A, un glucósido aislado de *J. gendarussa* también inhibe la TR-VIH en genotipos de VIH resistentes a nevirapina (80). El objetivo principal del presente trabajo fue establecer el efecto anti VIH de compuestos presentes en el extracto metanólico de *H. brachiata*. El posible efecto inhibitorio se estableció a través de un ensayo colorimétrico no radiactivo (Lenti RT® Activity Assay; Cavid Tech), el cual es una prueba

estandarizada para medir viabilidad viral, y que utiliza como sustrato la enzima transcriptasa reversa – VIH. Nuestros resultados muestran que el extracto metanólico de *H. brachiata* tiene actividad moderada de inhibición de la TR-VIH. Sin embargo, esto no excluye que los extractos puedan tener acción sobre otros mecanismos enzimáticos o compuestos estructurales del VIH. Para poder dilucidar esta interrogante, al igual que los mecanismos de acción sobre la TR-VIH, es necesario diseñar protocolos de investigación *ex profeso* para tal fin.

Por otra parte, la candidiasis oral (CO) es la infección oportunista más frecuente en los sujetos VIH+/SIDA. Tan es así que se le adjudicó un importante valor diagnóstico, pronóstico y como marcador de falla de terapia antiretroviral (83). Al menos el 80% de todos los pacientes VIH+/SIDA presentan al menos un evento clínico de CO en su vida. Si tomamos en cuenta que actualmente hay aproximadamente 37 millones de sujetos VIH+ en el mundo, la cantidad de enfermos que padecen, padecerán o padecieron candidiasis oral es enorme. Por lo anterior el contar con fármacos antifúngicos con eficacia anti-candidal comprobada se vuelve primordial. Aunque existen diferentes tipos de antifúngicos para el tratamiento de CO en sujetos VIH/SIDA que muestran éxito terapéutico, la condición de inmunosupresión siempre estará favoreciendo reinfecciones o reactivaciones de cepas residentes por lo que continuamente están sometidos a tratamiento antimicóticos por largos períodos de tiempo, prácticamente durante toda su vida. Actualmente, el tratamiento convencional de candidiasis oral es a base de azoles y polienos, donde el fluconazol, ketoconazol dentro de los primeros, y la nistatina en los segundos son los fármacos de elección. Los tratamientos por tiempo prolongado incrementan la prevalencia de cepas de *C. albicans* resistentes a los medicamentos, así como la presencia de cepas no-*albicans* de *Candida* (que muestran mayor resistencia) e incrementan la colonización por especies con resistencia intrínseca como *C. glabrata*, *C. dubliniensis* y *C. auris* (12, 84, 85). Aunque muestra un efecto terapéutico bueno, el uso prolongado de fluconazol aumenta el riesgo de que cepas de *C. albicans* desarrollen resistencia a este azol (86). Para el tratamiento de las personas con CO refractario a fluconazol se propone la utilización de equinocandinas con una alta tasa de éxito (87). Sin embargo, la aplicación de equinocandinas es por vía intravenosa, lo que restringe su aplicación. Por otra parte, la mayoría de los medicamentos antifúngicos son caros y por lo tanto pueden no ser asequibles para poblaciones VIH/SIDA

residentes en países en desarrollo (88). El aumento de cepas resistencias a los antimicóticos, pone de manifiesto la necesidad de descubrir nuevos y mejores antimicóticos. Una alternativa viable entonces es la fitofarmacia y los productos naturales, que podrían constituirse en nuevas alternativas para el tratamiento de la candidiasis oral. En el presente trabajo se demostró que cepas ATCC de *C. albicans* son sensibles al *Hb* MeOH a partir de una concentración de 2.5 mg/ml alcanzando un máximo de inhibición en una concentración de 10 mg/ml. Tomando como base las recomendaciones del NCCLS, que indica que si el porcentaje de inhibición es mayor al 50% se considera que es sensible, las cepas de *C. albicans* probadas mostraron sensibilidad el extracto metanólico de *H. brachiata*. La mayor inhibición, 98% se presentó en una concentración de 10 mg/ml y la mínima sensible, 61%, fue a una concentración de 2.5 mg/ml (53).

Diversos extractos de plantas con actividad anti-candidal han sido reportados. Entre ellos se han descrito a *Cinnamomum zeylanicum* (0.01 µg/ml), *Eucalyptus* (0.05 µg/ml), aceite de limón (0.06 µg/ml), aceite de jengibre ((0.08 µg/ml), Menta (0.08 µg/ml), Cilantro (0.2 µg/ml), y *Thymus villosus* (0.64 µg/ml) (89) (85). Extractos de *Mentha piperita*, *Tabebuia avellaneda*, *Casearia sylvestris*, *Arctium lappa*, *Arrabidaea chica*, *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium cumini* y *Punica granatum* producen inhibición de enzimas proteolíticas de cepas de referencia de especies de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. utilis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata* y *C. rugosa* (90, 91). Otras plantas cuyos extractos han probado tener efecto anti-candidal son *Achillea millefolium*, *Mikania glomerata*, *Stachys byzantine*, *Tribulus terrestris* (91, 92, 93), *Zygophyllum fabago*, *Vincetoxicum stocksii* (94, 95). Extractos de *Juglans regia*, *Eucalyptus globulus*, *Pterospartum tridentatum*, *Rubus ulmifolius*, *Origanum vulgare*, *Lippia graveolens* y aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* mostraron actividad anti *C. albicans* y anti *C. glabrata* (96). La presencia de *Eugenia uniflora* reduce notoriamente la filamentación en colonias de *C. albicans* e induce cambios en la transición de levadura a hifa (97, 98). Entre los principios activos propuestos para justificar la actividad anti-candidal están los taninos identificados en *A. chica*, *R. officinalis*, *S. cumini*, y *P. granatum* (90), flavonoides (99) y terpenos (91), polifenoles (96). Nosotros pudimos identificar en *Hb* MeOH alcaloides, saponinas, flavonoides y taninos. Las saponinas han mostrado efecto anti-candidal en la familia Malpighiaceae en el género *Byrsonima* (*B. intermedia*, *B. fagifolia*, *B. basiloba*) muestran

MIC en un intervalo entre 6 y 9 mg/mL sobre *C. albicans* (67), y en segundo término, la especie *Banisteriopsis anisandra*, cuyo extracto etanólico promovió una reducción significativa del crecimiento (215 mg/mL) de *C. albicans*, muy similar a la mostrada por el ketoconazol, utilizado como control (68). Taninos provenientes de *Banisteriopsis laevifolia* mostraron actividad anti-candidial en un intervalo de 31-63 µg/mL 1 en cepas de *C. krusei* y *C. parapsilosis* (71), mientras que las especies de *Byrsonima* (*B. intermedia*, *B. fagifolia* y *B. basiloba*) (67), así como *Banisteriopsis anisandra* (68) poseen propiedades anti-candidales contra *Candida albicans*.

Nuestros resultados entonces muestran que el extracto metanólico de *H. brachiata* posee actividad anti VIH-1 y anti-candidal. Este hecho cobra enorme relevancia debido a que la candidiasis, específicamente candidiasis oral es la infección oportunista más frecuente en la población VIH+/SIDA. La posibilidad de que un fármaco tuviera dos blancos biológicos diferentes empezó a ser postulado a mediados de los años 90's del siglo pasado, cuando se introdujeron los inhibidores de la proteasa del VIH-1 al tratamiento antirretroviral VIH-1. Ya que los mecanismos de adhesión de *Candida* constituyen mecanismos trascendentales para su patogenicidad y virulencia, estos mecanismos son mediados por las proteasas aspárticas secretorias (SAP's) (100). De tal forma se sugirió que los inhibidores de proteasa del VIH-1 pudieran al mismo tiempo inhibir las proteasas candidales. Clínicamente en un principio hubo una dramática disminución en los casos de candidiasis oral, específicamente la variedad clínica pseudomembranosa, y se demostró un 97% de susceptibilidad a saquinavir (un inhibidor de proteasa) en cepas de *Candida* provenientes de sujetos VIH+ y 52% a Indinavir (101). Sin embargo, la candidiasis oral no desapareció por completo en pacientes bajo TAAA aún cuando incluía un inhibidor de proteasa (102). La posibilidad biológica de que una droga tuviera un efecto anti VIH así como un efecto anti-candidal se estableció; y los factores de virulencia, principalmente las proteasas aspárticas secretadas, se constituyeron como objetivos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos anti-candidales estimulando la búsqueda de nuevos compuestos farmacológicos naturales con propiedades anti-SAPs (103). Aunque determinar el blanco de acción del extracto metanólico de *H. brachiata* sobre las cepas de *Candida*, rebasa los objetivos del presente trabajo, que habrá que descartar o confirmar una posible acción anti-SAP's con proyectos de investigación diseñados *ex profeso*.

La posibilidad de contar con una medicina, alopática o alternativa, con doble función terapéutica es un objetivo importantísimo y trascendental, más para una enfermedad caracterizada por el desarrollo de infecciones oportunistas. Nuestros resultados sugieren la posibilidad de que el extracto metanólico de *H. brachiata* posea esta característica ya que mostró actividad anti-candidal y anti VIH. Existen antecedentes de que plantas medicinales también son utilizadas para una doble terapéutica. El reporte de Davids *et. al.* (104) muestra que cuatro plantas medicinales, *Agathosma apiculata*, *Aloe ferox*, *Bulbine alooides*, *Hypoxis hemerocallidea* y *Lessertia frutescens* son reconocidas por tener propiedades anti VIH y se utilizan como tratamiento para la tuberculosis por médicos naturistas.

Entre las plantas más frecuentemente reportados utilizadas en etnomedicina para el tratamiento conjunto de VIH, tuberculosis, herpes zóster y de especial interés para el presente proyecto, candidiasis, están *H. hemerocallidea*, *L. frutescens* y *Asparagus densiflorus* (104). Aunque evidentemente éstos son resultados empíricos y tendrán que ser confirmados, muestran la posibilidad de que un solo principio activo presente un doble efecto.

IX. CONCLUSIÓN

El extracto metanólico de *Heteropterys brachiata* posee propiedades anti TR VIH-1 y propiedades anti-candidales, por lo que puede considerarse como un candidato futuro para ser útil en la terapia de SIDA debido a su doble efecto farmacológico que podría impactar en el apego de los pacientes al tratamiento, así como en la disminución del costo de los tratamientos y, eventualmente también en la disminución de la mortalidad asociada a VIH, a partir de un recurso natural nacional.

Los productos naturales pueden ser una alternativa eficaz para el tratamiento de diferentes condiciones. El desarrollo tecnológico actual hace posible el acercamiento al entendimiento de los principios activos de productos naturales con potencial terapéutico, posicionándose entonces los productos naturales como una estrategia exitosa para el desarrollo de nuevos fármacos. El descubrimiento y desarrollo de fármacos obtenidos de plantas es una importantísima contribución para resolver los desafíos mundiales de salud y alcanzar los objetivos de desarrollo sustentable en salud (105). Para una enfermedad como el VIH, donde

existe una enorme demanda de drogas antiretrovirales los avances en fitofarmacia podrían potencialmente contribuir a cerrar la brecha de oferta.

Se espera que a medida que la tecnología de producción y purificación se vuelva más estandarizada y que más candidatos de plantas progresen a lo largo del estudios preclínicos y clínicos, las plantas se convertirán en una fuente de productos biológicos terapéuticos y preventivos eficaces de uso rutinario. Las plantas presentan varias ventajas para su posible producción. A diferencia de los sistemas de células de mamíferos, las plantas no corren el riesgo de contaminarse con patógenos humanos, los sistemas de producción de plantas se escalan más fácilmente; y las plantas pueden cultivarse en grandes cantidades en parcelas designadas o en invernaderos contenidos. El mantenimiento y cultivo de las plantas es simple y más barato en comparación con los medios de crecimiento complejos de células de mamíferos. Además, las plantas proporcionan una enorme biomasa en forma de tejido de hoja verde o como numerosas semillas de ciertos cultivos. Este último proporciona una ventaja adicional de almacenamiento estable durante períodos de tiempo más largos.

Por lo tanto, se deben llevar a cabo investigaciones futuras para verificar los efectos *in vitro* e *in vivo* de extractos de plantas anti VIH y anti-candidales y confirmar la eficiencia y seguridad de los compuestos propuestos especialmente en individuos infectados por el VIH y otros pacientes inmunocomprometidos que corren el riesgo de desarrollar candidiasis oral. Eventualmente ensayos clínicos deberán dar la conclusión final sobre la actividad antiviral y anticandidal y su aplicación en pacientes (79).

X. REFERENCIAS

1. Fauci AS. 25 years of HIV. *Nature*. 2008; 453(15): p. 289-90.
2. Boza-Cordero R. Patogénesis del VIH/SIDA. *Rev. CI EMed UCR*. 2017; V(I): p. 28-46.
3. ONUSIDA. Hoja informativa — Últimas estadísticas sobre el estado de la epidemia de SIDA. [Online].; 2020 [cited 2020 Febrero 3]. Available from: <https://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>.
4. Herron JC, Freeman S. A Case for Evolutionary Thinking: Understanding HIV. In Wilbur B, editor. *Evolutionary Analysis*. United States of America: Pearson; 2014. p. 1-36.
5. Read TRH, Hocking J, Sinnott V, Hellard M. Risk factors for incident HIV infection in men having sex with men: A case-control study. *Sexual Health*. 2007; 4(1): p. 35-39.
6. Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(6): p. 447-57.
7. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*. 2010; 46(1): p. 5-14.
8. Boechat Andrade H, Righy Shinotsuka C, Rocha Ferreira da Silva I, Sunaitis Donini C, Yeh Li H, Bruzzi de Carvalho F, et al. Highly active antiretroviral therapy for critically ill HIV patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017; 12(10): p. e0186968.
9. Reyes-Montes MR, Duarte-Escalante E, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Frías-De León MG. Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Rev Iberoam Micol*. 2017; 34(4): p. 203-210.
10. Brown AJP, Brown GD, Netea MG, Gow NAR. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol*. 2014; 22(11): p. 614–622.
11. Clark-Ordóñez I, Callejas-Negrete OA, Aréchiga-Carvajal ET, Mouriño-Pérez RR. *Candida* species diversity and antifungal susceptibility patterns in oral samples of HIV/AIDS patients in Baja California, Mexico. *Med Mycol*. 2017; 55(3): p. 285-294.
12. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, et al. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol*. 2005; 22(2): p. 83-92.
13. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, et al. Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(8): p. 4159-4162.

14. Win NN, Ngwe H, Abe I, Morita H. Naturally occurring Vpr inhibitors from medicinal plants of Myanmar. *J Nat Med.* 2017; 71(4): p. 579–589.
15. Cos P, Maes L, Vlietinck A, Pieters L. Plant-derived leading compounds for chemoteraphy of human immunodeficiency virus (HIV) infection – an update (1998 - 2007). *Planta Med.* 2008; 74(11): p. 1323-1337.
16. Rungtung W, Ratha KK, Dutta S, Dixit AK, Hazra J. Secondary Metabolites of Plants in Drugs Discovery. *World Journal of Pharmaceutical Research.* 2015; 4(7): p. 604-613.
17. Jain C, Khatana S, Vijayvergia R. Bioactivity of Secondary Metabolites of Various Plants: A Review. *IJPSR.* 2019; 10(2): p. 494-504.
18. Anand U, Jacobo-Herrera N, Altemimi A, Lakhssassi N. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. *Metabolites.* 2019; 9(258): p. 1-13.
19. Rates SM. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 2001; 39(5): p. 603-63.
20. Kaur H, Mukhtar HM, Singh A, Mahajan A. Antiplasmodial medicinal plants: A literature review on efficacy, selectivity and phytochemistry of crude plant extracts. *J Biol Act Prod Nat.* 2018; 8(5): p. 272-94.
21. Ávalos-García A, Pérez-Urria Carril E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal.* 2009; 2(3): p. 119-145.
22. Tiwari R, Rana CS. Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science.* 2015; 3(5): p. 661-670.
23. Almaraz-Abarca N, Ávila-Reyes JA, Delgado-Alvarad EA, Naranjo-Jiménez N, Herrera-Corral J. El Metabolismo Secundario de las Plantas, Un Nuevo Concepto. *Vidsupra.* 2006; 1(2): p. 39-50.
24. Boucher HW, Ambrose PG, Chambers HF, Ebright RH, Jezek A, Murray BE, *et al.* White Paper: Developing Antimicrobial Drugs for Resistant Pathogens, Narrow-Spectrum Indications, and Unmet Needs. *J Infect Dis.* 2017; 216(2): p. 228-236.
25. Anderson WR, Anderson C, Davis CC. *Malpighiaceae.* Herbarium. [Online].; 2012 [cited 2020 Agosto 28. Available from: <http://herbarium.lsa.umich.edu/malpigh/index.html>.
26. León-Velasco ME. Catálogo de las especies útiles de la familia Malpighiaceae en el Estado de México y zonas aledañas [Tesis de Biología]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2005.
27. Anderson WR. *Malpighiaceae (Malpighia Family).* In Smith NP, Mori SA, Henderson A, Heald SV, Stevenson DW, editors. *Flowering plants of the Neotropics.* New York: Princeton University Press; 2004.

28. Leffa DD, da Silva J, Daumann F, Dajori AL, Longaretti LM, Damiani AP, *et al.* Corrective effects of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake on biochemical and genotoxic parameters in mice fed on a high-fat diet. *Mutat Res.* 2014; 770: p. 144-52.
29. Samoylenko V, Rahman MM, Tekwani BL, Tripathi LM, Wang YH, Khan SI, *et al.* *Banisteriopsis caapi*, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol.* 2010; 127(2): p. 357-67.
30. Argueta A, Cano LM, Rodarte ME. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana México: Instituto Nacional Indigenista; 1994.
31. Herrera-Ruiz M, González-Cortazar M, Jiménez-Ferrer E, Zamilpa A, Álvarez L, Ramírez G, *et al.* Anxiolytic effect of natural galphimines from *Galphimia glauca* and their chemical derivatives. *J Nat Prod.* 2006; 69(1): p. 59-61.
32. Tortoriello J, Herrera-Arellano A, Herrera-Ruiz ML, Rojas-Bribiesca G, Zamilpa A, González-Cortazar M. Aplicación clínica de un ansiolítico obtenido de *Galphimia glauca*. *Revista de Fitoterapia.* 2006; 6(S1): p. 37-40.
33. Aguilar-Santamaría L, Ramírez G, Herrera-Arellano A, Zamilpa A, Jiménez JE, Alonso-Cortés D, *et al.* Toxicological and cytotoxic evaluation of standardized extracts of *Galphimia glauca*. *J Ethnopharmacol.* 2007; 109(1): p. 35-40.
34. Heinrich M, Ankli A, Frei B, Weimann C, Sticher O. Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. *Soc Sci Med.* 1998; 47(11): p. 1859-71.
35. Maldonado A. Búsqueda de la actividad antidepresiva de diferentes plantas medicinales mexicanas sobre modelos animales de depresión [Tesis] , editor. [México]: Instituto Tecnológico de Zacatepec; 2008.
36. Verdam MCDS, Guilhaon-Simplicio F, Andrade KCD, Fernandes KLM, Machado TM, da Silva FMA. Analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant activities of *Byrsonima duckeana* WR Anderson (Malpighiaceae). *Scientific World Journal.* 2017; 2017(8367042).
37. Anderson WR. Origins of Mexican Malpighiaceae. *Acta Botanica Mexicana.* 2013; 104: p. 107-156.
38. Galvão SMP, Marques LC, Oliveira MGM, Carlini EA. *Heteropterys aphrodisiaca* (extract BST0298): a Brazilian plant that improves memory in aged rats. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79: p. 305-11.
39. Mattei R, Paz M, Pereira SM, Henriques EJ, deAraujo EL. *Heteropterys aphrodisiaca* O. Machado: effects of Extract BST0298 on the oxidative stress of young and old rats brains. *Phytother. Res.* 2001; 15: p. 604-7.

40. Galiotta G, Giuliani G, Loizzo A, Amat AG, Fumagalli E, DeFeo V, *et al.* Neurophysiological studies of *Heteropteris glabra* Hok. & Arn. (Malpighiaceae) in DBA/2Jmice. *J Ethnopharmacol.* 2005; 97: p. 415-9.
41. Huerta-Reyes M, Zamilpa A, Alvarez-Chimal R, Luna-Manzanares JA, León-Velasco ME, Aguilar-Rojas A, *et al.* *Heteropteris cotinifolia*: A neuropharmacological and phytochemical approach with possible taxonomic implications. *Scientific World Journal.* 2013; 2013(870468).
42. Junior HMS, Campos VA, Alves DS, Cavalheiro AJ, Souza LP. Antifungal activity of flavonoids from *Heteropteris byrsominifolia* and a commercial source against *Aspergillus ochraceus*; in silico interactions of these compounds with a protein kinase. *Crop Protect.* 2004; 62: p. 107-14.
43. Júnior WAR, Cardoso MLC, Vilegas W, Nakamura CV, Filho BPD, Mello JC. 2,3,4,6-Tetra-O-(3-nitropropanoyl)-O- β -D-glucopyranoside, a New Antimicrobial from the Roots of *Heteropteris aphrodisiaca*. *Acta Farm. Bonaerense.* 2005; 24(4): p. 543-5.
44. Melo FL, Benati FJ, Roman WAJ, de Mello JCP, Nozawa C, Linhares REC. The in vitro antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropteris aphrodisiaca*. *Microbiol. Res.* 2008; 163: p. 136-9.
45. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. *Heteropteris brachiata*. [Online].; 2010 [cited 2020 Marzo 23. Available from: <https://web.archive.org/web/20141220063122/http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Bejuco&id=7292>.
46. Huerta-Reyes M, Herrera-Ruiz M, González-Cortazar M, Zamilpa A, León E, Reyes-Chilpa R, *et al.* Neuropharmacological in vivo effects and phytochemical profile of the extract from the aerial parts of *Heteropteris brachiata* (L.) DC. (Malpighiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2013; 146: p. 311-17.
47. Huerta-Reyes M, Herrera-Ruiz M, Zamilpa-Álvarez A, González-Cortazar M, Tortoriello-García J, Aguilar-Rojas A, inventors; Extracto de *Heteropteris brachiata*, método de obtención y uso para el tratamiento de ansiedad y depresión. México patent 289104. 2011 Junio 29.
48. Robinson WE, Reinecke MG, Abdel Malek S, Jia Q, Chow AS. Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(13): p. 6326-6331.
49. Matsuse IT, Lim YA, Hattori M, Correa M, Gupta MP. A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. *J Ethnopharmacol.* 1999; 64(1): p. 15-22.
50. Fernández SP, Wasowski C, Paladini A, Marder M. Synergic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. *Eur J Pharmacol.* 2005; 512(2-3): p. 189-198.
51. Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea) MUNAdM. Departamento de Botánica,. [Online].; 2014 [cited 2020 Mayo 24. Available from: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:1284338>.

52. Shao X, Ekstrand DHL, Bhikhabhai R, Kallander CFR, Gronowitz JS. A non-radioactive microtitre plate reverse transcriptase (RT) assay, based on immobilized template, for screening for RT activity inhibitors and evaluation of their mode of action. *Antivir Chem & Chemother.* 1997; 8(2): p. 149-159.
53. Cantón Lacasa E, Martín Mazuelos E, Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). In Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo M, editors. *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*. 2nd ed. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología; 2007.
54. Harbone JB. *Phytochemicals methods: a Guide Plant to Modern Techniques of Plants Analysis* London: Chapman and Hall; 1973.
55. Sofowara A. *Medicinal plants and traditional medicine in Africa*. 2nd ed. New York: Wiley; 1982.
56. Trease GE, Evans WC. *Pharmacognosy*. 11th ed. London: Saunders; 1996.
57. Rieder A, Arruda PC. Plants known as “Node-to-dog” (*Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae) and its medicinal use in southwestern Mato Grosso, Brazil. *Planta Med.* 2011; 77(12): p. 1327.
58. Ali AH, Abdelrahman M, El-Sayed MA. Alkaloid Role in Plant Defense Response to Growth and Stress. In Jogaiah S, Abdelrahman M, editors. *Bioactive Molecules in Plant Defense.*: Springer International Publishing; 2019. p. 145-58.
59. Beutler JA, Cardellina JH, McMahon JB, Boyd MR, Cragg GM. Anti-HIV and cytotoxic alkaloids from *Buchenavia capitata*. *J Nat Prod.* 1992; 55(2): p. 207-13.
60. Daniel M. Alkaloids. In Daniel M. *Medicinal plants: chemistry and properties*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers; 2006. p. 10-55.
61. Zielińska S, Wójciak-Kosior M, Dziągwa-Becker M, Gleńsk M, Sowa I, Fijałkowski K, *et al.* The Activity of Isoquinoline Alkaloids and Extracts from *Chelidonium majus* against Pathogenic Bacteria and *Candida* sp. *Toxins.* 2019; 11(7): p. 406.
62. Kusano G, Takahashi A, Sugiyama K, Nozoe S. Antifungal properties of Solanum alkaloids. *Chem. Pharm. Bull.* 1987; 35(12): p. 4862-7.
63. Paula-Freire LI, Mendes FR, Molska GR, Duarte-Almeida JM, Carlini EA. Comparison of the chemical composition and biological effects of the roots, branches and leaves of *Heteropterys tomentosa* A. Juss. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 145(2): p. 647-52.
64. Hostettmann K, Marston A. *Saponins*: Cambridge University Press. ; 2005.
65. Sparg S, Light ME, Van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 94(2-3): p. 219-43.

66. Liu J, Henkel T. Traditional Chinese medicine (TCM): are polyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities? *Curr. Med. Chem.* 2002; 9: p. 1483-5.
67. Michelin DC, Sannomiya M, Figueiredo ME, Rinaldo D, Santos LCD, Souza-Brito AR, et al. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). *Rev. Bras. Farmacog.* 2008; 18: p. 690-5.
68. Pádua MS, Mendes-Costa MC, Ferreira JMS, Magalhães JC, Castro AHF. Assessment of antimicrobial activity in vitro of ethanolic extracts of *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae). *Rev. Bras. Plant. Med.* 2013; 15(3): p. 431-7.
69. Ky I, Floch L, Zeng A, Pechamat L, Jourdes L, Teissedre PL. Tannins. In Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, editors. *Encyclopedia of Food and Health*.; 2016. p. 247-255.
70. Sieniawska E, Baj T. Tannins. In Badal S, Delgoda R, editors. *Pharmacognosy. Fundamentals, Applications and Strategies*.: Academic Press; 2017. p. 199-232.
71. Nunes BC, Martins MM, Chang R, Morais SA, Nascimento EA, de Oliveira A, et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates leaves. *Ind Crops Prod.* 2016; 92: p. 277-9.
72. Klos M, Van de Venter M, Milne PJ, Traore HN, Meyer D, Oosthuizen V. In vitro anti-HIV activity of five selected South African medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol.* 2009; 124(2): p. 182-8.
73. Valadão ALC, Abreu CM, Dias JZ, Arantes P, Verli H, Tanuri A, et al. Natural plant alkaloid (emetine) inhibits HIV-1 replication by interfering with reverse transcriptase activity. *Molecules.* 2015; 20(6): p. 11474-89.
74. Konoshima T, Yasuda I, Kashiwada Y, Cosentino LM, Lee KH. Anti-AIDS agents, 21. Triterpenoid saponins as anti-HIV principles from fruits of *Gleditsia japonica* and *Gymnocladus chinensis*, and a structure-activity correlation. *J Nat Prod.* 1995; 58(9): p. 1372-7.
75. Bessong PO, Obi CL, Andréola ML, Rojas LB, Pouységu L, Igumbor E, et al. Evaluation of selected South African medicinal plants for inhibitory properties against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase. *J Ethnopharmacol.* 2005; 99(1): p. 83-91.
76. Vlietinck AJ, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med.* 1998; 64: p. 97-109.
77. Notka F, Meier G, Wagner R. Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. *Antiviral Res.* 2004; 64: p. 93-102.
78. Gambari R, Lampronti I. Inhibition of immunodeficiency type-1 virus (HIV-1) life cycle by medicinal plant extracts and plant-derived compounds. *Adv Phytomed.* 2006; 2: p. 299-311.

79. Cary DC, Peterlin BM. Natural Products and HIV/AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2018; 34(1): p. 31–8.
80. Bekut M, Brkić S, Kladar N, Dragović G, Gavarić N, Božin B. Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy. *Pharmacol Res*. 2018; 133: p. 301–14.
81. Laila U, Akram M, Shariati MA, Hashmi AM, Akhtar N, Tahir IM, *et al*. Role of medicinal plants in HIV/AIDS therapy. *Clin Exp Pharm Phys*. 2019; 46(12): p. 1063–73.
82. Salehi B, Kumar NVA, Şener B, Sharifi-Rad M, Kılıç M, Mahady GB, *et al*. Medicinal Plants Used in the Treatment of Human Immunodeficiency Virus. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(5): p. 1459.
83. Gaitán-Cepeda LA, Martínez-González M, Ceballos-Salobreña A. Oral candidosis as a clinical marker of immune failure in patients with HIV/AIDS on HAART. *AIDS Patient Care and Stds*. 2005; 19(2): p. 70-77.
84. Forsberg K, Woodworth K, Walters M, Berkow EL, Jackson B, Chiller T, *et al*. *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. *Med Mycol*. 2019; 57(4): p. e7.
85. Ramírez-Amador V, Patton LL, Naglik JR, Nittayananta W. Innovations for prevention and care of oral candidiasis in HIV-infected individuals: Are they available?—A workshop report. *Oral Dis*. 2020; 26(S1): p. 91–102.
86. Patton LL, Bonito AJ, Shugars DA. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 92(2): p. 170-179.
87. Vazquez JA, Schranz JA, Clark K, Goldstein BP, Reboli A, Fichtenbaum C. A phase 2, open-label study of the safety and efficacy of intravenous anidulafungin as a treatment for azole-refractory mucosal candidiasis. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008; 48(3): p. 30.
88. Nittayananta W. Oral fungi in HIV: challenges in antifungal therapies. *Oral Dis*. 2016; 22(S1): p. 107-13.
89. Soliman S, Alnajdy D, El-Keblawy AA, Mosa KA, Khoder G, Noreddin AM. Plants' Natural Products as Alternative Promising Anti-Candida Drugs. *Pharmacogn Rev*. 2017; 11(22): p. 104-122.
90. Hussein SAM, Barakat HH, Merfort I, Nawwar MAM. Tannins from the leaves of *Punica granatum*. *Phytochemistry*. 1997; 45: p. 819-823.
91. Anibal PC, Sardi JDCO, Peixoto ITA, Moraes JJDC, Höfling JF. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. *Brazilian J Microbiol*. 2010; 41(4): p. 824–31.
92. Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2005; 97(2): p. 305-311.

93. Costa CR, de Lemos JA, Passos XS, de Araujo CR, Cohen AJ, Souza LK, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of oral *Candida* isolates from HIV-infected patients in the antiretroviral therapy era. *Mycopathologia*. 2006; 162: p. 45-50.
94. Zaidi MA, Crow SAJ. Biologically active traditional medicinal herbs from Balochistan, Pakistan. *J Ethnopharmacol*. 2005; 96(1-2): p. 331-4.
95. Vidya K,RU,NW,LH,OF. Oral mycoses and other opportunistic infections in HIV: therapy and emerging problems - a workshop report. *Oral Dis*. 2016.; 22(S1): p. 158-65.
96. Sardi JCO, Almeida AMF, Mendes Giannini MJS. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites—A brief review. *Arch Oral Biol*. 2011; 56(10): p. 951-9.
97. Tsang PW, Bandara HM, Fong WP. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. *PLoS One*. 2012; 7(11): p. e50866.
98. Silva-Rocha WP, De Brito Lemos VL, Ferreira MRA, Soares LAL, Svidzinski TIE, Milan EP, et al. Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15(6).
99. Khan MS, Ahmad I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol*. 2012; 140(2): p. 416-423.
100. Ramírez Aristizábal LS, Arias Cristian M, Marulanda Osorio J. Estandarización de un método espectrofluorométrico para medición de proteasa aspártica secretada (Sap) de *Candida albicans*. *Rev Cubana Farm*. 2014; 48(2): p. 261-72.
101. Mata-Essayag S, Magaldi S, Hartung de Capriles C, Deibis L, Verde G, Perez C. "In vitro" antifungal activity of protease inhibitors. *Mycopathologia*. 2001; 152(3): p. 135-142.
102. Ceballos-Salobreña A, Gaitán-Cepeda LA, Ceballos-Garcia L, Lezama-Del Valle D. Oral lesions in HIV/AIDS patients undergoing highly active antiretroviral treatment including protease inhibitors: a new face of oral AIDS? *AIDS Patient Care Stds*. 2000; 14(2): p. 627-35.
103. Braga-Silva LA, Santos AL. Aspartic protease inhibitors as potential anti-*Candida albicans* drugs: impacts on fungal biology, virulence and pathogenesis. *Curr Med Chem*. 2011; 18(16): p. 2401-2419.
104. Davids D, Blouws T, Aboyade O, Gibson D, De Jong JT, Van'T Klooster C, et al. Traditional health practitioners' perceptions, herbal treatment and management of HIV and related opportunistic infections. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2014; 10(1): p. 77.
105. Thomford N, Senthebane D, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, et al. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(6): p. 1578.

APÉNDICE I

Dar doble click sobre la carátula para abrir



Journal of Pharmaceutical Research International

32(16): 139-152, 2020; Article no.JPRI.60198

ISSN: 2458-9119

(Past name: *British Journal of Pharmaceutical Research*, Past ISSN: 2231-2019,
NLM ID: 101631750)

Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties of Malpighiaceae Family and Its Potential Impact for Oral Cavity Infectious Diseases

**Getsemaní Sinai Villanueva-Amador^{1,2}, Luis Octavio Sánchez-Vargas³,
Luis Alberto Gaitán-Cepeda¹ and Maira Huerta-Reyes²**

¹Laboratorio de Patología Clínica y Experimental, División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, Mexico.

²Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas, Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico.

³Laboratorio de Bioquímica y Microbiología Oral, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Mexico.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. Author GSV managed the literature searches. Author MHR designed the study and wrote the first draft of the manuscript. Authors LOSV and LAGC managed the analyses of the study, reviewing and editing. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/JPRI/2020/V32I1630658

Editor(s):

(1) Dr. Sung-Kun Kim, Northeastern State University, USA.

Reviewers:

(1) Vishnu Vats, Guru Gobind Singh Indraprastha University, India.

(2) Mohammad Waheed El-Anwar, Zagazig University, Egypt.

Complete Peer review History: <http://www.sdiarticles.com/review-history/60198>

Mini-review Article

**Received 11 June 2020
Accepted 18 August 2020
Published 24 August 2020**

ABSTRACT

Recently, the impact of oral infections on global human health and their importance in the complications of patients with some chronic conditions have been recognized. Current medical treatments deal with the specificity and resistance of pathogenic strains of the oral cavity made up of by bacteria, fungi and viruses; thus, novel substances are necessary for use as effective drugs. Plants have been a source of active chemical agents since ancient times; however, a number of family plants still remain unstudied. This is the case of Malpighiaceae, a flowering plant family that

*Corresponding author: E-mail: chilanguitsima@yahoo.com;



Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties of Malpighiaceae Family and Its Potential Impact for Oral Cavity Infectious Diseases

**Getsemaní Sinaí Villanueva-Amador^{1,2}, Luis Octavio Sánchez-Vargas³,
Luis Alberto Gaitán-Cepeda¹ and Maira Huerta-Reyes^{2*}**

¹Laboratorio de Patología Clínica y Experimental, División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, Mexico.

²Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas, Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico.

³Laboratorio de Bioquímica y Microbiología Oral, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Mexico.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. Author GSVA managed the literature searches. Author MHR designed the study and wrote the first draft of the manuscript. Authors LOSV and LAGC managed the analyses of the study, reviewing and editing. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/JPRI/2020/v32i1630658

Editor(s):

(1) Dr. Sung-Kun Kim, Northeastern State University, USA.

Reviewers:

(1) Vishnu Vats, Guru Gobind Singh Indraprastha University, India.

(2) Mohammad Waheed El-Anwar, Zagazig University, Egypt.

Complete Peer review History: <http://www.sdiarticle4.com/review-history/60198>

Mini-review Article

Received 11 June 2020

Accepted 18 August 2020

Published 24 August 2020

ABSTRACT

Recently, the impact of oral infections on global human health and their importance in the complications of patients with some chronic conditions have been recognized. Current medical treatments deal with the specificity and resistance of pathogenic strains of the oral cavity made up of by bacteria, fungi and viruses; thus, novel substances are necessary for use as effective drugs. Plants have been a source of active chemical agents since ancient times; however, a number of family plants still remain unstudied. This is the case of Malpighiaceae, a flowering plant family that

possesses secondary metabolites that have exhibited a variety of pharmacological effects with promising results. This review has as objective to provide an overview of the extracts and active constituents isolated from species belonging to the Malpighiaceae family, to emphasize their activities against bacteria, fungi and viruses during recent years and their potential impact on the pathogens of the oral cavity.

Keywords: *Malpighiaceae; bacteria; fungi; viruses; antimicrobial; oral microbiota.*

1. INTRODUCTION

Nature remains an essential source of compounds in healthcare, and particularly in the case of plants. It has been calculated that only approximately 15% of the plant species that exist in the world today have been considered for the study of their pharmacological properties [1,2]. Only in recent decades the mechanisms of action of these natural products have been described, encouraging continuing research in the pharmacology of plants [3]. In addition to this, the acceptance of persons on the use of plants as medicine renders plants highly attractive from the economic point of view, since data released by the WHO revealed that between 70% and 95% of individuals use traditional medicines for primary care worldwide. Consequently, the global market for traditional medicines has been estimated at US\$ 83 billion annually, with an exponential rate of increase [4]. In this regard, recent estimates disclose that at least 25% of all modern medicines are derived either directly or indirectly from medicinal plants, and, in the case of certain classes of pharmaceuticals, such as antitumoral and antimicrobial medicines, this percentage may be as high as 60% [4,5]. This information results especially interesting when looking at the ongoing explosion of antibiotic-resistant infections that continue to plague global health care [6]. For these reasons, research on plants with potential pharmacological properties, and specifically those that possess antimicrobial activities acquire current relevance in aspects of human health within a global context.

On the other hand, one of the most interesting environments for microbial growth, due to the variety of ecologic niches and the diversity, number of species, and complexity of microbiota, such as fungi, bacteria and viruses is the human oral cavity [7]. Solely for the case of bacteria, some reports refer that over 750 species inhabit the oral cavity, among which more than 50% remain unidentified, and some of these are implicated in a number of oral diseases [8,9]. Interestingly, in that the relationship between humans and their oral microbiota begins more

intensely shortly after birth and lasts a lifetime [8], this association results significant for oral and global health in humans. For example, considerable evidence suggests that poor oral health is related with systemic diseases such as rheumatoid arthritis, osteoporosis, cardiovascular diseases, poor glycemic control in diabetics, and preterm low birth weight. Even so, oral infections are also recognized as a problem in patients with some chronic conditions: human immunodeficiency virus, cancer, and pneumonia [10]. Thus, in this respect, it would appear notorious that oral microbes are involved in a number of oral diseases that impact global human health, among dental caries, periodontal disease, and candidiasis are the most common [11]. In addition to this information and especially in developing countries, it has been reported that oro-dental treatments and medicaments are usually expensive for general population; hence, people have been preferred the use of medicinal plants to treat oral afflictions [12]. Therefore, the search for novel drugs against microbes and in particular, for oral diseases, has been intensified during recent years.

Although a variety of medicinal plants has provided new and diverse chemical identities that are potentially useful as drugs, some botanical families remain unstudied. This is the case of the Malpighiaceae family, a flowering plant family which is widely represented in the New World which approximately 75 genera and 1,300 species with tropical and subtropical distributions [13]. However, this is mainly because the Malpighiaceae family possesses a number of conspicuous chemical constituents such as alkaloids, anthocyanins, flavonoids, terpenoids, and tannins that have exhibited a variety of pharmacological effects with promising results when tested as isolated or as part of an extract [14]. Thus, this review has as its objective to provide an overview of the extracts and active constituents isolated from species belonging to the Malpighiaceae family, emphasizing activities against bacteria, fungi, and viruses during recent years and their potential impact on microbes from the oral cavity.

1.1 Malpighiaceae Family: A Brief Panorama

At present, the greatest number of genera and species of Malpighiaceae thrive in South America, which is now considered its center of origin and diversification [13]. In particular, Mexico has been considered as relevant in the diversification process of Malpighiaceae, due the number of lineages that exist now in that country [15]. Thus, today in Mexico, 23 genera and 150 species are registered [16].

Malpighiaceae comprise species of discrete economic importance. A number of Malpighiaceae species are ornamental, among which *Galphimia gracilis* is probably the most common and it is characterized by yellow flowers. Due the pulpous and edible fruits of species of *Byrsonima*, *Bunchosia*, and *Malpighia* these are consumed from Mexico to Brazil [17]. Among these, *Malpighia emarginata* (popularly known as “acerola”) has acquired relevance during the last decade, due to that the content of the juices of fruits from different stages of maturity help to reduce oxidative stress and may decrease genotoxicity under obesogenic conditions due the high levels of vitamin C and rutin [18].

Other species of Malpighiaceae are known for their properties exerted on the Central Nervous System (CNS) because of the content of alkaloid types, including: N,N-DiMethylTryptamine (DMT), TetraHydroHarmine (THH), harmaline, and harmine. This is the case of the species *Banisteriopsis caapi*, which is a potent hallucinogen and an ingredient of the popular sacred and psychoactive beverage known as Ayahuasca, which is widely used for prophecy, divination, and as sacrament in South America. Recently, reports indicate the potential benefit of this species for treating Parkinson disease but, at present, there is no conclusive evidence on the effectiveness and efficacy in this disease [19,20]. Diverse species from the genus *Heteropterys* also have been exerting properties on CNS. The ethanolic extract of *H. glabra* possesses anxiolytic/sedative properties [21], while *H. tomentosa* demonstrated a positive effect on memory in aged rats [22]. The methanolic extract of *H. brachiata* showed antidepressant, anxiolytic, and anticonvulsant properties; in this extract, chlorogenic acid and its methyl ester were the majority compounds [23]. The Mexican endemic species *H. cotinifolia* possess antidepressant activities in which chlorogenic

acid and rutin are the main content of the extract [24].

The genus *Byrsonima* is probably that most extensively studied in the Malpighiaceae family, due to its traditional uses and its number of species (>100) [25]. Several properties have been investigated for a number of *Byrsonima* species, such as anti-inflammatory, antiulcer, antioxidant, antihyperlipidemic, antihemorrhagic, antiarrheal, antihyperglycemic, analgesic, and spasmogenic. Some investigations have been focused on their properties against Gram-positive and Gram-negative bacteria, mycobacteria, protozoa, and fungi because of the traditional uses reported [26]. However, information on their possible chemically active compounds remains scarce.

2. SEARCH STRATEGY

Electronic databases PubMed, Reference Manager, Scopus, Web of Science and Google Scholar were systematically reviewed for publications that present data on Malpighiaceae species that exert activities on bacteria, fungi, and viruses. The structured question formulated for this search was as follows: Which species of plants belonging to the Malpighiaceae family exhibit activity on bacteria, fungi, and viruses?. Then, in accordance with the PICO [Patient Problem, (or Population), Intervention, Comparison (or Control), Outcome] strategy for this search, we combined, by using Boolean operators [27], the following keywords (Table 1): “Problem/Population” (5), “Intervention” (6), and “Outcome” (6). The previously mentioned keywords made up the PICO framework, and were the same for the string search in the English and Spanish languages. The resulting articles strictly fulfilled the search inclusion criteria in order to be selected; otherwise, they were excluded.

2.1 Exclusion and Inclusion Criteria

In the present search, the articles eligible for inclusion were those that had in the content of the title or in the abstract, a member of the Malpighiaceae family and the antimicrobial activity. For this purpose, as member of the Malpighiaceae family, we included the names of species and genera, and, in the case of antimicrobial activity, bacteria, fungi, and viruses. Other inclusion criteria were: (i) articles published in the time frame from January 1990 to July 28, 2020; (ii) articles published in English and Spanish, (iii) articles whose research strategy

includes controlled studies. The exclusion criteria were: (i) articles published outside the established time frame, (ii) literature reviews, (iii) and articles that did not include antimicrobial activity of medical interest.

The initial screening of the title and the abstract served to select articles for further reading and analysis, in order to avoid misleading data. Afterward, the articles that were included were classified according to the respective antimicrobial activity.

3. FINDINGS OF THE PICO SEARCH FOR THE MALPIGHIACEAE FAMILY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

The initial search yielded 57 articles, among which 17 were eliminated due to being duplicates. From the remaining 40 articles, 30 were excluded by criteria described later and only 10 met the inclusive criteria. Fig. 1 presents a PRISMA flow chart to explain this process.

Table 1. PICO strategy. The keywords of each column were combined by “AND” and separated by “OR” for the search

Problem/Population	Intervention	Outcome
Bacteria	Malpighiaceae	Antibacterial
Fungi	Secondary metabolism	Antibiotic
Mycosis	Metabolism	Antimycotic
Virus	Plant extract	Antivirus
Infection	Extract	Fungicide
	Effect	Fungistatic

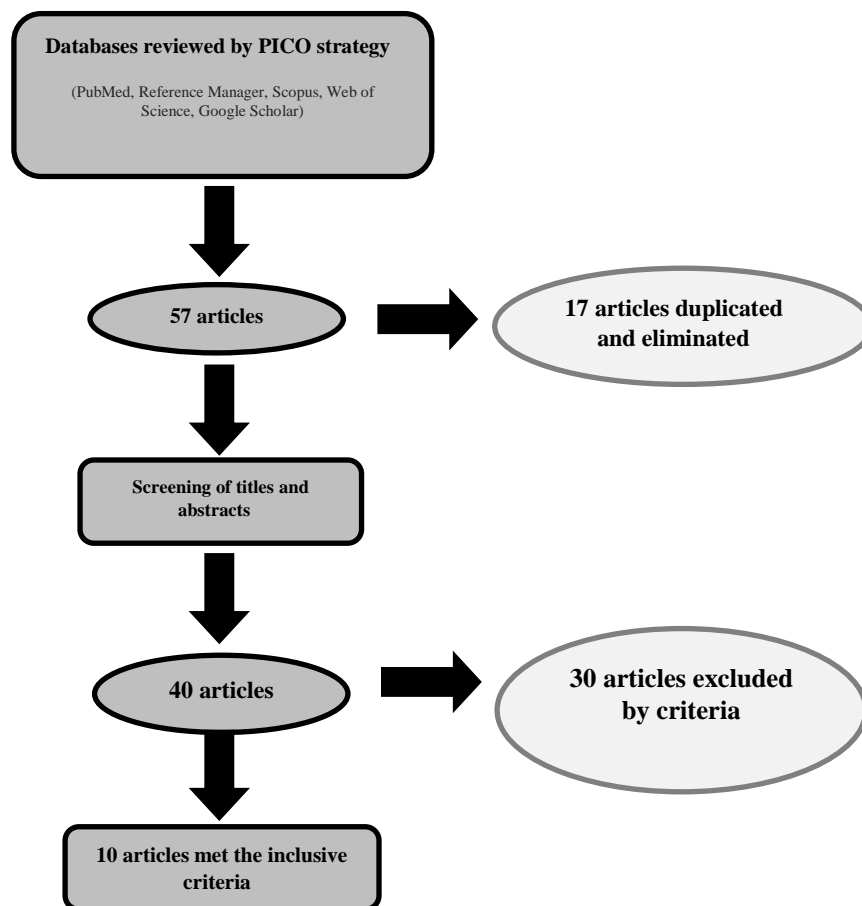


Fig. 1. PRISMA flow chart of exclusion / inclusion criteria. The search yields 17 duplicates from cross results among the groups of bacteria, fungi, and viruses. 10 articles met the inclusive criteria

Table 2. Summary of the articles included according with the criteria of search

Author	Inclusive criteria	Malpigiaceae species	Principal findings	Extract/compound
Bonacorsi et al. 2009 [28]	Antibacterial activity	<i>Byrsonima crassa</i> Nied.	<i>B. crassa</i> leaves extract possess components against <i>Helicobacter pylori</i>	Methanolic and chloroformic extracts
Santos et al. 2012 [29]	Antibacterial activity	<i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss	<i>B. intermedia</i> leaf extract presents gastroprotective, ulcer-healing, antibacterial, and antidiarrheal activities	Methanolic extract contents gallic acid, 3,4-di- <i>O</i> -galloylquinic acid, methyl gallate, catechin, epicatechin, 1,3,5-tri- <i>O</i> -galloylquinic acid, 1,3,4,5-tetra- <i>O</i> -galloylquinic acid, quercetin-3- <i>O</i> - β -galactopyranoside, quercetin-3-(2''- <i>O</i> -galloyl)- <i>O</i> - β -galactopyranoside, quercetin-3- <i>O</i> - α -arabinopyranoside, quercetin-3- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -galloyl)- α -arabinopyranoside and amentoflavone
Olugbuyiro et al. 2010 [30]	Antibacterial activity	<i>Flabellaria paniculata</i> Cav.	<i>F. paniculata</i> exhibit wound healing properties and antibacterial in vivo activities on <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Chloroform and aqueous fractions of the methanolic extract
Motohashi et al. 2004 [31]	Antibacterial activity	<i>Malpighia emarginata</i> DC.	Fractions of acetone and hexane extracts were highly cytotoxic against tumor cell lines such as human oral squamous cell carcinoma (HSC-2) and human submandibular gland carcinoma (HSG). Concerning extracts and fractions of hexane and ethyl acetate, although they showed some relatively higher antibacterial activity on Gram-positive <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 1228, they did not exhibit activity	Acetone, hexane and ethyl acetate extracts and fractions

Author	Inclusive criteria	Malpigiaceae species	Principal findings	Extract/compound
			against Gram-negative species <i>Escherichia coli</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , two <i>Candida</i> species, and HIV. However, hexane fractions exerted higher tumor-specific cytotoxicity and showed higher multidrug resistance (MDR) reversal activity, in which the radical-mediated oxidation is not involved in the induction of tumor-specific cytotoxic activity	
Hussain et al. 2014 [32]	Antifungal activity	<i>Acridocarpus orientalis</i> A. Juss	Flavonoids morin and morin-3-O- β -D-glucopyranoside were tested for anticancer, allelopathic, antifungal and antioxidant activities. In the case of antifungal properties, both flavonoids inhibited the growth of <i>Fusarium oxysporum</i> while they did not show inhibition against <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Alternaria alternate</i> and <i>Aspergillus niger</i> . Concerning anticancer activities, only morin tested at the 100 ppm concentration was able to reduce cancer cell viability in HepG2, HT29 and HCT116 cell lines. For allelopathic properties, both flavonoids showed significantly activity on the growth of various pathogenic fungi and phytotoxic activity against lettuce seed at higher concentrations. Finally, both	Morin and morin-3-O- β -D-glucopyranoside

Author	Inclusive criteria	Malpigiaceae species	Principal findings	Extract/compound
Oliveira et al. 2018 [33]	Antifungal activity	<i>Banisteriopsis argyrophylla</i> (A. Juss.) B. Gates	flavonoids exhibited strong antioxidant activities The ethyl acetate fractions exerted antifungal activities against <i>Candida</i> spp. (MIC) between 31.25 and 93.75 µg/ml, while the compound (-)-catechin exhibited a MIC of 2.83 µg/ml against <i>Candida glabrata</i> . Different ethyl acetate fractions showed inhibitory activities on the growth of <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , and <i>C. tropicalis</i> between (5.86–46.87 µg/ml). Although all samples were tested for Vero cells, no significant cytotoxic activities were found	Ethanollic extract, ethyl acetate fraction and compounds (-)-catechin, quercetin-3-O-b-D-Glc, quercetin-3-O-b-D-Ga, quercetin-3-O-b-L-Ara, quercetin-3-O-b-D-Xy, quercetin-3-O-a-L-Rha, kaempferol-3-O-a-L-Rha, quercetin-3-O-(2''- galloyl)-a-L-Rha, quercetin-3-O-(3''- galloyl)-a-L-Rha, kaempferol-3-O-(2''- galloyl)-a-L-Rha
Barros et al. 2019 [34]	Antifungal activity	<i>Malpighia emarginata</i> DC.	The saline extract of <i>Malpighia emarginata</i> with high concentration of flavonoids and phenolic acids exhibited antioxidant (through DPPH, ATT, and FRAP assays) and antifungal properties [<i>Candida albicans</i> (URM 5901), <i>C. krusei</i> (URM 6391), <i>C. tropicalis</i> (URM 6551), <i>C. parapsilosis</i> (URM 6951), and <i>C. glabrata</i> (URM4246)]. Additionally, the saline extract of <i>Malpighia emarginata</i> was not cytotoxic against mouse splenocytes (more than 90%), inducing a high proliferation index in these cells, showing the safe use of <i>M. emarginata</i>	Saline extract and compounds rhinocerotinoic acid, quinic acid, dimethoxycurcumin, protocatechuic acid, tolypodiol, pauciflorol A, gentisic acid, matricin, gallocatechin, 11a-hidroxi-3,7-dioxo-5a-lanosta-8,24 (E)-dien-26-oic acid, cicutoxin, salicylic acid, 2,5 ihydroxybenzaldehyde, apigenin-7-O- glucoside, magnosalicin, apigenin-8-O- glucoside, and isotriptophenolide

Author	Inclusive criteria	Malpighiaceae species	Principal findings	Extract/compound
Melo et al. 2008 [35]	Antiviral activity	<i>Heteropterys aphrodisiaca</i> O. Mach.	Although the compound 2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoyl)-O- α -D-glucopyranoside exhibited some discrete inhibition on poliovirus type 1 (PV-1) and bovine herpes virus type 1 (BHV-1), this activity was not significant (>50 μ g/ml)	2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoyl)-O- α -D-glucopyranoside
Matsuse et al. 1998 [36]	Antiviral activity	<i>Tetrapteris macrocarpa</i> Johnst.	A screening of 39 Panamanian medicinal plants against HIV. Extracts of 4 species showed potent inhibition against HIV-RT, among these, the methanolic extract of <i>Tetrapteris macrocarpa</i> (Malpighiaceae) (IC ₅₀ : 8 μ g/ml), while 7 species exhibited moderate inhibition on HIV-PR. Additionally, <i>Jatropha curcas</i> strongly inhibited the HIV-induced cytopathic effects with low cytotoxicity. Only the compounds corilagin and quercetin 3-O-b-D-glucopyranoside, magnesium lithospermate, calcium rosmarinate, and magnesium rosmarinate isolated from <i>Chamaesyce hyssopifolia</i> (Euphorbiaceae) exerted potent inhibition on HIV-RT through non-competitive mechanism with respect to the substrate.	Aqueous or methanolic extract. Compounds quercetin, quercetin 3-O- α -L-arabinopyranoside, quercetin 3-O-b-D-xylopyranoside, quercetin 3-O-b-D-glucopyranoside, quercetin 3-O-b-D-galactopyranoside, apigenin 7-O-b-D-glucopyranoside, kaempferol 3-O-b-D-glucopyranoside, gallic acid, gallic acid methyl ester, corilagin, and 1,3,4,6-tetra-O-galloyl-b-glucopyranose, magnesium lithospermate, calcium rosmarinate and magnesium rosmarinate.
Junior et al. 2005 [37]	Antibacterial and antifungal activity	<i>Heteropterys aphrodisiaca</i> O. Mach.	The antibacterial [<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6623), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)], and	2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoyl)-O- β -D-glucopyranoside

Author	Inclusive criteria	Malpigiaceae species	Principal findings	Extract/compound
			<p>the antifungal [(<i>Candida albicans</i>, <i>C. parapsilosis</i>, <i>C. krusei</i>, and <i>C. tropicalis</i>) activities were evaluated for the compound 2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoyl)-O-β-D-glucopyranoside]. The antifungal activity was stronger than the antibacterial activity, in which the minimal fungicidal concentration (MFC) was 250 µg/ml against all <i>Candida</i> species</p>	

The 30 articles were excluded due to the following reasons: off-topic [not medical interest, biotechnology, medical interest but not according to the antimicrobial activity (18)], data omission [mostly, the articles did not indicate the plant species or the results were not shown (6)], Malpighiaceae was not the subject of study (5), and antimicrobial activity was not in the title nor in the abstract (1).

The 10 articles that met the inclusive criteria are displayed in Table 2 and are classified by antimicrobial activity. In general the articles that studied the antibacterial activity of Malpighiaceae family constituted 50% of the articles included; while antifungal studies constituted 40% of all articles included. The most studied genus was *Candida* spp.

4. DISCUSSION

The present contribution included the literature available on the plant species belonging to the Malpighiaceae family that possess active constituents against bacteria, fungi, and viruses. Antibacterial was the main activity found in the literature reviewed, following by antifungal and antiviral activities. Although a variety of crude extracts, such as methanolic, aqueous, ethanolic, chloroformic, acetonic, hexanic, ethyl acetate, and saline extracts had been prepared and evaluated for antimicrobial activity, in these reviewed papers, the fractions and compounds isolated from these crude active extracts had been identified predominantly as polyphenols, particularly as flavonoids and phenolic acids (Table 2). These findings are in agreement with many other reports in the literature, since the flavan-3-ols and flavonols have been widely recognized as antibacterial, antifungal, and antiviral agents [38]. However, from the literature considered in the present review, the manuscript that stands out due its representing the most extensive phytochemical study of the Malpighiaceae family with antibacterial properties (Table 2), is that concerning the species *Byrsonima intermedia* with activity against *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*, in which the anti-diarrheal and anti-inflammatory effects observed were attributed to the presence of the oligomeric proanthocyanidins and flavonoids identified by the authors [29].

Regarding antiviral activity, a remarkable manuscript for the present review, was that which exhibited a wide phytochemical analysis

carried on the species *Tetrapteris macrocarpa*, in which, in addition to flavonoids and phenolic compounds, tannins were identified as a conspicuous group that previously had revealed inhibitory effects against HIV replicative enzymes such as RT and PR [36].

For the case of antifungal activity, although flavonoids and phenolic acids are the compounds most detected in the Malpighiaceae species cited by authors (Table 2), it results interesting to point out the diversity of the chemical groups detected in addition to flavonoids and phenolic acids as follows: terpenes, ketones, stilbenoids, and polyacetylene hydrocarbons, probably related with the saline extraction [34]. Likewise, the microorganism tested with most frequency for this activity in the literature reviewed in the present contribution was *Candida* spp., due its relevance as a pathogen, since *Candida* species are the most frequently microorganisms recovered from human fungal infection, especially in oral cavity [39,40], and also because recent data has demonstrated that infections caused by *Candida* species have risen significantly worldwide [41,42]. Oral candidiasis is the most common oral infection. Two main clinical forms of oral candidiasis have been described: pseudomembranous and erythematous. In the case of erythematous oral candidiasis, this clinical form has been associated with the use of acrylic dental prostheses (denture stomatitis). Epidemiological studies report a prevalence of prosthetic stomatitis among dental prosthetic users of up to 70%. Denture stomatitis is a common inflammatory reaction generally associated with *Candida* species, particularly *Candida albicans* [43]. Additionally, *Candida albicans* possess high virulence, the ability to adhere to acrylic (denture surfaces) and form biofilms in the oral mucosa. This fact acquires relevance due to the high prevalence of dental prosthesis users throughout the world, and the possibility of developing denture stomatitis. In such case, it is essential to increase phyto-pharmacological anti-candidal drugs, especially due to the increase in *Candida* strains resistant to antifungal agents conventionally used. In the case of pseudomembranous oral candidiasis, this clinical form is more frequent in children and in immunodeficient subjects, such as patients suffering chronic and degenerative diseases, cancer, or HIV infection. In HIV+/AIDS patients the presence of oral pseudomembranous candidiasis has an important diagnostic and prognostic value. Therefore, its control and

treatment is important in HIV+/AIDS patients [44].

Additionally, the emerging and increment of candidemias in hospitals has become more common, contributing mainly to the mortality of immunocompromised patients, such as those with AIDS, cancer, diabetes, chronic kidney disease, and organ transplantation [33]. In contrast to antibiotic-resistant infections, the study and development of antifungal agents have been discrete. This may be due to the mechanism of antifungal resistance, especially in the case of *Candida* spp., in which resistant strains can display a mechanism of inherent or acquired resistance. This may also be because the complex mechanisms of initial colonization of *Candida* spp. where adherence and biofilm formation are crucial. However, these mechanisms have not been fully understood [41,45].

Even when extracts and compounds obtained from Malpighiaceae species have exhibited properties against bacteria, fungi, and viruses, as we previously noted, the oral cavity represents an interesting object-of-study, in that the microorganisms that cause its diseases could be opportunistic and resistant strains. In addition, these could be because these infections are ascending in number and severity of cases worldwide, affecting the general health. For these reasons, searching for novel chemical agents of natural origin seems to be an alternative to explore for future candidates-of-study. In this regard, in the present review, one of the most interesting findings is the recognition of the compound 2,3,4,6-tetra-O- (3-nitropropanoyl)-O- β -D-glucopyranoside as an antimicrobe isolated from the Malpighiaceae family (Table 2), because of the antibacterial and antifungal activities against microbes that can cause infection in the oral cavity, such as *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *Staphylococcus aureus* [37]. Additionally, another aspect lies in that nitro aliphatic glycoside compounds have been found at present in some high plant families, such as Leguminosae (Fabaceae) [46,47], Malpighiaceae [48] and Corynocarpaceae [49], even more so, the nitro aliphatic compounds were proposed in the past as chemotaxonomic markers of the genus *Heteropterys* (Malpighiaceae) [37]. Thus, further studies of nitro aliphatic glycoside compounds obtained from Malpighiaceae species appear to be attractive for providing potential new pharmacological agents.

Therefore, taking together all the information presented in the present contribution, and to the best of our knowledge, the present study is the first report on the Malpighiaceae family and its pharmacological data for oral diseases. Thus, the Malpighiaceae family could be considered a potential source of secondary metabolites that could provide new therapeutic agents for the treatment of human oral infectious diseases. In addition, the development of dosage forms such as toothpaste, mouthwash and gel appears to comprise a solid possibility because of the recent available technologies that have been used for certain other plant extracts [50].

On the other hand, the present review was conducted following a PICO strategy based on the comprehensiveness that this tool can offer on comparison with others such as SPIDER or PICOS, and also to the feasibility for searching in a variety of databases [51]. Therefore, the present contribution is according with the increasing amount of qualitative state-of-the-art systematic reviews that also employ PICO as an effective search strategy for biomedical research studies [52]; but must of all, the present review pretends to provide knowledge in the area of natural chemical agents against microorganisms, and especially those with antibacterial, antifungal, and antiviral properties, through an exhaustive search of the species of the Malpighiaceae family, in which, these chemicals may be considered as future candidates of studies for pathogens of the oral cavity.

5. CONCLUSION

To the best of our knowledge, the present study is the first report of the Malpighiaceae family and its pharmacological data for oral infectious diseases. The Malpighiaceae family possesses the potential to be considered as a source of secondary metabolites with antibacterial, antifungal, and antiviral properties that could be useful for human oral infectious diseases, maintaining a general good state of health and avoiding complications in patients with chronic diseases. The number of species belonging to the Malpighiaceae that continue to remain unstudied encourages further studies on the development of therapeutic agents.

CONSENT

It is not applicable.

ETHICAL APPROVAL

It is not applicable.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grant FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/104 (to M. H.-R.) from the FIS-IMSS (Fondo de Investigación en Salud-Instituto Mexicano del Seguro Social), México. G.S. Villanueva-Amador is a master student from Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship (CVU 928551) from CONACyT through the Padrón Nacional de Posgrados de Calidad.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Rates SM. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001;39(5):603-63.
2. Kaur H, Mukhtar HM, Singh A, Mahajan A. Antiplasmodial medicinal plants: A literature review on efficacy, selectivity and phytochemistry of crude plant extracts. *J Biol Act Prod Nat*. 2018;8(5):272-94.
3. Armendáriz-Barragán B, Zafar N, Badri W, Galindo-Rodríguez SA, Kabbaj D, Fessi H, et al. Plant extracts: From encapsulation to application. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016; 13(8):1165-75.
4. World Health Organization. The world traditional medicines situation, in traditional medicines: Global situation, issues and challenges; 2011. Available:<http://digicollection.org/hss/documents/s18063en/s18063en.pdf> Accessed 8 April 2020.
5. Shu YZ. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J Nat Prod*. 1998; 61(8):1053-71.
6. Spellberg B, Gidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: A call to action for the medical community from the infectious diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):155-64.
7. Höfling JF, Mardegan RC, Anibal PC, Furletti VF, Foglio MA. Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and proteinases. *Mycopathologia*. 2011; 172(2):117-124.
8. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*. 2005;13(12):589-95.
9. Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: Potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2001;2011:680354.
10. Rautemaa R, Lauhio A, Cullinan MP, Seymour GJ. Oral infections and systemic disease an emerging problem in medicine. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(11):1041-7.
11. Silva MSP, Brandão DO, Chaves TP, Formiga Filho ALN, Costa EMB, Santos VL, et al. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: Contribution to the control of oral microorganisms. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012: 681207.
12. Rosas-Piñón Y, Mejía A, Díaz-Ruiz G, Aguilar MI, Sánchez-Nieto S, Rivero-Cruz JF. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplano region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *J Ethnopharmacol*. 2012; 141(3):860-5.
13. Anderson WR, Anderson C, Davis CC. Malpighiaceae. Herbarium, University of Michigan; 2012. Available:<http://herbarium.lsa.umich.edu/malpigh/index.html> Accessed 8 April 2020.
14. Huerta-Reyes M, Fonseca RM, Aguilar-Rojas A. *Heteropterys* genus: A review of its phytochemistry and pharmacology. *Int J Pharmacology*. 2015;11(6):523-31.
15. Anderson WR (2013) Orígenes de las Malpighiaceae mexicanas. *Act Bot Mex*. 2013;104:107-56.
16. León-Velasco ME. Catálogo de las especies útiles de la familia Malpighiaceae en el Estado de México y zonas aledañas, Tesis de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México; 2005. (Spanish) Available:<http://132.248.9.195/pd2006/0602597/Index.html> Accessed 8 April 2020.
17. Anderson WR Malpighiaceae (Malpighia Family). In: Smith NP, Mori SA, Henderson

- A, Heald SV, Stevenson DW, editors. Flowering plants of the Neotropics, New York: Princeton University Press; 2004.
18. Leffa DD, da Silva J, Daumann F, Dajori ALF, Longaretti LM, Damiani AP, et al. Corrective effects of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake on biochemical and genotoxic parameters in mice fed on a high-fat diet. *Mutat Res.* 2014;770:144-52.
 19. Samoylenko V, Rahman MM, Tekwani BL, Tripathi LM, Wang YH, Khan SI, et al. *Banisteriopsis caapi*, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol.* 2010;127(2):357-67.
 20. Kim TH, Cho KH, Jung WS, Lee MS. Herbal medicines for Parkinson's disease: A systematic review of randomized controlled trials. *PLoS One.* 2012;7:2012.
 21. Galletta G, Giuliani G, Loizzo A, Amat AG, Fumagalli E, De Feo V, et al. Neurophysiological studies of *Heteropterys glabra* Hok. and Arn. (Malpighiaceae) in DBA/2J mice. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 97(3):415-19.
 22. Galvao SMP, Marques LC, Oliveira MGM, Carlini EA. *Heteropterys aphrodisiaca* (extract BST0298): A Brazilian plant that improves memory in aged rats. *J Ethnopharmacol.* 2002;79(3):305-11.
 23. Huerta-Reyes M, Herrera-Ruiz M, Gonzalez-Cortazar M, Zamilpa A, Leon E, Reyes-Chilpa R. Neuropharmacological *in vivo* effects and phytochemical profile of the extract from the aerial parts of *Heteropterys brachiata* (L.) DC. (Malpighiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2013; 146(1):311-17.
 24. Huerta-Reyes M, Zamilpa A, Alvarez-Chimal R, Luna-Manzanares JA, León-Velasco ME, Aguilar-Rojas A, et al. *Heteropterys cotinifolia*: A neuropharmacological and phytochemical approach with possible taxonomic implications. *Scientific World Journal.* 2013;2013:870468.
 25. Guilhon-Simplicio F, Pereira MM. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). *Química Nova* 2011;34(6):1032-41. (Portuguese).
 26. Verdam MCDS, Guilhon-Simplicio F, Andrade KCD, Fernandes KLM, Machado TM, da Silva FMA, et al. Analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant activities of *Byrsonima duckeana* WR Anderson (Malpighiaceae). *Scientific World Journal.* 2017;2017:8367042.
 27. Kersting XAK, Hirsch S, Steinert T. Physical harm and death in the context of coercive measures in psychiatric patients: A systematic review. *Front Psychiatry.* 2019;10:400.
 28. Bonacorsi C, Raddi MSG, Carlos IZ, Sannomiya M, Vilegas W. Anti-*Helicobacter pylori* activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). *BMC Complement Altern Med.* 2009;9:2.
 29. Santos RC, Kushima H, Rodrigues CM, Sannomiya M, Rocha LRM, Bauab TM. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *J Ethnopharmacol.* 2012;140(2): 203-12.
 30. Olugbuyiro JA, Abo KA, Leigh OO. Wound healing effect of *Flabellaria paniculata* leaf extracts. *J Ethnopharmacol.* 2010;127(3): 786-8.
 31. Motohashi N, Wakabayashi H, Kurihara T, Fukushima H, Yamada T, Kawase M. Biological activity of barbados cherry (acerola fruits, fruit of *Malpighia emarginata* DC) extracts and fractions. *Phytother Res.* 2004;18(3):212-23.
 32. Hussain J, Ali L, Khan A, Rehman N, Jabeen F, Kim JS, et al. Isolation and bioactivities of the flavonoids morin and morin-3-O-β-D-glucopyranoside from *Acridocarpus orientalis*—A wild Arabian medicinal plant. *Molecules.* 2014;19:17763-17772.
 33. Oliveira DM, Silva TF, Martins MM, de Moraes SA, Chang R, de Aquino F, et al. Antifungal and cytotoxicity activities of *Banisteriopsis argyrophylla* leaves. *J Pharm Pharmacol.* 2018;70(11):1541-52.
 34. Barros BR, Barboza B, Ramos A, Moura MC, Coelho LC, Napoleao TH. Saline extract from *Malpighia emarginata* DC leaves showed higher polyphenol presence, antioxidant and antifungal activity and promoted cell proliferation in mice splenocytes. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91:e20190916.
 35. Melo FL, Benati FJ, Junior WAR, de Mello JCP, Nozawa C, Linhares REC. The *in vitro* antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropterys*

- aphrodisiaca*. Microbiol Res. 2008;163(2): 136-9.
36. Matsuse IT, Lim YA, Hattori M, Correa M, Gupta MP. A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. J Ethnopharmacol. 1999;64(1): 15-22.
 37. Júnior WAR, Cardoso MLC, Vilegas W, Nakamura CV, Dias Filho BP, De Mello JCP. A new antimicrobial from the roots of *Heteropteris aphrodisiaca*. Acta Farm Bonaerense. 2005;24(4):543-5.
 38. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 2005;26(5):343-56.
 39. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, et al. Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. J Clin Microbiol. 2005;43(8):4159-62.
 40. Gaitán-Cepeda LA, Sánchez-Vargas LO, Pavia-Ruz N, Muñoz-Hernández R, Villegas-Ham J, Caballos-Salobreña A. Oral *Candida* in Mexican children with malnutrition, social marginalization, or HIV/AIDS. Rev Panam Salud Publica. 2012;31(1):48-53.
 41. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiology Reviews. 2012;36(2):288-305.
 42. Williams DW, Lewis MAO. Oral Microbiology: Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. Oral Dis. 2000;6(1):3-11.
 43. Puryer J. Denture stomatitis - A clinical update. Dent Update. 2016;43(6):529-35.
 44. Gaitán-Cepeda LA, Martínez-González M, Ceballos-Salobreña A. Oral candidosis as a clinical marker of immune failure in patients with HIV/AIDS on HAART. AIDS Patient Care STDS. 2005;19(2): 70-7.
 45. Sánchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. Arch Oral Biol. 2013;58(10):1318-26.
 46. Williams MC. Nitro Compounds in *Indigofera* Species 1. Agron J. 1981;73(3): 434-6.
 47. Williams MC. Toxic Nitro Compounds in *Lotus* 1. Agron. J. 1983;75(3):520-2.
 48. Finnegan RA, Stephani RA. Structure of hiptagin as 1, 2, 4, 6-tetra-O-(3-nitropropanoyl)- β -D-glucopyranoside, its identity with endecaphyllin X, and the synthesis of its methyl ether. J Pharm Sci. 1968;57(2):353-4.
 49. Moyer BG, Pfeffer PE, Valentine KM, Gustine DL. 3-nitropropanoyl-D-glucopyranoses of *Corynocarpus laevigatus*. Phytochemistry. 1979;18(1):11 1-13.
 50. Saliassi I, Llodra JC, Bravo M, Tramini P, Dussart C, Viennot S, et al. Effect of a toothpaste/mouthwash containing *Carica papaya* leaf extract on interdental gingival bleeding: A randomized controlled trial. Int J Environ Res Public Health. 2018;15:E2660.
 51. Methley AM, Campbell S, Chew-Graham C, McNally R, Cheraghi-Sohi S. PICO, PICOS and SPIDER: A comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews. BMC Health Serv Res. 2014;14: 579.
 52. Scells H, Zuccon G, Koopman B, Deacon A, Azzopardi L, Geva S. Integrating the framing of clinical questions via PICO into the retrieval of medical literature for systematic reviews. Proceedings of the 2017 ACM on Conference on Information and Knowledge Management. 2017;2017: 2291-4.

© 2020 Villanueva-Amador et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:
 The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://www.sdiarticle4.com/review-history/60198>