

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN TRIPANOCIDAL DE EXTRACTOS DE *ARGEMONE MEXICANA*,
BIDENS PILOSA Y *CORDIA BOISSIERI* CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI*
(CHAGAS, 1909)

POR

GABRIEL ENRIQUE CAZARES JARAMILLO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA

2024

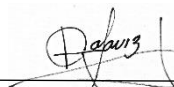
EVALUACIÓN TRIPANOCIDAL DE EXTRACTOS DE ARGEMONE
MEXICANA, BIDENS PILOSA Y CORDIA BOISSIERI CONTRA
TRYPANOSOMA CRUZI (CHAGAS, 1909)

Comité de tesis



Dra. Zinnia Judith Molina Garza

Director



Dr. Lucio Galaviz Silva

Secretario



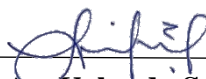
Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

Vocal



Dra. Patricia Tamez Guerra

Vocal



Dra. Luisa Yolanda Solís Soto

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Nino

Subdirector de Posgrado

EVALUACIÓN TRIPANOCIDAL DE EXTRACTOS DE *ARGEMONE*
MEXICANA, *BIDENS PILOSA* Y *CORDIA BOISSIERI* CONTRA
TRYPANOSOMA CRUZI (CHAGAS, 1909)



Dra. Zinnia Judith Molina Garza

Director de tesis



Dr. José Alejandro Martínez Ibarra

Director externo

Aviso derechos de autor

**DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de video y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando el autor o autores.

Financiamiento:

Este proyecto de investigación fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT :602-CN-2022 and 125-CS-2022) y por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) a través de la beca otorgada a lo largo del posgrado (CVU: 848246).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco ampliamente a la Universidad Autónoma de Nuevo León y en específico a la Facultad de Ciencias Biológicas, así como al Laboratorio de Patología Molecular y Experimental, al Laboratorio de Fitoquímica y al Laboratorio de Inmunología donde se me ha permitido continuar con mi formación profesional de doctorante.

A la Dra. Zinnia Judith Molina Garza y al Dr. Lucio Galaviz Silva, primero que nada, por la confianza nuevamente y por su paciencia en estos 4 años de altibajos, me dieron la oportunidad de demostrarles quien soy y que, a pesar de las diferencias de mi actividad laboral y estudio simultáneo, saben que soy una persona responsable y comprometida con ellos, muchas gracias por el gran apoyo y soporte del proyecto y sobre todo su amistad.

A todos los compañeros de trabajo del LPME, incluidos tesistas, alumnos de servicio social, becarios, voluntarios, arrimados, etc. gracias infinitas, aprendí grandes cosas con todos ustedes, siempre me ha gustado ayudar a los demás, pero hoy estoy agradecido con ustedes porque en verdad me apoyaron, gracias a todos: Karen Flores, Jorge Delgado, Rubí Rodríguez, Ana Karen Leal, Ana Cristina González, Viviana Martínez, Karla Soto; la gente externa al lab: Ángel Torres, Mónica Garza, Alicia Contreras.

Agradecido por la atención, apoyo y transmisión de conocimiento como docentes y gran ayuda en la revisión de este documento, así como el apoyo tutorial, gracias: Dra. Luisa Yolanda Solís Soto, Patricia Tamez y Dra. Itza Eloisa Luna Cruz; además de la participación como director externo del Dr. José Alejandro Martínez Ibarra, siempre estaré agradecido con los conocimientos que un docente puede portar y transmitir para ayudarnos a crecer profesionalmente, gracias a cada uno de mis docentes en su respectiva materia a lo largo del doctorado.

Por otro lado, agradezco a cada uno de mis compañeros de la generación de Doctores en Ciencia con Orientación en Microbiología 2020-2023: Karla Soto, Servando Cantú, Jesica Ramírez y Jesús Chávez, gracias por el tiempo compartido y vivencias en esta etapa tan dura.

Una de las cosas que aprendí estando acá en Monterrey es que no estoy solo, gracias, compañera de vida, gracias hermosa, gracias cosita “pisiosa”, gracias “mushasha”, gracias al amor de mi vida, gracias, Genesis Yamileth Cura Salazar.

DEDICATORIAS

Este proyecto de investigación de tesis y uno de mis más grandes sueños, lo dedico a mis padres, Etel Jaramillo Torres y Luis Enrique Cázares Orozco y a mis hermanos Luis Esteban, Eduardo y Elías, cada uno me ayudó como no tienen idea para poder armar y sobrevivir a este proyecto, siempre les estaré agradecido por todo, a mis padres por darme la vida y ser mi motor para no rendirme, y a mis hermanos porque me motivan a ser una mejor persona y un ejemplo a seguir, siempre cargo con ese peso pero amo hacerlo, me motiva a seguir adelante día a día; además agradezco a esta familia por enseñarme los valores y el pensamiento de una persona que quiere siempre lo mejor y siempre quiero más, los amo.

Te lo dedico a ti, chavalito cabezón que no te das por vencido, que tu terquedad te hace siempre querer ser el mejor, que no te intimidas con nada, que cargas con muchísimo peso en tu vida por querer ser un ejemplo, no lo quieras ser tan seguido, relájate, disfruta, pero sobre todo siempre créetela, todo pasa, todo se puede, todo lo vas a lograr, sueña, pero, sobre todo, ¡vive carajo!

De mí para mí

ÍNDICE

Comité de tesis.....	2
Aviso derechos de autor.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
DEDICATORIAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS.....	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
Lugar de trabajo	30
Colecta de material vegetal	30
Preparación del material vegetal	31
Extracción del material vegetal	32
<i>Obtención de extractos acuosos y metanólicos</i>	32
<i>Rendimiento de los extractos</i>	33
Preparación de inóculo de <i>T. cruzi</i>	34
Evaluación de la actividad tripanomicida de los extractos de plantas	34
Determinación de la actividad tóxica con <i>Artemia salina</i>	36
Citotoxicidad en línea celular Vero	37
Actividad hemolítica <i>in vitro</i>	39
Fraccionamiento por métodos cromatográficos	40
Cromatografía en capa fina	40
Cromatografía en columna	42
Tamizaje fitoquímico	43

Identificación de compuestos por GC/MS	44
Análisis estadísticos.....	45
RESULTADOS	46
Rendimiento de extractos de plantas.....	46
Actividad tripanocidal de extractos acuosos y metanólicos frente a epimastigotes	46
Ensayos de actividad tóxica, citotóxica y hemolítica de extractos metanólicos	49
Cromatogramas y fracciones colectivas.....	49
Actividad tripanocidal de fracciones colectivas	51
Actividad citotóxica y hemolítica de fracciones colectivas	53
Identificación de compuestos en fracción colectiva BPFC3MOH1	54
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIÓN	62
REFERENCIAS	63
RESUMEN BIOGRÁFICO	80
PUBLICACIÓN	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plantas colectadas en el área metropolitana de Nuevo León	30
Tabla 2. Número de identificación botánica	31
Tabla 3. Gradientes de elución	42
Tabla 4. Fracciones colectivas	42
Tabla 5. Rendimiento de extractos acuosos y metanólicos	46
Tabla 6. Actividad tripanomicida CL ₅₀ contra epimastigotes	48
Tabla 7. Actividad citotóxica y hemolítica	49
Tabla 8. Porcentaje de rendimiento de fracciones colectivas	50
Tabla 9. Actividad de fracciones frente al estadio epimastigote	52
Tabla 10. Actividad de fracciones frente al estadio tripomastigote	53
Tabla 11. Ensayos de toxicidad y hemólisis de fracciones colectivas	53-54
Tabla 12. Tamizaje fitoquímico de BPFC3MOH1	54-55
Tabla 13. Características de los diferentes compuestos identificados	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Primer caso de la enfermedad de Chagas	16
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 3. Manifestaciones clínicas de EC	20
Figura 4. <i>Argemone mexicana</i>	24
Figura 5. <i>Bidens pilosa</i>	25
Figura 6. <i>Cordia boissieri</i>	26
Figura 7. Secado y pulverizado de plantas	31
Figura 8. Extracción acuosa y metanólica de material vegetal	33
Figura 9. Ensayo de MTT	35
Figura 10. Ensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i>	37
Figura 11. Actividad citotóxica de extractos/fracciones vs <i>T. cruzi</i>	39
Figura 12. Actividad hemolítica de <i>Am</i> , <i>Bp</i> y <i>Cb</i>	40
Figura 13. Cromatografía en capa fina	43
Figura 14. Montaje de equipo de columna cromatográfica	43
Figura 15. Porcentajes de inhibición en contra de epimastigotes	48
Figura 16. Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos metanólicos	50
Figura 17. Porcentajes de inhibición de las fracciones colectivas	51-52
Figura 18. Cromatograma de espectros de masas de compuestos obtenidos de la fracción BPFC3MOH1.	55

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Porcentaje
>	Mayor que
<	Menor que
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
AE	Acetato de etilo
Am	<i>Argemone mexicana</i>
Aq	Acuoso
Bp	<i>Bidens pilosa</i>
Cb	<i>Cordia boissieri</i>
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50
CH ₅₀	Concentración hemolítica 50
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CL	Cloroformo
CL ₅₀	Concentración letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Enfermedad de Chagas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
et al.	Y colaboradores
FC	Fracción colectiva
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
IS	Índice de selectividad
LIT	Liver Infusion Tryptose
LPME	Laboratorio de Patología Molecular y Experimental
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
mOH	Metanol
Nm	Nanómetro
MTT	Bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio
pH	Potencial de hidrógeno
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La Enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* la cual es endémica de varias zonas en el continente americano y en los últimos años existe la persistencia de esta en México. A pesar de haber dos tratamientos contra este parásito, la administración de estos únicamente es efectiva en una de las fases de la enfermedad, la cual, si no se detecta a tiempo, no se puede controlar lo que pudiera conllevar a presentar efectos secundarios adversos en los enfermos. Por esto el uso de plantas medicinales, sus extractos y compuestos se consideran una alternativa que ayudaría a prevenir el desarrollo de esta enfermedad. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad tripanocidal de los extractos y fracciones de *Argemone mexicana*, *Bidens pilosa* y *Cordia Boissieri* contra los estadios epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi*, específicamente dirigidas a las cepas Brener y Nuevo León. Se trabajaron las partes aéreas de la planta (tallos, hojas y flores) para obtener un extractos y fracciones con diferentes polaridades de solvente. Estas preparaciones inhibieron más del 90% del crecimiento en concentraciones tan bajas como 800 µg/mL para ambas formas parasitarias. La mayor actividad anti *T. cruzi* evidenció valores de concentración letal media (CL₅₀) para el extracto de Bp-mOH y sus fracciones inferiores a 500 µg/mL. Las pruebas de citotoxicidad con *Artemia salina* y células Vero y los ensayos de actividad hemolítica del extracto y sus fracciones arrojaron resultados negativos. La fracción metanólica (BPFC3MOH1) de *B. pilosa* exhibió una actividad inhibidora superior en comparación a las otras plantas. Sus grupos funcionales, identificados como fenoles, enoles, alcaloides, carbohidratos y proteínas, incluyeron compuestos como 2-hidroxi-3-metilbenzaldehído (50.9%), prop-2-enoato de pentadecilo (22.1%) y linalol (15.1%). Se identificaron 8 compuestos de la fracción BPFC3MOH1 de *B. pilosa* que exhibieron la mayor actividad tripanocidal.

ABSTRACT

Chagas Disease is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* which is endemic in several areas of the American continent and has also been present in Mexico for several years. Although there are two treatments against this parasite, the administration of these is only effective in one of the phases of the disease, which, if not detected in time, cannot be controlled, which can lead to undesirable side effects in patients. For this reason, the use of medicinal plants, extracts and their compounds is considered an alternative that could help prevent the development of this disease. The aim of this study was to evaluate the trypanocidal activity of extracts and fractions of *Argemone mexicana*, *Bidens pilosa* and *Cordia Boissieri* against the epimastigote and trypomastigote stages of *T. cruzi*, especially against the Brener and Nuevo León strains. The aerial parts of the plant (stems, leaves, and flowers) were processed to obtain extracts and fractions with different solvent polarities. These preparations inhibited more than 90% of growth at concentrations as low as 800 µg/mL for both parasitic forms. The highest anti *T. cruzi* activity was shown by mean lethal concentration (LC₅₀) values for the Bp-mOH extract and its fractions of less than 500 µg/mL. Cytotoxicity tests with *Artemia salina* and Vero cells and hemolytic activity assays of the extract and its fractions gave negative results. The methanolic fraction (BPFC3MOH1) of *B. pilosa* showed higher inhibitory activity compared to the other plants. The functional groups, identified as phenols, enols, alkaloids, carbohydrates, and proteins, included compounds such as 2-hydroxy-3-methylbenzaldehyde (50.9%), pentadecyl prop-2-enoate (22.1%), and linalool (15.1%). Eighth compounds were identified from the BPFC3MOH1 fraction of *B. pilosa* that exhibited the highest trypanocidal activity.

INTRODUCCIÓN

Acorde a la Organización Mundial de la Salud (OMS) existe un grupo de enfermedades de naturaleza parasitaria que pueden afectar, en su mayoría, a la población con un nivel socioeconómico bajo, estas enfermedades son conocidas como enfermedades tropicales desatendidas (NTD) y , las cuales son de gran importancia debido a que perjudican a millones de personas alrededor del mundo, además que consiguen agobiar a la población de bajos recursos involucrándolos en un ciclo de pobreza y continua enfermedad (WHO 2013; CDC 2019; Peerzada et al. 2021). Dentro de estas enfermedades, se encuentra la Tripanosomiasis Americana también conocida como enfermedad de Chagas (Chagas 1909) la cual es una antropozoonosis causada por el parásito protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909; Schofield et al. 2006; Molina et al. 2016; PAHO 2019; WHO 2020).

Esta enfermedad es considerada una infección parasitaria de carga socioeconómica (enfermedad de los pobres) en América Latina, presentándose principalmente en países de América del sur y América central, aunque se han reportado casos en otros países como México (Stanaway y Roth 2015; Sánchez et al. 2016; Zingales 2018; WHO 2019). La enfermedad comprende una zoonosis compleja ya que el parásito se transmite a través de un insecto vector, principalmente por contacto con las heces u orina infectadas de insectos triatominos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) que se alimentan de sangre mientras defecan. Se han reportado más de 100 especies de éstos, los cuales son conocidos dependiendo de la región geográfica donde se les encuentre, como vincuchas, conenosos o chinches besuconas (Zingales 2018).

Otras vías de transmisión para adquirir esta enfermedad incluyen transfusiones sanguíneas, ingestión de alimentos y líquidos contaminados con el parásito, accidentes en el laboratorio, mal manejo de animales infectados, trasplantes de órganos de donantes afectados y por vía congénita de la madre al feto (Coura 2015; WHO 2019). La enfermedad de Chagas presenta dos fases clínicas: una fase aguda de curso asintomática (70-80 %) con algunos casos de personas con síntomas variables que pueden durar de 4 a 8 semanas (2-5 %); y una fase crónica, donde el 20-30 % de los afectados desarrollarán complicaciones del tejido cardiaco, del sistema digestivo como esófago y colon, y/o daño a sistema nervioso. Cabe resaltar que la prevalencia y severidad de las

formas clínicas van acorde a la región geográfica donde se presenten al depender de la virulencia de la cepa (Zingales et al. 2012; Rassi y Marin 2015; Rassi Jr et al. 2017; PAHO 2019).

Una serie de fármacos anti tripanosómicos de uso único o combinado, como el Benznidazol y Nifurtimox, son utilizados para contrarrestar al parásito, sin embargo, los esquemas terapéuticos son complicados ya que ambos requieren tratamiento prolongado, presentan alta toxicidad, muestran efectos secundarios y a pesar de ser efectivos en una fase aguda, la eficacia de ambos disminuye en una etapa crónica (Urbina 2010; Kennedy 2013; Chatelain 2015; Giordani et al. 2016; WHO 2019; PAHO 2019). Debido a las complicaciones en los tratamientos y el hecho que no existe una vacuna para tratar la enfermedad (Avery 2013; Goupil y McKerrow 2014), se ha propuesto e iniciado una búsqueda de diversas alternativas con nulas o bajas afectaciones secundarias para el humano comparadas con los tratamientos actuales. Dentro de estas alternativas se encuentra el uso de plantas medicinales y/o sus extractos (Ndjonka et al. 2013) a fin de evaluar e identificar nuevos compuestos con acción en contra de los diferentes estadios parasitarios de *T. cruzi*.

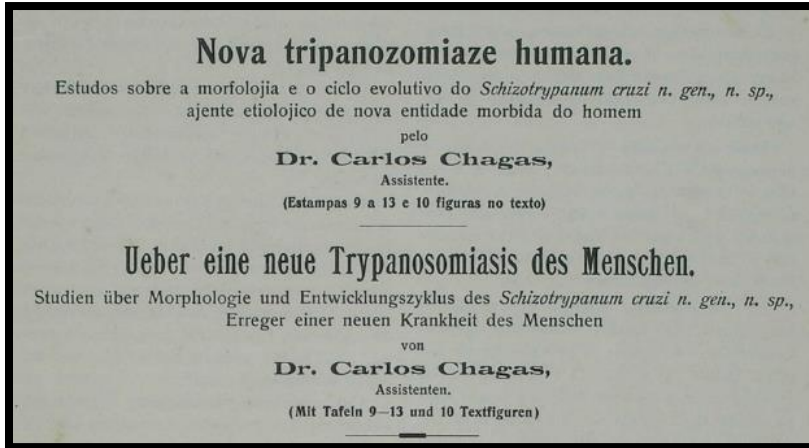
Por lo anterior, esta investigación se centra en buscar nuevas formas aplicables de medidas terapéuticas y/o profilácticas contra el parásito con el uso de diferentes extractos de plantas y sus compuestos.

ANTECEDENTES

Hallazgo de la Enfermedad de Chagas (EC)

Esta enfermedad toma su nombre en honor a su descubridor, el médico Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas originario de Brasil, donde se presentó el primer caso (Figura 1) (Chagas 1909; Kropf y Sá 2009).

(A)



(B)



(C)



Figura 1. Primer caso de la EC. (A) Primera reporte de investigación de la EC. (B) Niña Berenice, primer paciente diagnosticada con EC. (C) Reporte de un periódico brasileño de la EC, en la imagen se observa la paciente Berenice a sus 72 años.

Epidemiología de la Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana)

Con respecto a los datos de la OMS, existe un estimado de 8 millones de personas infectadas a nivel mundial, además, se estima que alrededor de 10 mil personas mueren cada año a causa de esta enfermedad y más de 25 millones de personas permanecen en constante riesgo de adquirir la EC (Corti y Villafaña 2017; WHO 2020). Un perfil epidemiológico relacionado indica que la EC ocurre por dos vías principales: en primer lugar, debido a la transmisión del vector a nivel doméstico y en segundo, la migración rural a urbana (Rassi et al. 2010; Rassi y de Rezende 2012). El problema de las migraciones hacia zonas urbanas donde no hay vectores, ha generado la presencia de la EC en zonas no rurales y, además, un impacto en la salud pública en países no endémicos, incluso se han informado casos adquiridos en los viajeros europeos que regresan de América Latina o por adopción de niños en zonas endémicas (Maguire 2006; WHO 2020).

Referente al continente americano, la EC es endémica en 21 países de esta región representando una de las problemáticas más importantes en cuestión de salud humana en América (WHO 2013). A pesar de que la aparición de las infecciones por EC decreció en Latinoamérica debido a la urbanización y mejora en el estilo de vida de las personas, un número estimado de 8 millones de personas sigue infectado (WHO 2020; PAHO 2024). En países de América del sur, la EC causa pérdidas de aproximadamente 700 000 días hábiles debido a las muertes y 1000 millones de pesos en cuanto a productividad. Cifras alarmantes referentes a los costos de atención médica rondan entre los 46 a 627 millones de pesos en cuanto a carga mundial anual; la situación de migración y los diferentes modos de transmisión ocasionan que la EC sobrepase más allá del límite geográfico natural y se convierta en problema global (Bern y Montgomery 2009; Schmunis y Yadon 2010; Lee et al. 2013; Requena et al. 2015).

Biología de *Trypanosoma cruzi*

El agente causal de la EC se encuentra clasificado dentro del reino Protista correspondiente al género *Trypanosoma* y especie *T. cruzi* (Chagas 1909; NCBI 2020). El parásito *T. cruzi* es un protozooario hemoflagelado que tiene la capacidad de infectar a diferentes células, al tener un tropismo celular marcado en macrófagos, fibroblastos y células epiteliales (Lieke et al. 2006).

El protozoo *T. cruzi* presenta tres estadios o formas principales: la forma amastigote (estadio intracelular y proliferativo encontrado en el hospedero vertebrado); forma epimastigote (fase proliferativa que se encuentra dentro del intestino del hospedero invertebrado) y tripomastigote (estadio infeccioso que se origina a partir de amastigotes en hospedero vertebrado y de epimastigotes en el tracto intestinal de hospedero invertebrado) (Hoare 1972; Brener 1997; Rassi et al. 2010).

Ciclo biológico de *T. cruzi*

Se conoce una amplia variedad de hospederos, y en el caso del ciclo silvestre, los reservorios principales son mamíferos como primates, roedores y algunos marsupiales, en tanto que para el ciclo doméstico los reservorios mamíferos incluyen perros, gatos y principalmente humanos (Rassi et al. 2010). El ciclo de vida de *T. cruzi* involucra dos hospederos intermediarios, el vector invertebrado y el hospedero vertebrado, de tal forma que el ciclo ocurre cuando el insecto vector succiona tripomastigotes que circulan en torrente sanguíneo del hospedero vertebrado infectado (en este caso el humano). Los tripomastigotes ingeridos por el triatomino se diferencian en esferomastigotes y posteriormente a epimastigotes, la etapa de replicación en invertebrados, lo cual ocurre en el intestino medio del vector. Luego, los epimastigotes migran a la parte posterior del intestino ocurriendo allí el proceso de metaciclogénesis, donde los epimastigotes no infecciosos se transforman en tripomastigotes infecciosos conocidos como tripomastigotes metacíclicos los cuales son excretados con las heces del vector. Cuando el vector triatomino se alimenta del hospedero humano, los tripomastigotes metacíclicos ingresan a través del sitio de picadura infectado con las deyecciones, por una lesión o por mucosas de alguna membrana del hospedero mamífero y una vez en torrente sanguíneo invaden diferentes tipos de células nucleadas en el sitio de inoculación, es allí en el citoplasma que los tripomastigotes se diferencian en formas amastigotes intracelular que al tener un número de duplicación considerable, los amastigotes se transforman en tripomastigotes y la célula se rompe por liberándose estos al torrente sanguíneo. Los tripomastigotes circulantes pueden invadir células o bien iniciar un nuevo ciclo, así como estar disponibles para infectar al vector triatomino que se alimenta del hospedero mamífero (Figura 2) (Rassi et al. 2010; de Souza 2019).

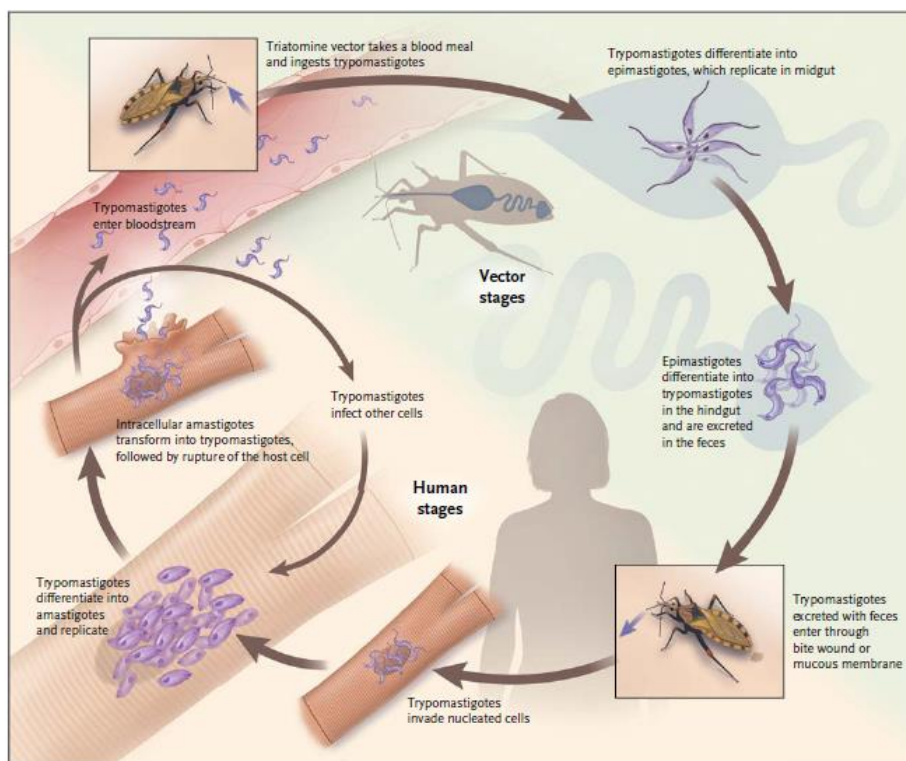


Figura 2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* tomado de Rassi et al. 2010

Manifestaciones clínicas de la EC

El curso clínico de la EC comprende un periodo agudo y otro crónico (Figura 3). El primero es asintomático en la mayoría de los casos y puede presentarse en cualquier rango de edad en el humano, usualmente durante los primeros cinco años de vida. Por otro lado, el curso crónico de la EC inicia después de la fase aguda, cuando los parásitos en sangre no son detectados al microscopio, sin embargo, las pruebas serológicas arrojan resultados positivos, lo que ocurre de 8 a 12 semanas post infección, y en ausencia de un tratamiento efectivo los individuos pasan por una fase crónica de la infección por *T. cruzi*. En su mayoría estos pacientes permanecen asintomáticos, aun cuando estarán infectados de por vida (Rassi et al. 2009).

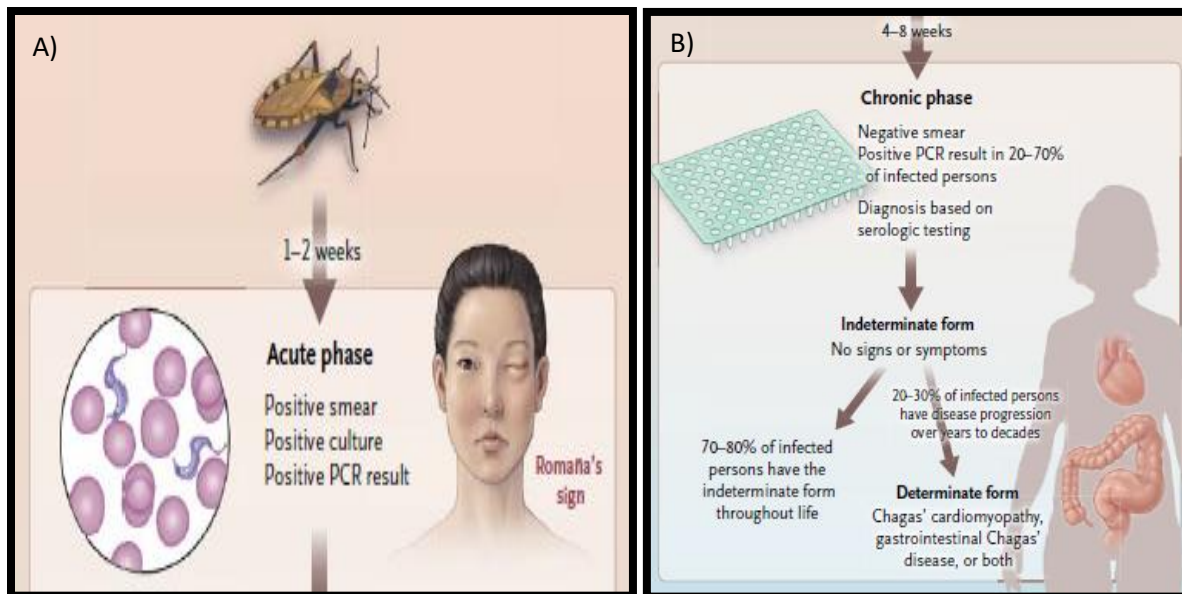


Figura 3. Curso clínico de la EC. A) fase aguda; B) fase crónica, tomado de Rassi et al. 2010.

Casos clínicos de la EC

En los últimos años la incidencia de la EC en sigue estando presente a nivel mundial. Respecto a la unión europea, los diversos reportes de casos clínicos siguen en auge, tal es el caso en el Reino Unido el cual evidenció 60 pacientes con EC serológicamente comprobada, lo interesante de esto es que tres cuartas partes de los pacientes eran originarios de Bolivia, llevándonos a destacar la importancia que tiene la migración de personas de zonas endémicas a regiones que no lo son (Sanz et al. 2020). En el continente americano, se han confirmado 76 casos de EC adquiridos localmente en EUA, lo cual según los autores esto no se reconocía en años anteriores (Lynn et al. 2020).

En nuestro país, los casos de la EC en México no se reportan y mucho menos se diagnostican, son pocos los estudios los que buscan identificar al agente causal, tal es el caso de un reporte en la Ciudad de México, donde se buscó detectar a *T. cruzi* mediante pruebas serológicas en 150 pacientes, de los cuales 30 dieron positivos en al menos una prueba diagnóstica (Chakravarti et al. 2022). Otro estudio donde se llevó a cabo la identificación de EC mediante hemaglutinación indirecta y pruebas de Western Blot demostró la presencia de esta enfermedad en 85 casos confirmados en localidades rurales y urbanas de Jalisco, Colima y Nayarit (Espinoza et al. 2022). De igual manera, son pocos los casos reportados en el estado de Nuevo León, sin embargo, los estudios dentro de esta región son una realidad. Por ejemplo, el reporte de un caso de una persona

originaria de Nashville, EUA la cual realizó un viaje para campamento cercano a la ciudad de Monterrey, Nuevo León, indicó que la mujer de 67 años dio positivo para infección por *T. cruzi* mientras donaba sangre (Beatty et al. 2023), lo interesante es que en estas regiones siguen presentándose las infecciones por este parásito, lo que resalta la importancia de la región donde nos encontramos.

Tratamiento antitripanosomal

Desde la década de 1970 y hasta la actualidad, los únicos fármacos disponibles en contra de *T. cruzi* con eficacia en humanos son Benznidazol (BZL) y Nifurtimox (NFX) (Grunberg et al. 1967). Estos tratamientos se indican para cualquier persona en fase aguda de la enfermedad y para pacientes con infección reactivada, si se aplica el tratamiento en estas situaciones, es en su totalidad efectivo y la enfermedad puede curarse por completo (WHO 2020), sin embargo, ambos antiparasitarios tienen una alta tasa de efectos secundarios además de requerir tiempos prolongados en su administración (60-90 días) (Nunes et al. 2013; Apt 2017).

El fármaco antiparasitario BZL [N-benzyl-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl) acetamida] es un derivado del 2-nitroimidazole considerado el tratamiento de primera línea para la EC que se administra de manera oral (Maximiano et al. 2010) debido a una mejor tolerancia y mayor eficacia (Bern 2015; Kratz et al. 2018). Este fármaco fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en el año 2017 y eventualmente comercializada de manera oficial el siguiente año en los Estados Unidos (DNDi 2017). BZL actúa a través de un mecanismo llamado estrés reductor por unión covalente de intermediarios de nitro reducción a diferentes moléculas del parásito que terminan en efectos tóxicos y tripanomicidas, además, la generación de estos radicales nitros tiene un efecto letal sobre el parásito, aumentando los porcentajes de muerte de este (Urbina y Docampo 2003). Las dosis altas de este fármaco y un tiempo prolongado en su administración, desencadena efectos adversos como dermatitis alérgica, neuropatía periférica, anorexia y pérdida de peso e insomnio (Lima et al. 2011).

Por otro lado, el NFX ((RS)-3-metil- N-[(1E)-(5-nitro-2-furil) metileno]tiomorfolin-4-amino 1,1-dioxido] altera el metabolismo de carbohidratos de *T. cruzi* con ayuda de la inhibición de la síntesis de ácido pirúvico (Forsyth et al. 2016) además actúa mediante la producción de radicales libres

nitrogenados y el parásito muere al afectarse su capacidad de desintoxicación (Urbina y Docampo 2003). Se han evidenciado diferentes efectos adversos del fármaco incluyendo náuseas, vómito, dolor abdominal y un porcentaje de pacientes pueden experimentar alteraciones en sistema nervioso como confusión, convulsiones focales o generalizadas, e incluso psicosis (Weiss et al. 2010). NFX ha evidenciado una mayor toxicidad y efectos secundarios que BZL (de Mecca et al. 2007; Mecca et al. 2008). Hasta el año 2019, el NFX no ha sido aprobado por la FDA, continua en protocolos de investigación bajo el mando de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) (CDC 2019).

Es de importancia resaltar que la tasa de curación de EC dependerá de factores como su fase y duración además de pruebas diagnósticas, edad del paciente y la susceptibilidad del genotipo de *T. cruzi* a los fármacos empleados (Días et al. 2016).

Nuevos candidatos a fármacos antitripanosómicos

Con la problemática de la presencia de casos de EC se hace imperante la búsqueda de nuevos fármacos con alta eficacia y un menor riesgo de efectos secundarios (López et al. 2020). Dentro de los compuestos que se han evaluado y que han presentado mayor actividad tanto *in vitro* como *in vivo* son las moléculas como alopurinol y triazoles (inhibidores de la biosíntesis de ergosterol de *T. cruzi*), estas moléculas se utilizan como antifúngicos y actúan interfiriendo en la síntesis de la membrana del protozooario. Se han comparado la eficacia de compuestos inhibidores de la síntesis de ergosterol y BZL en pacientes con EC, obteniendo tasas de fracaso terapéutico la cual fue medida detección del ADN parasitario presente en sangre periférica en más del 80 %, muy por encima de la obtenida con BZL (Molina et al. 2014). Con esto y otros estudios no se ha demostrado una eficacia mayor al tratamiento convencional de infección por *T. cruzi* (Torrice et al. 2013; Molina et al. 2014).

Otros enfoques terapéuticos

Debido a la ausencia de vacunas contra parásitos, los efectos secundarios considerables y la resistencia a fármacos antiparasitarios preexistentes, se han puesto en marcha esfuerzos para la

nueva búsqueda de medicamentos, más económicos, con mayor acción antiparasitaria y mejor eficacia para tratar esta enfermedad (Simoben et al. 2018). Dentro de las alternativas de hoy en día está el uso de plantas medicinales, ya que representan una fuente potencial para el descubrimiento de medicamentos más efectivos y el uso de compuestos tripanomicidas dirigidos (Cordell 2014; Ntie et al. 2014; Simoben et al. 2014; Tietjen et al. 2015; Bermúdez et al. 2016).

Los productos que derivan de plantas han sido evaluados como una fuente potencialmente activa contra diversos protozoarios (Croft et al. 2005; Salem y Werbovetz 2006), además, diferentes aceites esenciales y extractos de plantas han demostrado tener actividad biológica contra diversos microorganismos y otros agentes infecciosos (Rajbhandari et al. 2009; Misir et al. 2014; Abdel et al. 2015, 2016) incluido *T. cruzi* (Santoro et al. 2007; Junior et al. 2017).

***Argemone mexicana* (Amapolilla/amapola espinosa mexicana/chicalote/cardo)**

Esta planta es una especie de amapola (Figura 4) geográficamente nativa de Norteamérica, se puede encontrar en regiones de la República Mexicana, y se ha utilizado ampliamente en diversos países a nivel mundial con fines medicinales (Khan et al. 2019).

Se ha reportado la actividad anti tripanomicida de este género como el trabajo de Calderón et al. (2010) donde la especie de *Argemone subfusiformis* mostró inhibición contra protozoarios como *T. cruzi* y *Plasmodium falciparum*; además, *A. mexicana*, ha evidenciado efectos ante diversos parásitos, tales como *T. evansi* (Abdelrahman 2011), *Trichomonas vaginalis* (Dahab et al. 2011), *P. falciparum* y *T. brucei brucei* (Kamaraj et al. 2012; Simoes et al. 2014) y efecto inhibitorio en *Toxoplasma gondii* (Al Nasr et al. 2019) y *T. rhodesiense* (Mathew y Negi 2019).



Figura 4. *Argemone mexicana*

***Bidens pilosa* (cadillo/Acahuele blanco)**

Esta especie de planta (Figura 5) es nativa de América del Norte y se encuentra ampliamente distribuida en México (Hernández-Villa et al. 2020), y posee actividad antimicrobiana (Panda y Luyten 2018; Ajanaku et al. 2019).

Diversas especies del género *Bidens* sp. han presentado actividad contra parásitos, tal es el caso de, *Bidens sulphurea* contra *Schistosoma mansoni* y *Leishmania amazonensis* (Aguiar et al. 2013; Souza et al. 2019); y en especial *B. pilosa* contra *Giardia duodenalis*, *P. falciparum*, y protozoarios como *L. amazonensis* y *T. b. brucei*, *L. donovani* y *P. falciparum* (Ankli et al. 2002; Tobinaga et al. 2009; García et al. 2010; Ohashi et al. 2018).



Figura 5. *Bidens pilosa*

***Cordia boissieri* (Anacahuita)**

Dentro de las plantas y árboles nativos del noreste de México se encuentra la especie mexicana, *C. boissieri* (Figura 6) distribuida geográficamente en el estado de Nuevo León (Rodríguez et al. 2017) y reportándose numerosas actividades con un alto potencial de esta planta, por ejemplo, actividad contra diversas especies de comunidades microbianas (de Gante et al. 2018).

Diferentes investigaciones se han centrado en aprovechar el efecto que puedan tener estas plantas contra diversos microorganismos. La especie *C. myxa* se ha probado frente a *Leishmania major* y *L. infantum* (Saki et al. 2015), la especie *C. globosa* con actividad tripanocidal en el parásito *T. cruzi* (Vieira et al. 2008). Además, otra especie *C. sinensis* con efecto contra *P. falciparum*, *L. infantum*, *T. cruzi* y *T. brucei* (Al-Musayeib et al. 2012).



Figura 6. *Cordia boissieri*

En trabajos previos, se han utilizado diferentes metodologías y opciones experimentales donde se ha evidenciado el efecto antimicrobiano de las partes aéreas de ejemplares de *B. pilosa*, junto con el análisis cualitativo de grupos alcaloides y flavonoides presentes en dicha planta, así como la identificación de compuestos por el estudio de cromatografía de gases-espectrometría de masas de extractos metanólicos de *B. pilosa* (Ajanaku et al. 2019). Además, el uso antiparasitario de *B. pilosa* ha mostrado que tiene actividad frente a diferentes especies como *T. brucei* lo que nos genera una mayor cercanía con el potencial efecto tripanocidal de esta planta con especies del género *Trypanosoma* sp. (Dofuor et al. 2022).

JUSTIFICACIÓN

Dada la persistencia de la Enfermedad de Chagas ocasionada por el parásito *T. cruzi* y la importancia que la enfermedad tiene en América Latina, se ha relacionada con el bajo desarrollo económico y social, así como la migración poblacional y bajos ingresos económicos que no permiten la mejora en la calidad de vida de la persona y de su vivienda, lo que genera que la incidencia y prevalencia de la enfermedad, se concentre en países con niveles de desarrollo bajo; aunado a esto, la permanencia de complicaciones y efectos adversos que ocasionan los tratamientos actuales aunado a que no existe una vacuna para tratar la enfermedad, se propone el uso de diversas alternativas profilácticas y terapéuticas como el uso de plantas medicinales y sus extractos con el fin de evaluar e identificar nuevos compuestos con actividad tripanomicida.

HIPÓTESIS

Los extractos de plantas de *Argemone mexicana*, *Bidens pilosa* y *Cordia boissieri* evidencian un efecto tripanomicida.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad tripanomicida de extractos de plantas frente a *Trypanosoma cruzi*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el rendimiento de los extractos crudos de *A. mexicana*, *B. pilosa* y *C. boissieri*.
2. Determinar la actividad de los extractos crudos de *A. mexicana*, *B. pilosa* y *C. boissieri* en contra de epimastigotes de *T. cruzi*.
3. Evaluar actividad tóxica, citotóxica y hemolítica de extractos metanólicos de *A. mexicana*, *B. pilosa* y *C. boissieri*.
4. Obtener e identificar las fracciones bioactivas de extractos crudos frente a *T. cruzi* y comprobar la efectividad de la CL₅₀ de estas para seleccionar la más efectiva.
5. Evaluar el efecto tóxico, citotóxico y actividad hemolítica de las fracciones de *A. mexicana*, *B. pilosa* y *C. boissieri* frente a epimastigotes y tripomastigotes.
6. Identificar los compuestos presentes en la fracción con mejor actividad frente a *T. cruzi*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de trabajo

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular y experimental (LPME) del Departamento de Zoología de Invertebrados, así como en el Laboratorio de Fitoquímica y el Laboratorio de Inmunología Molecular, este último dentro del Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) que pertenecen a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

Colecta de material vegetal

Los distintos especímenes vegetales colectados tienen como característica que son nativos del continente americano y se encuentran distribuidos ampliamente dentro de la República Mexicana, todos ellos, fueron ubicados y tomados en el área metropolitana del estado de Nuevo León (Tabla 1). Los ejemplares se colectaron entre los meses de junio y julio del año 2020, en bolsas de colecta, bien aireadas y limpias a temperatura ambiente, además se tomó un ejemplar por separado y se colocó en prensa de papel corrugado para mantener la forma completa de la planta/plántula/árbol o en su caso una de sus partes aéreas (tallo, hoja y/o flor), las cuales fueron separadas para su identificación con ayuda del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, registrándose con número de folio dentro del herbario (Tabla 2).

Se descartaron las plantas en las que se observó signos de infección o enfermedad, incluso marchitas o de aspecto anormal (Retana et al. 2018).

Tabla 1. Plantas colectadas en el área metropolitana de Nuevo León

1er muestreo (22-06-2020)			
Planta	Coordenadas	Municipio	# ejemplares colectados
<i>Argemone mexicana</i>	25.4621770, -100.1613640	Santiago, N.L.	4
<i>Bidens pilosa</i>	25.6055172, -100.2546322	Monterrey, N.L.	8
<i>Cordia boissieri</i>	25.6054764, -100.2548572	Monterrey, N.L.	7
2do muestreo (29-06-2020)			
<i>Argemone mexicana</i>	25.725472, -100.311000	San Nicolás de los Garza, N.L.	3

<i>Bidens pilosa</i>	25.7260950, -100.3103592	San Nicolás de los Garza, N.L.	2
3er Muestreo (17-07-2020)			
<i>Argemone mexicana</i>	25.725694, -100.297444	San Nicolás de los Garza, N.L.	4
<i>Bidens pilosa</i>	25.6570490, -100.2540891	Guadalupe, N.L.	8
<i>Cordia boissieri</i>	25.7283289, -100.3100376	San Nicolás de los Garza, N.L.	8

Tabla 2. Número de identificación botánica

Ejemplar vegetal	# de identificación*
<i>Argemone mexicana</i>	030598
<i>Bidens pilosa</i>	030599
<i>Cordia boissieri</i>	030600

*Números de folio para el acervo del herbario FCB, UANL

Preparación del material vegetal

Se utilizaron las partes aéreas de la planta: flor, hoja y tallo, las cuáles se lavaron con agua destilada para eliminar y descartar impurezas superficiales. Luego, se dejaron secar en el laboratorio a temperatura ambiente durante dos semanas y el material vegetal se pulverizó con ayuda de un molino (Figura 7) y se almacenó a temperatura ambiente hasta su posterior uso (Molina et al. 2014).



Figura 7. Secado y pulverizado de plantas

Extracción del material vegetal

Obtención de extractos acuosos y metanólicos

Una vez pulverizado el material vegetal, se pesaron 25 g de cada planta en un papel filtro Whatman No. 1 el cual se colocó en el aparato de extracción Soxhlet de 500 mL KIMAX® 55/50. Como solvente de extracción se utilizaron 500 mL de agua destilada estéril para extracción acuosa y 500 mL de metanol absoluto para extracción metanólica, el extractor Soxhlet se montó sobre un agitador magnético para mantener agitación constante en el nivel 2-4 con un voltaje de 60 V para la metanólica y 95 V para la acuosa y por calentamiento indirecto al comenzar a condensar el solvente, inició la extracción, la cual se mantuvo por un periodo de 48 h (Meva et al. 2019).

Una vez transcurrida la extracción se apagó el voltaje y se dejó enfriar por 15 min el sistema a temperatura ambiente.

Los extractos acuosos, se filtraron a través de papel filtro Whatman No. 1 con ayuda de un embudo de vidrio y se distribuyeron en vasos de precipitado a volúmenes de 75 mL en refrigeración a 4 °C por 24 h, posteriormente a congelación a -30 °C por 24 h y por último se almacenaron a -80 °C protegidos de la luz. Tras una semana de congelado el extracto, se tomó y se sometió a un proceso de liofilización, estos liofilizados se recuperaron en frascos estériles previamente pesados. Para los extractos metanólicos, tras el proceso de filtración, se concentraron por evaporación a vacío con ayuda de un rotavapor hasta obtener un volumen de 50 mL. Una vez concentrado el extracto, se colocó en un desecador de vidrio hasta retirar la totalidad del solvente, por último, una vez obtenido el extracto, se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su utilización (Figura 8) (Quintanilla et al. 2012; Molina et al. 2014; da Silveira y Lazzarotto 2019).

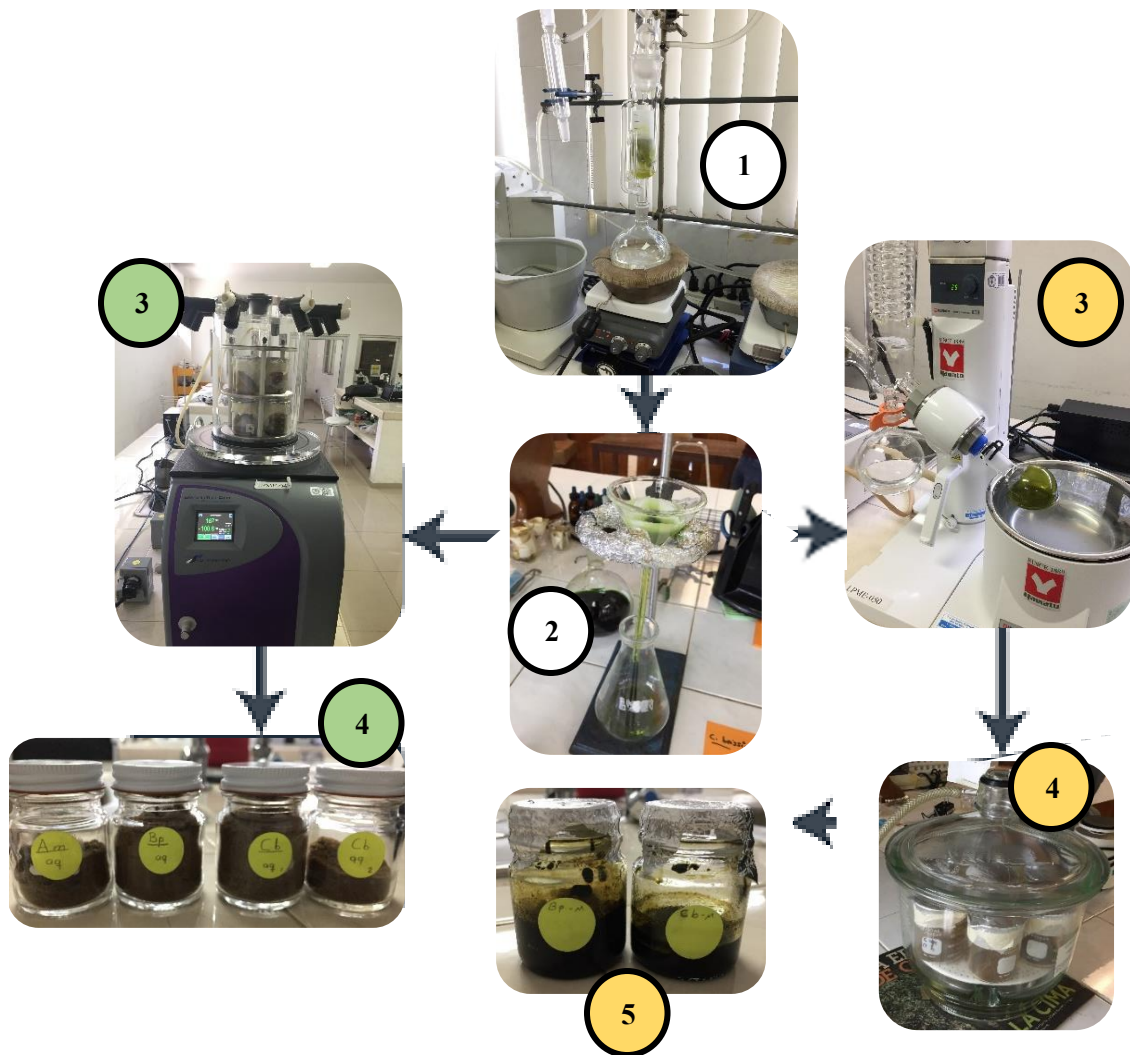


Figura 8. Extracción acuosa y metanólica de material vegetal

Rendimiento de los extractos

Se calculó el rendimiento de los extractos acuosos y metanólicos con ayuda de la siguiente fórmula (Salazar et al. 2008):

$$(\%)rendimiento = \frac{\text{Peso obtenido}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Donde:

Peso obtenido: se refiere al peso obtenido después de la extracción

Peso inicial: es el peso seco del material vegetal a extraer

Preparación de inóculo de *T. cruzi*

Las dos cepas de *T. cruzi* que se utilizaron en esta investigación fueron las identificadas como Brener (B) y Nuevo León (NL), proporcionadas por el LPME, las cuales se cultivaron en medio Liver Infusion Tryptose (LIT) suplementado al 10 % con suero fetal bovino para epimastigotes (Valencia et al. 2011) y medio de orina artificial para triatomino (TAU) adicionado con prolina (Contreras et al. 1998). El estadio epimastigote se incubó a una temperatura de 28 ± 2 °C durante 4- 8 días hasta obtener la fase exponencial de crecimiento, esto cuando los parásitos alcanzaron una densidad celular de 1.0×10^6 epimastigotes/mL, la cual se estableció al observar 100 % de epimastigotes libres y con alta movilidad en el cultivo (Acosta et al. 2019). Para llevar a cabo la metaciclologénesis, cultivos de epimastigotes al final de la fase exponencial fueron centrifugados a $10,000 \text{ g} \times 15 \text{ min}$ a 10°C , y el precipitado se resuspendió en medio TAU (NaCl 190 mM, buffer de fosfato 8 mM pH 6, KCl 17 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 2 mM) y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Los parásitos se diluyeron a una concentración final de 1.0×10^6 parásitos/mL en TAU suplementado con L-prolina 10 mM (medio TAUP) y se incubaron a 28 ± 2 °C por 24 h para posteriormente trabajar con los ensayos correspondientes (Contreras et al. 1998).

Evaluación de la actividad tripanomicida de los extractos de plantas

Para evaluar la actividad tripanomicida de los diferentes extractos, el bioensayo consistió en preparar diferentes concentraciones de cada uno de los extractos disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) al 1 %, donde se ajustaron algunas adecuaciones (3000, 2500, 2000, 1500, 1100, 950, 800, 650 y 300 $\mu\text{g/mL}$) (Pérez et al. 2017).

El ensayo biológico se realizó por triplicado en una microplaca estéril de 96 pocillos, donde en cada pozo se agregaron 190 μL de la suspensión de medio LIT junto con el inóculo de epimastigotes y tripomastigotes con 1.0×10^6 parásitos/mL, luego se agregaron 10 μL del extracto de cada una de las diferentes concentraciones a evaluar (Molina et al. 2014; Pérez et al. 2017).

Se utilizó como blanco medio LIT/TAU sin inóculo y cada una de las concentraciones del extracto a evaluar. Se usó como control positivo Nifurtimox a 100 $\mu\text{g/mL}$ y como control negativo el DMSO al 1 % así como cultivo del parásito en medio LIT/TAU con volúmenes igual al de los extractos evaluados (Muelas et al. 2000). Las microplacas se incubaron a 28 ± 2 °C durante 72 h (Pizzolatti et al. 2003).

El número de epimastigotes/tripomastigotes vivos de *T. cruzi* se determinó con el método colorimétrico del Bromuro de 3-(4, 5- dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol (MTT) (Muelas et al. 2000).

Pasado el tiempo de incubación de 72 h, el efecto de las concentraciones de los diferentes extractos se determinó con la medición de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial para lo cual se adicionó 10 µL/pozo de MTT + Metasulfato de fenazina (PMS) y se incubó la microplaca 28° C ± 2° C durante 90 min (Mejía et al. 2012). Posteriormente, para detener la reacción y disolver los cristales de formazán, se adicionó a cada pozo 100 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS al 10 %, 0.01N HCl). Se realizó la lectura en un espectrofotómetro ASYS UVM-340 a una densidad óptica de 570 nm en un lector para ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) (Muelas et al. 2000; Mejía et al. 2012) (Figura 9).

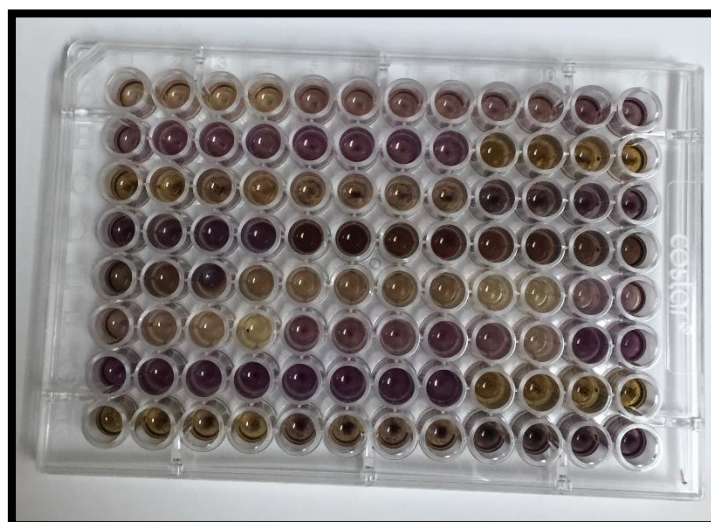


Figura 9. Ensayo de MTT. Coloraciones de amarillas a púrpuras por acción de deshidrogenasa mitocondrial de *T. cruzi*.

El número de parásitos vivos de *T. cruzi* se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{(Ac - Am) - (Ap - Apm)}{Ac - Am} \times 100$$

Donde:

Ac= Promedio de Abs del control negativo

Am= Promedio de Abs del medio LIT solo

Ap= Promedio de Abs de cada tratamiento

Apm= Promedio del blanco de cada tratamiento

Con los porcentajes de muerte obtenidos, se calcularon las concentraciones letales 50 (CL₅₀) las cuales corresponden a las concentraciones en que ocurre el 50 % de la muerte de los parásitos. Estas concentraciones se determinaron mediante un análisis de regresión dosis-respuesta con ayuda del software IBM SPSS Statistics v20 con un intervalo de confianza del 95 % (Al-Adhroey et al. 2010).

Determinación de la actividad tóxica con *Artemia salina*

Se tomaron huevos de *A. salina* que se encontraban en refrigeración, cuando se implementan condiciones de temperatura, salinidad y oxigenación del agua de una manera adecuada, el metabolismo de los embriones encapsulados se reactiva (Clegg 1980).

Para llevar a cabo el bioensayo con huevos de *A. salina* se colocaron en un Tetra acuario de agua salada artificial, con una preparación de 38 g/L de agua destilada, se ajustó a un pH 8 (Krishnaraju et al. 2005), con constante aireación y oxigenación, a temperatura ambiente (25-30 °C) y con exposición a la luz directa con ayuda de una lámpara. El agua fue suplementada con extracto de levadura al 0.06 % (al-Mamun et al. 2010; Flores et al. 2016). Al cabo de 48 h de incubación, después de la eclosión, se colectaron las larvas (nauplios) activas libres las cuales se utilizaron para el ensayo. Se tomaron 10 nauplios con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico y se colocaron en cada tubo Eppendorf que contenía 950 µL de agua salada artificial con 50 µL de cada extracto a evaluar. Las diferentes concentraciones evaluadas fueron 3000, 2500, 2000, 1500, 1100, 950, 800, 650 y 300 µg/mL (Krishnaraju et al. 2005). El control positivo utilizado para estos ensayos fue dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) a 100 µg/mL (Molina y Said 2006; Rajeh et al. 2012) y DMSO 1% como control negativo (Hamidi et al. 2014). Los viales se mantuvieron a temperatura de 25-30 °C por 24 h con iluminación persistente (Figura 10). Tras 24 h de exposición se contabilizó el número de larvas vivas y muertas ya que con estos datos se llevó a cabo un análisis PROBIT con ayuda del programa IBM SPSS Statistics 20 para determinar la concentración citotóxica (CC₅₀). La validez del experimento se consideró cuando el % de mortalidad del control negativo no superó el 10% (Fernández et al. 2009).

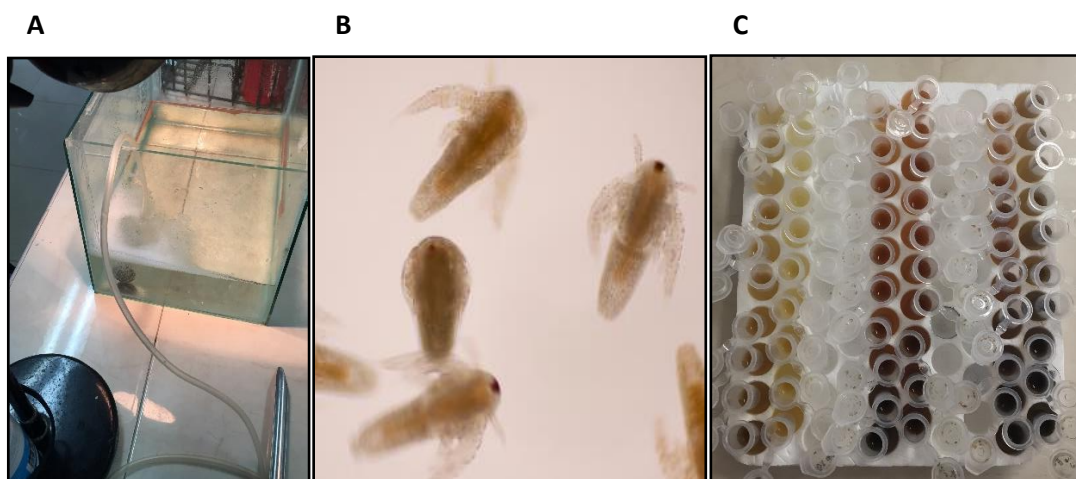


Figura 10. Ensayo de toxicidad con *Artemia salina*. A) Pecera acondicionada; B) Nauplios de *A. salina*; C) Triplicado de extractos.

De acuerdo con los criterios de toxicidad de Meyer y Clarkson, para evaluación de toxicidad de extractos/fracciones de plantas se clasificaron como: no tóxicos $CC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$, poco tóxicos $CC_{50} 500\text{-}1000 \mu\text{g/mL}$, medianamente tóxicos $CC_{50} 100\text{-}500$ y altamente tóxicos con CC_{50} de $0\text{-}100 \mu\text{g/mL}$ (Meyer et al. 1982; Clarkson et al. 2004).

Citotoxicidad en línea celular Vero

Para este ensayo se obtuvieron células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano) del UANL-FCB-LIV. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en atmósfera humidificada de CO_2 al 5%, en frascos de cultivo de 75 cm^2 con medio RPMI, suplementado con suero fetal bovino al 10% y una mezcla de antibiótico-antimicótico (penicilina 100 U/mL , estreptomycin 100 mg/mL , anfotericina B 0.25 mg/mL) al 1% (Gibco) (Artun et al. 2016; Ahmad et al. 2017; Azeredo et al. 2020).

Para los experimentos, se tripsinizaron células y cultivaron a una densidad de 2.2×10^5 cel/pocillo en microplaca de 96 pozos por 24 h a las condiciones antes mencionadas. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de extractos/fracciones ($300\text{-}3000 \mu\text{g/mL}$) por 24 h. La actividad citotóxica se evaluó por el ensayo colorimétrico de MTT para lo cual se agregaron $20 \mu\text{L}$ en c/pocillo de MTT a concentración de 5 mg/mL en PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4, las microplacas se incubaron 1 h a las condiciones previamente mencionadas. Luego, se adicionaron $100 \mu\text{L}$ de DMSO en c/pozo para la solubilización de los cristales de formazán y se

realizó la lectura de densidad óptica (DO) a 540 nm en un lector de ELISA Varioskan LUX multimode microplate reader (Thermo Scientific) y se calculó el porcentaje de citotoxicidad con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = \frac{\text{DO control negativo} - \text{DO tratamiento}}{\text{DO control negativo}} \times 100$$

Los resultados se representaron como concentración citotóxica 50 (CC₅₀) a partir de los valores medios de los triplicados y se llevó a cabo un análisis de regresión dosis-respuesta con ayuda del programa IBM SPSS Statistics 20 con un intervalo de confianza del 95 % (Salama et al. 1999; Al-Adhroey et al. 2010; Artun et al. 2016; Ahmad et al. 2017; Azeredo et al. 2020).

Los extractos/fracciones fueron clasificados como altamente citotóxicos (CC₅₀<10 µg/mL), citotóxicos (CC₅₀ 10-100 µg/mL), moderadamente citotóxicos (CC₅₀ 100-1000 µg/mL) y potencialmente no citotóxicos (CC₅₀>1000 µg/mL) (Osorio et al. 2007).

De igual forma, se obtuvo el índice de selectividad (IS) de los extractos/fracciones para conocer la relación entre CC₅₀ citotóxica y CL₅₀ del microorganismo blanco (Mena et al. 2009), en este sentido *T. cruzi*, se calculó con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\text{IS} = \frac{\text{CC}_{50} \text{ citotóxica}}{\text{CL}_{50} \text{ tripanomicida}}$$

Los extractos/fracciones frente a *T. cruzi* fueron considerados como no selectivos (IS<2), moderadamente selectivos (IS >2 y <3) y altamente selectivos (IS>3) (Prayong et al. 2008). Entre mayor sea la relación, mayor será el índice de selectividad y de esta forma el extracto/fracción tendrá mayor actividad frente al parásito y no contra las células del hospedero, para lo cual se

disminuyen los posibles efectos adversos que puedan ocasionarse por el extracto/fracción (Figura 11) (Valencia et al. 2011).

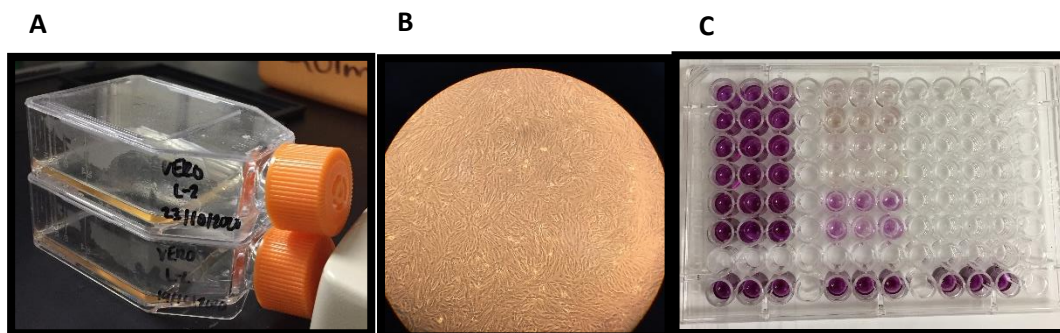


Figura 11. Actividad citotóxica de extractos/fracciones vs *T. cruzi*. A) Medio de cultivo; B) Células Vero; C) Ensayo de MTT

Actividad hemolítica *in vitro*

Para estos ensayos, la sangre humana fue colectada en tubo con EDTA por venopunción de un donante sano O rh positivo. De la sangre colectada, se realizaron 3 lavados con PBS a pH 7.2, y eritrocitos se recuperaron para preparar una suspensión al 5 % en PBS para los ensayos. En condiciones *in vitro*, se realizó la actividad hemolítica, donde, se agregaron diferentes concentraciones de extractos/fracciones (300-3000 µg/mL) a una solución de PBS y posteriormente con suspensión al 5 % de glóbulos rojos. Después de la incubación por 30 min a 37 °C, las suspensiones celulares se centrifugaron a 900 g x 10 min y el sobrenadante se colectó de manera cuidadosa. La absorbancia a 540 nm del sobrenadante se midió con ayuda de un espectrofotómetro ASYS UVM-340 (UK – Biochrom Ltd). Como control negativo se utilizó la suspensión de eritrocitos con PBS, mientras que como control positivo se utilizó agua destilada estéril (Figura 12) (Malagoli, 2007).

Se calculó el porcentaje de hemoglobina liberada o porcentaje de hemólisis (% H) a partir del valor medio de los ensayos por triplicado para cada una de las concentraciones utilizadas con ayuda de la siguiente formula:

$$\% H = \frac{A_m - A_{cn}}{A_{cp} - A_{cn}} \times 100$$

Donde:

A_m = absorbancia de la muestra

A_{cn} = absorbancia del control negativo

A_{cp} = absorbancia del control positivo

La concentración hemolítica 50 (CH_{50}) se calculó con ayuda del modelo de regresión logística dosis-respuesta con ayuda del programa IBM SPSS Statistics 20 con un valor de $p < 0.05$ (Alonso et al. 2005).

Son considerados como no hemolíticos los extractos/fracciones que no sobrepasan el valor de 10% reportado por la técnica como hemólisis permisible para un compuesto (Martínez et al. 2013).

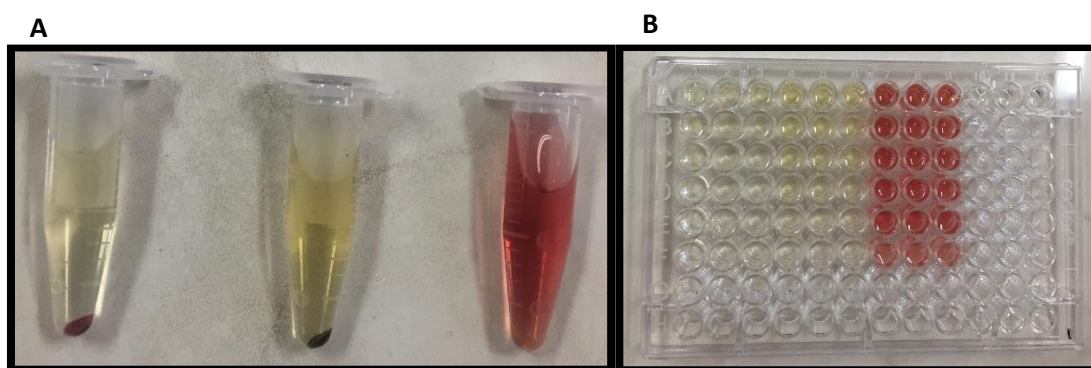


Figura 12. Actividad hemolítica de *Am*, *Bp* y *Cb*. A) De izquierda a derecha, sin efecto de hemólisis en primeros dos Eppendorf, tercer tubo con hemólisis; B) Ensayo en microplaca

Fraccionamiento por métodos cromatográficos

Los tres extractos de plantas fueron sometidos a fraccionamiento con el propósito de separar e identificar los compuestos que presentan actividad tripanocidal, para lo cual se utilizó el ensayo de cromatografía en capa fina y cromatografía en columna.

Cromatografía en capa fina

Se utilizaron cromatoplasmas de sílica gel 60 (Merck) 5 x 10 cm y con ayuda de un lápiz se rotularon de acuerdo con el nombre y número de muestra a analizar (Figura 13). Para esto, cada muestra se aplicó con ayuda de un capilar, a distancia de 1 cm del borde inferior. La muestra se concentró sobre la cromatoplasma, repitiendo la aplicación varias gotas sobre el origen, dejando secar entre aplicaciones. Las muestras se dejaron secar y se corrieron las cromatoplasmas dentro de cubas cromatográficas de vidrio con 10 mL de eluyente hasta 0.5 cm del borde superior. Los eluyentes

utilizados fueron: para los extractos crudos se utilizó cloroformo, acetato de etilo y metanol; para las fracciones se empleó cloroformo, acetato de etilo, metanol, cloroformo-acetato de etilo 1:1, acetato de etilo-metanol 1:1 y cloroformo- metanol. Las cromatoplasmas se secaron por 24 h y luego de esto se observaron a luz visible, luz UV a 254 y 365 nm, para lo cual se utilizó una cámara de análisis de luz fluorescente UV Transilluminator (Sherma y Fried 2003). En el caso de compuestos que no absorben luz UV, la visualización (o revelado) del cromatograma requirió utilizar un agente revelador, en este caso, fueron reveladas en una cámara saturada con vapores de ácido sulfúrico concentrado (Balcinde et al. 2005).

El factor de retención (Rf), por sus siglas en inglés, se calculó con la distancia del punto de aplicación de la muestra a la mitad de la fracción detectada y se dividió el valor obtenido sobre la distancia del punto de aplicación de la muestra y la distancia recorrida por el eluyente, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por analito}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil}}$$

Los valores de Rf se pueden tomar entre 0-1. Cuanto más cercano sea el valor a 0, el analito tiene mayor afinidad por la fase estacionaria, significa que es más retenido; mientras que el valor del analito sea más cercano a 1 tendrá afinidad por la fase móvil (Xu et al. 2022).



Figura 13. Cromatografía en capa fina

Cromatografía en columna

Se montó una columna cromatográfica de vidrio de 22 x 300 mm (Figura 14) empacada con 20 g de sílica gel (Sigma-Aldrich) y se añadieron 50 mg del extracto a fraccionar. Se corrió con 10 mL de diferentes solventes de menor a mayor polaridad (Revathy et al. 2011) y se colectaron fracciones de 5 mL (Tabla 3). Del extracto de *A. mexicana* se obtuvieron 38 fracciones, de *B. pilosa* se colectaron 60 y de *C. boissieri* se obtuvieron un total de 61 fracciones.

Tabla 3. Gradientes de elución

Extracto	Fracciones colectadas (5 mL)
Am	38
Bp	60
Cb	61

Am: *A. mexicana*; Bp: *B. pilosa*; Cb: *C. boissieri*

Se evaporó la totalidad del solvente con ayuda de un rotavapor y las fracciones con perfil cromatográfico similar se unieron para formar fracciones colectivas de cada columna (Tabla 4).

Tabla 4. Fracciones colectivas

Extracto	Columna	Fracciones unidas	Fracción colectiva	Nomenclatura atribuida
Am	Cloroformo	1-13	Fracción colectiva 1	AMFC1CL1
	Acetato de etilo	14-26	Fracción colectiva 2	AMFC2AE1
	Metanol	27-38	Fracción colectiva 3	AMFC3MOH1
Bp	Cloroformo	1-27	Fracción colectiva 1	BPFC1CL1
	Acetato de etilo	28-40	Fracción colectiva 2	BPFC2AE1
	Metanol	41-60	Fracción colectiva 3	BPFC3MOH1
Cb	Cloroformo	1-41	Fracción colectiva 1	CBFC1CL1
	Acetato de etilo	42-54	Fracción colectiva 2	CBFC2AE1
	Metanol	55-61	Fracción colectiva 3	CBFC3MOH1

Am: *A. mexicana*; Bp: *B. pilosa*; Cb: *C. boissieri*

Por último, se realizaron ensayos de actividad tripanomicida, tóxica, citotóxica y hemolítica de cada fracción colectiva, estos ensayos se llevaron a cabo con la metodología previamente descrita.

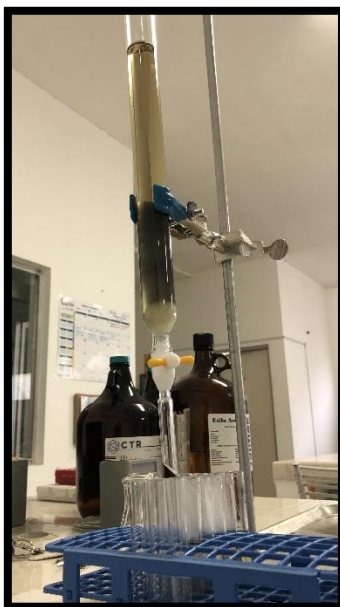


Figura 14. Montaje de equipo de columna cromatográfica

Tamizaje fitoquímico

Se llevaron a cabo diferentes exámenes fitoquímicos para los tres extractos y fracciones colectivas según los diversos métodos estándar (Dipali y Vilas 2013; Rodríguez 2015)

1. Detección de carbohidratos. **Test de Molisch:** Se utilizó un tubo de ensaye de 13 x 100 mm, en el cual se agregó una pequeña cantidad del extracto/fracción a evaluar, posteriormente se añadieron 2 gotas de solución alcohólica de α -naftol (Reactivo de Molisch) y luego se adicionaron cuidadosamente 2 mL de ácido sulfúrico concentrado por las paredes internas del tubo. No se agitan los tubos. La formación de un anillo color violeta/morado/vino en la interfase indicó la presencia de carbohidratos.

2. Detección de aminoácido. **Test de 43xposi:** Se colocó en una gradilla el tubo de ensaye de 13 x 100 mm y se añadió muestra de extracto/fracción seguido de 10 gotas de reactivo de 43xposi y mezclamos. Luego, se introdujo el tubo de ensaye en baño maría durante 2 minutos. Al terminar este tiempo se retiró el tubo y se agregó 10 gotas de Nitrito de sodio 0.05 % p/v y se agitó

vigorosamente la mezcla. Al cabo de unos minutos la formación de un color rosa o rojo ladrillo indica la presencia de aminoácidos.

3. Detección de flavonoides. **Test de Shinoda:** Se colocó un tubo de ensaye de 13 x 100 mm en una gradilla de plástico donde se mezcló el extracto/fracción con 3-4 fragmentos de magnesio más ácido clorhídrico concentrado. Al cabo de uno minutos, las coloraciones rojo/rosa y/o verde indican resultado positivo para flavonoides.

4. Detección de proteínas. **Test de Biuret:** Para esta prueba, se adicionó extracto/fracción en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm con 15 gotas de Reactivo de Biuret y se procedió a mezclar. La aparición del color violeta/púrpura indicó un resultado positivo.

5. Detección de fenoles y enoles. **Test de cloruro férrico (FeCl₃):** Dentro de un tubo de ensaye de 13 x 100 mm, el extracto/fracción fue tratado con 4-5 gotas de FeCl₃. La coloración negro-azulado indicó la detección de fenoles y enoles en la muestra.

6. Detección de saponinas. **Test de Foam:** En un tubo de ensaye de 13 x 100 mm se colocó extracto/fracción y una pequeña cantidad de agua destilada. Luego de mezclar vigorosamente, la formación de espuma indica la presencia de saponinas y una prueba positiva.

7. Detección de colesterol y esteroides. **Test de Salkowski:** Se colocó en una gradilla de plástico, un tubo de ensaye de 13 x 100 mm donde se depositó muestra más unos mililitros de ácido sulfúrico concentrado. Luego de agitar bien la mezcla, la presencia de dos capas: una capa superior, rojo-azulado/violeta; y una capa inferior de color amarillo/verde, indicó un resultado positivo. Un resultado negativo indica la permanencia del color original.

8. Detección de alcaloides. **Test de Wagner:** Para esta prueba, se añadió a un tubo de ensaye de 13 x 100 mm el extracto/fracción a probar, junto con 4-5 gotas de reactivo de Wagner se mezcló la muestra y al cabo de unos minutos, la formación de un precipitado color rojo-marrón indicó la presencia de alcaloides.

Identificación de compuestos por GC/MS

Para esto se seleccionó el extracto/fracción que presentó mayor y mejor actividad frente al parásito *T. cruzi*. Para identificar los compuestos se optó por un análisis de Cromatografía de gases-

Espectrometría de masas (GC/MS) en el Instituto Politécnico Nacional (IPN) campus Reynosa del Centro de Biotecnología Genómica en el Laboratorio de Biotecnología. Brevemente, para el análisis se empleó un equipo Agilent Technologies: 7890^a, con detector triple de masas, con una columna HP-5MS (30m x 250 μ m x 0.25 μ m). La programación de temperatura para el horno fueron 170 °C/ 2min luego 5 °C/min hasta 250 °C por 15 min. La inyección se efectúa en Split a 30.924 ml/min. El gas portador utilizado fue Helio 1ml/min. La identificación de los compuestos volátiles a partir de su espectro de masas fue con ayuda de la librería NIST (NIST MS Search 2.3 program) (Gutiérrez y Droguet 2002).

Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico se utilizó un modelo de regresión lineal con una curva de dosis respuesta de los tratamientos utilizados frente a los extractos de plantas.

Además, la prueba de Kruskal-Wallis, también conocido como test H, es la alternativa no paramétrica a la prueba ANOVA de una vía para datos no pareados. Aquí se prueba si varias muestras independientes (más de dos muestras o lo que es lo mismo decir k muestras independientes) provienen o no de la misma población.

Se realizó un análisis Probit que permitió determinar la IC₅₀ de la actividad citotóxica de los extractos.

Los resultados se consideraron significativos si el valor de p fue menor o igual a 0.05. los datos se expresaron en gráficos como \pm SEM.

Se calcularon las medias y las desviaciones estándar (SD) y los datos se expresaron como una media de réplicas \pm SD. Las concentraciones que inhibieron el crecimiento de epimastigotes en un 50 % (IC₅₀) después de 72 h, la concentración letal del 50 % de los tripomastigotes (LC₅₀) después de 72 h y la concentración que provocó una disminución del 50 % en la viabilidad celular (CC₅₀) se determinaron mediante análisis Probit empleando regresión de mínimos cuadrados simple utilizando el programa StatPlus Pro-5.9.8 (AnalystSoft Inc., Canadá).

RESULTADOS

Rendimiento de extractos de plantas

Referente a las extracciones de ejemplares vegetales, en la Tabla 5 se plasman los rendimientos obtenidos tanto de extractos metanólicos como acuosos de las plantas colectadas. Referente a la extracción acuosa, el extracto de Am presentó el mayor rendimiento (32.72 %); en cambio, en las extracciones metanólicas, el extracto de Bp fue el que presentó un mayor rendimiento (26.268 %).

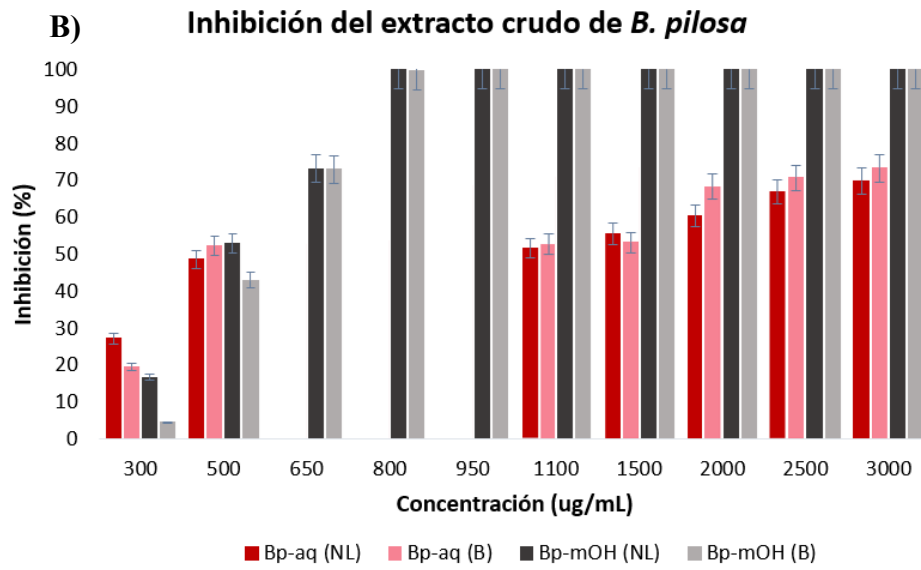
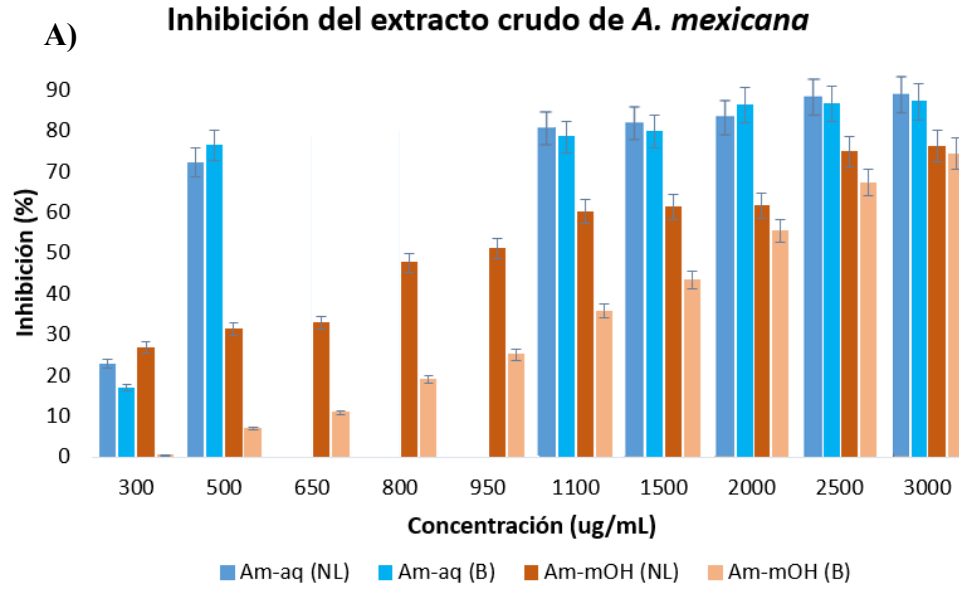
Tabla 5. Rendimiento de extractos acuosos y metanólicos

		Peso frasco (g)	Peso frasco c/extracto (g)	Peso obtenido (g)	% de rendimiento
Am	Metanólica	55.94	57.969	2.029	23.87
	Acuosa	54.972	63.152	8.18	32.72
Bp	Metanólica	55.206	61.773	6.567	26.268
	Acuosa	54.899	62.905	8.006	32.024
Cb	Metanólica	55.784	61.29	5.506	22.04
	Acuosa	55.257	61.295	6.038	24.152

Am: *A. mexicana*; Bp: *B. pilosa*; Cb: *C. boissieri*

Actividad tripanocidal de extractos acuosos y metanólicos frente a epimastigotes

Los ensayos biológicos frente al estadio epimastigote de *T. cruzi* arrojaron diferentes porcentajes de mortalidad (Figura 15), el extracto de *B. pilosa* fue el que presentó la mejor actividad tripanomicida con porcentajes de inhibición por encima del 90 % a partir de los 800 µg/mL.



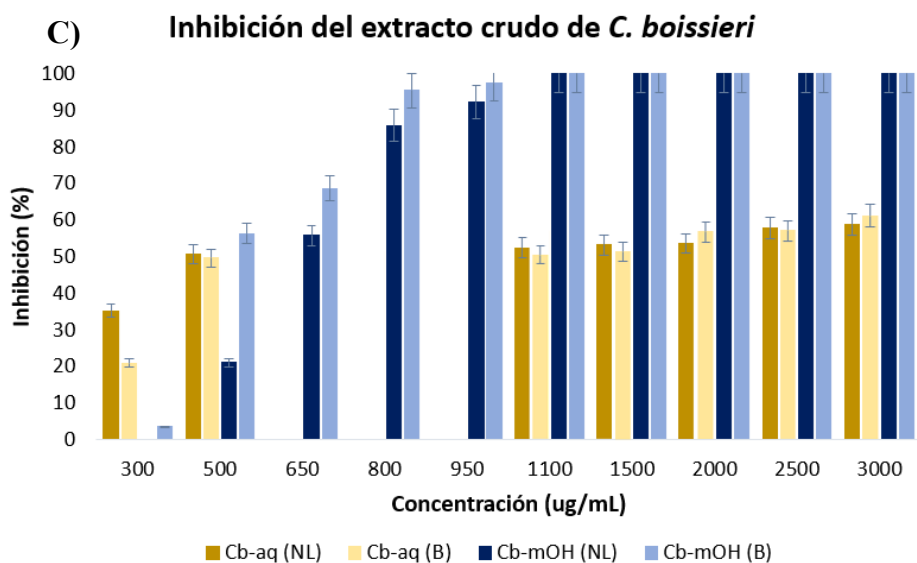


Figura 15. Porcentajes de inhibición en contra de epimastigotes. A) Inhibición por parte del extracto crudo de *A. mexicana*. B) Inhibición de epimastigotes por el extracto crudo de *B. pilosa*. C) Inhibición por parte del extracto crudo de *C. boissieri*. NL: cepa Nuevo León; B: cepa Brener; aq: extracto acuoso; mOH: extracto metanólico

De igual forma, la actividad tripanocidal (CL_{50}) de extractos acuosos y metanólicos frente a las cepas NL y Brener de *T. cruzi* se muestran a continuación en la Tabla 6. El extracto metanólico de *B. pilosa* mostró los mejores resultados, ya que se presentó una mejor actividad tripanocidal (CL_{50} 318 y 432 $\mu\text{g/mL}$) para cada una de las cepas a probar, por esta razón se seleccionó el extracto metanólico de *B. pilosa* para próximos ensayos.

Tabla 6. Actividad tripanocida CL_{50} contra epimastigotes

Plantas	Cepa NL		Cepa Brener	
	Aq $\mu\text{g/mL}$	mOH $\mu\text{g/mL}$	Aq $\mu\text{g/mL}$	mOH $\mu\text{g/mL}$
<i>Argemone mexicana</i>	130 \pm 21	1199 \pm 18	1249 \pm 25	1906 \pm 26
<i>Bidens pilosa</i>	768 \pm 14	318 \pm 83	555 \pm 18	432 \pm 90
<i>Cordia boissieri</i>	369 \pm 8	559 \pm 70	794 \pm 13	342 \pm 68

\pm Desviación estándar con intervalo de confianza del 95 %

Ensayos de actividad tóxica, citotóxica y hemolítica de extractos metanólicos

Dados los resultados anteriores, se procedió a trabajar en los próximos ensayos únicamente con los extractos metanólicos de *B. pilosa*, ya que fue el extracto que mostró mejor actividad tripanocidal. A continuación, se muestran los resultados de los ensayos citotóxicos y hemolíticos (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad citotóxica y hemolítica

Extracto metanólico	Actividad tóxica µg/mL <i>Artemia salina</i>	Actividad citotóxica µg/mL Células Vero	Actividad hemolítica µg/mL	Índice de selectividad (IS)
<i>A. mexicana</i>	503 ± 18 <1000 Moderadamente tóxico	491 ± 12 Moderadamente citotóxico	>1000 No hemolítico	0.40 No selectivo
<i>B. pilosa</i>	2652 ± 19 >1000 No tóxico	1003 ± 10 Potencialmente no citotóxico	>1000 No hemolítico	3.15 Selectivo
<i>C. boissieri</i>	993 ± 15 <1000 Moderadamente tóxico	7905 ± 5 Potencialmente no citotóxico	276 ± 22 Hemolítico	14.12 Selectivo

Cromatogramas y fracciones colectivas

Posteriormente, de las fracciones colectivas obtenidas y mostradas en el apartado de métodos en la Tabla 4, se calculó el porcentaje de rendimiento de cada una de estas (Tabla 8) y a su vez, se realizaron las CCP y a continuación se muestran los resultados de RT de las fracciones obtenidas (Figura 16).

Tabla 8. Porcentaje de rendimiento de fracciones colectivas

<i>A. mexicana</i>	<i>B. pilosa</i>	<i>C. boissieri</i>
<ul style="list-style-type: none"> • AMFC1CL1 (2.11 %) • AMFC2AE1 (1.99 %) • AMFC3MOH1 (6.16 %) 	<ul style="list-style-type: none"> • BPFC1CL1 (1.47 %) • BPFC2AE1 (5.83 %) • BPFC3MOH1 (12.9 %) 	<ul style="list-style-type: none"> • CBFC1CL1 (6.18 %) • CBFC2AE1 (11.04 %) • CBFC3MOH1 (18.1 %)

Am: *A. mexicana*; Bp: *B. pilosa*; Cb: *C. boissieri*; FC: Fracción colectiva; CL: clorofórmica; AE: Acetato de etilo; MOH: metanólica

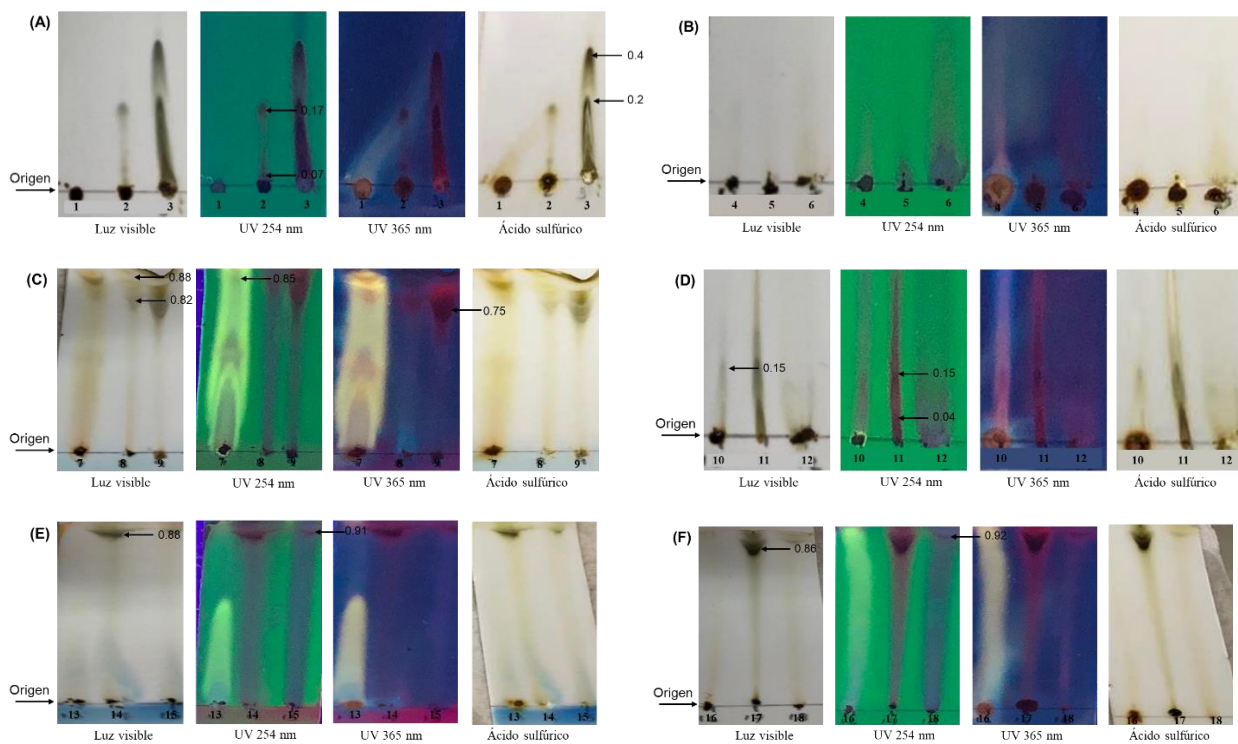


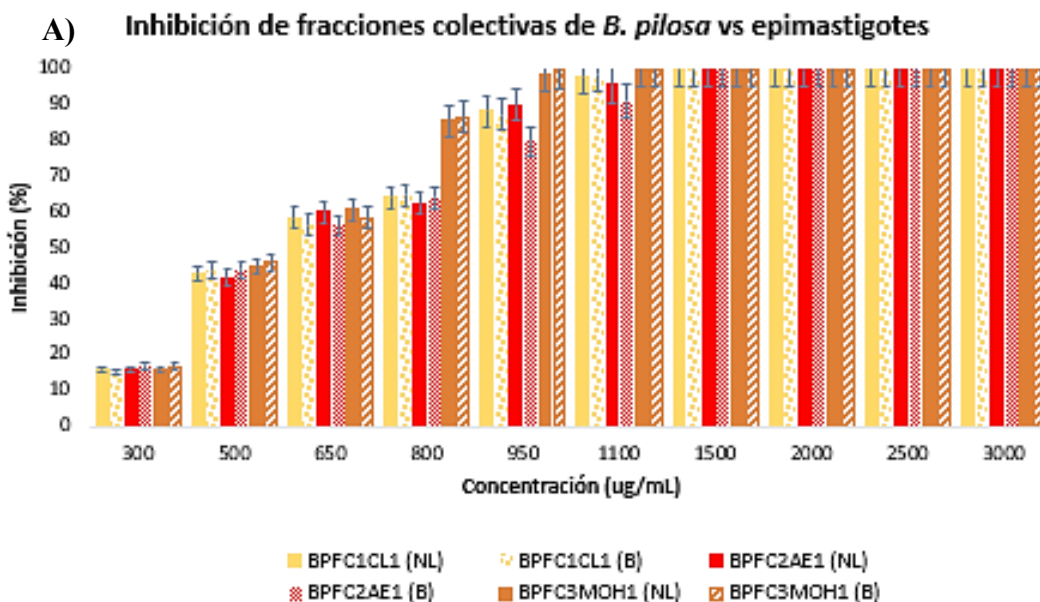
Figura 16. Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos metanólicos. El análisis de TLC reveló cromatografías con eluyente cloroformo (A), el número de manchas (4) con tiempos de retención de 0.07 y 0.17 para Bp; 0.2 y 0.4 para Cb. No se observaron manchas para Am; con eluyente de acetato de etilo (B). No se observaron manchas para ningún caso; con eluyente metanol (C), el número de manchas (4) con tiempos de retención de 0.85 para Am; 0.82 y 0.88 para Bp; 0.75 en el caso de Cb; con eluyente cloroformo-acetato de etilo 1:1 (D), el número de manchas (3) con

tiempos de retención de 0.15 para Am; 0.04 y 0.15 para Bp; No se observaron manchas para Cb; con eluyente acetato de etilo-metanol 1:1 €, el número de manchas (2) con tiempos de retención de 0.88 para Bp; 0.91 para Cb.

No se observaron manchas para Am; con eluyente cloroformo-metanol 1:1 (F), el número de manchas (2) con tiempos de retención de 0.86 para Bp; 0.92 para Cb. No se observaron manchas para Am. Las cromatoplasmas se revelaron por luz visible, UV a dos longitudes de onda y con exposición a gases de ácido sulfúrico. Los números corresponden, de izquierda a derecha: Am, Bp y Cb.

Actividad tripanocidal de fracciones colectivas

Al tener los mejores resultados de actividad tripanocidal, citotoxicidad y hemólisis de extractos metanólicos, a partir de los siguientes resultados, se trabajó únicamente con dichos datos. Por lo tanto, se presentan los resultados de la inhibición por parte de las fracciones de *B. pilosa* frente a dos estadios de *T. cruzi* y dos cepas de interés (Figura 17) así como las CL₅₀ obtenidas (Tablas 9 y 10).



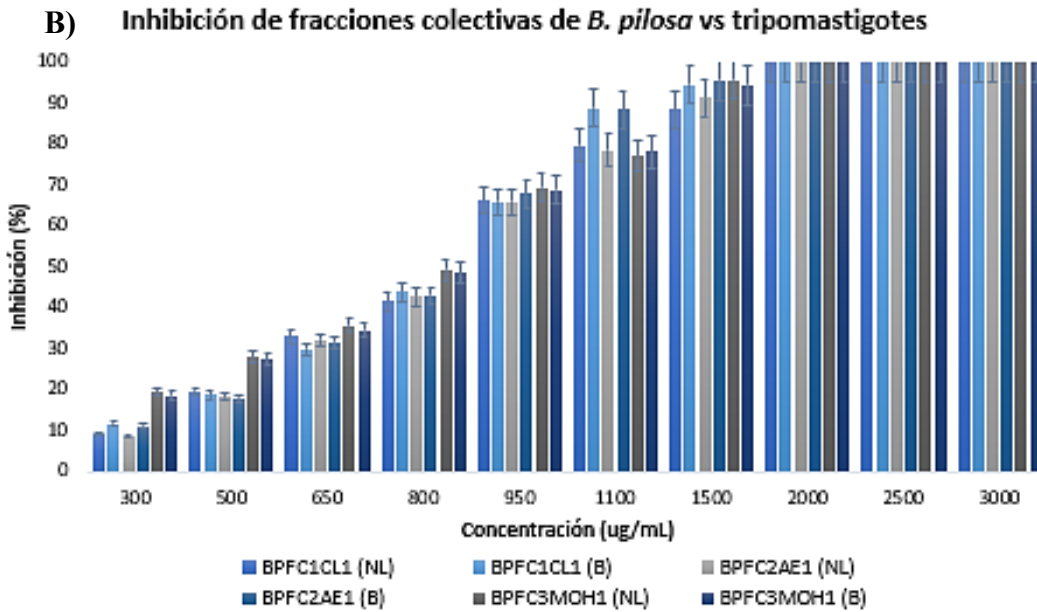


Figura 17. Porcentajes de inhibición de las fracciones colectivas. (A) Efecto inhibitorio frente al estadio epimastigote, y (B) frente al estadio tripomastigote de *T. cruzi*.

Tabla 9. Actividad de fracciones frente al estadio epimastigote

Actividad tripanomicida CL ₅₀			Actividad tripanomicida CL ₅₀		
<i>A. mexicana</i> (partición)	Cepa NL	Cepa Brener	<i>B. pilosa</i> (partición)	Cepa NL	Cepa Brener
	µg/mL	µg/mL		µg/mL	µg/mL
Cloroformo	5895 ± 6	5353 ± 6	Cloroformo	530 ± 52	544 ± 54
Acetato de etilo	5722 ± 6	5595 ± 5	Acetato de etilo	518 ± 53	533 ± 56
Metanol	1282 ± 17	1191 ± 17	Metanol	390 ± 62	400 ± 66

Actividad tripanomicida CL ₅₀		
<i>C. Boissieri</i> (partición)	Cepa NL	Cepa Brener
	µg/mL	µg/mL
Cloroformo	632 ± 63	445 ± 60
Acetato de etilo	632 ± 73	436 ± 60
Metanol	549 ± 67	358 ± 62

+: positivo; -: negativo

Tabla 10. Actividad de fracciones frente al estadio **tripomastigote**

Actividad tripanomicida CL ₅₀			Actividad tripanomicida CL ₅₀		
<i>A. mexicana</i> (partición)	Cepa NL	Cepa Brener	<i>B. pilosa</i> (partición)	Cepa NL	Cepa Brener
	µg/mL	µg/mL		µg/mL	µg/mL
Cloroformo	5942 ± 11	5749 ± 33	Cloroformo	894 ± 25	871 ± 9
Acetato de etilo	5682 ± 28	5707 ± 16	Acetato de etilo	907 ± 5	913 ± 8
Metanol	2627 ± 17	2582 ± 18	Metanol	825 ± 75	809 ± 71

Actividad tripanomicida CL ₅₀		
<i>C. boissieri</i> (partición)	Cepa NL	Cepa Brener
	µg/mL	µg/mL
Cloroformo	759 ± 41	771 ± 37
Acetato de etilo	610 ± 30	786 ± 27
Metanol	867 ± 48	824 ± 49

+: positivo; -: negativo

Actividad citotóxica y hemolítica de fracciones colectivas

De igual forma, se realizaron los ensayos para conocer la toxicidad y la actividad hemolítica en este caso de las fracciones colectivas, los cuales se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Ensayos de toxicidad y hemólisis de fracciones colectivas

<i>A. mexicana</i> (fracción)	Actividad citotóxica	Actividad tóxica	Actividad hemolítica	índice de selectividad (IS)
	CC ₅₀ µg/mL		CH ₅₀ µg/mL	
Cloroformo	263 ± 14 Moderadamente citotóxico	200 ± 18 Moderadamente tóxico	>1000 No hemolítico	0.0467 No selectivo
Acetato de etilo	435 ± 11 Moderadamente citotóxico	318 ± 18 Moderadamente tóxico	>1000 No hemolítico	0.0768 No selectivo
Metanol	650 ± 13 Moderadamente citotóxico	416 ± 20 Moderadamente tóxico	>1000 No hemolítico	0.5256 No selectivo

<i>B. pilosa</i> (fracción)	Actividad citotóxica	Actividad tóxica	Actividad hemolítica	índice de selectividad (IS)
	CC ₅₀ µg/mL		CH ₅₀ µg/mL	
Cloroformo	1128 ± 12 No citotóxico	1493 ± 19 No tóxico	>1000 No hemolítico	2.1005 Selectivo
Acetato de etilo	1312 ± 12 No citotóxico	1570 ± 19 No tóxico	>1000 No hemolítico	2.4966 Selectivo
Metanol	1594 ± 13 No citotóxico	1655 ± 19 No tóxico	>1000 No hemolítico	4.0354 Selectivo

<i>C. boissieri</i> (fracción)	Actividad citotóxica	Actividad tóxica	Actividad hemolítica	índice de selectividad (IS)
	CC ₅₀ µg/mL		CH ₅₀ µg/mL	
Cloroformo	1410 ± 17 No citotóxico	1033 ± 15 No tóxico	352 Hemolítico	2.6183 Selectivo
Acetato de etilo	1525 ± 5 No citotóxico	1340 ± 15 No tóxico	297 Hemolítico	2.8558 Selectivo
Metanol	3553 ± 6 No citotóxico	1377 ± 15 No tóxico	501 Hemolítico	7.8346 Selectivo

+: positivo; -: negativo; IS: Índice de selectividad

Identificación de compuestos en fracción colectiva BPFC3MOH1

Dentro de los resultados de las fracciones colectivas frente a los diferentes estadios morfológicos de *T. cruzi*, la fracción identificada como BPFC3MOH1 de la planta *B. pilosa* evidenció mejores efectos de inhibición en contra del parásito y destacados efectos citotóxicos y no hemolíticos, a partir de esto, se procedió con un screening fitoquímico para identificar los grupos que estuvieran presentes en la fracción (Tabla 12) y a su vez, se identificaron 8 compuestos por GC/MS mostrados en cromatograma (Figura 18) y sus diferentes características (Tabla 13).

Tabla 12. Tamizaje fitoquímico de BPFC3MOH1

Prueba	Compuestos	BPFC3MOH1
Test de Molisch	Carbohidratos	+
Test de Millón	Aminoácidos	-
Test de Shinoda	Flavonoides	-
Test de Biuret	Proteínas	+
Test de cloruro férrico (FeCl ₃)	Fenoles y enoles	+

Test de Foam	Saponinas	-
Test de Salkowski	Colesterol y esteroides	+
Test de Wagner	Alcaloides	+

+: positivo; -: negativo

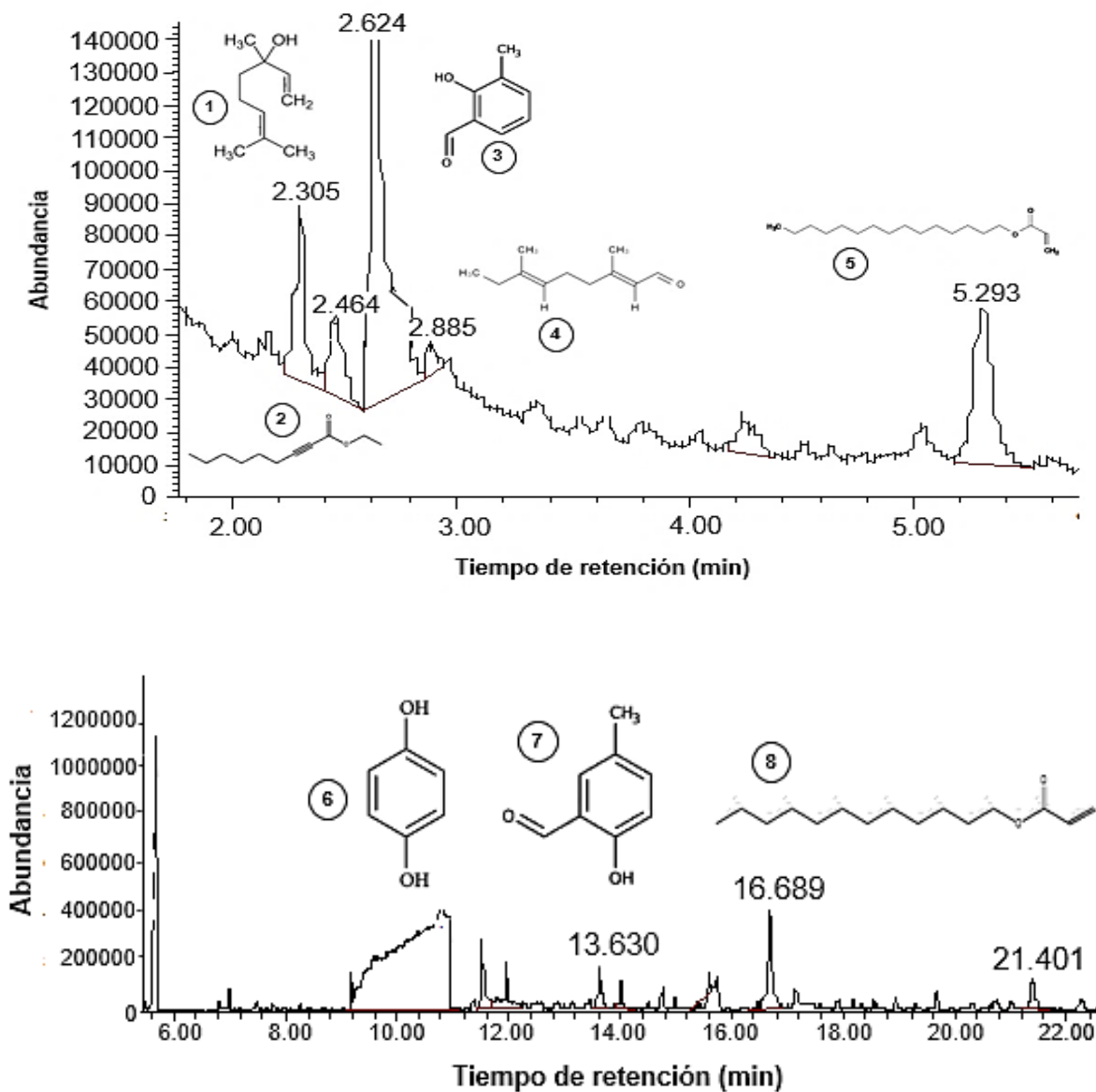


Figura 18. Cromatograma de espectros de masas de compuestos obtenidos de la fracción BPFC3MOH1.

Tabla 13. Características de los diferentes compuestos identificados

Número	Compuesto (IUPAC)	Sinónimos	Clasificación	Fórmula molecular	% área del pico
1	2-Furano metanol, 5-ethenyltetrahydro- $\alpha,\alpha,5$ -trimethyl-, cis-	*Linalol oxide B *Linalol oxide, cis-	Terpeno con un grupo alcohol.	$C_{10}H_{18}O_2$	15.145
2	2-Nonynoic acid, ethyl ester	*Ethyl 2-nonynoate *Ethyl non-2-ynoate	Agente saborizante	$C_{11}H_{18}O_2$	9.330
3	2-Hydroxy-3-methylbenzaldehyde	*3-Methylsalicylaldehyde *2,3-Cresotaldehyde	Benzaldehído	$C_8H_8O_2$	50.918
4	-3,7-dimethylnona-2,6-dienal	*Ethyl citral *2,6-Nonadienal, 3,7-dimethyl-	Componente de fragancia	$C_{11}H_{18}O$	2.492
5	pentadecyl prop-2-enoate	*Pentadecyl acrylate *2-Propenoic acid, pentadecyl ester	Ester	$C_{18}H_{34}O_2$	22.114
6	benzene-1,4-diol	*Hydroquinone *Quinol	Fenol	$C_6H_6O_2$	0.111
7	2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde	*5-Methylsalicylaldehyde *Benzaldehyde, 2-hydroxy-5-methyl-	Aldehído aromático	$C_8H_8O_2$	0.364
8	dodecyl prop-2-enoate	* Dodecyl acrylate	Éster carboxílico	$C_{15}H_{28}O_2$	0.116

DISCUSIÓN

Desde hace ya varios años, los compuestos derivados de plantas han sido un recurso para la formulación de nuevos fármacos con enfoque profiláctico y/o terapéutico, además, con un potencial antimicrobiano. La búsqueda de nuevas moléculas con nula o baja toxicidad frente a *T. cruzi*, aumenta a medida con la persistencia de los efectos adversos de los antiparasitarios preexistentes, por esto las alternativas siguen poniéndose en marcha para evaluar los extractos de diferentes productos vegetales y sus compuestos (Izumi et al. 2011).

En diversas investigaciones, los porcentajes de rendimiento de diferentes tejidos vegetales mostraron un mayor porcentaje en hojas, seguido de semillas y frutos, lo cual se sustenta teniendo en cuenta los principios activos de vegetales superiores que puedan encontrarse en mayor proporción en hojas, esto como resultado de ser uno de los órganos representativos y más importantes donde se tiene lugar la mayoría de los procesos fotosintéticos de las plantas (Muñoz 2002). En otros estudios, por ejemplo, para Bp obtuvieron porcentajes de rendimiento entre 4-6 % con parámetros similares a los de esta investigación al momento de las extracciones (Owoyemi y Oladunmoye 2017), de igual forma los rendimientos máximos obtenidos en diferentes extracciones de otros materiales vegetales no superaron más del 11 % de rendimiento (Ahmed et al. 2017), en cambio en estos resultados obtuvimos muy buenos rendimientos, por encima del 25-30 %.

Posteriormente, se evaluó la actividad tripanocidal de los extractos acuosos y metanólicos de los tres ejemplares de plantas frente a dos cepas de *T. cruzi*. En primer lugar, para el ejemplar de Am se evidenció una mayor actividad tripanomicida por parte del extracto acuoso con una CL_{50} de 130 $\mu\text{g/mL}$. En otros estudios se ha utilizado el proceso de cocción en hojas de la planta *A. mexicana* como medicina tradicional para tratamiento de malaria y tripanosomiasis en etapas tempranas, tal es el caso de la actividad reportada del extracto acuoso con $IC_{50} = 4.5 \mu\text{g/mL}$ frente a epimastigotes de la cepa de *T. brucei rhodesiense* (Schmidt et al. 2012; Mathew y Negi 2019).

Por otro lado, los extractos acuosos y metanólicos de *B. pilosa* mostraron CL_{50} de 768 y 318 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente contra epimastigotes de la cepa NL; mientras que frente a epimastigotes de la cepa internacional Brener, se obtuvieron CL_{50} 555 $\mu\text{g/mL}$ con extracto acuoso y 432 $\mu\text{g/mL}$ del extracto metanólico para estos ensayos. Se ha evidenciado la amplia actividad antimicrobiana y en específico frente a diversos parásitos de la planta Bp, hay que tener en cuenta que la tripanosomiasis africana, la cual es muy cercana a la enfermedad de Chagas, , actualmente sigue

con varias afectaciones a la salud humana en países del África subsahariana, y se ven involucradas diversas especies y subespecies causantes de esta enfermedad, la relación que tienen estas especies del protozooario *Trypanosoma* muestran que diversas plantas pueden tener efecto letal frente a cepas africanas como americanas. Partiendo de esto, una investigación muestra la actividad *in vitro* del extracto acuoso de *B. pilosa* sobre una cepa de *T.b. rhodesiense* aislada de un paciente en la localidad de Busia, Kenia, en el continente africano teniendo una CL₅₀ de 125 µg/mL (Mwaniki et al. 2017), además, los estudios realizados con extractos crudos de la planta completa de Bp han resultado en IC₅₀ 5.51 µg/mL frente a otra especie africana como lo es *T.b. brucei* (Ohashi et al. 2018). Las publicaciones más recientes, muestran el resultado del extracto metanólico de *B. pilosa* frente otra cepa, ahora *T. brucei*, con resultados prometedores de IC₅₀ de 5.86 µg/mL (Dofuor et al. 2022)

En tercera instancia, las CL₅₀ obtenidas de la actividad de *C. boissieri* frente a las cepas de NL y Brener fueron desde los 342 hasta 794 µg/mL para extractos acuosos y metanólicos. Diversos estudios han resaltado la actividad tripanocidal de diferentes especies del género *Cordia* (Oza y Kulkarni 2017). Un grupo de trabajo utilizó las raíces de la especie de *C. globosa* y posteriormente los extractos etanólicos los probaron frente a epimastigotes (cepa Berenice) de *T. cruzi*, el compuesto con mayor actividad fue una IC₅₀ de 12.2 µg/mL (Vieira et al. 2008). Otras investigaciones han demostrado la actividad antiprotozoal de la especie de *C. sinensis* contra dos especies, *T. cruzi* (33.9 µg/mL) y *T. brucei* (32.0 µg/mL) lo que demuestra el potencial papel que presentan estas especies de *Cordia* sp. (Al-Musayeib et al. 2012).

No se observó citotoxicidad en dos de los tres extractos metanólicos probados en la línea celular Vero, estos fueron Am y Bp con una CC₅₀ >1000 µg/mL clasificados como potencialmente no citotóxicos (Osorio et al. 2007). Destaca la CL₅₀ (>1000 µg/mL) del extracto metanólico de Bp el cual no fue tóxico para el ensayo con *A. salina* según Clarkson et al. 2004, además mostró una mayor viabilidad en comparación con los otros dos extractos.

Así mismo, el análisis fitoquímico de *B. pilosa* permitió identificar compuestos de naturaleza fenólicos, alcaloides, carbohidratos y proteínas, lo que concuerda con lo reportado en investigaciones anteriores donde se identifican estos mismos compuestos (Ajanaku et al. 2019). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la composición química de la planta puede variar según factores como las partes de la planta en cuestión, el momento de la recolección y la región

geográfica de donde se colectan (Wang et al. 2010). La fracción BPFC3MOH1 de *B. pilosa* se sometió a análisis mediante TLC y GC/MS, donde la separación más eficaz de sus componentes se logró al utilizar solventes metanólicos. Este análisis reveló perfiles cromatográficos con señales y tiempos de retención similares a los encontrados en investigaciones previas que detectaron estos compuestos en extractos metanólicos de las partes aéreas de *B. pilosa* (Wang et al. 2010; Ajanaku et al. 2019). Este estudio demuestra que la actividad biológica contra epimastigotes y tripomastigotes se atribuye a la presencia de 8 compuestos específicos en dicha fracción. Si bien, estudios previos informaron actividades antimicrobianas (ethyl-2-nonynoato) (Ba-Hamdan et al. 2014), antioxidantes (linalol) (Silva et al. 2016) y anti protozoarias (Ethyl citral) (García et al. 2010) de estos compuestos identificados, esta investigación es pionera en la exploración de actividad anti *T. cruzi*.

Los análisis comparativos de las actividades de extractos crudos y las fracciones de *B. pilosa* contra las cepas NL y B de *T. cruzi* mediante ANOVA unidireccional, no revelaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Estos resultados indican que ambas cepas, a pesar de provenir de diferentes linajes y regiones geográficas, comparten similitudes genómicas que las hacen susceptibles a los compuestos encontrados en el extracto crudo y fracciones de *B. pilosa* (Dost et al. 2002). La presencia de terpenos en las hojas de *B. pilosa*, incluidos compuestos como 2-furano metanol,5-etenil tetrahidro- $\alpha,\alpha,5$ -trimetil-, cis-(linalol), se ha informado su existencia en varias partes de la planta (Chokoe 2021). El linalol, por ejemplo, en un estudio previo, se identificó entre los 66 compuestos químicos en la fracción de hexano de la planta *Achillea wilhelmsii*, y demostró actividad frente a *Leishmania major* (Achakzai et al. 2019).

Los principales compuestos presentes en BPFC3MOH1 fueron 2-hidroxi-3-tilbenzaldehído (50.9%), prop-2-enoato de pentadecilo (22.1%) y linalol (15.1%). Otros compuestos menos abundantes incluyeron ácido 2-oninoico, éster etílico (9.3%), 3,7-dimetilnona-2,6-dienal (2.4%), 2-hidroxi-5-metilbenzaldehído (0.3%) y prop-2-enoato de dodecilo (0.1%). Es de suma importancia poner a prueba las actividades individuales de cada compuesto para determinar si el efecto anti-*T. cruzi* se debe al 2-hidroxi-3-metilbenzaldehído (el componente principal de la muestra), o como resultado de algún tipo de efecto sinérgico existente entre los 8 compuestos. En ambas cepas de *T. cruzi* los porcentajes de inhibición a diversas concentraciones para cada fracción y el extracto crudo no difirieron estadísticamente significativas. Este hallazgo reafirma el efecto

dosis-respuesta de las concentraciones, como se demostró previamente para los extractos de *B. pilosa*, que mostraron una actividad anti protozoaria significativa frente a *Leishmania amazonensis* (García et al. 2010), actividad antipalúdica (Ohashi et al. 2018) y anti-*T. brucei rhodesiense* de forma dosis dependiente (Mwaniki et al. 2017). Diversos estudios han informado sobre estos rangos de concentración, que a menudo oscilan entre 500 µg/mL y valores por encima de 1000 µg/mL contra diversos microorganismos. Los resultados actuales no clasifican estos compuestos como "buenos" o "malos" respecto a su actividad antiparasitaria, pero sí confirman los efectos citotóxicos bajos o nulos en comparación con otros extractos de plantas (Idris et al. 2023).

En cuanto a las evaluaciones de toxicidad utilizando *Artemia salina* y la línea celular Vero, los resultados de CC₅₀ superaron los 1000 µg/mL tanto para el extracto de Bp-mOH como para las 3 fracciones evaluadas (BPFC1CL1, BPFC2AE1 y BPFC3MOH1). Estos resultados indicaron que el extracto y las fracciones no eran tóxicos (Idris et al. 2023). Los estudios de toxicidad son fundamentales, ya que proporcionan información muy relevante sobre los posibles efectos nocivos en diferentes organismos y células. Cuando los resultados indican una citotoxicidad baja o nula, sirven como una guía valiosa para emprender hacia estudios más avanzados, incluidos aquellos que involucran modelos animales (Meyer et al. 1982; Hernández y Cañas 2006; Osorio et al. 2007).

El extracto Bp-mOH exhibió un IS de 3.15, mientras que la fracción BPFC3MOH1 mostró un IS aún mayor de 4.03. Un IS más alto sugiere que la fracción se dirigirá específicamente al parásito sin afectar a las células del hospedero, lo que reduciría la probabilidad de efectos adversos causados por el compuesto (Osorio et al. 2007; Valencia et al. 2011). En cuanto a las pruebas de actividad hemolítica con eritrocitos humanos, los resultados de extracto y fracciones de *B. pilosa* no evidenciaron hemólisis visual, manteniéndose los porcentajes de hemólisis por debajo del 10% en todas las concentraciones utilizadas en el experimento. Esto indica que estos extractos y fracciones no son hemolíticos (Martínez et al. 2013). En última instancia, se espera que este nuevo conocimiento se aplique a pacientes con enfermedad de Chagas en etapa aguda, ya que los daños en etapa crónica son irreversibles y particularmente en regiones donde la incidencia ha aumentado recientemente (Secretaría de Salud 2024), además, el seguimiento de experimentación *in vivo* en modelos murino comprobará si aquellas moléculas o compuestos identificados y probados en una

etapa *in vitro* tienen el potencial de ser alternativas terapéuticas o trabajar en conjunto con los antiparasitarios actuales (Pandey et al. 2002).

CONCLUSIÓN

Esta investigación resalta las propiedades anti-tripanosómicas de tres ejemplares de plantas, *A. mexicana*, *B. pilosa* y *C. boissieri*, donde se destacó la mayor actividad inhibitoria por parte de *B. pilosa* frente a dos estadios morfológicos de *T. cruzi*.

Los extractos acuosos y metanólicos derivados de las partes aéreas de *A. mexicana*, *B. pilosa* y *C. boissieri* demostraron efecto de inhibición *in vitro* frente a las formas epimastigote de *T. cruzi*.

La fracción metanólica (BPFC3MOH1) presentó la más alta inhibición frente a estadios de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, además, no presentó efecto citotóxico ni hemolítico.

Se identificaron 8 compuestos de la fracción BPFC3MOH1 de *B. pilosa* que exhibieron la mayor actividad tripanocidal.

REFERENCIAS

- Abdel EH, Ahmad AK, Kamal AM, Abdellatif MZM, Abdelgelil NH. 2015. *In vivo* antiprotozoan effects of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) extracts on experimentally infected mice with *Blastocystis* spp. *Parasitology Research*. 114(9), 3439–3444.
- Abdel EH, Ahmad AK, Kamal AM, Belal US, Mowafy NM. 2016. Anti-*Giardia lamblia* activity of ginger (*Zingiber officinale*) extract in an improved modified axenic culture. *Parasitologists United Journal*. 9(1), 7.
- Abdelrahman SH. 2011. Trypanocidal activity of some Sudanese medicinal plants against experimental *Trypanosoma evansi* infection. *Research Journal of Medicinal Plant*. 1-8.
- Achakzai JK, Anwar M, Kakar AM, Akhtar B, Akbar A, Kakar S, Panezai M. 2019. *In vitro* antileishmanial activity and GC-MS analysis of whole plant hexane fraction of *Achillea wilhelmsii* (WHFAW). *Journal of Chemistry*, 2019, 1-26.
- Acosta H, Burchmore R, Naula C, Gualdrón M, Quintero E, Cáceres AJ, Quiñones W. 2019. Proteomic analysis of glycosomes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Aguiar GP, Melo NI, Wakabayashi KA, Lopes MH, Mantovani AL, Dias HJ, Silva AA. 2013. Chemical composition and *in vitro* schistosomicidal activity of the essential oil from the flowers of *Bidens sulphurea* (Asteraceae). *Natural product research*. 27(10), 920-924.
- Ahmad R, Fatima A, Srivastava AN, Khan MA. 2017. Evaluation of apoptotic activity of *Withania coagulans* methanolic extract against human breast cancer and Vero cell lines. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 8(3), 177-183.
- Ahmed M, Fatima H, Qasim M, Gul B. 2017. Polarity directed optimization of phytochemical and *in vitro* biological potential of an indigenous folklore: *Quercus dilatata* Lindl. ex Royle. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 1-16.
- Ajanaku C, Echeme J, Mordi R, Bolade O, Okoye S, Jonathan H, Ejilude, O. 2019. *In-vitro* antibacterial, phytochemical, antimycobacterial activities and GC-MS analyses of *Bidens*

- pilosa* leaf extract. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2019, 721-725.
- Al Nasr IS, Koko WS, Khan TA, Elghazali GE. 2019. *In vitro* antitoxoplasmal activity of some medicinal plants. *Pharmacognosy Magazine*. 15(65), 568.
- Al-Adhroey AH, Nor ZM, Al-Mekhlafi HM, Mahmud R. 2010. Median lethal dose, antimalarial activity, phytochemical screening, and radical scavenging of methanolic *Languas galanga* rhizome extract. *Molecules*, 15(11), 8366-8376.
- al-Mamun M, Jahan N, Chowdhury MH, Jahan R, Nasrin D. 2010. Brine shrimp toxicity study of different Bangladeshi medicinal plants. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 4(2), 163-173.
- Al-Musayeib NM, Mothana RA, Al-Massarani S, Matheecussen A, Cos P, Maes L. 2012. Study of the *in vitro* antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of medicinal plants from Saudi Arabia. *Molecules*, 17(10), 11379-11390.
- Al-Musayeib NM, Mothana RA, Al-Massarani S, Matheecussen A, Cos P, Maes L. 2012. Study of the *in vitro* antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of medicinal plants from Saudi Arabia. *Molecules*. 17(10), 11379-11390.
- Alonso Y, del Toro G, Falcón JE, Valdés YC. 2005. Actividad hemolítica de la ortovainillina y la isovainillina sobre eritrocitos humanos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(1), 1-1.
- Ankli A, Heinrich M, Bork P, Wolfram L, Bauerfeind P, Brun R, Wasescha M. 2002. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of ethnopharmacology*. 79(1), 43-52.
- Apt W. 2017. Treatment of Chagas disease. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease*. Elsevier, pp. 751-771.
- Artun T, Karagoz A, Ozcan G, Melikoglu G, Anil S, Kultur S, Sutlupinar N. 2016. *In vitro* anticancer and cytotoxic activities of some plant extracts on HeLa and Vero cell lines. *Journal of the Balkan Union of Oncology*, 21(3), 720-725.
- Avery V. 2013. Ask the experts: drug discovery for the treatment of leishmaniasis, African sleeping sickness and Chagas disease. *Future Medicinal Chemistry*. 5(15), 1709–1718.

- Azeredo CM, Saraiva MF, de Oliveira MR, Barbosa G, de Almeida MV, de Souza MV, Soares MJ. 2020. The terpenic diamine GIB24 inhibits the growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and intracellular amastigotes, with proteomic analysis of drug-resistant epimastigotes. *Chemico-Biological Interactions*, 330, 109165.
- Ba-Hamdan AH, Aly MM, Bafeel SO. 2014. Antimicrobial activities and phytochemical analysis of the essential oil of *Ocimum basilicum*, collected from Jeddah Region, Saudi Arabia. *Journal of Microbiology Research*, 4(6), 1-9.
- Balciñde Y, Tirado S, Pérez C, Falero A, Martí E, Pineda M, Hung B. R. 2005. Cromatografía en capa delgada para la separación de los componentes del producto obtenido a partir de cera cruda de caña de azúcar. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 36.
- Beatty NL, Alcalá RF, Luque NA, Radetic M, Joshi-Guske P, Alakrad E, Hamer DH. 2023. Case Report: Chagas Disease in a Traveler Who Developed Esophageal Involvement Decades after Acute Infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 108(3), 543.
- Bermúdez J, Davies C, Simonazzi A, Real JP, Palma S. 2016. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta tropica*. 156, 1-16.
- Bern C, Montgomery SP. 2009. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 49(5), e52-e54.
- Bern C. 2015. Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*. 373(5), 456-466.
- Brener Z. 1997. *Trypanosoma cruzi*: morfología e ciclo evolutivo. *Clínica e terapéutica da doença de Chagas: urna abordagem prática para o clínico general*. pp. 25-31
- Calderón ÁI, Romero LI, Ortega E, Solís PN, Zacchino S, Gimenez A, Espinosa A. 2010. Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. *Pharmaceutical biology*. 48(5), 545-553.
- CDC (Centers for Disease Control and prevention). 2019. Antiparasitic treatment, [Online]. Disponible en: https://www.cdc.gov/parasites/chagas/health_professionals/tx.html

- Chagas C. 1909. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1(2), 159-218.
- Chakravarti I, Miranda M, Ruiz A, Briones C, Fernández EA, Villanueva CC, Gilman RH. 2022. Chagas disease in pregnant women from endemic regions attending the Hospital General de Mexico, Mexico City. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 7(1), 8.
- Chatelain E. 2015. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *Journal of biomolecular screening*. 20(1), 22-35.
- Chokoe PK. 2021. Integrative analysis of the epigenetic modification in a breast cancer cell line treated with a bioactive extract of *Bidens pilosa* [PhD Thesis]. Limpompo, South Africa; University of Limpompo, 124 p.
- Clarkson C, Maharaj VJ, Crouch NR, Grace OM, Pillay P, Matsabisa MG, Folb PI. 2004. *In vitro* antiparasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *Journal of ethnopharmacology*, 92(2-3), 177-191.
- Clegg JS. 1980. A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*. *The brine shrimp Artemia*, 2, 11-54.
- Contreras VT, De Lima AR, Zorrilla G. 1998. *Trypanosoma cruzi*: maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93, 753-760.
- Cordell GA. 2014. Phytochemistry and traditional medicine—the revolution continues. *Phytochemistry Letters*. 10, 28-11.
- Corti M, Villafañe MF. 2017. AIDS and Chagas' disease. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease*. Elsevier. pp. 731-749.
- Coura JR. 2015. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood, and oral transmissions-A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 110(3), 277-282.
- Croft S, Barrett M, Urbina J. 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 21(11), 508–512.

- da Silveira AC, Lazzarotto M. 2019. Evaluation of yerba mate fruit pulp total and fractioned soxhlet extraction using thermal analyses. In *Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: simpósio de análise térmica, 9. Pp 4.
- Dahab MM, Koko WS, Osman EE. 2011. *In vitro* antitrichomonal activity of *Xanthium brasiliicum vell* and *Argemone mexicana L* different extracts. *Australian Journal of Medical Herbalism*. 23(2), 88.
- de Gante CR, Rocha JA, Collins CP. 2018. Using native plants of the northeast of Mexico for developing active antimicrobial food packaging films. In *Active Antimicrobial Food Packaging*. IntechOpen: London, pp. 25-45.
- de Mecca MM, Fanelli SL, Bartel LC, de Castro CR, Díaz EG, Castro JA. 2007. Nifurtimox nitroreductase activity in different cellular fractions from male rat pancreas. Biochemical and ultrastructural alterations. *Life sciences*. 81(2), 144-152.
- de Souza W. 2019. Introductory Chapter: Biology of *Trypanosoma cruzi*. In *Biology of Trypanosoma cruzi*. IntechOpen: London, pp. 4-19.
- Días JC, Ramos JA, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai MA, Coura JR, Silveira AC. 2016. Brazilian consensus on Chagas disease, 2015. *Epidemiologia e servicos de saude: revista do Sistema Unico de Saude do Brasil*. 25, 7-86.
- Dipali O, Vilas A. 2013. Phytochemical screening of ethanolic extracts of stem, leaves, flower and seed kernel of *Mangifera indica L*. *Int J Pharm Bio Sci*, 4(2), 383-389.
- DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative). 2017. U.S. FDA approves Chemo Group's benznidazole to treat children with Chagas disease. Geneva, Switzerland, [Online]. Disponible en: <https://www.dndi.org/2017/media-centre/press-releases/fda-approves-benznidazole-chagas-children/>
- Dofuor AK, Djameh GI, Amoa M, Kwain S, Osei E, Tetevi GM, Ohashi M. 2022. *In vitro* effects and mechanisms of action of *Bidens pilosa* in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 12(3), 260-268.

- Dofuor AK, Djameh GI, Amoa-Bosompem M, Kwain S, Osei E, Tetevi GM, Ohashi M. 2022. *In vitro* effects and mechanisms of action of *Bidens pilosa* in *Trypanosoma brucei*. *Journal of traditional and complementary medicine*, 12(3), 260-268.
- Dost C, Albuquerque SD, Hemleben V, Engels W, Prado J. 2002. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. *Parasitology research*, 88, 609-616.
- Espinoza F, Rojas F, Zavala MG, Nava AH, Lozano F. 2022. Socioeconomic Determinants of Chagas Disease in an endemic zone in Western Mexico. *Advances in Preventive Medicine and Health Care*. 5, 1032.
- Fernández A, Mendiola J, Monzote L, García M, Sariego I, Acuña D, Gutiérrez Y. 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(3), 254-258.
- Flores FR, Reyes RM, Salgado H, Cornejo H. 2016. Eclosión de huevos de artemia (*Artemia franciscana*) a nivel de laboratorio en la Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. *La Calera*, 16(27), 81-85.
- Forsyth CJ, Hernandez S, Olmedo W, Abuhamidah A, Traina MI, Sanchez DR, Meymandi SK. 2016. Safety profile of nifurtimox for treatment of Chagas Disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 63(8), 1056–1062.
- Giordani F, Morrison LJ, Rowan TG, de Koning HP, Barrett MP. 2016. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology*. 143(14), 1862–1889.
- Goupil LS, McKerrow JH. 2014. Introduction: drug Discovery and development for neglected diseases. *Chemical Reviews*. 114(22), 11131–11137.
- Grunberg E, Beskid G, Cleeland R, DeLorenzo WF, Titsworth E, Scholer HJ, Brener Z. 1967. Antiprotozoan and antibacterial activity of 2-nitroimidazole derivatives. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 7, 513-519.
- Gutiérrez M, Droguet M. 2002. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Gutiérrez, MC; Droguet, M." La*

cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor". Boletín Intexter, juliol 2002, núm. 122, p. 35-41.

- Hamidi MR, Jovanova B, Panovska TK. 2014. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Maced pharm bull*, 60(1), 9-18.
- Hernández MR, Cañas JC. 2006. Citotoxicidad *in vitro*: sistema para la evaluación de biomateriales y equipos médicos implantables en Cuba. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 37(3), 173-176.
- Hoare CA. 1972. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. *The trypanosomes of mammals. A zoological monograph*. Oxford, pp. 27
- Horie T, Sugiyama Y, Awazu S, Hanano M. 1981. The correlation between drug binding to the human erythrocyte and its hemolytic activity. *Journal of pharmacobio-dynamics*, 4(2), 116-122.
- Idris OA, Kerebba N, Horn S, Maboeta MS, Pieters R. 2023. Phytochemical-based evidence of the health benefits of *Bidens pilosa* extracts and cytotoxicity. *Chemistry Africa*, 1-22.
- Izumi E, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Júnior VF, Nakamura CV. 2011. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Natural Product Reports*, 28(4), 809-823.
- Junior GZ, Massago M, Teston AP, Morey AT, Toledo MJ. 2017. Efficacy of some essential oils in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 16(6), 1307-1316.
- Kamaraj C, Kaushik NK, Rahuman AA, Mohanakrishnan D, Bagavan A, Elango G, Kirthi AV. 2012. Antimalarial activities of medicinal plants traditionally used in the villages of Dharmapuri regions of South India. *Journal of Ethnopharmacology*. 141(3), 796-802.
- Kennedy PG. 2013. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet Neurology*. 12(2), 186–194.
- Khan MG, Umama Y, Baskar H, Ayush K, Lakshman K, Sekar M. 2019. Ethnopharmacological Studies of *Argemone Mexicana* for the management of psoriasis followed by molecular

- techniques: focus on plant metabolomics & mechanism of action. *International Journal of Basic Sciences and Applied Computing*. 2(8), 1-5.
- Kratz JM, Garcia F, Forsyth CJ, Sosa S. 2018. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 11(10), 943-957.
- Krishnaraju AV, Rao TV, Sundararaju D, Vanisree M, Tsay HS, Subbaraju GV. 2005. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 3(2), 125-134.
- Kropf SP, Sá MR. 2009. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*. 16, 13-34.
- Lagarto A, Silva R, Guerra I, Iglesias L. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8(5):395-400
- Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. 2013. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet infectious diseases*. 13(4), 342-348.
- Lieke T, Steeg C, Graefe SE, Fleischer B, Jacobs T. 2006. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. *Clinical & Experimental Immunology*. 145(2), 357-364.
- Lima AA, Soares JL, Silva JL, Corrêa RA, Lyra MA, Santos FL, Rolim PJ. 2011. The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benznidazole solubility. *Journal of pharmaceutical sciences*. 100(6), 2443-2451.
- López R, Norman FF, Bern C. 2020. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. Elsevier, pp. 762-775.
- Lynn MK, Bossak BH, Sandifer PA, Watson A, Nolan MS. 2020. Contemporary autochthonous human Chagas disease in the USA. *Acta trópica*. 205, 105361.
- Maguire JH. 2006. Chagas' disease—can we stop the deaths? *New England Journal of Medicine*. 355(8), 760-761.

- Malagoli D. 2007. A full-length protocol to test hemolytic activity of palytoxin on human erythrocytes. *Invertebrate Survival Journal*, 4(2), 92-94.
- Martínez M, Mancuello C, Pereira C, González F, Prieto R, Rolón M, Benítez B. 2013. Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del extracto crudo de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler sobre eritrocitos humanos. *Steviana*, 5, 114-121.
- Mathew NS, Negi, P. S. 2019. Plant-derived compounds against protozoan neglected diseases: toward sustainable drug development. In *Discovery and Development of Therapeutics from Natural Products Against Neglected Tropical Diseases*. Elsevier, pp. 241-292.
- Maximiano FP, Costa GH, Souza JD, Cunha MS. 2010. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. *Química nova*. 33(8), 1714-1719.
- Mecca MM, Bartel LC, Castro CR, Castro JA. 2008. Benznidazole biotransformation in rat heart microsomal fraction without observable ultrastructural alterations: comparison to Nifurtimox-induced cardiac effects. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 103(6), 549-553.
- Mejía AM, Fernández GJ, Montilla M, Nicholls RS, Triana O. 2012. Estudio de la susceptibilidad al benznidazol de cepas *Trypanosoma cruzi* sugiere la circulación de cepas naturalmente resistentes en Colombia. *Biomédica*, 32(2), 1-31.
- Mena G, Caamal E, Cantillo Z, Cedillo R, Flores J, Moo R. 2009. *In vitro* cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 121(3), 462-465.
- Meva FE, Mbeng JO, Ebongue CO, Schlüsener C, Kökçam Ü, Ntumba AA, Tchoumbi E. 2019. *Stachytarpheta cayennensis* aqueous extract, a new bioreactor towards silver nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 10(02), 102.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, 45(05), 31-34.
- Misir J, Brishti FH, Hoque MM. 2014. *Aloe vera* gel as a novel edible coating for fresh fruits: A review. *American Journal of Food Science and Technology*. 2(3), 93-97.

- Molina GM, Said S. 2006. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline*, 3, 633-638.
- Molina I, Gómez J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Blanco A. 2014. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*. 370(20), 1899-1908.
- Molina I, Salvador F, Sánchez A. 2016. Actualización en enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 34(2), 132-138.
- Molina ZJ, Bazaldúa AF, Quintanilla R, Galaviz L. 2014. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. *Acta tropica*, 136, 14-18
- Muelas S, Nogal JJ, Gómez A. 2000. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, 86(12), 999-1002.
- Muñoz F. 2002. *Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado* (No. F01 MUÑ 17578). Mundi-prensa.
- Mwaniki LM, Mose JM, Mutwiri T, Mbithi JM. 2017. Evaluation of trypanocidal activity of *Bidens pilosa* and *Physalis peruviana* against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *American Journal of Laboratory Medicine*. 2(4), 69-73.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information) 2020. *Trypanosoma cruzi* NCBI: txid5693, [Online]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=5693>
- Ndjonka D, Rapado LN, Silber AM, Liebau E, Wrenger C. 2013. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(2), 3395–3439.
- Ntie F, Lifongo LL, Simoben CV, Babiaka SB, Sipp, W, Mbaze LM. 2014. The uniqueness and therapeutic value of natural products from West African medicinal plants, part II: terpenoids, geographical distribution and drug discovery. *The Royal Society of Chemistry advances*. 4(67), 35348-35370.

- Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. 2013. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*. 62(9), 767-776.
- Ohashi M, Amoa M, Kwofie KD, Agyapong J, Adegle R, Sakyiamah MM, Tung NH. 2018. *In vitro* antiprotozoan activity and mechanisms of action of selected *G. hanaian* medicinal plants against *Trypanosoma*, *Leishmania*, and *Plasmodium* parasites. *Phytotherapy Research*. 32(8), 1617-1630.
- Osorio E, Arango GJ, Jiménez N, Alzate F, Ruiz G, Gutiérrez D, Robledo S. 2007. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. *Journal of ethnopharmacology*, 111(3), 630-635.
- Owoyemi O, Oladunmoye MK. 2017. Phytochemical screening and antibacterial activities of *Bidens pilosa* L. and *Tridax procumbens* L. on skin pathogens. *International Journal of Modern Biology and Medicine*, 8, 24-46.
- Oza MJ, Kulkarni YA. 2017. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the medicinal species of the genus *Cordia* (Boraginaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(7), 755-789.
- PAHO (Pan American Health Organization) 2024. Chagas disease: Achievements in prevention, control, and healthcare of Chagas disease, by Subregion: [Online]. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es#gsc.tab=0
- PAHO (Pan American Health Organization. 2019. [Online]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=en
- Panda SK, Luyten W. 2018. Antiparasitic activity in Asteraceae with special attention to ethnobotanical use by the tribes of Odisha, India. *Parasite*. 25.
- Pandey RP, Nascimento MS, Franco CH, Bortoluci K, Silva MN, Zingales B, Cunha-Neto E. 2022. Drug Repurposing in Chagas Disease: chloroquine potentiates benznidazole activity

against *Trypanosoma cruzi* in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(11), e00284-22.

Peerzada MN, Gaur A, Azam A. 2021. Advances in drug discovery against neglected tropical diseases: human African and American trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*. 28(36), 7544-7582.

Pérez KC, Galaviz L, Iracheta JM, Lucero EA, Molina ZJ. 2017. Actividad contra *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de extractos metanólicos de plantas de uso medicinal en México. *Revista de Biología Tropical*, 65(4), 1459-1469.

Pizzolatti MG, Koga AH, Grisard EC, Steindel M. 2003. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine*, 10(5), 422-426.

Prayong P, Barusrux S, Weerapreeyakul N. 2008. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*, 79(7-8), 598-601.

Quintanilla R, Morado R, Gomez R, Laatsch H, Verde MJ, Hernández H, Rodríguez C. 2012. Bioassay-guided isolation and identification of cytotoxic compounds from *Gymnosperma glutinosum* leaves. *Molecules*, 17(9), 11229–11241.

Rajbhandari M, Mentel R, Jha PK, Chaudhary RP, Bhattarai S, Gewali MB, Lindequist U. 2009. Antiviral activity of some plants used in Nepalese traditional medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 6(4), 517–522.

Rajeh MA, Kwan YP, Zakaria Z, Latha LY, Jothy SL, Sasidharan S. 2012. Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. *Pharmacognosy Research*, 4(3), 170.

Rassi A, de Rezende JM, Luquetti AO, Rassi Jr A. 2010. Clinical phases and forms of Chagas disease. In *American Trypanosomiasis*. Elsevier, pp. 709-741

Rassi A, de Rezende JM. 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics*, 26(2), 275-291.

Rassi A, Dias JC, Marin JA. 2009. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart*. 95(7), 524-534.

- Rassi A, Marin JA. 2015. Chagas disease. In *Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean*. Springer, Vienna. pp. 45-71
- Rassi Jr A, Neto M, Antonio J, Rassi A. 2017. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 112(3), 224-235.
- Requena A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DA, Munoz J. 2015. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(2).
- Retana K, Ramírez JA, Castro O, Blanco M. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 115-126.
- Revathy S, Elumalai S, Antony MB. 2011. Isolation, purification and identification of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) by column chromatography. *Journal of Experimental sciences*, 2(7).
- Rodríguez JA. 2015. Manual de prácticas de bioquímica. Rodríguez Arzave (Ed.). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, pp 5-57.
- Rodríguez JJ, Rodríguez Á, Berzunza M, Gutiérrez G, Becker I, Sánchez V, Rebollar EA. 2017. Ecology of phlebotomine sandflies and putative reservoir hosts of leishmaniasis in a border area in Northeastern Mexico: implications for the risk of transmission of *Leishmania mexicana* in Mexico and the USA. *Parasite*, 24.
- Saki J, Khademvatan S, Pazyar N, Eskandari A, Tamoradi A, Nazari P. 2015. *In vitro* activity of *Cordia myxa* Mucilage extract against *Leishmania major* and *L. infantum* promastigotes. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(3).
- Salama A, Orozco O, Angel AC, Urrea S. X. 1999. Citotoxicidad, actividad antitumoral y análisis fitoquímico de *Cucumis dipsaaceus*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 28(1).

- Salazar R, Pozos ME, Cordero P, Perez J, Salinas MC, Waksman N. 2008. Determination of the antioxidant activity of plants from Northeast Mexico. *Pharmaceutical Biology*, 46(3), 166-170.
- Salem M, Werbovetz K. 2006. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*, 13(21), 2571–2598.
- Sánchez G, Figueroa A, Elizondo M, Wilson L, Novelo B, Valiente L, Ramsey JM. 2016. Cost-effectiveness of blood donation screening for *Trypanosoma cruzi* in Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004528.
- Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LG, Freire JM, Soares MJ. 2007. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitology*, 134(11).
- Sanz MG, De Sario V, García A, Nolder D, Dawood N, Álvarez MJ, Chiodini PL. 2020. Chagas disease in the United Kingdom: a review of cases at the hospital for Tropical Diseases London 1995–2018. The current state of detection of Chagas disease in the UK. *Travel medicine and infectious disease*, 36, 101760.
- Schmidt TJ, Khalid S A, Romanha AJ, Alves TM, Biavatti MW, Brun R, Tempone AG. 2012. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases-part II. *Current Medicinal Chemistry*, 19(14), 2128-2175.
- Schmunis GA, Yadon ZE. 2010. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta tropica*, 115(1-2), 14-21.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. 2006. The future of Chagas disease control. *Trends in parasitology*, 22(12), 583-588
- Secretaria de Salud. Boletín Epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información. 2024, pp 1-63 [Online]. Disponible en :<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/568960/sem31.pdf>
- Sherma J, Fried, B. 2003. *Handbook of thin-layer chromatography*. CRC press, 89.

- Silva SD, Blank DE, Peixoto CR, de Jesus J, Fernandes de Moura N. 2016. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Bunchosia glandulifera*. *International Journal of Food Properties*, 19(2), 467-473.
- Simoben CV, Ntie F, Akone SH, Sippl W. 2018. Compounds from African medicinal plants with activities against selected parasitic diseases: schistosomiasis, trypanosomiasis and leishmaniasis. *Natural products and bioprospecting*, 8(3), 151-169.
- Simoben CV, Ntie F, Lifongo LL, Babiaka SB, Sippl W, Mbaze LM. 2014. The uniqueness and therapeutic value of natural products from West African medicinal plants, part III: least abundant compound classes. *RSC advances*, 4(75), 40095-40110.
- Simoës C, Hostettmann K, Haouala A, Cuendet M, Falquet J, Graz B, Christen P. 2014. Reverse pharmacology for developing an anti-malarial phytomedicine. The example of *Argemone mexicana*. *International Journal for parasitology: Drugs and Drug resistance*, 4(3), 338-346.
- Souza JM, Candido AC, Pagotti MC. 2019. *In vitro* evaluation of the leishmanicidal potential of selected plant-derived extracts against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Int J Complement Alt Med*, 12(1), 36-41.
- Stanaway JD, Roth G. 2015. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. *Global Heart*, 10(3), 139-144.
- Tietjen I, Ntie F, Mwimanzi P, Onguéné PA, Scull MA, Idowu TO, Andrae K. 2015. Screening of the pan-African Natural Product Library identifies ixoratannin A-2 and boldine as novel HIV-1 inhibitors. *PLoS One*, 10(4).
- Tobinaga S, Sharma MK, Aalbersberg WG, Watanabe K, Iguchi K, Narui K, Waki S. 2009. Isolation and identification of a potent antimalarial and antibacterial polyacetylene from *Bidens pilosa*. *Planta médica*, 75(06), 624-628.
- Torrìco F, Gascon J, Ribeiro I. 2013. E1224—Results of proof of concept clinical trial in patients with chronic indeterminate Chagas disease. In *Proceedings of the 62nd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*.

- Urbina JA, Docampo R. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in parasitology*, 19(11), 495-501.
- Urbina JA. 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica*. 115, 55-68.
- Valencia L, Muñoz DL, Robledo SM, Echeverri F, Arango GJ, Vélez ID, Triana O. 2011. Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. *Biomédica*, 31(4), 552-559.
- Vieira NC, Espíndola LS, Santana JM, Veras ML, Pessoa OD, Pinheiro SM, Silveira ER. 2008. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(4), 1676-1682.
- Vieira NC, Espíndola LS, Santana JM, Veras ML, Pessoa OD, Pinheiro SM, Silveira ER. 2008. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(4), 1676-1682.
- Wang R, Wu QX, Shi YP. 2010. Polyacetylenes and flavonoids from the aerial parts of *Bidens pilosa*. *Planta Medica*, 76(09), 893-896.
- Weiss LM, Tanowitz HB, Kirchhoff L. V. (Eds.). 2010. *Advances in Parasitology: Chagas Disease, Part A*. Academic Press.
- WHO (World Health Organization). 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases, (En línea). Disponible en: https://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/
- WHO (World Health Organization). 2019. (En línea). Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- WHO (World Health Organization). 2020. Chagas disease (American trypanosomiasis). What is Chagas disease?, (En línea). Disponible en: <https://www.who.int/chagas/disease/en/>
- WHO (World Health Organization). 2020. Treatment of Chagas disease, (En línea). Disponible en: https://www.who.int/chagas/disease/home_treatment/en/

- Xu H, Lin J, Liu Q, Chen Y, Zhang J, Yang Y, Mo F. 2022. High-throughput discovery of chemical structure-polarity relationships combining automation and machine learning techniques. *arXiv preprint arXiv:2202.05962*.
- Zingales B, Miles MA, Campbell, D.A. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 2, 240-25
- Zingales B. 2018. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184, 38-52.
- Zohra M, Fawzia A. 2014. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. *Int J Pharm Sci Res*, 5(8), 495-500.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Gabriel Enrique Cázares Jaramillo

Candidato para el grado de:

Doctorado en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: EVALUACIÓN TRIPANOCIDAL DE EXTRACTOS DE *Argemone mexicana*, *Bidens pilosa* Y *Cordia boissieri* CONTRA *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)

Campo de estudio: Microbiología, Parasitología

Datos personales: Nacido el 28 de mayo de 1994 en la Ciudad de Chihuahua, Chih, hijo de Luis Enrique Cázares Orozco y Etel Jaramillo Torres

Educación: egresado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, obteniendo el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2017. Obtención de grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2020.

Experiencia profesional: Auxiliar en la Brigada de Cuidado y Protección Ambiental en conjunto con el antirrábico de la ciudad de Chihuahua en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), en el periodo febrero-agosto 2016. Ayudante en el Laboratorio de Microbiología 2 de la Facultad de Ciencias Químicas en la UACH. Responsable de cepario microbiológico del Laboratorio de Microbiología 1 y 2 en la misma institución, dentro de los periodos agosto 2016- agosto 2017. Auxiliar en el Departamento de Manejo de Producto en la Planta Sigma Alimentos en la Ciudad de Chihuahua en el periodo de septiembre-diciembre 2017. Auxiliar académico y apoyo en investigación del Laboratorio de Patología molecular y experimental de 2018 a 2023. Químico analista en ALFA laboratorios de dic 2020 a dic 2021. Químico analista en clínica MEDICAD de ene 2022 a jun 2022. Profesor de asignatura en la Universidad del Valle de México en el cuerpo académico de Ciencias de la Salud de agosto 2022 a la fecha. Profesor de asignatura en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León de ene 2024 a la fecha.

PUBLICACIÓN

Korean Journal of Parasitology



대한기생충학·열대의학회

The Korean Society for Parasitology and Tropical Medicine

In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of methanolic extract of *Bidens pilosa* and identification of their active compounds by gas chromatography-mass spectrometry analysis

Journal:	<i>Parasites, Hosts and Diseases</i>
Manuscript ID	23-069-OA.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	24-Jul-2023
Complete List of Authors:	Cázares-Jaramillo, Gabriel; Universidad Autonoma de Nuevo Leon Facultad de Ciencias Biologicas, Laboratorio de Patología Molecular y Experimental Molina-Garza, Zinnia; Universidad Autonoma de Nuevo Leon Facultad de Ciencias Biologicas, Laboratorio de Patología Molecular y Experimental Luna-Cruz, Itza; Universidad Autonoma de Nuevo Leon Facultad de Ciencias Biologicas, Inmunología Solis-Soto, Luisa; Universidad Autonoma de Nuevo Leon Facultad de Ciencias Biologicas, Microbiología Rosales-Encina, José; CINVESTAV, Infectómica y Patogénesis Molecular Galaviz-Silva, Lucio; Universidad Autonoma de Nuevo Leon Facultad de Ciencias Biologicas, Laboratorio de Patología Molecular y Experimental