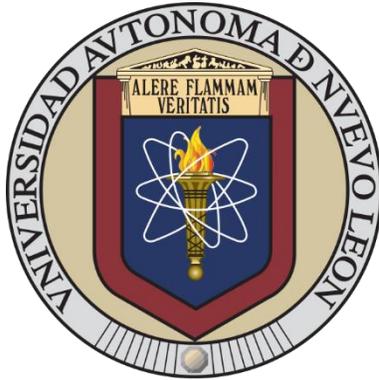


RC-07AC-025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFEECTO ANTIPARASITARIO DE *AGAVE LECHUGUILLA*, *BUDDLEJA SCORDIOIDES* Y *PERSEA AMERICANA* SOBRE CEPAS DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* (DONNÉ 1836-1837) RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE A METRONIDAZOL

POR

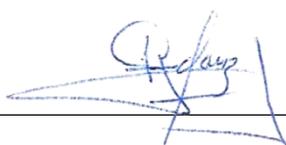
VIVIANA MARTÍNEZ PLASCENCIA

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

2024

EFFECTO ANTIPARASITARIO DE *AGAVE*  
*LECHUGUILLA*, *BUDDLEJA SCORDIOIDES* Y *PERSEA*  
*AMERICANA* SOBRE CEPAS DE *TRICHOMONAS*  
*VAGINALIS* (DONNÉ 1836-1837) RESISTENTE Y  
SUSCEPTIBLE A METRONIDAZOL

**Comité de Tesis**



---

Dr. Lucio Galaviz Silva  
Director



---

Dra. Itza Eloisa Luna Cruz  
Secretaria



---

Dra. Luisa Yolanda Solís-  
Soto Vocal



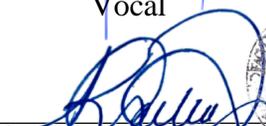
---

Dr. Aldo Fabio Bazaldúa Rodríguez  
Vocal



---

Dr. José Ángel Merino Mascorro  
Vocal



---

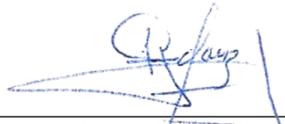
Dra. Katiushka Arévalo Niño  
Subdirectora de posgrado



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

EFFECTO ANTIPARASITARIO DE *AGAVE*  
*LECHUGUILLA, BUDDLEJA SCORDIOIDES Y PERSEA*  
*AMERICANA* SOBRE CEPAS DE *TRICHOMONAS*  
*VAGINALIS* (DONNÉ 1836-1837) RESISTENTE Y  
SUSCEPTIBLE A METRONIDAZOL

**Dirección de Tesis**



---

Dr. Lucio Galaviz-Silva  
Director



---

Dra. Magda Elizabeth Hernández-  
García Directora externa

## AVISO DERCHOS 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 videos, 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 al autor o autores.

### Financiamiento

Este trabajo fue financiado por:

- El Programa de Apoyo a la Ciencia, Tecnología e Innovación ProACTI 2023. No. 80-CA-2023.
- El Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) 2022. No. 179-CAT-2022.

## **LUGAR DE TRABAJO**

- Laboratorio de Patología Molecular y Experimental, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
- Laboratorio de Fitoquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
- Laboratorio de Parasitología y Farmacognosia-CIBIN, Instituto Mexicano del Seguro Social.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada, la cual me permitió sustentar mi estancia durante mis estudios de posgrado.

Agradezco también a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Laboratorio de Patología Molecular y Experimental de la Facultad de Ciencias Biológicas-UANL, en especial, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los doctores Zinnia y Lucio por su gran apoyo, comprensión y palabras de aliento que me motivaron en los momentos difíciles. Su dedicación y apoyo marcaron una gran diferencia para mí durante esta etapa.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de LPME: Ana Karen, Ana Cristina, Karen, Rubí, Jorge y Gabriel, les agradezco por recibirme como parte del grupo, por su amistad, consejos y apoyo a lo largo de esta etapa.

También agradezco a mis compañeras y amigas de maestría: Alicia, Karen y Lizbeth, por su amistad y por motivarnos mutuamente para superar los desafíos que surgieron durante nuestros estudios de posgrado y acompañarnos durante todo este proceso.

A mis compañeros del laboratorio de Fitoquímica: Nancy y en especial a Ángel, por sus consejos y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A los Doctores José Ángel Merino, Luisa Yolanda Solís e Itza Eloisa Luna, por sus valiosas observaciones y recomendaciones.

Al laboratorio de Fitoquímica-UANL y al Laboratorio de Parasitología y Farmacognosia del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS.

## DEDICATORIAS

A mis padres por su incondicional apoyo y sacrificio, los cuales han sido fundamentales en cada etapa de mi vida. Gracias por creer en mí, por sus sabios consejos y por darme el ánimo y la fortaleza necesarios para superar los desafíos.

A mis hermanas por su constante presencia y aliento desde la distancia, que me han ayudado a superar cada obstáculo.

A toda mi familia por estar siempre pendientes de mí, por alegrarse de mis éxitos y por brindarme su apoyo cada vez que lo he necesitado.

A mi prometido por acompañarme y estar conmigo en todo momento a lo largo de esta etapa, brindándome soporte y apoyo. Gracias por tus consejos y por ser mi compañero incondicional.

En memoria de “Abuelito Carlos”, cuya presencia iluminó nuestras vidas y cuyo recuerdo vivirá eternamente en nuestros corazones. Que en paz descanse.

*"Las formas de vida se multiplicaron e hicieron más complejas asociándose a otras, no matándose (...) la vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite triunfar a los que se asocian." - Lynn Margulis.*

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES .....	3
2.1	Características biológicas de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	3
2.1.1	Clasificación taxonómica.....	3
2.1.2	Morfología .....	3
2.1.3	Ciclo biológico.....	4
2.1.4	Epidemiología.....	5
2.2	Manifestaciones clínicas .....	5
2.2.1	Mujeres.....	6
2.2.2	Hombres .....	6
2.2.3	Tratamiento .....	6
2.2.3.1	Metronidazol .....	7
2.2.3.2	Mecanismo de acción del metronidazol.....	8
2.2.3.3	Resistencia al metronidazol.....	9
2.2.3.4	Resistencia anaeróbica: .....	9
2.2.3.5	Resistencia aeróbica:.....	9
2.2.3.6	Efectos secundarios.....	10
2.3	Plantas medicinales para tratamiento.....	10
2.3.1	<i>Agave lechuguilla</i> Torr, <i>Asparagaceae</i> .....	11
2.3.1.1	Clasificación taxonómica.....	11
2.3.1.2	Actividad bactericida .....	12
2.3.1.3	Actividad antifúngica.....	12
2.3.2	<i>Buddleja scordioides</i> Kunth .....	13
2.3.2.1	Clasificación taxonómica.....	13
2.3.2.2	Actividad antiparasitaria .....	14
2.3.3	<i>Persea americana</i> Mill.....	15

2.3.4	<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> .....	16
2.3.4.1	Clasificación taxonómica: .....	16
2.3.4.2	Actividad antiparasitaria .....	17
2.3.4.3	Actividad antibacteriana.....	17
3.	JUSTIFICACIÓN .....	18
4.	HIPÓTESIS .....	19
5.	OBJETIVOS .....	20
5.1	Objetivo General .....	20
5.2	Objetivos Particulares .....	20
6.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	21
6.1	Elaboración de extractos .....	21
6.1.1	Colecta del material vegetal .....	21
6.1.2	Preparación del material vegetal .....	22
6.1.3	Extracción del material vegetal .....	22
6.2	Aislamiento biodirigido .....	23
6.2.1	Partición mediante la técnica de extracción líquido-líquido de extractos con mayor actividad tricomonocida empleando solventes por orden de polaridad ascendente.....	23
6.2.2	Fraccionamiento por columna en sílica gel.....	24
6.2.3	Columna 1: Partición de hexano .....	25
6.2.4	Columna 2: Partición de acetato de etilo.....	25
6.2.5	Cromatografía en capa fina (CCF).....	27
6.2.6	Pruebas fitoquímicas cualitativas.....	27
6.3	Ensayo biológico.....	28
6.3.1	Material biológico .....	28
6.3.2	Preparación del medio TYI-S-33 .....	29

6.3.3	Mantenimiento del cultivo .....	29
6.3.4	Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad tricomonocida de los extractos metanólicos elaborados a partir de <i>A. lechuguilla</i> , <i>B. scordioides</i> y <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> 30	
6.3.5	Determinación de la CI <sub>50</sub> .....	31
6.3.6	Evaluación de las concentraciones citotóxicas al 50% (CC <sub>50</sub> ) sobre la línea celular Vero .....	31
6.3.7	Determinación del índice de selectividad (IS) .....	33
6.4	Análisis estadístico.....	33
7.	RESULTADOS .....	34
7.1	Objetivo 1: Obtener los extractos metanólicos de <i>Agave lechuguilla</i> , <i>Buddleja scordioides</i> y <i>Persea americana</i> , seleccionar los de mayor actividad inhibitoria en la cepa susceptible de <i>T. vaginalis</i> y evaluar su efectividad en la cepa resistente a metronidazol.....	34
7.1.1	Porcentaje de rendimiento de los extractos crudos metanólicos.....	34
7.1.2	Actividad tricomonocida de los extractos metanólicos crudos de <i>A. lechuguilla</i> , <i>B. scordioides</i> y <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> .....	34
7.2	Objetivo 2: Determinar la concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) de los extractos con mayor porcentaje de inhibición en la cepa susceptible, y posteriormente calcular la CI <sub>50</sub> de estos en la cepa resistente a metronidazol. ....	35
7.3	Objetivo 3: Fraccionar mediante técnicas cromatográficas los extractos que muestren la mayor actividad inhibitoria contra <i>T. vaginalis</i> susceptible y evaluar su efectividad en la cepa resistente a metronidazol. ....	36
7.3.1	Determinación de los porcentajes de rendimiento de las particiones obtenidas del extracto de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> .....	36
7.3.2	Evaluación de las particiones obtenidas de los extractos con mayor actividad tricomonocida .....	36

7.3.3	Evaluación de las fracciones obtenidas de las particiones de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> que presentaron mayor actividad tricomonocida .....	37
7.3.3.1	Columna 1 .....	38
7.3.3.2	Columna 2 .....	39
7.3.3.3	Fracciones colectivas .....	39
7.3.4	Determinación de los porcentajes de rendimiento de las fracciones obtenidas de las particiones de hexano y acetato de etilo de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> .....	40
7.3.5	Evaluación de las fracciones colectivas hexánicas y de acetato de etilo de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> .....	40
7.4	Objetivo 4: Determinar la CI <sub>50</sub> de las particiones y fracciones con mayor porcentaje de inhibición en la cepa susceptible, y posteriormente calcular la CI <sub>50</sub> de estas en la cepa resistente a metronidazol. ....	42
7.4.1	Determinación de la CI <sub>50</sub> de las particiones obtenidas del extracto metanólico crudo de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> que presentaron la mayor actividad tricomonocida .....	42
7.4.2	Determinación de la CI <sub>50</sub> de las fracciones obtenidas de las particiones de hexano y acetato de etilo de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> que presentaron la mayor actividad tricomonocida.....	43
7.5	Objetivo 5: Determinar la actividad citotóxica de las fracciones que presenten la mayor actividad inhibitoria contra la cepa de <i>T. vaginalis</i> susceptible y resistente a metronidazol en la línea celular Vero. ....	43
7.6	Objetivo 6: Caracterizar parcialmente la composición química de las fracciones con mayor actividad inhibitoria contra la cepa susceptible y resistente a metronidazol mediante pruebas fitoquímicas. ....	46
7.6.1	Caracterización Fitoquímica de la fracción colectiva cuatro obtenida de la partición de hexano (FC4HX).....	46
7.6.2	Caracterización Fitoquímica de la fracción colectiva cuatro obtenida de la partición de acetato de etilo (FC4AE) .....	46
8.	DISCUSIÓN .....	48

9. CONCLUSIONES.....	52
10. PERSPECTIVAS .....	53
11. BIBLIOGRAFÍA .....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Colecta de material vegetal en el estado de Nuevo León.....	21
Tabla 2. Sistema de elución utilizado en las cromatografías en las columnas de gel de sílice. ....	26
Tabla 3. Descripción de las pruebas fitoquímicas. ....	28
Tabla 4. Rendimiento de los extractos metanólicos obtenidos. ....	34
Tabla 5. CI <sub>50</sub> de los extractos metanólicos crudos para la cepa susceptible y resistente a MTZ. ....	36
Tabla 6. Inhibición (%) y rendimiento de las particiones obtenidas de los extractos crudos metanólicos <i>B. scordioides</i> y <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> contra <i>T. vaginalis</i> susceptible y resistente a metronidazol.....	37
Tabla 7. Actividad tricomonocida y rendimientos de las fracciones colectivas obtenidas de las particiones de hexano y acetato de etilo obtenidas de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> contra <i>T. vaginalis</i> susceptible y resistente a metronidazol. ....	41
Tabla 8. CI <sub>50</sub> de las particiones obtenidas a partir del extracto crudo de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> contra <i>T. vaginalis</i> susceptible y resistente a metronidazol.....	42
Tabla 9. CI <sub>50</sub> de las fracciones colectivas obtenidas de las particiones de hexano y acetato de etilo contra <i>T. vaginalis</i> susceptible y resistente a metronidazol. ....	43
Tabla 10. Concentración citotóxica media (CC <sub>50</sub> ) e índice de selectividad (IS) de las fracciones colectivas: FC4HX y FC4AE en línea celular Vero. ....	45
Tabla 11. Análisis fitoquímico de las fracciones con mayor actividad tricomonocida. ....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Trofozoíto de <i>T. vaginalis</i> .....	4
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	5
Figura 3. Estructura química de los nitroimidazoles.....	7
Figura 4. Esquema general de la vía de activación del fármaco MTZ.....	8
Figura 5. <i>Agave lechuguilla</i> Torr.....	12
Figura 6. Planta silvestre de <i>Buddleja scordioides</i> Kunth. ....	14
Figura 7. Diversos frutos de <i>P. americana</i> Mill. var. <i>drymifolia</i> de Aramberri y General Zaragoza, Nuevo León, México.....	15
Figura 8. Imágenes de las plantas evaluadas.....	21
Figura 9. Proceso de secado y triturado del material vegetal.....	22
Figura 10. Imagen del proceso de extracción líquido-líquido.....	24
Figura 11. Cromatografía en columna en fase normal sílica gel.....	25
Figura 12. Cultivo de trofozoítos de <i>T. vaginalis</i> observados bajo un microscopio invertido (10x).....	29
Figura 13. Trofozoítos de <i>T. vaginalis</i> observados mediante un microscopio óptico analizados en cámara de Neubauer. ....	30
Figura 14. Análisis de la viabilidad y confluencia del cultivo de la línea celular Vero..	32
Figura 15. Actividad biológica de los extractos crudos metanólicos contra cepas de <i>T. vaginalis</i> .....	35
Figura 16. CCF de las fracciones columna 1. ....	38
Figura 17. CCF de las fracciones columna 2.. ....	39
Figura 18. CCF de las fracciones colectivas.. ....	39
Figura 19. Evaluación de la actividad citotóxica sobre células Vero utilizando el método de MTT.....	44
Figura 20. Viabilidad celular de la línea celular Vero. ....	45
Figura 21. Resultado de las pruebas fitoquímicas de FC4HX. ....	47
Figura 22. Resultado de las pruebas fitoquímicas de FC4AE.....	47

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación para determinar rendimientos porcentuales.....	23
Ecuación 2. Ecuación para determinación de factor de retención. ....	27
Ecuación 3. Fórmula para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento celular. .	32
Ecuación 4. Fórmula para calcular el índice de selectividad. ....	33

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Porcentaje
<	Menor que
>	Mayor que
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromoles
ADN	Ácido desoxirribonucleico
°C	Grados centígrados
CC <sub>50</sub>	Concentración citotóxica media
CCF	Cromatografía en capa fina
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EE. UU	Estados Unidos
FC	Fracción colectiva
FCAE	Fracción colectiva de acetato de etilo
FCHX	Fracción colectiva de hexano
Fdx	Ferredoxina
g	Gramos
h	Hora
IS	índice de selectividad
ITS	Infección de transmisión sexual
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio

MTZ	Metronidazol
nm	Nanómetros
NTR	Nitrorreductasa
OMS	Organización mundial de la salud
PAE	Partición de acetato de etilo
PHX	Partición de hexano
POH	Partición hidroalcohólica
PROF	Ferredoxina oxidorreductasa
R <sub>f</sub>	Factor de retención
SINAVE	Sistema Nacional De Vigilancia Epidemiológica
SOD	Superóxido dismutasa
TrxP	Tiorredoxina peroxidasa
TrxR	Tiorredoxina reductasa
TV-R-MTZ	<i>T. vaginalis</i> resistente a metronidazol
TV-S-MTZ	<i>T. vaginalis</i> susceptible a metronidazol
TYI	Medio Trypticasa, extracto de levadura
TYI-S-33	Medio Trypticasa, extracto de levadura y suero-hierro.
UV	Luz ultravioleta

## RESUMEN

*Trichomonas vaginalis* es un parásito protozoario causante de la tricomoniasis, la infección de transmisión sexual no viral más común en todo el mundo (Bouchemal et al. 2017). En 2020, la OMS reportó 156 millones de casos de tricomoniasis a nivel mundial (OMS 2020), y en 2024, el SINAVE reportó 7,344 de casos en México en los primeros meses del año (Boletín Epidemiológico 2024). Los nitroimidazoles, como el metronidazol (MTZ), son los únicos fármacos aprobados por la FDA y el CDC para el tratamiento de la tricomoniasis; sin embargo, estos pueden causar efectos secundarios significativos en la salud de los usuarios. Por otra parte, el incremento de cepas resistentes a estos fármacos ha incrementado significativamente en los últimos años. El uso de productos naturales ofrece una alternativa para la búsqueda y desarrollo de fármacos efectivos contra *T. vaginalis*. En la presente investigación fue evaluada la actividad tricomonocida de tres extractos de plantas recolectadas en el estado de Nuevo León: *A. lechuguilla*, *B. scordioides* y *P. americana*, en dos cepas de *T. vaginalis*: una resistente y otra susceptible al MTZ. Para lo cual, se generaron los extractos metanólicos crudos de las plantas y se evaluó su porcentaje de inhibición medio, posteriormente, se seleccionaron las plantas que presentaron mayor porcentaje de inhibición frente a la cepa susceptible y se evaluaron contra la cepa resistente. Una vez que fue identificada la planta que presentó el mayor porcentaje de inhibición se prosiguió con el aislamiento biodirigido mediante las estrategias de separación por extracción líquido-líquido y la técnica de cromatografía en columna. Los extractos metanólicos crudos de *B. scordioides* y *P. americana* var. *drymifolia* presentaron la mayor actividad tricomonocida contra la cepa de TV-S-MTZ, de estos, *P. americana* var. *drymifolia* fue la planta que exhibió mayor actividad biológica contra la cepa TV-R-MTZ, al ser fraccionada las particiones que presentaron mayor bioactividad fueron la partición de hexano y acetato de etilo. Estas particiones fueron seleccionadas para ser fraccionadas mediante la técnica de cromatografía en columna obteniendo seis fracciones colectivas (FC) de acetato de etilo y ocho FC de hexano, de las cuales las fracciones colectivas cuatro de hexano y acetato (FC4AE y FC4HX) fueron las que presentaron la mayor actividad contra la cepa susceptible y la resistente a metronidazol.

## ABSTRACT

*Trichomonas vaginalis* is a protozoan parasite that causes trichomoniasis, the most common non-viral sexually transmitted infection worldwide (Bouchemal et al. 2017). In 2020, the WHO reported 156 million cases of trichomoniasis worldwide (WHO 2020), and in 2024, SINAVE reported 7,344 cases in Mexico in the first months of the year (Boletín Epidemiológico 2024). Nitroimidazoles, such as metronidazole (MTZ), are the only drugs approved by the FDA and CDC for the treatment of trichomoniasis; however, these can cause significant side effects on the health of users. In addition, the number of strains that are resistant to these drugs has increased significantly in recent years. The use of natural products offers an alternative for the search and development of effective drugs against *T. vaginalis*. In the present study, the trichomonocidal activity of three plant extracts from the state of Nuevo León was investigated: *A. lechuguilla*, *B. scordioides* and *P. americana*, was evaluated in two strains of *T. vaginalis*: one was resistant and the other susceptible to MTZ. For this purpose, crude methanolic extracts of the plants were prepared and their mean percentage of inhibition was evaluated. Subsequently, the plants with the highest percentage of inhibition against the susceptible strain were selected and evaluated against the resistant strain. Once the plant with the highest percentage of inhibition was identified, biodirected isolation was continued by liquid-liquid extraction and column chromatographic separation strategies. The methanolic crude extracts of *B. scordioides* and *P. americana* var. *drymifolia* exhibited the highest trichomonocidal activity against the TV-S-MTZ strain, of these, *P. americana* var. *drymifolia* was the plant that exhibited the highest biological activity against the TV-R-MTZ strain, when fractionated the partitions that presented the highest bioactivity were the hexane and ethyl acetate partition. These partitions were selected to be fractionated using column chromatography technique. Six collective fractions (FC) of ethyl acetate and eight FC of hexane were obtained, of which the four collective fractions of hexane and acetate (FC4AE and FC4HX) showed the highest activity against the susceptible and metronidazole-resistant strains.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Trichomonas vaginalis* es un parásito protozoario extracelular flagelado que causa la infección de transmisión sexual (ITS) denominada tricomoniasis. La infección se propaga al colonizar el epitelio escamoso del tracto urogenital inferior de los seres humanos, que incluye la vagina, el exocérnix, la uretra y la próstata. Se transmite principalmente a través del contacto sexual, siendo una de las ITS no virales de mayor prevalencia en el mundo (Aquino et al. 2020). La tricomoniasis se encuentra asociada a diversas complicaciones de salud sexual y reproductiva en mujeres y hombres, incluyendo: la enfermedad pélvico-inflamatoria (EPI), complicaciones en el embarazo, cáncer de cuello uterino, prostatitis e infertilidad (Mabaso y Abbai 2021) debido al proceso inflamatorio y daño al epitelio escamoso que ocasiona *T. vaginalis* al adherirse a las paredes del aparato urogenital.

En el año 2020 la Organización mundial de la salud (OMS) reportó un total de 156 millones de casos de tricomoniasis a nivel mundial en individuos cuyos rangos de edad oscilaban entre 15 a 49 años, presentándose 73.3 millones de casos en mujeres y 82.6 millones en hombres (WHO 2023). Por otra parte, datos proporcionados por el Sistema Nacional De Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) reportan un total de 7,344 casos de tricomoniasis urogenital hasta los primeros meses del 2024 (Boletín Epidemiológico 2024).

El tratamiento primario para la tricomoniasis se limita al uso de nitroimidazoles, siendo el metronidazol uno de los pocos fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA). Sin embargo, desde 1962 se han documentado casos de *T. vaginalis* resistentes al metronidazol (TV-R-MTZ), y en la actualidad se ha observado un aumento significativo en los casos de resistencia y fracaso del tratamiento (Marques-Silva et al. 2021). Del mismo modo, el uso de este fármaco ocasiona efectos secundarios adversos como náuseas, vómitos, diarrea, calambres abdominales, anorexia, hipersensibilidad, sabor metálico, neuropatías (periférica, óptica y autonómica), convulsiones, encefalopatía y toxicidad cerebelosa (Lala et al. 2021).

El metronidazol (MTZ) fue introducido como tratamiento por primera vez en 1959 y para el año 1962 se generó el primer reporte de resistencia in vitro en *T. vaginalis*. Esta resistencia está asociada a la resistencia cruzada con otros fármacos pertenecientes a la

familia de los 5-nitroimidazoles. La resistencia por parte de este parásito es motivo de gran preocupación debido a que los tratamientos alternativos existentes son limitados (Graves et al. 2020).

Ante esta problemática los productos naturales se pronuncian como una fuente alternativa de compuestos bioactivos para la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos más efectivos y con nula o menor cantidad de efectos secundarios (Hashemi et al. 2021).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Características biológicas de *Trichomonas vaginalis*

#### 2.1.1 Clasificación taxonómica

Clasificación taxonómica tomada de: Aquino et al. 2020.

Reino: Protozoa

Filo: Parabasalia

Clase: Trichomonadea

Orden: Trichomonadida

Familia: Trichomonadidae

Género: *Trichomonas*

Especie: *T. vaginalis*

#### 2.1.2 Morfología

*Trichomonas vaginalis* es un protozoo flagelado anaeróbico/microaerófilo que actúa como agente causal de la ITS conocida como tricomoniasis (Leitsch 2021). Este parásito presenta una forma ovoide cuando se cultiva en condiciones axénicas. Sin embargo, experimenta una transformación a una forma ameboide al adherirse a las superficies de las células epiteliales del huésped (Wanderley de Souza 2022). Dentro de su ciclo biológico, se encuentra exclusivamente en estadio de trofozoíto, con una morfología piriforme, su longitud promedio es de 10  $\mu\text{m}$  por 7  $\mu\text{m}$  de ancho. Posee cuatro flagelos anteriores que le confieren una motilidad espasmódica, mientras que el flagelo posterior da forma al borde externo de la membrana ondulada que recorre el cuerpo de la célula (Figura 1), proporcionándole movilidad (Edwards et al. 2016). La cromatina nuclear se distribuye uniformemente, presenta axostilo, así como una gran cantidad de hidrogenosomas (Sulyman y Kadir 2021).

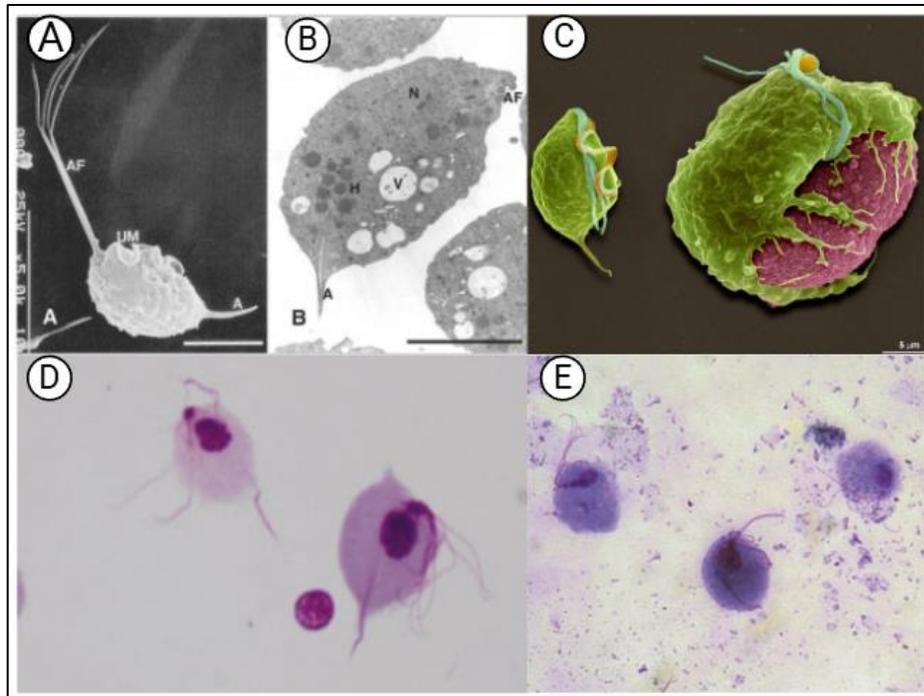


Figura 1. Trofozoíto de *T. vaginalis*. A) Observado bajo de un microscopio electrónico de barrido, donde se muestran cuatro flagelos anteriores (AF), membrana ondulante (UM) y axostilo (A). B) Microscopía electrónica de transmisión que muestra el núcleo (N), hidrogenosomas (H), vacuolas (V) y axostilo (A). C) Microscopía electrónica de barrido de los trofozoítos de *T. vaginalis* mostrando las formas ovoide y ameboide. A la izquierda, se observa el trofozoíto en forma ovoide (verde), con flagelos (azul), flagelos recurrentes (naranja) y axostilo. A la derecha, la forma ameboide (verde) está adherida a una célula epitelial vaginal (rosa). D) y E) Observados bajo microscopio óptico. (Gunn A. y Pitt SJ 2022; McConnaughey 2014; Ryu y Min 2006; Wanderley de Souza 2022).

### 2.1.3 Ciclo biológico

*Trichomonas vaginalis* coloniza la superficie epitelial del tracto urogenital y se aloja en la parte inferior del tracto genital femenino, en el caso de los varones coloniza próstata y uretra. El periodo de incubación es de 5-28 días. El ciclo biológico (Figura 2) del parásito consiste en la replicación de los trofozoítos por fisión binaria longitudinal con división mitótica de núcleos. A la fecha se conoce únicamente el estadio de trofozoíto. La transmisión ocurre principalmente por contacto sexual entre humanos, incluyendo el contacto genital de hombre a mujer, de mujer a hombre y de mujer a mujer. Recientemente, también se han reportado casos poco frecuentes de transmisión entre hombres a través de contacto rectal (Mc Connaughey 2014; Wanderley de Souza 2022).

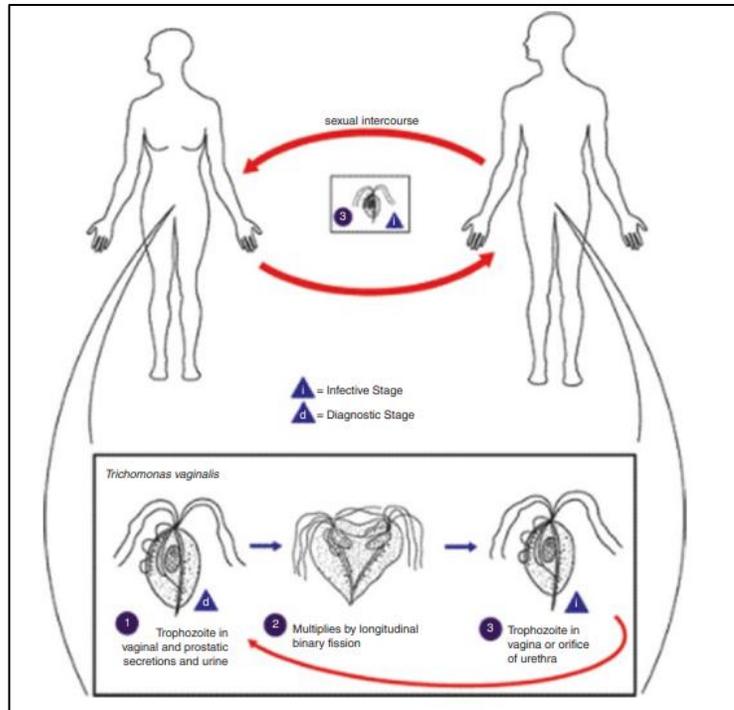


Figura 2. Ciclo biológico de *Trichomonas vaginalis*. Tomado de: <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>.

### 2.1.4 Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud estima que en el año 2020 se presentaron 156 millones de casos de tricomoniasis entre individuos de 15 a 49 años a nivel mundial. De estos casos 73.3 millones fueron en mujeres y 82.6 millones en hombres (WHO 2023). Por otra parte, el Sistema Nacional De Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) reportó un total de 7,344 casos de tricomoniasis urogenital registrados hasta la semana epidemiológica 21 del año 2024 (Boletín Epidemiológico 2024).

### 2.2 Manifestaciones clínicas

La sintomatología de cada paciente es variable, con casos asintomáticos y pacientes que presentan procesos inflamatorios severos e invasivos en el tracto genitourinario con alto riesgo de conducir a un proceso neoplásico. Cabe destacar que la tricomoniasis ha sido comprobada como un factor que aumenta hasta 2.7 veces el riesgo de adquirir otros patógenos que afectan el tracto urogenital como: el virus de la inmunodeficiencia humana

(VIH), *Chlamydia trachomatis*, herpes simple tipo 2 (VHS-2), *Neisseria gonorrhoeae* y el virus del papiloma humano asociado al serotipo 16 de alto riesgo (VPH-16) (Bolumburu et al. 2020).

### **2.2.1 Mujeres**

La tricomoniasis en mujeres se manifiesta con diversos síntomas, entre los que se incluyen: eritema vaginal, dispareunia, disuria, prurito en la zona genital y flujo vaginal difuso con mal olor y coloración amarillo-verdosa. Durante la exploración pélvica, es común identificar el signo característico de esta infección, conocido como cuello uterino en fresa o colitis macular. Entre las principales complicaciones de la tricomoniasis en mujeres se destacan: el aumento del riesgo de padecer enfermedades pélvico-inflamatorias y la infección de las glándulas de Skene y Bartholin. Además, otras complicaciones más graves incluyen el cáncer de cuello uterino, que está relacionado con la enfermedad pélvico-inflamatoria, así como nacimientos prematuros, bajo peso al nacer en bebés y muerte neonatal. También se observa un mayor riesgo de adquirir otras infecciones de transmisión sexual, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Kissinger et al. 2022). Esto se debe a que los trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* se adhieren a las células epiteliales escamosas mediante proteínas de adhesión y poseen enzimas asociadas a la membrana con actividad fosfolipasa A, lo que ocasiona la lisis de las células nucleadas. Esta lisis genera micro ulceraciones y hemorragias microscópicas en la pared vaginal y el exocérnix (Hashemi et al. 2021).

### **2.2.2 Hombres**

En los hombres, la tricomoniasis suele ser asintomática en la mayoría de los casos, sin embargo, en situaciones graves conlleva complicaciones significativas. Estas incluyen uretritis asociada a cistitis, epididimitis y prostatitis crónica, e incluso aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de próstata (Dalimi y Payameni 2021; Hashemi et al. 2021).

### **2.2.3 Tratamiento**

Actualmente, los fármacos disponibles para tratar la tricomoniasis son los 5-nitroimidazoles, entre los cuales el metronidazol y el tinidazol son los únicos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) (Saito-Nakano et al. 2023). Según las pautas de tratamiento establecidas por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades

(CDC) en 2015, el tratamiento de primera línea contra la tricomoniasis para mujeres y hombres VIH negativos consiste en una dosis oral de 2 g de metronidazol o tinidazol en una sola toma. Como terapia alternativa, también se propone una dosis oral de metronidazol de 500 mg dos veces al día durante una semana (Van Gerwen y Muzny 2019).

### 2.2.3.1 Metronidazol

Los nitroimidazoles se caracterizan por tener una estructura heterocíclica que consta de un núcleo de imidazol con un grupo nitro ( $\text{NO}_2$ ) en la posición cinco (Figura 3). El metronidazol, un fármaco sintético de administración oral, se encuentra dentro de esta categoría de compuestos y se destaca por sus propiedades antiparasitarias y antibacterianas. Es ampliamente utilizado para tratar infecciones como las causadas por *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica*, dos agentes patógenos responsables de enfermedades parasitarias en humanos. Además, presenta actividad *in vitro* contra la mayoría de los microorganismos anaerobios facultativos y aerobios obligados (Nagel y Aronoff 2015; Sobel y Sobel 2015).

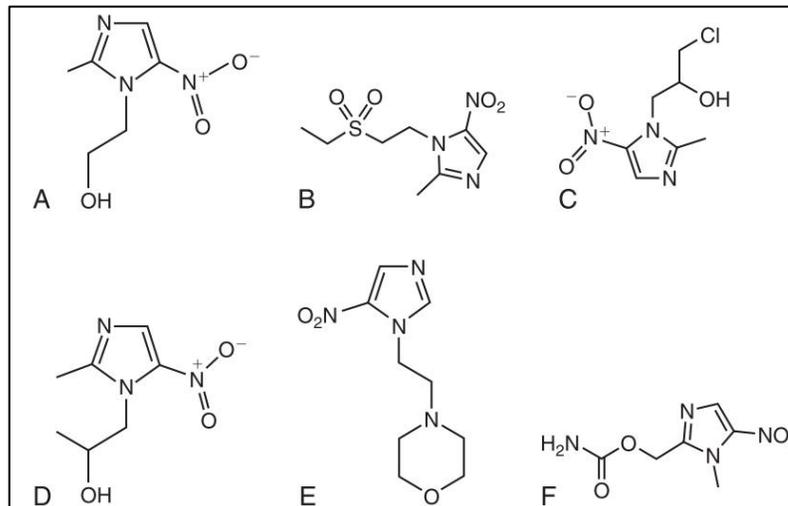


Figura 3. Estructura química de los nitroimidazoles. A) Metronidazol, B) Tinidazol, C) Ornidazol, D) Secnidazol, E) Nimorazol, F) Ronidazol. Fuente: Nagel y Aronoff 2015.

### 2.2.3.2 Mecanismo de acción del metronidazol

El mecanismo de acción del metronidazol (Figura 4) está regulado por cuatro etapas que conducen a la generación intracelular de metabolitos intermedios críticos redox. En primer lugar, el metronidazol penetra en la célula como profármaco por difusión pasiva y se activa en orgánulos específicos de los protozoos. En microorganismos anaerobios el fármaco se transforma en una forma activa a través de la reducción de su grupo nitro, lo que resulta en la formación de un radical nitroso libre que causa citotoxicidad e interferencia con el ADN (ácido desoxirribonucleico) celular. Este proceso de activación del profármaco establece un gradiente de concentración que aumenta la captación del fármaco, lo que potencia su efecto antimicrobiano. En la tercera etapa, el compuesto de metronidazol activado puede inhibir o dañar la síntesis de ADN a través de un proceso de oxidación que ocasiona daños en las hélices del ADN, induce la degradación de este y la muerte celular, después, ocurre la liberación de los productos finales inactivos del fármaco (Nagel y Aronoff 2015; Kumanan et al. 2021).

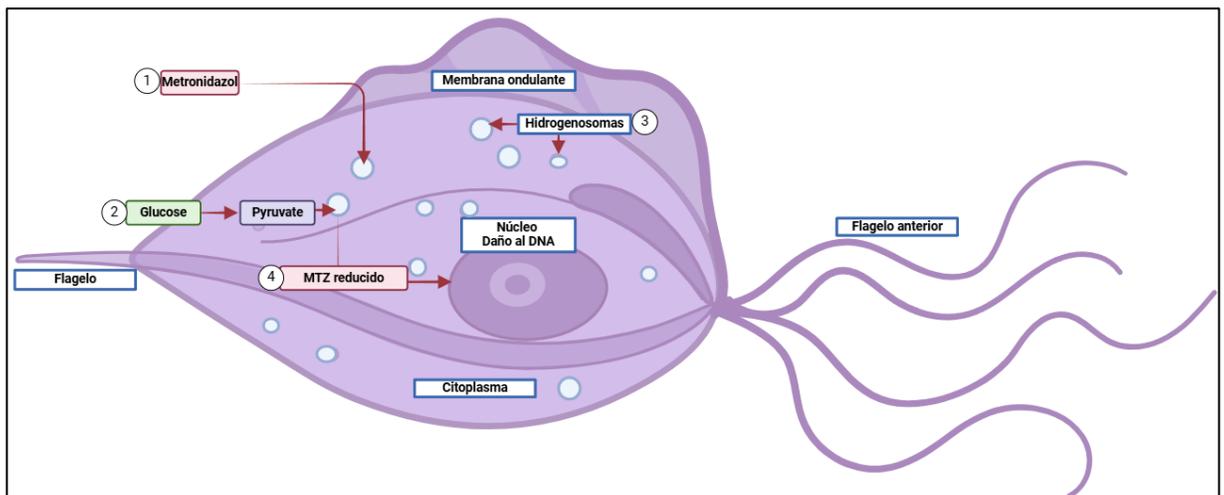


Figura 4. Esquema general de la vía de activación del fármaco MTZ. (1) En primera instancia el MTZ penetra la célula por difusión pasiva y se metaboliza en el hidrogenosoma. (2) El piruvato se genera a partir de glucosa a través de la glucólisis en el citosol. (3) En el hidrogenosoma, PFOR (piruvato: ferredoxina oxidorreductasa) facilita la descarboxilación oxidativa del piruvato mediante la reducción y transferencia de electrones a Fdx. A continuación, Fdx (piruvato por ferredoxina) reduce el grupo nitro de MTZ, lo que crea un anión radical nitro citotóxico. (4) El MTZ activado interactúa entonces con el ADN de *T. vaginalis* causando daños y la muerte del organismo. Imagen tomada y modificada de (Graves et al. 2020).

### **2.2.3.3 Resistencia al metronidazol**

El metronidazol ha sido considerado como el tratamiento estándar contra la tricomoniasis desde su introducción en 1959; sin embargo, la resistencia a este fármaco fue reportada pocos años después, en 1962 (Graves et al. 2020). Los principales mecanismos de resistencia reportados en la literatura incluyen alteraciones a nivel genético en genes diana y activadores de fármacos, así como la presencia de endosimbiontes intracelulares como *Mycoplasma hominis* y *Trichomonasvirus*, que favorecen la patogenicidad de *T. vaginalis* (Mabaso et al. 2020).

Se considera que una cepa de *T. vaginalis* es sensible al metronidazol cuando la concentración letal mínima (MLC) es  $\leq 25 \mu\text{g/mL}$ . La resistencia se clasifica en baja cuando la MLC es de  $50 \mu\text{g/mL}$ , moderada a rangos de MLC entre  $100\text{-}200 \mu\text{g/mL}$  y en alta cuando es  $\geq 400 \mu\text{g/mL}$  (Graves et al. 2020). Han sido descritos dos tipos de resistencia en la literatura: la resistencia aeróbica, asociada a fracasos en el tratamiento de la tricomoniasis, y la resistencia anaeróbica, inducida en laboratorio *in vitro*.

### **2.2.3.4 Resistencia anaeróbica:**

Se caracteriza por presentar una disminución de la expresión génica o de proteínas involucradas en las principales vías del metabolismo de los carbohidratos (la vía dependiente de piruvato y la vía dependiente de malato) y las vías de activación de fármacos: piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), la ferredoxina (Fdx), la enzima mállica malato deshidrogenasa (ME/MDH), la NADH deshidrogenasa y la nitroreductasa (NTR). La eliminación de glucosa y vías energéticas alternas también han sido asociadas a la resistencia anaeróbica a los 5-nitroimidazoles (Graves et al. 2023).

### **2.2.3.5 Resistencia aeróbica:**

Presenta una disminución de la expresión de genes y/o proteínas involucradas en la eliminación de oxígeno y en los mecanismos antioxidantes de defensa como la flavina reductasa 1 (FR1), la tiorredoxina reductasa (TrxR) y la tiorredoxina peroxidasa (TrxP), así como el superóxido dismutasa (SOD) y la NADH oxidasa (Graves et al. 2023).

### **2.2.3.6 Efectos secundarios**

Existen antecedentes donde se reporta que el metronidazol, además de sus propiedades terapéuticas, puede provocar efectos secundarios de severidad variable. Entre estos se incluyen un sabor metálico, náuseas (presentes en aproximadamente el 10% de los pacientes), y neutropenia transitoria (afectando alrededor del 7.5% de los casos). Además, su consumo con alcohol puede desencadenar un efecto similar al del disulfiram con efectos secundarios como: náuseas, vómito, sudoración, palpitaciones, dolor de cabeza y mareos. Adicionalmente, se ha reportado que el metronidazol puede prolongar el cociente internacional normalizado en pacientes que requieren antagonistas de la vitamina K, como la warfarina. Se ha observado que el metronidazol puede potenciar el efecto anticoagulante de la warfarina y otros anticoagulantes, lo que resulta en una prolongación de los tiempos de protrombina (Sobel y Sobel 2015). Además de los efectos secundarios anteriormente mencionados, se han reportado otros efectos leves asociados al metronidazol, como dolor abdominal y diarrea. Es importante destacar que el metronidazol también puede provocar efectos secundarios graves tales como la neurotoxicidad severa, neuropatías ópticas y periféricas, así como encefalopatías (Hernández-Ceruelos et al. 2019).

Adicionalmente, se han documentado casos de alergia al metronidazol, que pueden manifestarse con síntomas como urticaria, edema facial y, en casos más graves, choque anafiláctico (Hashemi et al. 2021). Por otra parte, se ha descrito como un agente mutagénico para las bacterias y con efectos carcinogénicos en ratones cuando se utiliza en dosis elevadas durante períodos prolongados (Parrado 2003).

## **2.3 Plantas medicinales para tratamiento**

Los medicamentos elaborados a base de plantas medicinales exhiben eficiencia, rentabilidad mayor tolerancia y disminución de efectos adversos en contraste con los fármacos sintéticos, razón por la cual se han convertido en objeto de estudio debido a la gran cantidad diversidad de compuestos bioactivos que albergan. Previamente se ha reportado que algunas plantas medicinales con actividad tricomonocida pertenecen en su mayoría a las familias *Asteracea*, *Lamiaceae* y *Myrtaceae* (Hashemi et al. 2021).

### 2.3.1 *Agave lechuguilla* Torr, *Asparagaceae*

#### 2.3.1.1 Clasificación taxonómica

Clasificación taxonómica tomada del Herbario Nacional de México (MEXU) propuesto por el Departamento de Botánica del Instituto de Biología (IBUNAM) (Departamento de Botánica 2019).

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Especie: *Agave lechuguilla*

La lechuguilla (Figura 5) es una planta suculenta que pertenece a la familia *Agavaceae* y se distribuye en regiones áridas desde el sureste de los Estados Unidos hasta el sur de México (López-Díaz et al. 2022). Se trata de un arbusto rosetófilo que presenta hojas oblongo-lanceoladas, las cuales pueden alcanzar una longitud de hasta 60 cm. Los bordes de estas hojas están adornados con espinas pequeñas en forma de gancho, y su ápice terminal es también espinoso. Las flores que produce son de color verde pálido o verde amarillento (Macouzet-Pacheco et al. 2013). Posee un valor económico y ecológico significativo en estas áreas y se considera un recurso forestal no maderable. Su distribución nacional abarca aproximadamente 20 millones de hectáreas, incluyendo los estados de Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas (Carmona et al. 2017).

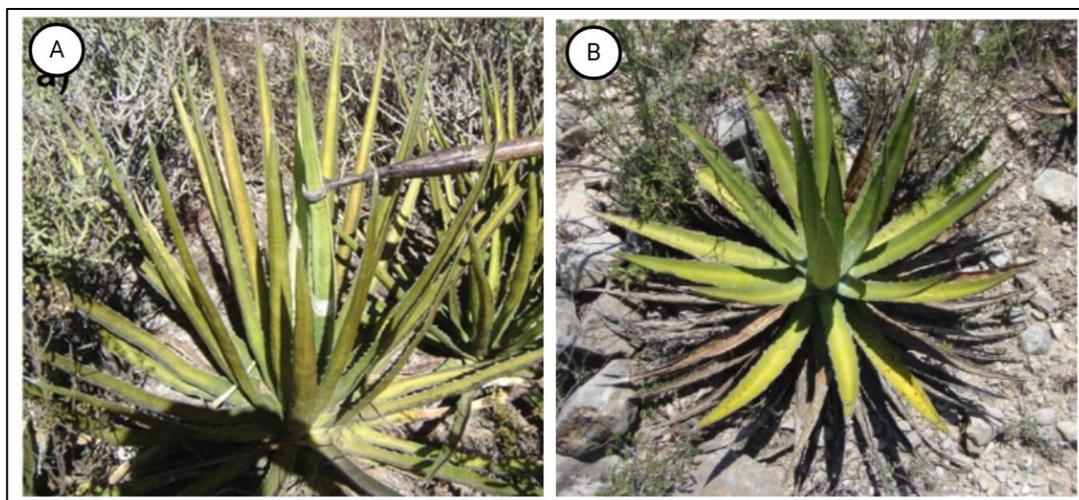


Figura 5. *Agave lechuguilla* Torr. Tomadas de A) González-López y González-Uribe (2023) y B) Macouzet-Pacheco et al. 2013.

El interés farmacológico en el uso de *A. lechuguilla* se ha centrado en el estudio de sus principios activos. En un estudio realizado por Almaraz-Abarca et al. (2013), se informa que los extractos foliares de esta planta contienen flavonoles, derivados de ácido fenólico, flavonoides glucósidos y dihidroflavonoides. Además, se han reportado efectos antimicrobianos y antifúngicos atribuidos a la presencia de polifenoles. La presencia de compuestos como saponinas, flavonoides, terpenos y compuestos fenólicos se ha asociado con la actividad insecticida. Asimismo, la presencia de flavonoides en extractos etanólicos se ha relacionado con su potencial anticancerígeno y antioxidante (Morreeuw et al. 2021)

### 2.3.1.2 Actividad bactericida

Barrón (2016) demostró la actividad antibacteriana de saponinas presentes en el extracto hidroalcohólico elaborado de hojas de *A. lechuguilla* contra bacterias aisladas a partir de alimentos, reportando actividad bactericida contra *Kurthia gibsonii* y *Lactiplantibacillus plantarum* obteniendo una  $CI_{50}$  de 298.12 mg/mL y 324.56 mg/mL, respectivamente.

### 2.3.1.3 Actividad antifúngica

La actividad antifúngica de *A. lechuguilla* fue evaluada en la investigación de Barrón (2016) contra aislados fúngicos provenientes de muestras alimentarias. Se utilizaron saponinas aisladas de extracto hidroalcohólico de las hojas de *A. lechuguilla* para medir el porcentaje de inhibición de la germinación de las esporas de diversos hongos. Los

resultados mostraron una inhibición del crecimiento del 48.77% para *Fusarium oxysporum*, mientras que en los demás hongos la inhibición del crecimiento fue inferior al 30%. Del mismo modo, se calcularon las concentraciones inhibitorias medias para cada hongo, obteniéndose los siguientes valores: *Rhizopus stolonifer* (142.55 mg/mL), *Fusarium oxysporum* (113.96 mg/mL), *Fusarium graminearum* (141.17 mg/mL), *Penicillium digitatum* (28130 mg/mL) y *Penicillium rubrum* (267.79 mg/mL).

### **2.3.2 *Buddleja scordioides* Kunth**

#### **2.3.2.1 Clasificación taxonómica**

Clasificación taxonómica tomada del Herbario Nacional de México (MEXU) propuesto por el Departamento de Botánica del Instituto de Biología (IBUNAM) (Departamento de Botánica 2019).

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Gentianales

Familia: *Loganiaceae*

Género: *Buddleja*

Especie: *Buddleja scordioides*

*Buddleja scordioides* Kunth, también conocida como salvilla, escobilla, arbusto mariposa o salvia real (Figura 6), es una planta perteneciente a la familia *Loganiaceae*, aunque algunas clasificaciones la ubican en la familia *Buddlejaceae*. Se trata de un arbusto ramificado que puede alcanzar una altura de 1 m, con una forma estrellada y pubescente. Las flores de esta planta son diminutas, de color amarillo, y se agrupan formando una cabeza globosa densa y lanosa. Originario de África, Asia y Sudamérica, este género cuenta con alrededor de 100 especies, 16 de las cuales se encuentran en México, incluyendo a *B. scordioides* (Macías-Cortés et al. 2022; Rocha-Guzmán et al. 2018; Macouzet-Pacheco et al. 2013).



Figura 6. Planta silvestre de *Buddleja scordioides* Kunth. Imágenes tomadas de (Macouzet-Pacheco et al. 2013).

Se encuentra distribuida desde el sur de los Estados Unidos hasta el centro de México, abarcando regiones como Nuevo México, Texas, Jalisco, Hidalgo, Quintana Roo y el noroeste de México (Macouzet-Pacheco et al. 2013). Diversos estudios han reportado distintos efectos positivos sobre la salud humana, tales como propiedades antiespasmódicas, actividad antibacteriana, protección solar, efecto antidiarreico y actividad contra trastornos gastrointestinales, fungiendo además como un antiinflamatorio gástrico e intestinal (Macías-Cortés et al. 2022)

Diversas investigaciones sobre la composición de las infusiones de *B. scordioides* han informado la presencia de distintos compuestos, entre ellos ácido cafeico, ácido vanílico, vainillina y ácido coumárico. Además, se ha identificado la presencia de ácidos de las subclases de hidroxibenzoicos (gálico, gentísico, 4-hidroxibenzoico y salicílico) e hidroxicinámicos (quínico, 4-O-cafeoilquínico, 4,5 dicafeoilquínico y ferúlico). También se ha descrito la presencia de flavonoides de subclase flavonoles como la quercetina, isoquercitrina, rutina, quercetina 3-O- $\beta$ -glucurónido, así como flavononas como la naringenina y eriodictiol (Villegas-Novoa et al. 2020).

### **2.3.2.2 Actividad antiparasitaria**

Mohammed et al. (2016) evaluó la actividad antimalárica del extracto metanólico de hojas de *B. polystachya* en términos de la reducción de la carga parasitaria, obteniendo una supresión de la parasistema del 66.67% a una dosis de 300 mg/kg.

El efecto antiparasitario de *Buddleja* también ha sido evaluado contra *Plasmodium falciparum* a partir de extractos elaborados de la especie *B. globosa* con  $CI_{50}$  obtenida de 6.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en extractos metanólicos y 8.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el caso de extractos acuosos. Otra especie reportada con actividad es *B. tacumanensis* con una  $CI_{50}$  de 17.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el extracto metanólico (Debenedetti et al. 2002).

### 2.3.3 *Persea americana* Mill

El aguacate, miembro de la familia de las plantas con flores *Lauraceae*. Es originario de México y América Central, siendo México el principal productor a nivel mundial (Bhuyan et al. 2019).

Mesoamérica es reconocida como el epicentro de la diversidad y el origen del aguacate (*Persea americana* Mill.), ya que la mayoría de sus poblaciones primigenias prosperan en esta región, que se extiende desde la Sierra Madre Oriental del estado de Nuevo León, México, hasta Costa Rica. La diversidad del aguacate se puede categorizar en tres razas principales: *P. americana* var. *drymifolia* (raza mexicana), *P. americana* var. *guatemalensis* (raza guatemalteca) y *P. americana* var. *americana* (raza antillana). En México el aguacate exhibe una amplia diversidad genética (Figura 7), resultado de la fenología que se manifiesta en características como el tamaño, color, forma y sabor de sus frutos y hojas (Montes-Hernández et al. 2017).



Figura 7. Diversos frutos de *P. americana* Mill. var. *drymifolia* de Aramberri y General Zaragoza, Nuevo León, México. 1) Pato, 2) Amarillo, 3) Cuerno, 4) El Salto, 5) Huevo de Paloma, 6) Mantequilla, 7) Criollo Bola, 8) Pagua, 9) Plátano, 10) y 14) Criollos, 11) Campeón, 12) Plátano Delgado, 13) Plátano Grueso, 15)

Criollo Todo el Año, 16) María Elena, 17) Leonor, 18) Salvador. Imagen tomada de Gutiérrez-Díez et al. 2015.

### **2.3.4 *P. americana* var. *drymifolia***

#### **2.3.4.1 Clasificación taxonómica:**

Clasificación taxonómica tomada del Herbario Nacional de México (MEXU) propuesto por el Departamento de Botánica del Instituto de Biología (IBUNAM) (Departamento de Botánica 2019).

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Laurales

Familia: Lauraceae

Género: *Persea*

Especie: *Persea americana*

Esta variedad se encuentra en bosques mesófilos y montañas; sin embargo, su estado de conservación se considera como precario. La demanda del consumo local del fruto en México es alta. Del mismo modo, esta variedad mexicana representa una gran fuente de genes de resistencia contra enfermedades y plagas que afectan a esta planta. Diversos estudios sobre *P. americana* var. *drymifolia* han demostrado la presencia de compuestos activos contra herbívoros y patógenos, atribuyéndose a la presencia de terpenoides y fenilpropanoides en las hojas de esta planta. Asimismo, es reconocido como un alimento funcional debido a la presencia de compuestos con alto valor nutracéutico. Sin embargo, el conocimiento de sus propiedades biomédicas ha sido poco estudiado (Ochoa-Zarzosa et al. 2021).

El aguacate ha sido utilizado desde la antigüedad para el tratamiento de diversas patologías. Entre las propiedades medicinales que se le han atribuido se incluye el efecto emenagogo otorgado por el fruto de la planta, el efecto cicatrizante presente en la pulpa, y el efecto antiinflamatorio de la piel proporcionado por las hojas, así como para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Ochoa-Zarzosa et al. 2021)

Se han reportado una variedad de efectos medicinales atribuidos al aguacate, entre los que se destacan sus propiedades antihipertensivas, hepatoprotectores, antiulcerosas, anticancerígenas, insecticidas, antimicrobianas, antioxidantes, antidiabéticas, antiinflamatorias y anticoccidiales. Estos efectos se deben a la amplia diversidad de compuestos bioactivos presentes en el aguacate, que incluyen flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides, carotenoides, entre otros (Alajmi et al. 2023).

#### **2.3.4.2 Actividad antiparasitaria**

Cédric et al. (2023) evaluó la actividad antihelmíntica de los extractos etanólicos y acuosos de las semillas de *P. americana* contra la eclosión de los huevos de *Heligmosomoides polygyrus* reportando una  $CI_{50}$  a los 0.49 mg/mL y 0.22 mg/mL respectivamente.

Jiménez-Arellanes et al. (2013), investigaron los efectos de extractos clorofórmicos y etanólicos de semillas de *P. americana* sobre *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *T. vaginalis*. Los resultados mostraron una actividad anti protozoaria significativa en los tres parásitos. El extracto clorofórmico exhibió valores de  $CI_{50}$  de 0.634, 0.417 y 0.524  $\mu\text{g/mL}$  para *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *T. vaginalis*, respectivamente. Por otra parte, el extracto etanólico mostró valores de  $CI_{50}$  de 0.486 0.386 y 0.533  $\mu\text{g/mL}$  frente a los mismos parásitos, respectivamente.

#### **2.3.4.3 Actividad antibacteriana**

La actividad bactericida de *P. americana* Mill ha sido documentada por Gómez-Flores et al. (2008), quienes demostraron su eficacia contra las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra y H37Rv, a partir de extractos metanólicos elaborados a partir de las hojas de la planta. Su estudio reveló una notable inhibición del crecimiento bacteriano, con un rango del 82 al 100% y una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 125  $\mu\text{g/mL}$  contra la cepa H37Ra. En el caso de la cepa H37Rv, se observó una inhibición del 53 al 100% y una CIM de 62.5  $\mu\text{g/mL}$ . Por otra parte, la evaluación de las fracciones obtenidas del extracto mostró que la fracción hexánica presentó actividad inhibitoria con un rango del 18 al 100% contra la cepa H37Ra, y un rango del 84 al 100% con una CIM de 31.2  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Trichomonas vaginalis* es el agente causal de la infección de transmisión sexual denominada como tricomoniasis, que invade, coloniza y parasita el aparato genitourinario femenino y masculino. Actualmente es una infección que requiere vigilancia epidemiológica en México y los casos diagnosticados demandan notificación obligatoria ante el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). El tratamiento de primera línea empleado en esta infección es el metronidazol y sus derivados, sin embargo, en los últimos años han aumentado los casos que reportan resistencia al fármaco y fracaso del tratamiento. Por otra parte, dicho medicamento ocasiona diversos efectos secundarios con consecuencias adversas para sus usuarios, que van desde afecciones como náuseas, problemas gastrointestinales y alteraciones en el sentido del gusto hasta afecciones más severas como la neurotoxicidad y neuropatías óptica y periférica, así como, complicaciones hematológicas como la neutropenia. Ante este escenario, se ha vuelto necesaria la búsqueda de alternativas efectivas y viables para enfrentar la crisis emergente que se ha presentado en los últimos años contra *Trichomonas vaginalis* resistente a metronidazol, en orden de mejorar el pronóstico y curso de la infección ocasionada por este protozooario. Dado que México es uno de los países con mayor diversidad biológica en el mundo, se considera que existe un gran potencial de plantas medicinales con compuestos bioactivos altamente efectivos como una alternativa a los fármacos sintéticos que han perdido eficacia con el tiempo.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los extractos metanólicos de *A. lechuguilla*, *B. scordioides* y *P. americana* poseen actividad biológica inhibitoria contra las cepas de *Trichomonas vaginalis* susceptibles y resistentes a metronidazol.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Evaluar la actividad inhibitoria de los extractos metanólicos de *Agave lechuguilla*, *Buddleja scordioides* y *Persea americana* sobre el crecimiento de cepas de *T. vaginalis* resistente y susceptible a metronidazol.

### 5.2 Objetivos Particulares

1. Obtener los extractos metanólicos de *Agave lechuguilla*, *Buddleja scordioides* y *Persea americana*, seleccionar los de mayor actividad inhibitoria en la cepa susceptible de *T. vaginalis* y evaluar su efectividad en la cepa resistente a metronidazol.
2. Determinar la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de los extractos con mayor porcentaje de inhibición en la cepa susceptible, y posteriormente calcular la CI<sub>50</sub> de estos en la cepa resistente a metronidazol.
3. Fraccionar mediante técnicas cromatográficas los extractos que muestren la mayor actividad inhibitoria contra *T. vaginalis* susceptible y evaluar su efectividad en la cepa resistente a metronidazol.
4. Determinar la CI<sub>50</sub> de las particiones y fracciones con mayor porcentaje de inhibición en la cepa susceptible, y posteriormente calcular la CI<sub>50</sub> de estas en la cepa resistente a metronidazol.
5. Determinar la actividad citotóxica de las fracciones que presenten la mayor actividad inhibitoria contra la cepa de *T. vaginalis* susceptible y resistente a metronidazol en la línea celular Vero.
6. Caracterizar parcialmente la composición química de las fracciones con mayor actividad inhibitoria contra la cepa susceptible y resistente a metronidazol mediante pruebas fitoquímicas.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Elaboración de extractos

#### 6.1.1 Colecta del material vegetal

La colecta del material vegetal se llevó a cabo en dos municipios ubicados en el estado de Nuevo León: Rayones y García, durante los meses de floración y/o fructificación de cada planta según se muestra en la Tabla 1. El material vegetal fue seleccionado, etiquetado y almacenado en recipientes herméticos (Cabrera y Silva 2021). Se depositó una muestra de cada planta recolectada (Figura 8) en el herbario del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

Tabla 1. Colecta de material vegetal en el estado de Nuevo León.

Planta	Fecha de colecta (mes/año)	Municipio
<i>A. lechuguilla</i>	10/22	García
<i>B. scordioides</i>	05/23	Rayones
<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> .	09/23	Rayones

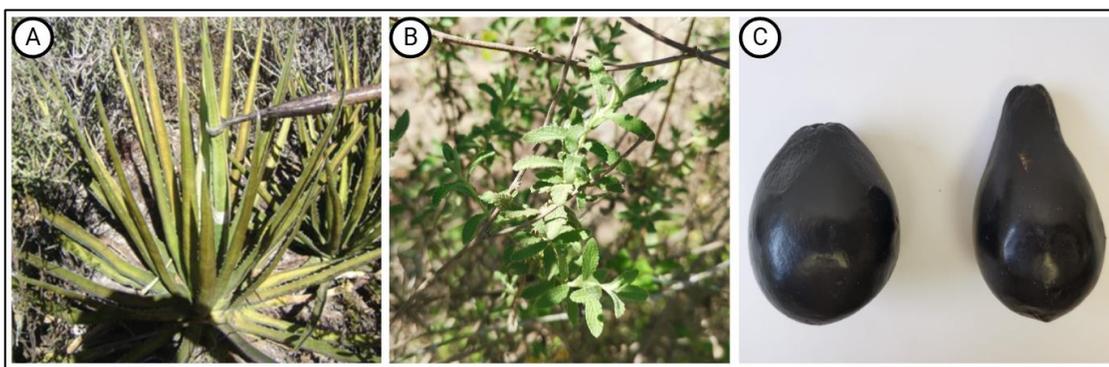


Figura 8. Imágenes de las plantas evaluadas. (A) *A. lechuguilla* (González-López y González-Urbe 2023), (B) *B. scordioides* y (C) *P. americana* var. *drymifolia*.

### 6.1.2 Preparación del material vegetal

Para la elaboración de los extractos, se utilizaron las partes aéreas de *A. lechuguilla* y *B. scordioides*, mientras que para *P. americana* se empleó el exocarpio del fruto. El material vegetal fue secado con lámparas de calor a una temperatura de 40-45 °C durante 2 a 3 semanas. Posteriormente, se pulverizó el material vegetal seco con un molino manual (Figura 9) y se almacenó en frascos herméticos de plástico a temperatura ambiente hasta su uso (Molina-Garza et al. 2014).



Figura 9. Proceso de A) secado y B) triturado del material vegetal.

### 6.1.3 Extracción del material vegetal

La extracción se llevó a cabo mediante el método de maceración en frío utilizando metanol absoluto (MetOH, CTR Scientific) como solvente. La relación utilizada fue de 20 g de material vegetal en 300 mL de solvente en un matraz bola de fondo plano (Pyrex) con agitación constante. Se realizaron tres extracciones sucesivas con intervalos de 48 h, para ello se reemplazó el solvente en cada ocasión. Después de completar la extracción, la solución resultante se filtró con filtros de papel (Whatman N.º 1) y se concentró a través de la eliminación de solvente con ayuda de un Rotavapor (Büchi R-3000) manteniendo una temperatura menor a 40 °C hasta concentrar el extracto. Posteriormente, el concentrado del extracto se transfirió a un contenedor de vidrio previamente pesado, donde se finalizó la concentración del extracto empleando un desecador de vidrio al vacío, y el extracto resultante se almacenó a 4 °C hasta su uso. (Molina-Garza et al. 2014).

Una vez evaporado completamente el solvente de extracción se procedió a pesar las muestras secas en una balanza de precisión para registrar los datos de peso. Con los datos obtenidos para los pesos finales se determinaron los rendimientos porcentuales aplicando la Ecuación 1, donde % R representa el porcentaje de rendimiento,  $W_i$  es el peso inicial y  $W_f$  es el peso final de la materia vegetal después de obtener el extracto (Benítez-Benítez et al. 2020).

$$\% R = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad (1)$$

Ecuación 1. Ecuación para determinar rendimientos porcentuales.

## **6.2 Aislamiento biodirigido**

### **6.2.1 Partición mediante la técnica de extracción líquido-líquido de extractos con mayor actividad tricomonida empleando solventes por orden de polaridad ascendente**

A partir del extracto crudo se obtuvieron las particiones fitoquímicas, empleando la técnica de extracción líquido-líquido (Figura 10), para lo cual se tomaron 3 g de extracto metanólico crudo que fue disuelto en 50 mL de metanol absoluto (MeOH; CTR Scientific), la mezcla se depositó en un embudo de separación (Pyrex) con capacidad de 500 mL y se realizaron extracciones sucesivas con 150 mL de disolventes de polaridades ascendentes: hexano, acetato de etilo e hidroalcohólico. Cada disolución fue homogenizada mediante agitación y se dejó reposar 48 h hasta obtener una separación de fases definida. Se realizaron tres extracciones con cada solvente, recuperando y reservando cada partición obtenida. La partición metanólica resultante del primer lavado con hexano se trató con agua destilada para generar una partición hidroalcohólica, la cual fue sometida a un segundo proceso de particionamiento con tres lavados de 150 mL de acetato de etilo absoluto (AcEt; CTR Scientific). Las particiones hidroalcohólicas resultantes se sometieron a un proceso de liofilización utilizando un liofilizador BTP-8ZLEVW (SP Scientific). Por otro lado, las particiones de hexano y acetato de etilo se recolectaron y concentraron en un rotavapor hasta alcanzar sequedad, para eliminar el disolvente.

Posteriormente, se transfirieron a frascos de vidrio previamente pesados y cada partición se almacenó a 4 °C hasta su posterior manipulación (Barboza et al. 2010).

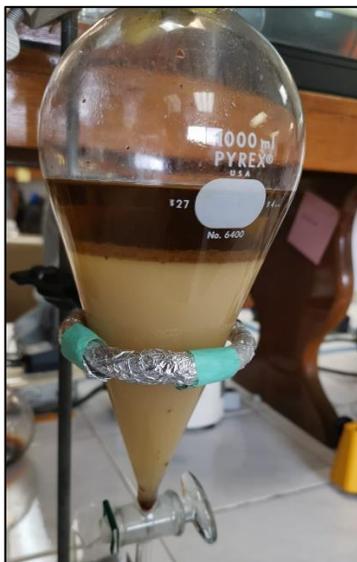


Figura 10. Imagen del proceso de extracción líquido-líquido.

### 6.2.2 Fraccionamiento por columna en sílica gel

El fraccionamiento se llevó a cabo mediante la técnica de exclusión molecular por cromatografía en columna (Figura 11). Se emplearon las particiones que mostraron la mayor actividad tricomonocida contra la cepa de *T. vaginalis* susceptible a metronidazol, específicamente las particiones de hexano y acetato de etilo. Se utilizó una columna de vidrio de 15 cm con 20 g de sílica gel (Aldrich, 100-200 mallas) como fase estacionaria, suspendida en cloroformo absoluto ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; CTR Scientific). La fase móvil consistió en una mezcla de cloroformo, acetato de etilo y metanol, siguiendo el sistema de elución presentado en la Tabla 2 con un flujo de 40 gotas por minuto. Las fracciones recolectadas tuvieron un volumen de 5 mL. Posteriormente, las fracciones obtenidas se analizaron mediante cromatografía de capa fina (CCF) y se agruparon en fracciones colectivas según la similitud de su perfil químico y su factor de retención ( $R_f$ ). Estas fracciones fueron almacenadas en frascos previamente pesados a una temperatura de 4 °C (Torres-Hernández 2021).

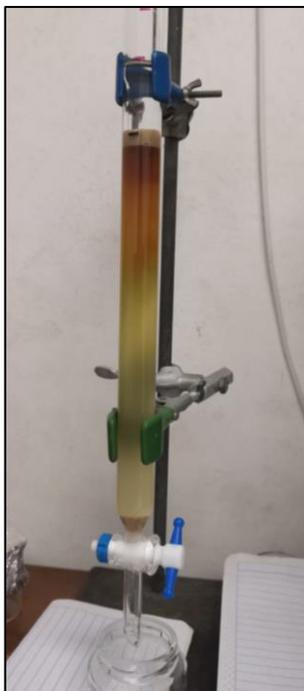


Figura 11. Cromatografía en columna en fase normal sílica gel.

### **6.2.3 Columna 1: Partición de hexano**

Se tomó 1 g de la partición de hexano y se realizó el fraccionamiento en columna de sílica gel. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante la técnica de cromatografía de capa fina y se agruparon en fracciones colectivas conforme a la similitud de su perfil químico y  $R_f$ .

### **6.2.4 Columna 2: Partición de acetato de etilo**

Se tomaron 200 mg de la partición de Acetato de etilo y se realizó el fraccionamiento en columna de sílica gel. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante la técnica de cromatografía de capa fina y se agruparon en fracciones colectivas conforme a la similitud de su perfil químico y  $R_f$ .

Tabla 2. Sistema de elución utilizado en las cromatografías en las columnas de gel de sílice.

<b>Volumen total (mL)</b>	<b>Solvente</b>	<b>Relación (%)</b>
50	CH <sub>3</sub> Cl	100
50	CH <sub>3</sub> Cl- AcEt	90:10
50	CH <sub>3</sub> Cl- AcEt	80:20
50	CH <sub>3</sub> Cl- AcEt	70:30
50	CH <sub>3</sub> Cl- AcEt	60:40
50	CH <sub>3</sub> Cl- AcEt	50:50
50	CH <sub>3</sub> Cl- AcEt	40:60
50	CH <sub>3</sub> Cl- AcEt	30:70
50	CH <sub>3</sub> Cl- AcEt	20:80
50	CH <sub>3</sub> Cl- AcEt	10:90
50	AcEt	100
50	AcEt -MetOH	90:10
50	AcEt -MetOH	80:20
50	AcEt -MetOH	70:30
50	AcEt -MetOH	60:40
50	AcEt -MetOH	50:50
50	AcEt -MetOH	40:60
50	AcEt -MetOH	30:70
50	AcEt -MetOH	20:80
50	AcEt -MetOH	10:90
50	MetOH	100

CH<sub>3</sub>Cl: Cloroformo; AcEt: Acetato de etilo; MeOH: Metanol.

### 6.2.5 Cromatografía en capa fina (CCF)

La distribución de metabolitos contenidos en los extractos, particiones y fracciones obtenidas fue revelada mediante la técnica de cromatografía en capa fina. Se emplearon cromatoplasmas de sílica gel con dimensiones de 5 x 10 cm en soporte de vidrio (TLC Sílica Gel 60 F254, Merck), las muestras a analizar fueron colocadas con un capilar a una distancia de 1 cm de la base y espaciadas entre sí. La elución se realizó a través de una fase móvil compuesta por una mezcla de por acetato de etilo: cloroformo (1:1) con una solución final de 10 mL (eluyente). El eluyente se dejó fluir hasta llegar a 0.5 cm del límite superior de la cromatoplasma. El resultado de la elución fue revelado en luz ultravioleta a una longitud de onda corta (UV 365 nm) y mediante la técnica de vapores de yodo (Torres-Hernández 2021). El factor de retención ( $R_f$ ) fue calculado mediante la Ecuación 2 (Rejšek et al. 2016):

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente}}$$

Ecuación 2. Ecuación para determinación de factor de retención.

Las fracciones que presentaron perfiles de  $R_f$  similares fueron agrupadas en fracciones colectivas (FC).

### 6.2.6 Pruebas fitoquímicas cualitativas

El perfil fitoquímico fue realizado en las fracciones que exhibieron la mayor actividad tricomonocida contra las cepas de *T. vaginalis* susceptible y resistente a metronidazol. Se realizó un tamizaje fitoquímico cualitativo. Las fracciones que exhibieron actividad tricomonocida se analizaron bajo el estándar químico para la determinación de cumarinas, sesquiterpenos, dobles enlaces, xantofilas, esteroides, triterpenos, carbohidratos, flavonoides y saponinas (Tabla 3) (Rodríguez-Arzave 1987; Domínguez 1973).

Tabla 3. Descripción de las pruebas fitoquímicas.

Prueba	Metabolito	Prueba positiva
NaOH 10%	Cumarinas	Cambio de coloración al acidular la solución.
Baljet	Sesquiterpenos	Coloración anaranjada o roja oscura.
Beayer	Dobles enlaces	Cambio de color y formación de precipitado a café-rojizo.
HCl	Xantofilas	Coloración verde, azul o morado.
Lieberman-Burchard	Esteroles y triterpenos	Color verde/azul para esteroles. Coloración morada/violeta/rosa para triterpenos.
Shinoda	Flavonoides	Coloración anaranjada/rojo/morado.
Molisch	Carbohidratos/Saponinas	Formación de anillo morado en la interfase.

### 6.3 Ensayo biológico

#### 6.3.1 Material biológico

Se utilizaron cultivos axénicos de las cepas de referencia *T. vaginalis* con la clave de identificación GT-15 para la cepa sensible a metronidazol y GT-15-R para la cepa resistente a metronidazol, que a partir de este momento se denominarán TV-S-MTZ y TV-R-MTZ respectivamente. Ambos cultivos fueron proporcionados por el Laboratorio de Parasitología y Farmacognosia del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS (CIBIN).

### 6.3.2 Preparación del medio TYI-S-33

El medio Trypticase, extracto de levadura, suero-hierro (Trypticase, yeast extract, iron-serum, TYI-S-33) fue preparado según la metodología descrita por Suleiman y Ralston (2022). El medio fue adicionado con 10 % de suero bovino adulto para obtener un medio completo, previamente esterilizado el suero mediante un filtro de jeringa de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millex-GV).

### 6.3.3 Mantenimiento del cultivo

Los cultivos de *T. vaginalis* susceptible a metronidazol se mantuvieron en medio completo TYI-S-33, mientras que la cepa resistente se mantuvo en medio TYI-S-33 adicionado con metronidazol (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (TYI-S-33-MTZ). Los cultivos fueron analizados con la ayuda de un microscopio invertido (Figura 12), y se ajustó el inóculo mediante la técnica de conteo en cámara de Neubauer a  $1 \times 10^5$  trofozoítos/mL. Posteriormente, una alícuota de 0.02 mL del inóculo de los trofozoítos fue inoculada en 5 mL de medio TYI-S-33/TYI-S-33-MTZ. El cultivo se mantuvo en incubación a  $36.5 \pm 0.5$  °C durante 48 h previo a su uso (Elizondo-Luevano et al. 2020).



Figura 12. Cultivo de trofozoítos de *T. vaginalis* observados bajo un microscopio invertido (10x).

#### 6.3.4 Ensayo *in vitro* de la actividad tricomonocida de los extractos metanólicos elaborados a partir de *A. lechuguilla*, *B. scordioides* y *P. americana* var. *drymifolia*

La actividad tricomonocida de los extractos metanólicos fue evaluada mediante la técnica de micro ensayo. El ensayo biológico se realizó en micro viales cónicos de 1 mL (Wheaton) con un inóculo ajustado a  $1 \times 10^5$  trofozoítos/mL y el extracto, partición o fracción a 150  $\mu\text{g/mL}$ . El ensayo se mantuvo en incubación a 36.5 °C durante 24 h. Posteriormente, el número de trofozoítos se determinó mediante el método de conteo en cámara de Neubauer (Neubauer, Hausser Scientific, Horsham, Pensilvania, EE. UU.) (Figura 13) para calcular el porcentaje de inhibición de cada extracto. Para lo cual, se realizó una dilución del contenido de cada vial con formalina en proporción 9:1. Se utilizó metronidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MUS, EE. UU.) (0.19  $\mu\text{g/ml}$ ) como control positivo y el cultivo de *T. vaginalis* sin tratamiento como control negativo. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento de los cultivos tratados en contraste con los de los controles no tratados. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Bazaldúa-Rodríguez et al. 2021).

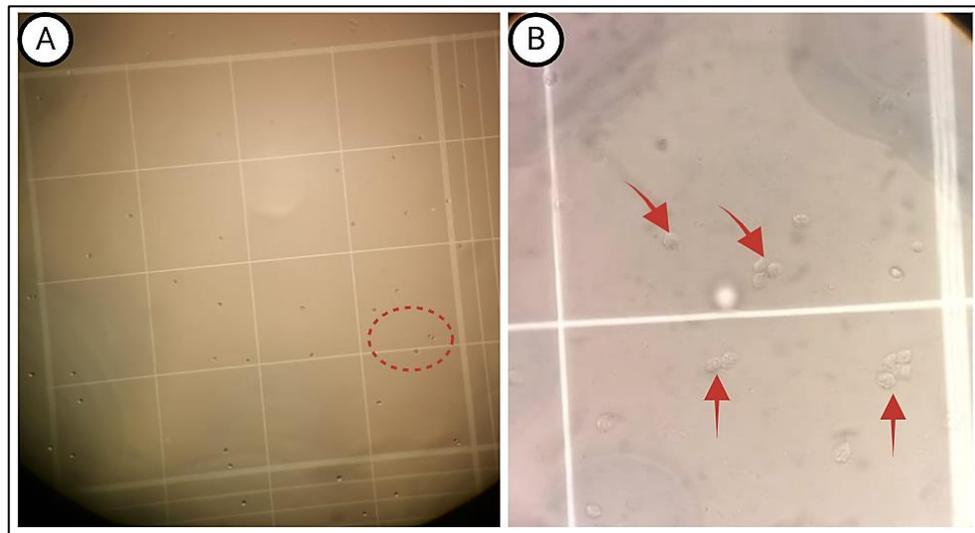


Figura 13. Trofozoítos de *T. vaginalis* observados mediante un microscopio óptico analizados en cámara de Neubauer. A) 10x (trofozoítos indicados en el círculo rojo) y B) 40x (trofozoítos señalados con flechas).

### **6.3.5 Determinación de la CI<sub>50</sub>**

Para determinar la CI<sub>50</sub> de los extractos crudos, particiones y fracciones, se prepararon diluciones seriadas del extracto metanólico crudo concentrado a 150, 75, 37.5, 18.75 y 9.37 µg/mL. Se realizaron ensayos por triplicado en micro viales cónicos de 1 mL (Wheaton) adicionando el inóculo a  $1 \times 10^5$  trofozoítos/mL y el extracto, partición o fracción a las concentraciones preparadas. El ensayo se mantuvo en incubación a 36.5 °C durante 24 h. Posteriormente, el número de trofozoítos se determinó mediante el método de conteo en cámara de Neubauer (Neubauer, Hausser Scientific, Horsham, Pensilvania, EE. UU.). Se utilizó metronidazol (0.19 µg/mL) como control positivo y el cultivo de *T. vaginalis* sin tratamiento como control negativo (Mata-Cárdenas et al. 2008).

### **6.3.6 Evaluación de las concentraciones citotóxicas al 50% (CC<sub>50</sub>) sobre la línea celular Vero**

La línea celular Vero (Figura 14) fue utilizada para evaluar el efecto citotóxico de los extractos. Los cultivos celulares se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM/F-12; Life Technologies), enriquecido con suero fetal bovino (SFB; Life Technologies) al 10% y una solución antibiótica-antifúngica (penicilina-estreptomicina) al 1% (Life Technologies) denominado como medio completo. Las células se incubaron a 37 °C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (Ramírez-Villalobos et al. 2021).

Para evaluar el efecto citotóxico de las fracciones con mayor actividad tricomonocida, se realizó un ensayo de citotoxicidad mediante la técnica del ensayo colorimétrico de reducción de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliumbromida (MTT; Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células fueron incubadas en microplacas de fondo plano de 96 pocillos (Corning Incorporated, Corning, NY, EE. UU.) a una densidad celular de  $1 \times 10^4$  células por pocillo con una confluencia estimada del 90%, en medio completo, y se dejaron incubar durante 24 h. Después del periodo de incubación, las células fueron sometidas a tratamiento con las fracciones a las concentraciones de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 µg/mL. Se utilizaron 100 µg/mL de vincristina (Kocak Pharma, Estambul, Turquía) como control positivo y el medio de cultivo no tratado se utilizó como control negativo. Las células se mantuvieron en incubación durante 48 h a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posterior al periodo de incubación, se adicionaron 15 µL de MTT por pocillo, el tiempo de

incubación fue de 3 h a 37 °C. Las placas fueron decantadas y adicionadas con 80 µL de dimetil sulfóxido concentrado (DMSO; Sigma-Aldrich). La densidad óptica se midió a 570 nm en un lector de microplacas MULTISKAN GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). El porcentaje de inhibición fue determinado mediante la Ecuación 3 (Rodríguez-Garza et al. 2023).

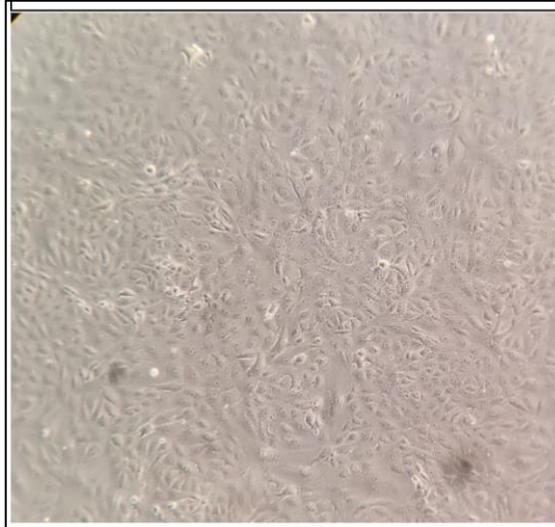


Figura 14. Análisis de la viabilidad y confluencia del cultivo de la línea celular Vero. Observado mediante un microscopio invertido con un aumento de 10x, donde se pueden observar detalles importantes sobre la morfología y el estado de las células.

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento celular} = 100 - \left( \frac{DO_{570} \text{ Células con tratamiento}}{DO_{570} \text{ Células sin tratamiento}} \times 100 \right)$$

Ecuación 3. Fórmula para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento celular.

Los resultados se expresaron como la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) con un 95% de confianza.

### 6.3.7 Determinación del índice de selectividad (IS)

El índice de selectividad de las particiones se calculó a través de la relación entre la  $CC_{50}$  y la  $CI_{50}$  obtenida para el microorganismo (*T. vaginalis*). Se empleó la Ecuación 4 (Rodríguez-Garza et al. 2021):

$$\text{Índice de selectividad} = \frac{CC_{50} \text{ Citotóxica}}{CI_{50} \text{ Tricomónica}}$$

Ecuación 4. Fórmula para calcular el índice de selectividad.

## 6.4 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media de la desviación estándar ( $\pm$  SEM). El análisis de varianza de una vía (ANOVA) se utilizó para calcular la significancia estadística de los extractos y fracciones a varias concentraciones; después se empleó la comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey (post-Hoc) ( $P \leq 0.05$ ). La determinación de las  $CI_{50}$  y  $CC_{50}$  se realizó empleando análisis Probit con un intervalo de confianza del 95 %. Los análisis se realizaron con el paquete GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU).

## 7. RESULTADOS

**7.1 Objetivo 1: Obtener los extractos metanólicos de *Agave lechuguilla*, *Buddleja scordioides* y *Persea americana*, seleccionar los de mayor actividad inhibitoria en la cepa susceptible de *T. vaginalis* y evaluar su efectividad en la cepa resistente a metronidazol.**

### 7.1.1 Porcentaje de rendimiento de los extractos crudos metanólicos

La planta que presentó el mayor rendimiento fue *P. americana* var. *drymorfolia* (34.11 %), seguida por *B. scordioides* (30.5 %) y *A. lechuguilla* (25 %) (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimiento de los extractos metanólicos obtenidos.

Planta	Municipio de colecta	Solvente	Parte empleada	Rendimiento (%)
<i>A. lechuguilla</i>	García	MeOH	A	25
<i>B. scordioides</i>	Rayones		H y PA	30.50
<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Rayones		E	34.11

MeOH: metanol, A: Aérea, H: hoja, PA: Parte aérea, E: exocarpio (cáscara).

### 7.1.2 Actividad tricomonocida de los extractos metanólicos crudos de *A. lechuguilla*, *B. scordioides* y *P. americana* var. *drymifolia*

La evaluación de la actividad biológica de los extractos metanólicos crudos de las tres plantas medicinales se realizó a una concentración de 150 µg/mL. A través de este análisis, se observó que *A. lechuguilla* no presentó actividad significativa contra la cepa TV-S-MTZ, por lo que fue descartada para su análisis contra TV-R-MTZ. En contraste, *B. scordioides* y *P. americana* var. *drymifolia* mostraron una mayor actividad tricomonocida contra TV-S-MTZ, con un 74.74 % y 97.20 % respectivamente. Por lo tanto, fueron seleccionadas para continuar con su evaluación en TV-R-MTZ, donde se obtuvieron

porcentajes de inhibición más bajos. En el caso de *P. americana* var. *drymorfolia*, la actividad fue del 73.14 %, mientras que en *B. scordioides* fue del 57.23 % (Figura 15).

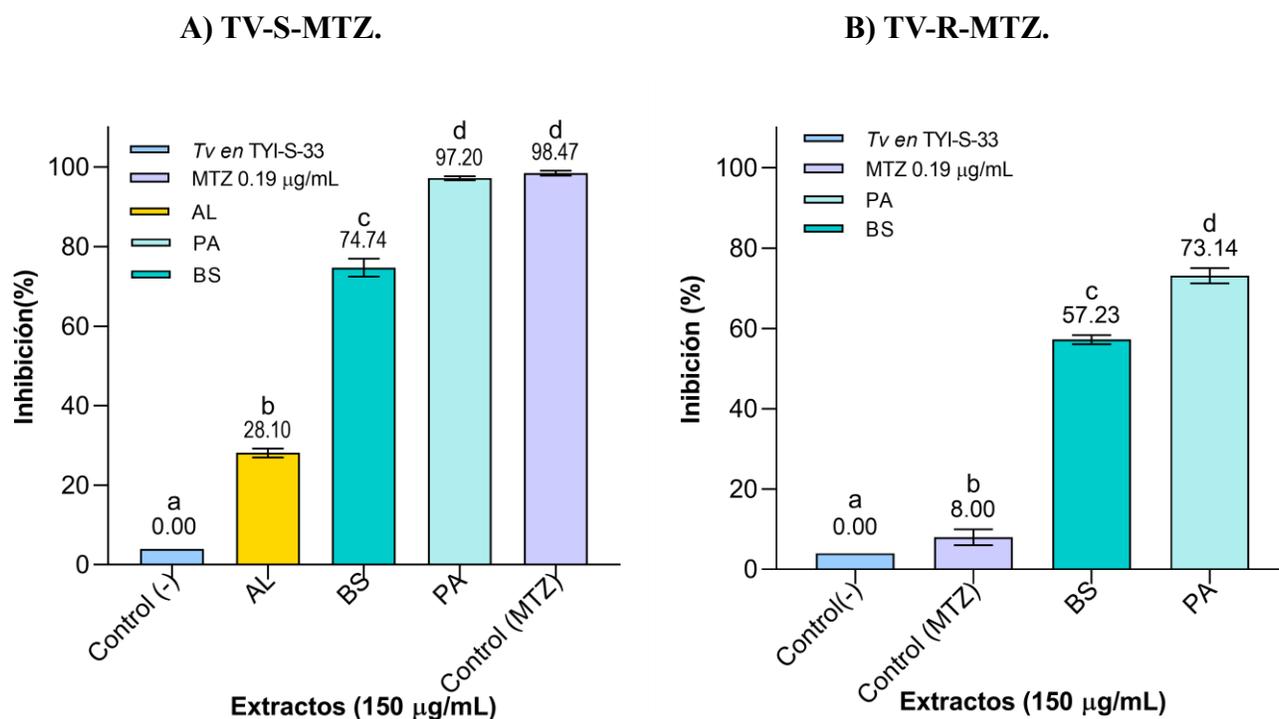


Figura 15. Actividad biológica de los extractos crudos metanólicos contra cepas de *T. vaginalis*. A) susceptible y B) resistente a metronidazol. Los datos son la media  $\pm$  SEM de los ensayos con tres replicas independientes. Resultados expresados en porcentaje de inhibición. Se utilizó metronidazol (MTZ) como control positivo y *T. vaginalis* (*Tv*) en medio TYI-S-33 como control negativo. AL: *A. lechuguilla*, BS: *B. scordioides* y PA: *P. americana*. <sup>a, b, c, d</sup> Diferencia significativa (alfa = 0.05).

## 7.2 Objetivo 2: Determinar la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de los extractos con mayor porcentaje de inhibición en la cepa susceptible, y posteriormente calcular la CI<sub>50</sub> de estos en la cepa resistente a metronidazol.

La determinación de la CI<sub>50</sub> (Tabla 5) se realizó en los extractos metanólicos crudos que presentaron la mayor actividad tricomonocida tanto para la cepa de TV-S-MTZ como para la cepa TV-R-MTZ: *B. scordioides* y *P. americana* var. *drymifolia*. En el caso de TV-S-MTZ, las CI<sub>50</sub> obtenidas respectivamente fueron de 87.24 y 35.91 µg/mL, respectivamente. Por otra parte, los resultados obtenidos contra TV-R-MTZ fueron: *B. scordioides* 144.9 µg/mL y *P. americana* var. *drymifolia* 57.76 µg/mL.

Tabla 5. CI<sub>50</sub> de los extractos metanólicos crudos para la cepa susceptible y resistente a MTZ.

Extracto crudo	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	
	TV-S-MTZ	TV-R-MTZ
<i>B. scordioides</i>	87.24 ± 1.016	144.9 ± 1.051
<i>P. americana</i>	35.91 ± 1.076	57.76 ± 1.011

CI<sub>50</sub> obtenida mediante regresión no lineal Probit. Los datos son la media ± SEM (error estándar de la media) del tratamiento por triplicado. TV-MTZ-S: *T. vaginalis* susceptible a metronidazol. TV-MTZ-R: *T. vaginalis* resistente a metronidazol.

### 7.3 Objetivo 3: Fraccionar mediante técnicas cromatográficas los extractos que muestren la mayor actividad inhibitoria contra *T. vaginalis* susceptible y evaluar su efectividad en la cepa resistente a metronidazol.

#### 7.3.1 Determinación de los porcentajes de rendimiento de las particiones obtenidas del extracto de *P. americana* var. *drymifolia*

Las particiones de *B. scordioides* con mayor rendimiento fueron la hidroalcohólica (0.943 g) y la de acetato de etilo (0.321 g), mientras que la partición de hexano (0.269 g) tuvo el menor rendimiento. En el caso de *P. americana* var. *drymifolia*, las particiones de hexano (1.054 g) e hidroalcohólica (0.913 g) obtuvieron el mayor rendimiento, mientras que la de acetato de etilo (0.233 g) mostró el menor rendimiento (Tabla 6).

#### 7.3.2 Evaluación de las particiones obtenidas de los extractos con mayor actividad tricomonocida

El fraccionamiento de los extractos crudos se realizó mediante dos etapas, la primera consistió en una extracción liquido-líquido denominada como particionamiento, esta extracción se realizó a los extractos metanólicos crudos con mayor actividad contra TV-S-MTZ y TV-R-MTZ: *B. scordioides* y *P. americana* var. *drymifolia*. En el caso de *B. scordioides* se observó que, al ser sometida a esta separación, sus particiones individuales (PHX: partición hexánica, PAE: partición de acetato de etilo y POH: partición

hidroalcohólica) presentaron una menor actividad tricomonocida en comparación por la exhibida por el extracto crudo, ya que las actividades obtenidas de sus particiones fueron: PHX (24.92%), PAE (28.04%) y POH (13.48%) contra TV-S-MTZ. Por lo cual no se procedió a realizar los bioensayos con TV-R-MTZ, por ende, en la Tabla 6 se citan como “No determinados” (ND).

Por otra parte, en *P. americana* var. *drymifolia*, se obtuvieron particiones con un porcentaje de inhibición de 88.48% (hexano) y 94.05% (acetato de etilo) frente a TV-S-MTZ. Por lo cual, se procedió a seguir con la evaluación contra TV-R-MTZ, los resultados mostraron menor actividad que los obtenidos con TV-S-MTZ: PHX exhibió un 27.25% mientras que PAE presentó un 61.32% (Tabla 6).

Tabla 6. Inhibición (%) y rendimiento de las particiones obtenidas de los extractos crudos metanólicos *B. scordioides* y *P. americana* var. *drymifolia* contra *T. vaginalis* susceptible y resistente a metronidazol.

Extracto crudo	Partición	Rendimiento (g)	Inhibición (%) 150 µg/mL	
			TV-S-MTZ	TV-R-MTZ
<i>P. americana</i>	PHX	1.054	88.48 <sup>a</sup>	27.25
	PAE	0.233	94.05 <sup>b</sup>	61.32
	POH	0.913	38.70 <sup>c</sup>	ND
<i>B. scordioides</i>	PHX	0.269	24.92 <sup>x</sup>	ND
	PAE	0.321	28.04 <sup>y</sup>	ND
	POH	0.943	13.48 <sup>z</sup>	ND

TV-MTZ-S: *T. vaginalis* susceptible a metronidazol. TV-MTZ-R: *T. vaginalis* resistente a metronidazol. PHX: Partición de hexano, PAE: Partición de acetato de etilo y POH: Partición hidroalcohólica. ND: No determinada. <sup>a, b, c, d, w, x, y, z</sup> Diferencia significativa (alfa = 0.05).

mediante cromatografía en columna fase normal a las particiones que presentaron mayor actividad tricomonocida contra TV-S-MTZ y TV-R-MTZ. De la partición de hexano de *P. americana* var. *drymifolia*, se obtuvieron 84 fracciones (Figura 16) que fueron analizadas

mediante la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) y agrupadas según su  $R_f$  y la similitud de su perfil químico, de estas se obtuvieron 8 fracciones colectivas hexánicas (FC1-8 HX) nombradas como FC1HX ( $R_f= 0.76$ ), FC2HX ( $R_f= 0.72$ ), FC3HX ( $R_f= 0.70$ ), FC4HX ( $R_f= 0.6$  y  $10.48$ ), FC5HX ( $R_f= 0.42$  y  $0.37$ ), FC6HX ( $R_f= 0.34$  y  $0.12$ ), FC7HX ( $R_f= 0.27$  y  $0.14$ ), FC8HX ( $R_f= 0.08$ ).

De la partición de acetato de etilo se obtuvieron 84 fracciones (Figura 17) que fueron agrupadas según su  $R_f$  y la similitud de su perfil químico, obteniendo seis fracciones colectivas (FC1-6 AE) nombradas como FC1AE ( $R_f= 0.77$ ), FC2AE ( $R_f= 0.68$ ), FC3AE ( $R_f= 0.44$ ), FC4AE ( $R_f= 0.32$ ), FC5AE ( $R_f= 0.06$ ), FC6AE ( $R_f= 0.01$ ). El resultado final de las fracciones colectivas y su análisis químico se detalla en la Figura 18.

### 7.3.3.1 Columna 1

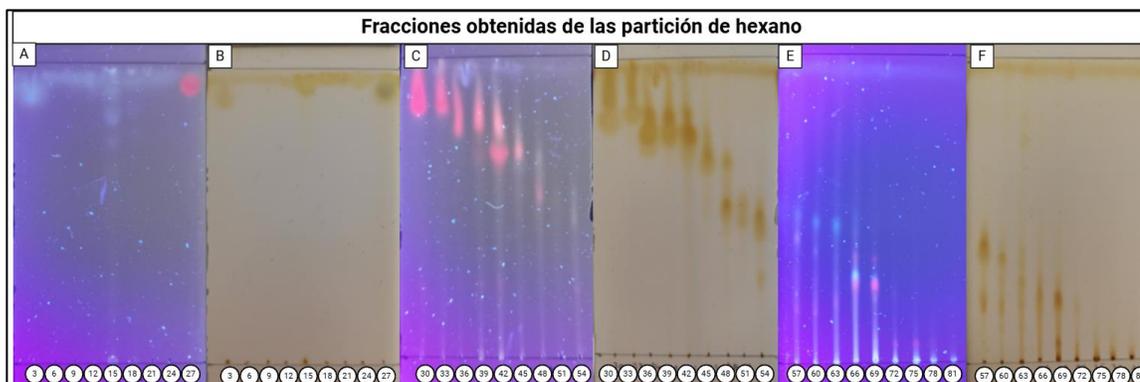


Figura 16. CCF de las fracciones columna 1. A), C) y E) Revelado en luz  $UV_{365nm}$ . B), D), F) Revelado en cámara de yodo. Eluyente: cloroformo/acetato de etilo (1:1). El análisis se llevó a cabo depositando muestras y evaluando las fracciones obtenidas cada tres unidades.

### 7.3.3.2 Columna 2

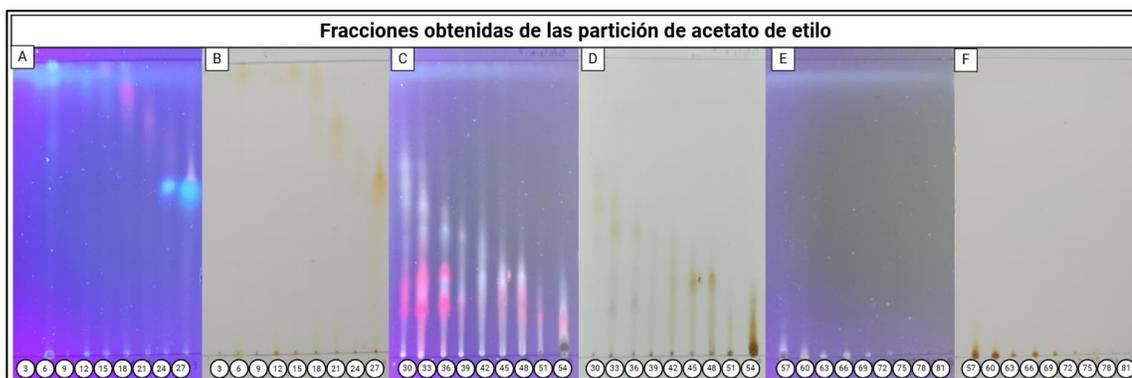


Figura 17. CCF de las fracciones columna 2. A), C) y E) Revelado en luz UV<sub>365nm</sub>. B), D), F) Revelado en cámara de yodo. Eluyente: cloroformo/acetato de etilo (1:1). El análisis se llevó a cabo depositando muestras y evaluando las fracciones obtenidas cada tres unidades.

### 7.3.3.3 Fracciones colectivas

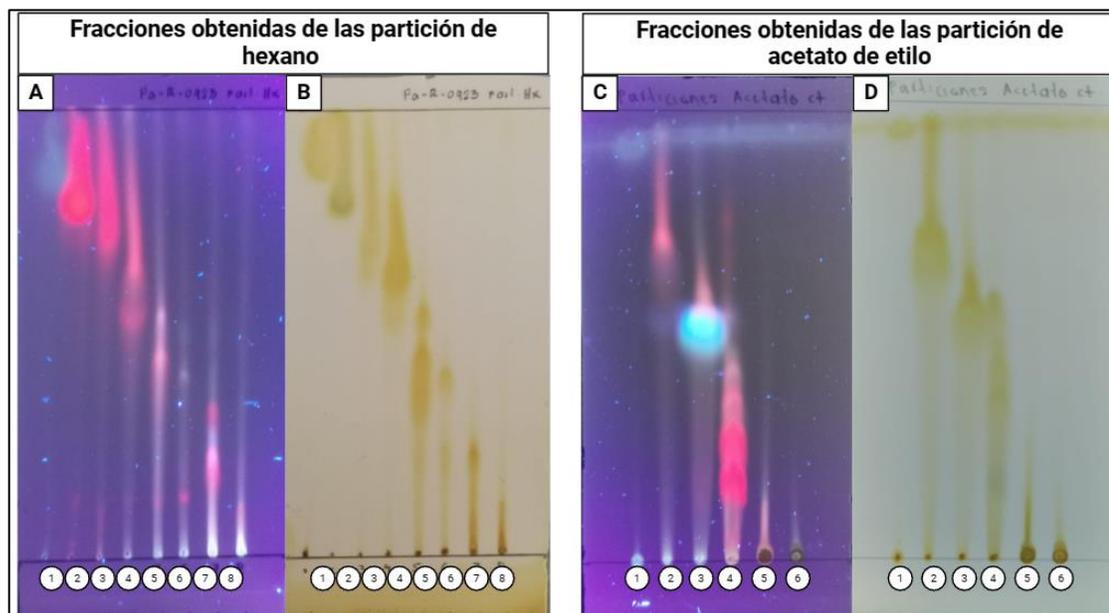


Figura 18. CCF de las fracciones colectivas. A) fracciones colectivas obtenidas de la partición de hexano reveladas en luz UV<sub>365nm</sub> y B) fracciones colectivas obtenidas de la partición de hexano reveladas mediante cámara de vapores de yodo. C) fracciones colectivas obtenidas de la partición de acetato de etilo reveladas en luz UV<sub>365nm</sub> y D) fracciones obtenidas de la partición de acetato de etilo reveladas mediante cámara de vapores de yodo. Eluyente: cloroformo/acetato de etilo (1:1).

#### **7.3.4 Determinación de los porcentajes de rendimiento de las fracciones obtenidas de las particiones de hexano y acetato de etilo de *P. americana* var. *drymifolia***

Las fracciones con mejor rendimiento obtenidas de la partición de hexano fueron FC2HX (0.543 g), FC4HX (0.201 g) y FC3HX (0.171 g), mientras que las demás fracciones presentaron rendimientos bajos. Por otro lado, en cuanto a las fracciones de la partición de acetato de etilo, las de mejor rendimiento fueron FC1AE (0.060 g) y FC5AE (0.038 g), mientras que las demás fracciones mostraron rendimientos menores (Tabla 7).

#### **7.3.5 Evaluación de las fracciones colectivas hexánicas y de acetato de etilo de *P. americana* var. *drymifolia***

La evaluación de las fracciones obtenidas de las particiones de hexano y acetato de etilo de *P. americana* var. *drymifolia* reveló que las fracciones con mayor actividad tricomónica contra TV-S-MTZ fueron: FC4HX (98.83 %), FC5HX (93.57 %), FC2AE (92.88 %) y FC4AE (96.14 %). Estas fracciones fueron seleccionadas para continuar con el análisis de la actividad tricomónica contra TV-R-MTZ, descartando aquellas que mostraron una actividad menor (ND). La evaluación de estas fracciones contra la cepa resistente demostró que las más efectivas contra los trofozoítos de TV-R-MTZ fueron FC4HX (89.06 %) y FC4AE (89.21 %) (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad tricomonocida y rendimientos de las fracciones colectivas obtenidas de las particiones de hexano y acetato de etilo obtenidas de *P. americana var. drymifolia* contra *T. vaginalis* susceptible y resistente a metronidazol.

Origen	Fracción colectiva	Rendimiento (g)	Inhibición (%) 150 µg/mL	
			TV-S-MTZ	TV-R-MTZ
Partición de hexano	FC1HX	0.021	7.3 <sup>a</sup>	ND
	FC2HX	0.543	21.18 <sup>b</sup>	ND
	FC3HX	0.171	24.52 <sup>bc</sup>	ND
	FC4HX	0.201	98.83 <sup>d</sup>	89.06
	FC5HX	0.042	93.57 <sup>d</sup>	77.90
	FC6HX	0.028	10.47 <sup>abe</sup>	ND
	FC7HX	0.040	8.55 <sup>ae</sup>	ND
	FC8HX	0.022	23.71 <sup>bc</sup>	ND
Partición de acetato de etilo	FC1AE	0.060	27.89 <sup>v</sup>	ND
	FC2AE	0.034	92.88 <sup>w</sup>	84.25
	FC3AE	0.031	59.87 <sup>x</sup>	ND
	FC4AE	0.034	96.14 <sup>w</sup>	89.21
	FC5AE	0.038	54.98 <sup>y</sup>	ND
	FC6AE	0.014	34.12 <sup>z</sup>	ND

TV-MTZ-S: *T. vaginalis* susceptible a metronidazol. TV-MTZ-R: *T. vaginalis* resistente a metronidazol.

ND: No determinada. FCHX: Fracción colectiva de hexano. FCAE fracción colectiva de acetato de etilo. <sup>a</sup>

<sup>b, c, d, e, v, w, x, y, z</sup> Diferencia significativa (alfa = 0.05).

**7.4 Objetivo 4: Determinar la CI<sub>50</sub> de las particiones y fracciones con mayor porcentaje de inhibición en la cepa susceptible, y posteriormente calcular la CI<sub>50</sub> de estas en la cepa resistente a metronidazol.**

**7.4.1 Determinación de la CI<sub>50</sub> de las particiones obtenidas del extracto metanólico crudo de *P. americana* var. *drymifolia* que presentaron la mayor actividad tricomonocida**

De las particiones obtenidas del extracto crudo metanólico de *P. americana* var. *drymifolia* identificadas con mayor porcentaje de inhibición contra TV-S-MTZ y TV-R-MTZ se calculó la CI<sub>50</sub>. La partición de hexano mostró una CI<sub>50</sub> de 47.36 µg/mL contra la cepa susceptible a metronidazol, sin embargo, debido a la significativa disminución en la actividad tricomonocida contra la cepa resistente (27.25 %), no se calculó su CI<sub>50</sub>. Por otro lado, la partición de acetato de etilo presentó una CI<sub>50</sub> de 31.09 µg/mL frente a la cepa susceptible, mientras que para la cepa resistente fue de 81.69 µg/mL (Tabla 8).

Tabla 8. CI<sub>50</sub> de las particiones obtenidas a partir del extracto crudo de *P. americana* var. *drymifolia* contra *T. vaginalis* susceptible y resistente a metronidazol.

Extracto crudo	Partición	TV-S-MTZ	TV-R-MTZ
		CI <sub>50</sub> (µg/mL)	
<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	PHX	47.36 ± 1.051	ND
	PAE	31.09 ± 1.035	81.69 ± 1.037
	POH	ND	ND

TV-MTZ-S: *T. vaginalis* susceptible a metronidazol. TV-MTZ-R: *T. vaginalis* resistente a metronidazol. PHX: Partición de hexano, PAE: Partición de acetato de etilo y POH: Partición hidroalcohólica. ND: No determinada. CI<sub>50</sub> obtenida mediante regresión no lineal Probit. Los datos son la media ± SEM del tratamiento por triplicado.

#### 7.4.2 Determinación de la CI<sub>50</sub> de las fracciones obtenidas de las particiones de hexano y acetato de etilo de *P. americana* var. *drymifolia* que presentaron la mayor actividad tricomonocida

Las fracciones identificadas con mayor actividad tricomonocida fueron FC4HX y FC4AE (Tabla 9), obteniendo una CI<sub>50</sub> de 31.44 y 30.25 µg/mL contra TV-S-MTZ y por otra parte contra TV-R-MTZ se obtuvo 54.46 y 47.23 µg/mL respectivamente.

Tabla 9. CI<sub>50</sub> de las fracciones colectivas obtenidas de las particiones de hexano y acetato de etilo contra *T. vaginalis* susceptible y resistente a metronidazol.

Fracción	TV-S-MTZ	TV-R-MTZ
	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	
FC4HX	31.44 ± 1.111	54.46 ± 1.109
FC4AE	30.25 ± 1.032	47.23 ± 1.035

CI<sub>50</sub> obtenida mediante regresión no lineal Probit. Los datos son la media ± SEM del tratamiento por triplicado. TV-MTZ-S: *T. vaginalis* susceptible a metronidazol. TV-MTZ-R: *T. vaginalis* resistente a metronidazol. ND: No determinada. FCHX: Fracción colectiva de hexano. FCAE fracción colectiva de acetato de etilo.

#### 7.5 Objetivo 5: Determinar la actividad citotóxica de las fracciones que presenten la mayor actividad inhibitoria contra la cepa de *T. vaginalis* susceptible y resistente a metronidazol en la línea celular Vero.

El análisis de citotoxicidad (Figura 19) se realizó a las fracciones que presentaron mayor actividad contra TV-S-MTZ y TV-R-MTZ (FC4HX y FC4AE). En la figura 20 se muestra un gráfico con el porcentaje de viabilidad celular obtenido correspondiente al tratamiento con las fracciones a diferentes concentraciones. La Tabla 10 muestra la CC<sub>50</sub> obtenida para cada una de las FC, así como el IS calculado para fracción colectiva y cepa.

FC4HX y FC4AE fueron clasificadas como citotóxicas para la línea celular Vero, aplicando el rango de citotoxicidad establecido por Osorio et al. (2007) y Ríos et al. (2008), quienes indican que los extractos se clasifican como: altamente citotóxicos ( $CC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ), citotóxicos ( $CC_{50} > 10 < 100 \mu\text{g/mL}$ ), moderadamente citotóxicos ( $CC_{50} > 100 < 1000 \mu\text{g/mL}$ ) y potencialmente no citotóxicos ( $CC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ ). Por otro lado, las fracciones fueron clasificadas como no selectivas en la línea celular sana, en este estudio frente a la línea Vero, debido a que presentaron un IS menor a 10 (Ríos et al. 2008).

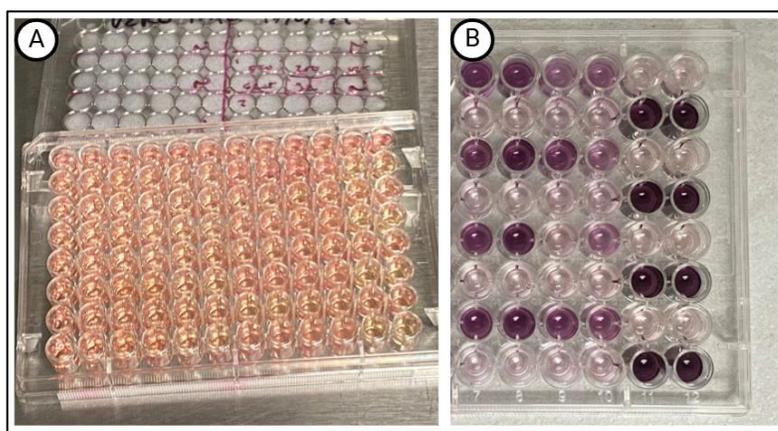


Figura 19. Evaluación de la actividad citotóxica sobre células Vero utilizando el método de MTT. A) Cultivo celular en medio D-MEM/F-12. B) Ensayo de citotoxicidad de la línea celular tratada con fracciones y añadido de MTT.

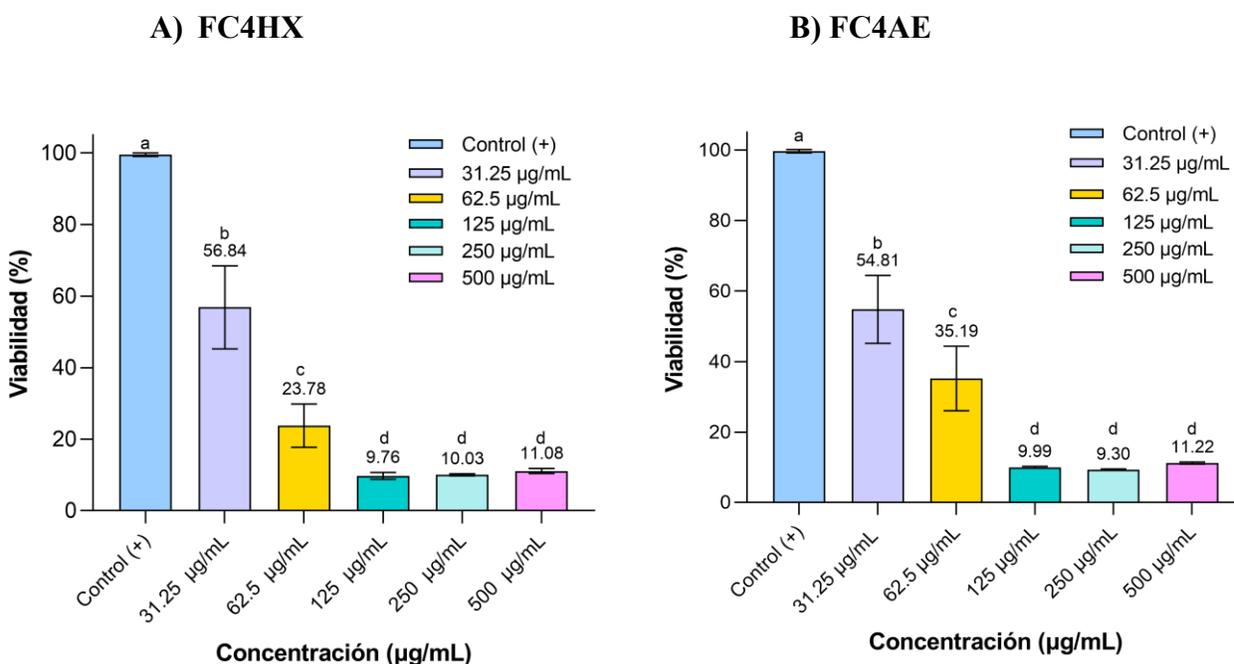


Figura 20. Viabilidad de la línea celular Vero. A) Tratadas con FC4HX y B) Tratadas con FC4AE. Los datos son la media  $\pm$  SEM de los ensayos por cuadruplicado. Resultados expresados en porcentaje de viabilidad. Se utilizó la línea celular vero sin tratamiento en medio DME-M/F-12 como control positivo. a, b, c, d Diferencia significativa (alfa = 0.05).

Tabla 10. Concentración citotóxica media ( $CC_{50}$ ) e índice de selectividad (IS) de las fracciones colectivas: FC4HX y FC4AE en línea celular Vero.

Fracción colectiva	$CC_{50}$ Línea Vero (µg/mL)	TV-S-MTZ	TV-R-MTZ
		IS	
FC4HX	$34.62 \pm 1.091$	1.10	0.63
FC4AE	$41.09 \pm 1.083$	1.35	0.86

$CC_{50}$  obtenida mediante regresión no lineal Probit. Los datos son la media  $\pm$  SEM de los tratamientos por duplicado. FC4HX: Fracción colectiva 4 obtenida de la partición de hexano. FC4AE: fracción colectiva 4 obtenida de la partición de acetato de etilo. TV-MTZ-S: *T. vaginalis* susceptible a metronidazol. TV-MTZ-R: *T. vaginalis* resistente a metronidazol.

**7.6 Objetivo 6: Caracterizar parcialmente la composición química de las fracciones con mayor actividad inhibitoria contra la cepa susceptible y resistente a metronidazol mediante pruebas fitoquímicas.**

**7.6.1 Caracterización Fitoquímica de la fracción colectiva cuatro obtenida de la partición de hexano (FC4HX)**

Los resultados de la evaluación del perfil fitoquímico de FC4HX evidenciaron la presencia de cumarinas, sesquiterpenos, dobles enlaces, triterpenos, carbohidratos y saponinas. Los resultados para la presencia o ausencia de cada compuesto se detallan en la Tabla 11 y los resultados visuales de las pruebas colorimétricas se muestran en la Figura 21.

**7.6.2 Caracterización Fitoquímica de la fracción colectiva cuatro obtenida de la partición de acetato de etilo (FC4AE)**

Los resultados de la evaluación del perfil fitoquímico de FC4AE evidenciaron la presencia de xantofilas, triterpenos, carbohidratos y saponinas. Los resultados para la presencia o ausencia de cada compuesto se detallan en la Tabla 11 y los resultados visuales de las pruebas colorimétricas se muestran en la Figura 22.

Tabla 11. Análisis fitoquímico de las fracciones con mayor actividad tricomonocida.

Prueba	Grupo de metabolitos	FC4HX	FC4AE
NaOH 10%	Cumarinas	+	-
Baljet	Sesquiterpenos	+	-
Beayer	Dobles enlaces	+	-
HCl	Xantofilas	-	+
Lieberman-Burchard	Esteroles	-	-
	Triterpenos	+	+
Shinoda	Flavonoides	-	-
Molisch	Carbohidratos/Saponinas	+	+

FC4HX: fracción colectiva hexánica 4. FC4AE: fracción colectiva 4 de acetato de etilo.

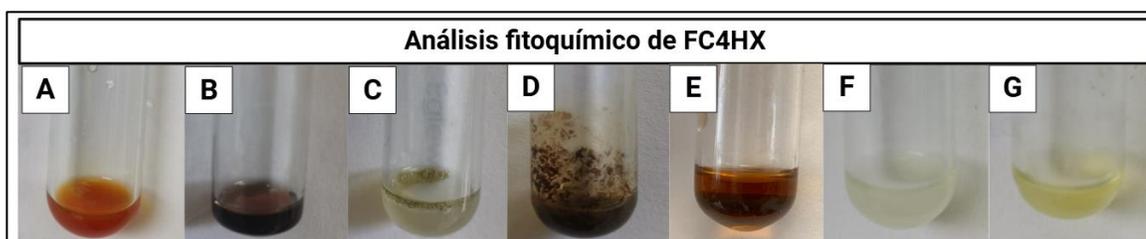


Figura 21. Resultado de las pruebas fitoquímicas de FC4HX. A) Baljet, B) Liebermann- Burchard, C) Shinoda, D) Beayer, E) Molisch, F) Xantofilas y G) Cumarinas.

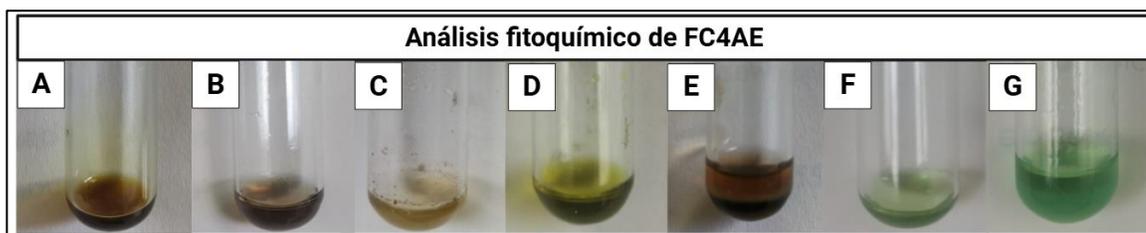


Figura 22. Resultado de las pruebas fitoquímicas de FC4AE. A) Baljet, B) Liebermann- Burchard, C) Shinoda, D) Beayer, E) Molisch, F) Xantofilas y G) Cumarinas.

## 8. DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó la actividad antiparasitaria de tres plantas colectadas en los municipios de García y Rayones del estado de Nuevo León, México: *A. lechuguilla*, *B. scordioides* y *P. americana* contra las cepas de *T. vaginalis* susceptible y resistente a metronidazol (TV-S-MTZ y TV-R-MTZ).

Mediante el análisis de los extractos metanólicos crudos, se identificaron dos plantas con actividad significativa contra la cepa de TV-S-MTZ: *B. scordioides* y *P. americana* var. *drymifolia*. Mismas que fueron seleccionadas para continuar con el proceso de aislamiento biodirigido. Por otro lado, la evaluación de *A. lechuguilla* mostró que esta planta no posee actividad significativa contra dicha cepa, por lo que fue descartada para continuar con el análisis de bioactividad y separación. El extracto metanólico crudo de *B. scordioides* no muestra actividad relevante contra TV-R-MTZ ya que fue obtenida una  $CI_{50}$  de 144.9  $\mu\text{g/mL}$ , sin embargo, contra TV-S-MTZ presentó una  $CI_{50}$  de 87.24  $\mu\text{g/mL}$ . La actividad biológica del extracto de *B. scordioides* no ha sido reportada contra *T. vaginalis*, sin embargo, en el estudio realizado por Debenedetti et al. (2002), se evaluó la actividad antiparasitaria del género *Buddleja* spp con otros parásitos como *Plasmodium falciparum* a partir de extractos metanólicos de las especies *B. globosa* y *B. tacumanensis* reportando una  $CI_{50}$  de 6.2 y 17.8  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Su  $CI_{50}$  fue menor a la reportada en este trabajo. Aunque la especie evaluada en esta investigación fue distinta, se puede destacar que existe diferencia en la actividad exhibida por distintas especies de un mismo género. Esto puede deberse a que la biosíntesis de metabolitos secundarios presentes en distintas poblaciones de una misma especie vegetal se produce generalmente en respuesta a las condiciones ambientales y factores de estrés. Algunos factores que ocasionan variaciones en los metabolitos de especies individuales de una misma planta se asocian a cambios fenológicos, adaptación y diferencias genéticas (Motta et al. 2019).

Del particionamiento de *B. scordioides*, se obtuvieron tres particiones hexano (24.92%), acetato de etilo (28.04%) e hidroalcohólica (13.48%). Estas particiones mostraron una pérdida significativa del porcentaje inhibitorio contra la TV-S-MTZ. Esto puede deberse a que la actividad de los extractos botánicos puede ser resultado de un efecto sinérgico, aditivo o antagonista de una mezcla de metabolitos y al fraccionar la mezcla se pierde la actividad

(Caesar y Cech 2019). Existen otras explicaciones para la disminución de la actividad biológica de los extractos, como la adsorción irreversible de los fitoquímicos a la empaquetadura de la columna (Qiu et al. 2013), por lo que se descartaron para continuar con el fraccionamiento dirigido por bioactividad.

El extracto metanólico crudo de *P. americana* var. *drymifolia* mostró la mejor actividad tricomonocida contra las cepas TV-S-MTZ y TV-R-MTZ, obteniendo una  $CI_{50}$  de 35.91 y 57.76  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente. La actividad tricomonocida de la cáscara de *P. americana* no ha sido reportada previamente. No obstante, Jiménez-Arellanes et al. (2013) reportaron actividad biológica contra *T. vaginalis* en los extractos clorofórmico y etanólico elaborados a partir de las semillas del fruto, con  $CI_{50}$  de 0.524 y 0.533  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente.

Con base en estos resultados, se decidió continuar con el particionamiento del extracto metanólico crudo de *P. americana* var. *drymifolia*, obteniéndose tres particiones. De las cuales, la partición de hexano y acetato de etilo presentaron la mayor actividad tricomonocida, con  $CI_{50}$  de 47.36 y 31.09  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, contra la cepa TV-S-MTZ. Al ser evaluadas con TV-R-MTZ, se observó una pérdida de la actividad en la partición de hexano, mientras que la partición de acetato disminuyó su actividad, obteniendo una  $CI_{50}$  de 81.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Estos datos evidencian que la actividad tricomonocida de *P. americana* se encuentra en los metabolitos de baja a mediana polaridad.

De las fracciones colectivas, se identificó actividad contra la cepa de TV-S-MTZ en dos de ellas: la FC4HX mostró una  $CI_{50}$  de 31.44  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que la FC4AE tuvo una  $CI_{50}$  de 30.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sin embargo, al ser evaluadas contra la cepa TV-R-MTZ, se observó una menor actividad inhibitoria. En el caso de FC4HX, se obtuvo una  $CI_{50}$  de 54.46  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y la FC4AE presentó una  $CI_{50}$  de 47.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

La evaluación de los rendimientos porcentuales de las particiones y fracciones obtenidas mostró que de las particiones obtenidas del extracto metanólico crudo de *B. scordioides* que presentaron mayor rendimiento fueron la partición hidroalcohólica (0.943 g) y la partición de acetato de etilo (0.321 g), la de menor rendimiento fue la partición de hexano (0.269 g). En el caso de las particiones del extracto metanólico crudo de *P. americana*, las particiones de mayor rendimiento fueron la de hexano (1.054 g), la hidroalcohólica (0.913 g) y la partición con menor rendimiento fue la partición de acetato de etilo (0.233 g). La extracción de fitoquímicos puede

verse afectada por diversos factores, como el tiempo, temperatura, polaridad del disolvente de extracción, la concentración y la técnica de aislamiento empleada. Estos factores tienen un efecto significativo en el rendimiento de la extracción de metabolitos secundarios y, simultáneamente, en la actividad de los extractos obtenidos. Del mismo modo, la naturaleza química de los fitoquímicos influye directamente en su extracción a partir de la materia vegetal, ya que dependen de la polaridad del solvente utilizado (Nawaz et al. 2020; Rafińska et al. 2019).

El análisis fitoquímico se realizó a las fracciones que exhibieron mayor actividad biológica (FC4HX y FC4AE) contra TV-S-MTZ y TV-R-MTZ. Las pruebas fitoquímicas realizadas en la FC4AE resultaron positivas para xantofilas, triterpenos, carbohidratos y saponinas. Por otro lado, la evaluación fitoquímica de la fracción FC4HX mostró resultados positivos para las pruebas de cumarinas, sesquiterpenos, dobles enlaces, carbohidratos, triterpenos y saponinas.

La presencia de cumarinas obtenida mediante este análisis concuerda con lo reportado por Chil-Núñez et al. (2019), quienes reportan la presencia de escopoletina de las hojas de *P. americana* Mill. Por otra parte, también se ha informado la presencia de furanocumarinas, como la isopimpinellina, así como hidroxycumarinas identificadas como esculina, cumarina, esculina y escopoletina en la cáscara del aguacate de variedades de caña, Hass y Wurtz (Lyu et al. 2023).

La prueba positiva a xantofilas se correlaciona con la presencia de carotenoides en la cáscara del fruto, reportada por Vinha et al. (2013). Los carbohidratos podrían deberse a la presencia de azúcares, previamente descritos en la cáscara del aguacate como manoheptulosa y perseitol (Bertling et al. 2007).

Los sesquiterpenos se han identificado en hojas y ramas del aguacate de variedad Meléndez (Niogret et al. 2013). Además, (Rahman et al. 2022) evaluaron los extractos metanólicos de cáscaras de aguacate *P. americana* Mill y reportaron la presencia de saponinas.

En cuanto a la actividad biológica, los grupos de compuestos identificados presentan reportes de actividad tricomonocida o antiparasitaria tal es el caso de Loyola et al. (2001) quienes aislaron diterpenoides y triterpenos con dicha actividad. Por otra parte, las saponinas han sido descritas como activas contra la viabilidad de los trofozoítos de *T. vaginalis* por Rocha et al. (2012). Las cumarinas han demostrado una potente actividad antileishmanial según Pierson et

al. (2010). De igual manera, Calzada et al. (2003) identificaron un derivado del ácido cumarínico denominado melilotoside con actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica* y *G. lamblia*.

Las fracciones colectivas FC4HX y FC4AE fueron clasificadas como citotóxicas para la línea celular Vero, aplicando los rangos de citotoxicidad establecidos por Osorio et al. (2007) y Ríos et al. (2008). Aunque las fracciones muestran citotoxicidad, presentan una  $CC_{50} > 200 \mu\text{M}$  contra la línea celular Vero. Al comparar este valor con el reportado en el estudio de Rocha-Garduño et al. (2020), donde se reporta una  $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$  para el metronidazol frente a la misma línea celular, se observa que las fracciones evaluadas en este estudio tienen menor citotoxicidad que el metronidazol.

Por otro lado, las fracciones fueron clasificadas como no selectivas en la línea celular Vero, debido a que presentan un IS menor a 10, clasificándose como tóxicos para las células. Puesto que, un índice de selectividad mayor a 10 sugiere que existe una mayor discriminación entre parásitos y células sanas, lo cual reduce la probabilidad de efectos adversos causados por el extracto (Ríos et al., 2008; Sánchez-Suárez et al. 2010). Para desarrollar fármacos antiparasitarios seguros y eficaces para humanos, es crucial evaluar tanto su eficacia como su toxicidad, debido a las similitudes bioquímicas y moleculares entre parásitos y células humanas. Al informar sobre la bioactividad *in vitro* de extractos de plantas, es fundamental considerar su biodisponibilidad y baja toxicidad para que un extracto sea considerado como un potencial fármaco. El IS es una herramienta clave que sirve como guía inicial para evaluar la citotoxicidad de un fármaco en parásitos y células humanas (Wink 2012).

Es importante destacar que la actividad tricomonocida observada contra la cepa de *Trichomonas vaginalis* resistente a metronidazol en este estudio representa uno de los primeros informes sobre la efectividad de las plantas evaluadas, cuyos metabolitos secundarios bioactivos han mostrado efectividad contra una cepa resistente a metronidazol.

## 9. CONCLUSIONES

Este estudio destaca la actividad tricomonocida de los extractos metanólicos crudos de las plantas *B. scordioides* y *P. americana* var. *drymifolia* contra la cepa de *Trichomonas vaginalis* susceptible a metronidazol. Dado que el estudio de las plantas medicinales se basa fundamentalmente en el aislamiento dirigido por la bioactividad de los metabolitos secundarios activos, se realizó un fraccionamiento biodirigido mediante una extracción líquido-líquido de los extractos metanólicos crudos más bioactivos. Sin embargo, solo las particiones de hexano y acetato de etilo obtenidas del extracto de *P. americana* var. *drymifolia* mostraron una actividad significativa contra las cepas susceptibles y resistentes a metronidazol. En el caso de *B. scordioides*, se observó una notable pérdida de actividad al particionar el extracto metanólico crudo, lo cual resalta la importancia de las interacciones entre fitoquímicos presentes en las plantas, que pueden potenciar la actividad biológica o actuar de manera sinérgica o antagónica entre sí.

A partir de estas particiones, se continuó con el fraccionamiento por cromatografía en columna, lo que permitió identificar que las fracciones FC4HX y FC4AE de *P. americana* var. *drymifolia* poseen la mayor actividad tricomonocida contra las cepas de *T. vaginalis* susceptibles y resistentes a metronidazol. No obstante, estas fracciones también mostraron citotoxicidad en células Vero y un bajo índice de selectividad. Sin embargo, la citotoxicidad del metronidazol es mayor que la obtenida en estas fracciones.

Además, el análisis fitoquímico permitió identificar presuntivamente la presencia de grupos de compuestos en las fracciones activas. Este estudio es notable por ser uno de los primeros reportes que documentan la actividad tricomonocida de plantas medicinales contra una cepa de *T. vaginalis* resistente a metronidazol, subrayando el potencial de las plantas analizadas como fuentes de nuevos tratamientos con potencial tricomonocida.

## 10. PERSPECTIVAS

- Dar continuidad al aislamiento biodirigido para la búsqueda y purificación de compuestos bioactivos: implementando técnicas avanzadas de separación, como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para aislar y purificar los compuestos más prometedores. Asimismo, realizar pruebas de estabilidad y reproducibilidad de la actividad tricomonocida en diferentes lotes de extractos para garantizar consistencia en los resultados.
- Realizar un análisis de los compuestos fitoquímicos presentes en las fracciones identificadas con mayor actividad tricomonocida mediante análisis espectroscópicos: métodos avanzados como RMN (resonancia magnética nuclear), espectrometría de masas (MS) e infrarrojo (IR), así como cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), para una identificación precisa de los compuestos bioactivos responsables de la actividad.
- Realizar pruebas de sinergismo y antagonismo de particiones y fracciones para identificar el comportamiento e interacción de los metabolitos presentes mediante estudios de interacción de compuestos como: isobogramas y análisis de dosis combinada para evaluar la sinergia o antagonismo entre los compuestos de las fracciones más activas. Esto permitirá determinar si los metabolitos presentes mejoran o reducen su efecto al interactuar entre sí.
- Ampliar el perfil de citotoxicidad de las fracciones identificadas con mayor actividad tricomonocida evaluando otras líneas celulares sanas. Expandir los estudios de citotoxicidad a una variedad más amplia de líneas celulares no cancerosas, para garantizar que los compuestos bioactivos sean seguros para células humanas sanas. Además, se pueden implementar marcadores de apoptosis y necrosis para estudiar en mayor detalle el mecanismo de toxicidad.
- Realizar evaluaciones *in vivo* en modelo murino para comprobar la efectividad y seguridad de los extractos para su uso farmacológico: Los estudios *in vivo* se complementarían con evaluaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas para entender mejor la biodisponibilidad, metabolismo y posibles efectos adversos de

los extractos. Del mismo modo es posible realizar estudios de dosis sub-crónicas y seguimiento a largo plazo para establecer un perfil de seguridad robusto.

- Continuar el análisis de los extractos que inicialmente no presentaron la mayor actividad tricomocida para corroborar si los resultados obtenidos se deben a concentraciones subóptimas o a la necesidad de combinar estos extractos con otros mediante pruebas de sinergismo y antagonismo. Esto permitirá explorar si algunos de los extractos menos bioactivos pueden mostrar efectos significativos bajo condiciones específicas o en combinación con otros compuestos bioactivos.

## 11.BIBLIOGRAFÍA

- Alajmi F, Al-Otaibi T, Al-Quraishy S, Al-Shaebi EM, Al-Hoshani N, Dkhil MA y Abdel-Gaber R. 2023. *Persea americana* extract protects intestinal tissue from *Eimeria papillata*-induced murine Infection. BMC veterinary research,19(1), 248
- Almaraz-Abarca N, González-Elizondo M. D. S, Campos M. D. G, Ávila-Sevilla ZE, Delgado-Alvarado EA y Ávila-Reyes JA. 2013. Variability of the foliar phenol profiles of the *Agave victoriae-reginae* complex (Agavaceae). Botanical Sciences,91(3), 295-306.s
- Aquino MFK, Hinderfeld AS y Simoes-Barbosa A. 2020. *Trichomonas vaginalis*. Trends in parasitology, 36(7), 646–647.
- Barboza J, Hilje L, Durón J, Cartín V, y Calvo M. 2010. Fagodisuasión de un extracto de ruda (*Ruta chalepensis*, Rutaceae) y sus particiones sobre larvas de *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae). Revista de Biología Tropical,58(1), 01-14.
- Barrón RL. 2016. Evaluación de la actividad microbiana y antifúngica de saponinas de la pulpa de *Agave lechuguilla* Torrey. CIATEJ. [accessed 15 Apr]. <http://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/533>.
- Bazaldúa-Rodríguez AF, Quintanilla-Licea R, Verde-Star MJ, Hernández-García ME, Vargas-Villarreal J y Garza-González JN. 2021. Furanocoumarins from *Ruta chalepensis* with amebicide activity. Molecules,26(12), 3684.
- Benítez-Benítez R, Sarria-Villa RA, Gallo-Corredor JA, Pacheco NOP, Sandoval JHÁ, Aristizabal CIG. 2020. Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. Revista Facultad de Ciencias Básicas,15(1):31-40.
- Bertling I, Tesfay S, Bower JP. 2007. Antioxidants in ‘Hass’ avocado. South African Avocado Growers’ Association; 30.
- Bhuyan DJ, Alsherbiny MA, Perera S, Low M, Basu A, Devi OA, Barooah MS, Li CG, y Papoutsis K. 2019. The Odyssey of Bioactive Compounds in Avocado (*Persea americana*) and Their Health Benefits. Antioxidants (Basel, Switzerland), 8(10), 426.
- Bolumburu C, Zamora V, Muñoz-Algarra M, Portero-Azorín F, Escario JA y Ibáñez-Escribano A. 2020. Trichomoniasis in a tertiary hospital of Madrid, Spain (2013-2017): prevalence

and pregnancy rate, coinfections, metronidazole resistance, and endosymbiosis. *Parasitology research*, 119(6), 1915–1923.

Cabrera Meléndez JL, y Silva Alarcón JT. 2021. Guía Técnica para la colecta de plantas medicinales. In *Guía técnica para la colecta de plantas medicinales*, pp. 17-17.

Caesar LK, Cech NB. 2019. Synergy and Antagonism in Natural Product Extracts: When 1 + 1 Does Not Equal 2. *Natural Product Reports* 36(6):869–88.

Calzada F, Velázquez C, Cedillo-Rivera R, Esquivel B. 2003. Antiprotozoal activity of the constituents of *Teloxys graveolens*. *Phytotherapy Research*. 17(7):731–732.

Carmona JE, Morales-Martínez TK, Mussatto SI, Castillo-Quiroz D y Ríos-González LJ. 2017. Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). *Revista mexicana de ciencias forestales*, 8(42), 100-122.

Cédric Y, Nadia NAC., Nfufu S, Azizi MA, Sandra TNJ y Payne VK. (2023). Nematocidal Activity of Ethanol and Aqueous Extracts of *Persea americana* Seeds against *Heligmosomoides polygyrus* using the Worm Microtracker Method. *Journal of Parasitology Research*, 2023(1), 9545565.

Cenkowski M, Wudel B, Baragar I y Poliquin V. 2021. Metronidazole-resistant trichomoniasis: Two Canadian cases. *Official Journal of the Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada*, 6(1), 63-68.

Centers for Disease Control and Prevention. 2020. CDC-DPDx-Trichomoniasis, [online]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>.

Ceruelos AH, Romero-Quezada LC, Ledezma JR y Contreras LL. 2019. Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23(1), 397-401.

Chil-Núñez I, Molina-Bertrán S, Ortiz-Zamora L, Dutok CMC, and Souto RNP1. 2019. ‘Artículo de Investigación Estado Del Arte de La Especie *Persea Americana* Mill (Aguacate)’. *Revista Amazonia Investiga* 8(21):73–86.

- Dalimi A, Payameni S. 2021. *Trichomonas Vaginalis* Infection in Men with High-Risk Sexual Behaviors. Iranian Journal of Parasitology, 16(3), 411.
- Debenedetti S, Muschietti L, Van Baren C, Clavin M, Broussalis A, Martino V, Steele J. (2002). In vitro antiplasmodial activity of extracts of Argentinian plants. Journal of ethnopharmacology, 80(2-3), 163-166.
- Departamento de Botánica. 2019. Herbario Nacional de México (MEXU). Instituto de Biología (IBUNAM), editor. Portal de Datos Abiertos UNAM. [accessed 2024]. <https://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:613019>.
- Dirección General de Epidemiología. 2024. Boletín Epidemiológico, [online]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/919475/sem21.pdf>.
- Domínguez X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. 1ª edición. LIMUSA.
- Edwards T, Burke P, Smalley H, Hobbs G. 2016. *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. Critical reviews in microbiology, 42(3), 406-417.
- Elizondo-Luevano JH., Verde-Star MJ, González-Horta A, Castro-Ríos R, Hernández-García ME, Chávez-Montes A. 2020. In vitro effect of methanolic extract of *Argemone mexicana* against *Trichomonas vaginalis*. The Korean Journal of Parasitology, 58(2), 135.
- Gomez-Flores R, Arzate-Quintana C, Quintanilla-Licea R, Tamez-Guerra P, Tamez-Guerra R, Monreal-Cuevas E, Rodríguez-Padilla C. 2008. Antimicrobial activity of *Persea americana* Mill (Lauraceae)(Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) leaf extracts and active fractions against *Mycobacterium tuberculosis*. American-Eurasian Journal of Scientific Research, 3(2), 188-194.
- González López HD, González Uribe DU. 2023. Biomass and fiber estimation of *Agave lechuguilla* Torr. at north of Zacatecas State. Revista mexicana de ciencias forestales, 14(75), 97-117.
- Graves KJ, Novak J, Secor WE, Kissinger PJ, Schwebke JR, Muzny CA. 2020. A systematic review of the literature on mechanisms of 5-nitroimidazole resistance in *Trichomonas vaginalis*. Parasitology, 147(13), 1383-1391.

- Graves KJ, Reily C, Tiwari HK, Srinivasasainagendra V, Secor WE, Novak J, Muzny CA. 2023. Identification of *Trichomonas vaginalis* 5-Nitroimidazole Resistance Targets. *Pathogens*, 12(5), 692.
- Gunn A. y Pitt SJ. 2022. *Parasitology: an integrated approach*. S.L.: Wiley-Blackwell.
- Gutiérrez-Díez A, Sánchez-González EI, Torres-Castillo JA, Cerda-Hurtado IM, Ojeda-Zacarias MDC. 2015. Genetic diversity of mexican avocado in Nuevo Leon, Mexico. *Molecular Approaches to Genetic Diversity*; Mahmut, Ç., Halil, K., Gül, CÖ, Birgul, O., Eds, 141-159.
- Hashemi N, Ommi D, Kheyri P, Khamesipour F, Setzer WN, Benchimol M. 2021. A review study on the anti-trichomonas activities of medicinal plants. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 15, 92-104.
- Hernández-Ceruelos A, Romero-Quezada LC, Ruvalcaba Ledezma JC, López Contreras L. 2019. Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 23(1):397–401.
- Hughes Y, Sawleshwarkar S. 2023. Global Epidemiology of Selected Sexually Transmitted Infections: An Overview. *Sexually Transmissible Oral Diseases*, 25-35.
- Jiménez-Arellanes A, Luna-Herrera J, Ruiz-Nicolás R, Cornejo-Garrido J, Tapia A, Yépez-Mulia L. 2013. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 1-5.
- Kissinger PJ, Gaydos CA, Seña AC, McClelland SR, Soper D, Secor WE, Muzny CA. 2022. Diagnosis and management of *Trichomonas vaginalis*: summary of evidence reviewed for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted infections treatment guidelines. *Clinical Infectious Diseases*, 74(Supplement\_2), S152-S161.
- Kumanan T, Sujanitha V, Sri Ranganathan S. 2021. Metronidazole for Amoebiasis: A tale of more than half a century. *Jaffna Medical Journal*. 33(1):6.
- Lala VG, Bobat B, Haagensen M, Kathan P, Mahomed A. 2021. Metronidazole-induced encephalopathy. *SA Journal of Radiology*, 25(1).

- Leitsch D. 2021. Recent advances in the molecular biology of the protist parasite *Trichomonas vaginalis*. Faculty Reviews, 10.
- López-Díaz JÓM, Méndez-González J, López-Serrano PM, Sánchez-Pérez FJ, Méndez-Encina FM, Mendieta-Oviedo R, Sosa-Díaz L, Flores A, García-Montiel E, Cambrón-Sandoval VH, Zermeño-González A, Corral Rivas JJ, et al. 2022. Dummy regression to predict dry fiber in *Agave lechuguilla* Torr. in two large-scale bioclimatic regions in Mexico. PloS one. 17(9).
- Loyola LA, Bórquez J, Morales G, Araya J, González J, Neira I, Sagua H, San-Martín A. 2001. Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichomonocidal activities. Phytochemistry. 56(2):177–180.
- Lyu X, Agar OT, Barrow CJ, Dunshea FR, Suleria HAR. 2023. Phenolic Compounds Profiling and Their Antioxidant Capacity in the Peel, Pulp, and Seed of Australian Grown Avocado. Antioxidants. 12(1):185.
- Mabaso N, Abbai NS. 2021. A review on *Trichomonas vaginalis* infections in women from Africa. Southern African Journal of Infectious Diseases, 36(1).
- Mabaso N, Tinarwo P, Abbai N. 2020 Oct 17. Lack of association between *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis in relation to metronidazole resistance. Parasitology Research.
- Macías-Cortés E, Gallegos-Infante JA, Rocha-Guzmán NE, Moreno-Jiménez MR, Cervantes-Cardoza V, Castillo-Herrera GA, González-Laredo RF. 2022. Antioxidant and anti-inflammatory polyphenols in ultrasound-assisted extracts from salvilla (*Buddleja scordioides* Kunth). Ultrasonics Sonochemistry. 83:105917.
- Macouzet-Pacheco MV, Estrada-Castillón E, Jiménez-Pérez J, Villarreal-Quintanilla JÁ, Herrera-Monsiváis MC. 2013. Plantas Medicinales de Miquihuana, Tamaulipas. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Marques-Silva M, Lisboa C, Gomes N, Rodrigues AG. 2021 Jul 26. *Trichomonas vaginalis* and growing concern over drug resistance: a systematic review. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.

- Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J, González-Salazar F, Palacios-Corona R, Said-Fernández S. 2008. A New Vial Microassay to Screen Antiprotozoal Drugs. *Pharmacology online*. 1:529–537.
- McConnaughey M. 2014. Life Cycle of Parasites. Reference Module in Biomedical Sciences, pp. 1–15.
- Mohammed N, Abdulwuhab M, Mohammed F. 2016. Antimalarial Activity of Crude Extract of *Buddleja Polystachya* Fresen (Buddlejaceae) Against *Plasmodium Berghei* in Mice. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 11(05):27–35.
- Molina-Garza ZJ, Bazaldúa-Rodríguez AF, Quintanilla-Licea R, Galaviz-Silva L. 2014. Anti-Trypanosoma cruzi activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. *Acta Tropica*. 136:14–18.
- Montes-Hernández S, Torre-Vizcaino JD de la, Heredia-García E, Hernández-Martínez M, Hernández MGC -. 2017. Caracterización morfológica de germoplasma de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*, LAURACEAE). *Interciencia*. 42(3):175–180.
- Montesinos-Peña NE, Hernández-Valencia M, Delgado-Enciso I, Herrera-Leal A, Paz-Michel BA, Montesinos-Peña NE, Hernández-Valencia M, Delgado-Enciso I, Herrera-Leal A, Paz-Michel BA. 2019. Evaluación de un gel antiséptico de aplicación intravaginal para pacientes con infecciones cervicovaginales multitratadas. *Ginecología y obstetricia de México*. 87(7):454–466.
- Morreeuw ZP, David Castillo Quiroz, Ríos-González LJ, Martínez-Rincón RO, Estrada N, Melchor-Martínez EM, Hafiz M.N. Iqbal, Parra-Saldívar R, Reyes AG. 2021. High Throughput Profiling of Flavonoid Abundance in *Agave lechuguilla* Residue-Valorizing under Explored Mexican Plant. *Plants*. 10(4):695–695.
- Motta EVS, Sampaio BL, Costa JC, Teixeira SP, Bastos JK. 2019. Quantitative analysis of phenolic metabolites in *Copaifera langsdorffii* leaves from plants of different geographic origins cultivated under the same environmental conditions. *Phytochemical Analysis*. 30(3):364–372.

- Muñoz-Ramírez A, López-Monteon A, Ramos-Ligonio A, Méndez-Bolaina E, Guapillo-Vargas MRB. 2018. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* and Human papillomavirus in female sex workers in Central Veracruz, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología*. 50(4):351–358.
- Nagel JL, Aronoff DM. 2015. Metronidazole. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. p. 350–357.
- Nawaz H, Shad MA, Rehman N, Andaleeb H, Ullah N, Nawaz H, Shad MA, Rehman N, Andaleeb H, Ullah N. 2020. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 56.
- Niogret J, Epsky ND, Schnell RJ, Boza EJ, Kendra PE, Heath RR. 2013. Terpenoid Variations within and among Half-Sibling Avocado Trees, *Persea americana* Mill. (Lauraceae). Peña L, editor. *PLoS ONE*. 8(9): e73601.
- Ochoa-Zarzosa A, Báez-Magaña M, Guzmán-Rodríguez JJ, Flores-Alvarez LJ, Lara-Márquez M, Zavala-Guerrero B, Salgado-Garciglia R, López-Gómez R, López-Meza JE. 2021. Bioactive Molecules From Native Mexican Avocado Fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*): A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 76(2):133–142.
- Osorio E, Arango GJ, Jiménez N, Alzate F, Ruiz G, Gutiérrez D, Paco MA, Giménez A, Robledo S. 2007. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 111(3):630–635.
- Parrado R. 2003. Empleo de metronidazol durante el primer trimestre de embarazo: revisión bibliográfica. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 54(1):43–46.
- Pierson J-T, Aurélien Dumètre, Hutter S, Delmas F, Michèle Laget, Jean-Pierre Finet, Azas N, Combes S. 2010. Synthesis and antiprotozoal activity of 4-arylcoumarins. *European journal of medicinal chemistry*. 45(3):864–869.
- Qiu F, Cai G, Jaki BU, Lankin DC, Franzblau SG, Pauli GF. 2013. Quantitative Purity–Activity Relationships of Natural Products: The Case of Anti-Tuberculosis Active Triterpenes from *Oplopanax horridus*. *Journal of Natural Products*. 76(3):413–419.

- Rafińska K, Pomastowski P, Rudnicka J, Krakowska A, Maruška A, Narkute M, Buszewski B. 2019. Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity of *Lepidium sativum* extracts. *Food Chemistry*, 289, 16–25.
- Rahman N, Sabang SM, Abdullah R, Bohari B. 2022. Antioxidant properties of the methanolic extract of avocado fruit peel (*Persea americana* Mill.) from Indonesia. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*. 13(3):166–170.
- Ramírez-Villalobos JM, Romo-Sáenz CI, Morán-Santibañez KS, Tamez-Guerra P, Quintanilla-Licea R, Orozco-Flores AA, Romero-Arguelles R, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C, Gomez-Flores R. 2021. In Vitro Tumor Cell Growth Inhibition Induced by *Lophocereus marginatus* (DC.) S. Arias and Terrazas Endophytic Fungi Extracts. *International journal of environmental research and public health/International journal of environmental research and public health*. 18(18):9917–9917.
- Rejšek J, Vrkoslav V, Vaikkinen A, Haapala M, Kauppila TJ, Kostianen R, Cvačka J. 2016. Thin-Layer Chromatography/Desorption Atmospheric Pressure Photoionization Orbitrap Mass Spectrometry of Lipids. *Analytical Chemistry*. 88(24):12279–12286.
- Ríos R YK, Otero J AC, Muñoz H DL, Echeverry R M, Robledo R SM, Yepes C MA. 2008. Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*. 37(2):200–211.
- Rocha TD, Brum P, Gnoatto SCB, Tasca T y Gosmann G. 2012. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from Quillaja, Passiflora, and Ilex species. 110(6):2551–2556.
- Rocha-Garduño G, Hernández-Martínez NA, Colín-Lozano B, Estrada-Soto S, Hernández-Núñez E, Prieto-Martínez FD, Medina-Franco JL, Chale-Dzul JB, Moo-Puc R, Navarrete-Vázquez G. 2020. Metronidazole and Secnidazole Carbamates: Synthesis, Antiprotozoal Activity, and Molecular Dynamics Studies. *Molecules*. 25(4):793.
- Rocha-Guzmán NE, Simental-Mendía LE, Barragán-Zúñiga LJ, Ramírez-España JC, J. Alberto Gallegos-Infante, Lujan-Mendoza CI, Gamboa-Gómez CI. 2018. Effect of *Buddleja scordioides* K. leaves infusion on lipid peroxidation in mice with ultraviolet light-induced oxidative stress. *Medicinal chemistry research*. 27(10):2379–2385.

- Rodríguez Garza NE. 2021. Identificación de compuestos activos de extractos de plantas de uso medicinal con actividad biológica contra *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de chagas. eprintsuanl.mx. [accessed 2024 Jun 23]. <http://eprints.uanl.mx/22166/>
- Rodriguez-Arzave JA. 1987. Manual de Bioquímica. 4ta ed. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rodríguez-Garza NE, Quintanilla-Licea R, Romo-Sáenz CI, Elizondo-Luevano JH, Tamez-Guerra P, Rodríguez-Padilla C, Gomez-Flores R. 2023. In Vitro Biological Activity and Lymphoma Cell Growth Inhibition by Selected Mexican Medicinal Plants. Life. 13(4):958–958.
- Ryu J-S, Min D-Y. 2006. *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis in the Republic of Korea. The Korean Journal of Parasitology. 44(2):101.
- Saito-Nakano Y, Umeki Y, Shimokawa C, Kobayashi K, Hashimoto K, Takada T, Makii C, Hasebe R, Yoshida Y, Nakajima R, et al. 2023. Prevalence and metronidazole resistance of *Trichomonas vaginalis* among Japanese women in 2021. IJID Regions. 7:130–135.
- Sánchez-Suárez J, Albarracín D, Rojas M, Rincón J, Robledo S, Muñoz DL, Oviedo JJ, Calderón MN, Fernández N, Delgado G. 2010. Evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y fracciones de *Piper cumanense* y *Piper holtonii*. Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas. 39(1):21–29.
- Sobel R, Sobel JD. 2015. Metronidazole for the treatment of vaginal infections. Expert Opinion on Pharmacotherapy. 16(7):1109–1115.
- Suleiman RL, Ralston KS. 2022. Growth and Genetic Manipulation of *Entamoeba histolytica*. Current protocols. 2(1).
- Sulyman ME, Kadir MA. 2021. Detection and comparison of size of *trichomonas vaginalis* in direct smear and culture media. World Bulletin of Public Health. 3:4–8.
- Torres Hernández ÁD. 2021. Aislamiento e identificación de sustancias bioactivas de *Haematoxylum brasiletto* (palo de Brasil) contra *Trypanosoma cruzi*, causante de la

enfermedad de chagas. eprintsuanl.mx. [accessed 2024 Jun 23].  
<http://eprints.uanl.mx/22895/>

- Van Gerwen OT y Muzny CA. 2019. Recent advances in the epidemiology, diagnosis, and management of *Trichomonas vaginalis* infection. *Research*, 8.
- Van Gerwen OT, Opsteen SA, Graves KJ y Muzny CA. 2023. Trichomoniasis. *Infectious Disease Clinics*, 37(2), 245-265.
- Villegas-Novoa C, Martha Rocío Moreno-Jiménez, Nuria Elizabeth Rocha-Guzmán. 2020. Infusión de la planta medicinal *Buddleja scordioides* Kunth utilizada para tratar la inflamación intestinal. *CienciaUAT*. 14(2):21–21.
- Vinha AF, Moreira J, Barreira SVP. 2013. Physicochemical Parameters, Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of the Algarvian Avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of Agricultural Science*. 5(12).
- Waleguele CC, Tchunte-Tchuenmogne MA, Fotsing-Fongang YS, Ngatchou J, Kezetas-Bankeu, JJ, Ngouela AS, Lent BN. 2021. Bioguided isolation of antiplasmodial secondary metabolites from *Persea americana* Mill. (Lauraceae). *Zeitschrift für Naturforschung C, A journal of biosciences*. 77(3-4):125–131.
- Wanderley de Souza. 2022. *Lifecycles of Pathogenic Protists in Humans*. Springer Nature.
- Wink M. 2012. Medicinal Plants: A Source of Anti-Parasitic Secondary Metabolites. *Molecules*. 17(11):12771–12791.
- World Health Organization: WHO. 2023. Trichomoniasis, [online]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trichomoniasis>.