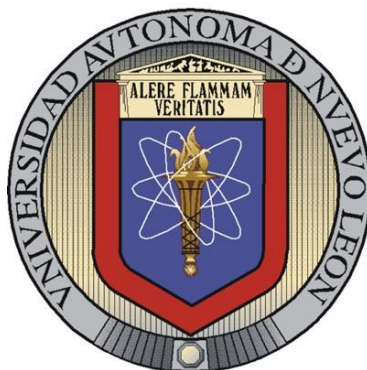


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
AMEBICIDA Y TRICOMONICIDA DE CUATRO PLANTAS CON USO
ETNOMEDICO EN EL SURESTE MEXICANO**

Por

MARIO ALBERTO HERNÁNDEZ TORRES

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN MANEJO Y APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE
RECURSOS BIÓTICOS**

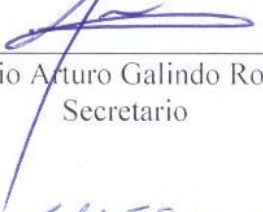
2025

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
AMEBICIDA Y TRICOMONICIDA DE CUATRO PLANTAS CON USO
ETNOMÉDICO EN EL SURESTE MEXICANO

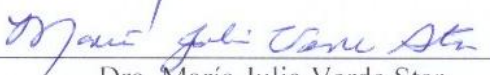
Comité de Tesis



Dr. José Ezequiel Viveros Valdez
Presidente



Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Secretario



Dra. María Julia Verde Star
Vocal



Dr. Jorge Luis Hernández Piñero
Vocal



Dra. Irma Edith Carranza Torres
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirección de Posgrado



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
 AMEBICIDA Y TRICOMONICIDA DE CUATRO PLANTAS CON USO
 ETNOMÉDICO EN EL SURESTE MEXICANO**

Dirección de Tesis



Dra. José Ezequiel Viveros Valdez
Director de tesis



Dra. Magda Elizabeth Hernández García
Director externo

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.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, agradezco por brindarme las herramientas y la formación necesaria para completar esta etapa académica.

Agradezco profundamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, México por el apoyo financiero brindado a través de la Beca Nacional, con clave: 2021-000018-02NACF (CVU 706423), la cual fue fundamental para la realización de mis estudios de posgrado.

A el Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González de la Universidad de la Laguna extendiendo mi gratitud por haberme recibido en sus instalaciones y proporcionarme el entorno propicio para enriquecer mi formación científica y desarrollar parte de esta investigación. En especial, al personal Investigador del laboratorio de “Marinos”

Mi agradecimiento a el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS por el suministro de materiales, recursos y cepas biológicas esenciales para la ejecución experimental de este trabajo. Su apoyo fue invaluable para la obtención de los resultados presentados en esta tesis.

Expreso mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, Dr. José Ezequiel Viveros Valdez, por su invaluable guía, compromiso y paciencia en cada etapa de este proyecto. Su orientación y confianza fueron determinantes para el desarrollo y conclusión de este trabajo.

A mis asesores, Dra. Magda Elizabeth Hernández García, Dra. Sara García Davis y Dra. Irma Edith Carranza Torres les agradezco profundamente sus aportes, sugerencias y apoyo durante la investigación. Su experiencia y conocimientos enriquecieron significativamente este estudio.

Asimismo, al comité de tesis, conformado por Dra. María Julia Verde Star, Dr. Jorge Luis Hernández Piñero y Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez, les expreso mi gratitud por su tiempo, dedicación y comentarios constructivos, que contribuyeron a mejorar la calidad de este trabajo.

Lilian Zenteno, gracias por la colecta de algunos especímenes.

A mi Gran Maestro Arzave, por enseñarme con paciencia y sabiduría, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de crecer a su lado. Gracias por cada consejo, por los días compartidos en el trabajo, por los viajes a los congresos y las experiencias que me han formado no solo como profesional, sino también como persona. Gracias por la amistad sincera, por celebrar conmigo los momentos felices y los cumpleaños, y por crear un espacio donde siempre me sentí valorado y apoyado. Su ejemplo ha sido guía, inspiración y motor en cada paso de mi camino.

A mi querida familia laboral: Martita, Noris, Lilian, Silvia y Rito, por su apoyo incondicional, los convivios, la confianza que siempre han depositado en mí y por acompañarme con cariño y paciencia a lo largo de toda mi carrera universitaria.

A mis amigos, por su compañía sincera, sus risas compartidas, su apoyo en los momentos difíciles y por ser parte de tantas experiencias que han hecho este camino más alegre y memorable. En especial, agradezco a Arturo Alan, por su paciencia, constancia, alegría y por siempre escucharme. Su apoyo y compañía han sido un verdadero regalo a lo largo de este camino.

Finalmente, y lo más importante, agradezco a Dios y a mi querida familia: a mis padres, hermanos y sobrinos, quienes han sido mi motor, mi refugio y mi inspiración en cada paso de este camino. Su amor, apoyo y confianza incondicional me han acompañado siempre, y gracias a ustedes he podido crecer y enfrentar cada desafío con fuerza y entusiasmo.

A todos, gracias.

DEDICATORIA

A las instituciones que han brindado su respaldo y confianza, permitiendo que esta investigación llegara a su término. Su compromiso con el desarrollo del conocimiento y la ciencia ha sido fundamental para alcanzar cada uno de los objetivos de este trabajo.

A los investigadores y colaboradores que, con su guía, experiencia y paciencia, enriquecieron este trabajo con sus conocimientos y aportaciones. Su experticia y compromiso han sido una fuente inagotable de aprendizaje e inspiración.

A la comunidad académica, que, con su espíritu crítico y su incansable búsqueda del saber, ha alimentado el rigor y la profundidad de esta investigación.

A mis amigos y a mi familia, quienes con su amor, apoyo y aliento inquebrantable me sostuvieron en cada desafío. Sin su compañía y palabras de ánimo, este camino habría sido aún más arduo.

A la sociedad que enfrenta día a día los efectos de las parasitosis, con la esperanza de que este trabajo contribuya al bienestar y la mejora de su calidad de vida.

Y, con profundo respeto y admiración, a los pueblos originarios, guardianes del conocimiento ancestral de la medicina tradicional, cuya sabiduría ha perdurado a través del tiempo, recordándonos que la ciencia y la tradición pueden caminar juntas en la búsqueda de la salud y el equilibrio.

ÍNDICE

	Pag.
Índice de figuras	XI
Índice de tablas	XIV
Símbolos y abreviaturas	XV
Resumen	XVII
Abstract	XVIII
Introducción	1
Antecedentes	3
Parasitosis intestinales y sexuales en salud humana y pecuaria...	3
Tratamiento contra la amebiasis y la tricomoniasis.....	9
Productos naturales y medicina tradicional frente a parasitosis...	10
Etnomedicina en el sureste mexicano.....	13
Plantas etnomedicinales en el sureste mexicano de interés antiparasitario.....	14
Arrayan (<i>Gaultheria odorata</i>).....	15
Cupapé (<i>Cordia dodecandra</i>).....	17
Chilchahua (<i>Tagetes nelsonii</i>).....	19
Guaya (<i>Talisia oliviformis</i>).....	21
Justificación	23
Hipótesis	24
Objetivo	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos.....	25
Metodología	26
Actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i>	26
Colecta de plantas medicinales y obtención de extractos orgánicos.....	26
Cultivo de trofozoítos parásitos.....	26
Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad antiprotozoaria de los extractos crudos.....	27

Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀).....	27
Análisis estadístico.....	28
Aislamiento de los compuestos con actividad antiprotozoaria a través de fraccionamiento quimiobiodirigido.....	29
Partición del extracto metanólico de <i>T. nelsonii</i> y <i>G. odorata</i>	29
Fraccionamiento quimiobiodirigido del extracto hexánico de <i>T. nelsonii</i> y <i>G. odorata</i>	29
Elucidación estructural de los compuestos aislados mediante Resonancia Magnética Nuclear.....	33
Actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i> de los compuestos aislados del extracto hexánico de <i>T. nelsonii</i> y <i>G. odorata</i>	34
Actividad biológica <i>in silico</i> de los compuestos aislados de <i>T. nelsonii</i> y <i>G. odorata</i> mediante acoplamiento molecular.....	34
Modelado molecular de las proteínas diana ASPK y PFOR.....	34
Obtención estructural y análisis de los ligandos (compuestos aislados).....	35
Predicción de la interacción proteína-ligando mediante acoplamiento molecular.....	35
Resultados.....	36
Actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i>	36
Rendimiento de extracción de la maceración de las plantas etnomedicinales.....	36
Actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i> de los extractos crudos de selectas plantas medicinales.....	36
Determinación de la concentración inhibitoria media de crecimiento (CI ₅₀) de los extractos crudos de selectas plantas medicinales.....	39
Aislamiento de los compuestos con actividad antiprotozoaria a través de fraccionamiento quimiobiodirigido.....	44

Partición y fraccionamiento quimiobiodirigido de los extractos de <i>T. nelsonii</i> y <i>G. odorata</i>	44
Elucidación estructural de los compuestos aislados mediante Resonancia Magnética Nuclear.	49
Análisis espectroscópico RMN del compuesto 1 de <i>T. nelsonii</i>	49
Análisis espectroscópico RMN del compuesto 2 de <i>T. nelsonii</i>	54
Análisis espectroscópico RMN del compuesto aislado de <i>G. odorata</i>	59
Actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i> de los compuestos aislados de <i>T. nelsonii</i> y <i>G. odorata</i>	64
Actividad antiprotozoaria <i>in silico</i> de los compuestos aislados de <i>T. nelsonii</i> y <i>G. odorata</i> mediante acoplamiento molecular.....	65
Modelado molecular de las proteínas diana ASPK y PFOR.	65
Acoplamiento molecular de los compuestos aislados de <i>T. nelsonii</i> y <i>G. odorata</i> con las proteínas ASPK y PFOR.....	67
Discusión.....	80
Conclusiones.....	92
Perspectivas.....	94
Bibliografía	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Pág.
1.	Ciclo Biológico de <i>Entamoeba histolytica</i> .	4
2.	Ciclo Biológico de <i>Trichomonas tenax</i> .	5
3.	Ciclo Biológico de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	6
4.	Ciclo Biológico de <i>Tritrichomonas foetus</i> .	8
5.	Mecanismo de acción antiprotozoaria del Metronidazol.	9
6.	Hojas y flor de <i>Gaultheria odorata</i> .	15
7.	Corteza, hojas, flor y fruto de <i>Cordia dodecandra</i> .	18
8.	Partes aéreas de <i>Tagetes nelsonii</i> .	19
9.	Flor, follaje y fruto de <i>Talisia oliviformis</i> .	21
10.	TLC-Fracciones del extracto hexánico de <i>T. nelsonii</i>	30
11.	Espectro de RMN-H ¹ (500 MHz) de las fracciones de TnH.	30
12.	TLC-Subfracciones 3 y 6 de TnH.	31
13.	TLC-Fracciones del extracto hexánico de <i>G. odorata</i> .	32
14.	TLC-Subfracciones derivadas de la fracción 2 de GoH.	32
15.	Espectro de RMN-H ¹ (600 MHz) de las subfracciones derivadas de la fracción 2 de GoH.	33
16.	Esquema de fraccionamiento quimiobiodirigido de <i>T. nelsonii</i> frente a <i>E. histolytica</i> .	45
17.	Esquema de fraccionamiento quimiobiodirigido de <i>T. nelsonii</i> frente a <i>T. vaginalis</i> .	46
18.	Esquema de fraccionamiento quimiobiodirigido de <i>G. odorata</i> frente a <i>E. histolytica</i> .	47
19.	Esquema de fraccionamiento quimiobiodirigido de <i>G. odorata</i> frente a <i>T. vaginalis</i> .	48
20.	Estructura y Espectro de RMN-H ¹ (600 MHz, CDCl ₃) del Compuesto 1 aislado del extracto hexánico de <i>T. nelsonii</i> .	51
21.	Espectro de RMN-C13 (151 MHz, CDCl ₃) del Compuesto 1 aislado del extracto hexánico de <i>T. nelsonii</i> .	52

22.	Espectro de HSQC del Compuesto 1 aislado del extracto hexánico de <i>T. nelsonii</i> .	53
23.	Estructura y Espectro de RMN-H1 (600 MHz, CDCl ₃) del Compuesto 2 aislado del extracto hexánico de <i>T. nelsonii</i> .	56
24.	Espectro de RMN-C13 (151 MHz, CDCl ₃) del Compuesto 2 aislado del extracto hexánico de <i>T. nelsonii</i> .	57
25.	Espectro de HSQC del Compuesto 2 aislado del extracto hexánico de <i>T. nelsonii</i> .	58
26.	Espectro de RMN-H1 (600 MHz, CDCl ₃) del Compuesto aislado del extracto hexánico de <i>G. odorata</i> .	61
27.	Espectro de RMN-C13 (151 MHz, CDCl ₃) del Compuesto aislado del extracto hexánico de <i>G. odorata</i> .	62
28.	Espectro de HSQC del Compuesto aislado del extracto hexánico de <i>G. odorata</i> .	63
29.	Estructura molecular modelo del dominio catalítico de ASPK de <i>E. histolytica</i> y su evaluación conformacional.	65
30.	Estructura molecular modelo de PFOR de <i>T. vaginalis</i> .	66
31.	Gráfico de Ramachandran para el modelo proteico PFOR de <i>T. vaginalis</i> .	67
32.	Centro de acoplamiento seleccionado del sitio activo del dominio catalítico de la proteína ASPK.	68
33.	Acoplamiento molecular ciego y dirigido entre ligando-ASPK.	70
34.	Interacciones hidrofóbicas en el acoplamiento molecular entre β -sitosterol y proteína ASPK.	71
35.	Contactos hidrofóbicos en el acoplamiento molecular entre β -sitosterol y proteína ASPK.	71
36.	Centro de acoplamiento seleccionado del sitio activo de la cadena A de la proteína PFOR.	72
37.	Acoplamiento molecular ciego entre ligando y PFOR.	73
38.	Interacciones en el acoplamiento molecular ligando-PFORa.	73
39.	Acoplamiento molecular entre Estigmasterol y PFORa por CB-DOCK.	74
40.	Interacciones en el acoplamiento molecular Betulina-PFOR.	76

41.	Contactos hidrofílicos e hidrófobos en el acoplamiento molecular entre Betulina y la proteína PFOR.	77
42.	Interacciones en el acoplamiento molecular Estigmasterol-PFOR.	78
43.	Contactos hidrófobos en el acoplamiento molecular entre Estigmasterol y la proteína PFOR.	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.		Pag.
1.	Recursos bióticos y productos naturales con potencial antiparasitario.	11
2.	Recursos herbarios colectados y rendimiento de extracción.	36
3.	Actividad antiprotozoaria in vitro de selectas plantas etnomedicinales del sureste mexicano.	38
4.	Actividad anti- <i>E. histolytica</i> de selectas plantas medicinales y sus extractos.	40
5.	Actividad anti- <i>T. vaginalis</i> de selectas plantas medicinales y sus extractos.	41
6.	Actividad anti- <i>T. tenax</i> de selectas plantas medicinales y sus extractos.	42
7.	Actividad anti- <i>T. fetus</i> de selectas plantas medicinales y sus extractos.	43
8.	Actividad antiprotozoaria de las particiones del extracto metanólico de <i>T. nelsonii</i> y <i>G. odorata</i> .	44
9.	Desplazamientos químicos de RMN-H ¹ y C ¹³ del compuesto 1 aislado de <i>T. nelsonii</i> .	50
10.	Desplazamientos químicos de RMN-H ¹ y C ¹³ del compuesto 2 aislado de <i>T. nelsonii</i> .	55
11.	Desplazamientos químicos de RMN-H ¹ y C ¹³ del compuesto aislado de <i>G. odorata</i> .	60
12.	Actividad antiprotozoaria in vitro de los compuestos aislados.	64
13.	Acoplamiento molecular semiflexible de los compuestos aislados frente a dominio catalítico ASPK de <i>E. histolytica</i> .	69
14.	Acoplamiento molecular semiflexible de los compuestos aislados frente a sitio catalítico PFOR de <i>T. vaginalis</i> .	75

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

δ	Desplazamiento químico
δ_H	Desplazamiento químico del protón
δ_c	Desplazamiento químico del carbono
Å	Angstrom
AceOEt	Acetato de Etilo
ANOVA	Análisis normal de varianza
C.C.	Cromatografía en columna
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Desviación estándar
Ext	Extracto
GoH	Extracto Hexánico de <i>Gaultheria odorata</i>
GoM	Extracto Metanólico de <i>Gaultheria odorata</i>
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple
HMBC	Correlación heteronuclear cuántica múltiple
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Hz	Hertzio
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
MeOH	Metanol
<i>n</i>-Hex	n-Hexano
ppm	Partes por millón
PFORa	Subunidad A de proteína PFOR
PSDCM	Partición soluble en Diclorometano
PISDCM	Partición insoluble en Diclorometano
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN-H¹	Resonancia magnética nuclear de protón 1
RMN-C¹³	Resonancia magnética nuclear de carbono 13

RMSD	Desviación cuadrática media
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TLC	Cromatografía de capa fina
TMS	Tetrametilsilano
TnH	Extracto Hexánico de <i>Tagetes nelsonii</i>
TnM	Extracto Metanólico de <i>Tagetes nelsonii</i>
UV	Luz ultravioleta

RESUMEN

El desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios es fundamental para la salud humana y animal, especialmente en países en desarrollo, donde enfermedades como la amebiasis y la tricomoniasis presentan alta morbilidad. La eficacia de las terapias convencionales se ve cada vez más comprometida debido a la aparición de cepas resistentes, lo que resalta la necesidad urgente de identificar y desarrollar nuevos compuestos con actividad antiparasitaria. Este trabajo tuvo como objetivo el aislamiento y elucidación de metabolitos con actividad antiprotozoaria a partir *Cordia dodecandra*, *Gaultheria odorata*, *Tagetes nelsonii* y *Talisia oliviformis*, plantas etnomedicinales del sureste de México. Partes aéreas de las plantas de estudio fueron colectadas en localidades de Chiapas, México durante el invierno del año 2021. Extractos metanólicos y hexánicos fueron obtenidos mediante maceración asistida con sonicación y su actividad antiprotozoaria (CI₅₀) fue determinada *in vitro* frente a trofozoítos de *E. histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax* y *Tritrichomonas foetus* mediante análisis de regresión Probit a partir de ensayos por triplicado e independientes. Metronidazol fue empleado como control positivo. Los extractos con mayor actividad fueron fraccionados mediante técnicas cromatográficas a través de un estudio quimiobiodirigido, la identidad de los metabolitos responsables de la actividad biológica fue determinada mediante resonancia magnética nuclear ¹H y ¹³C. Además, se evaluó la actividad biológica *in silico* de los compuestos a través de acoplamiento molecular con las proteínas diana Adenosil fosfosulfo quinasa (ASPK) de *E. histolytica* y Piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) de *Trichomonas spp.* Los ocho extractos orgánicos presentaron actividad antiprotozoaria, particularmente amebicida y variable propiedad tricomonicida, destacando los provenientes de *T. nelsonii* y *G. odorata*. El fraccionamiento quimiobiodirigido del extracto hexánico de *T. nelsonii* condujo al aislamiento de Betulina y Estigmasterol, mientras que β-sitosterol fue aislado del extracto no polar de *G. odorata* y presentó la mayor actividad biológica: anti-*E. histolytica* con CI₅₀ = 21.52 ± 2.22 µg/mL y anti-*T. vaginalis* con CI₅₀ = 33.87 ± 2.57 µg/mL. *T. foetus* se mostró menos sensible a los compuestos aislados presentando un porcentaje de inhibición de crecimiento celular menor a 30, a una concentración de 35 µg/mL. El análisis *in silico* reveló que Betulina y Estigmasterol se unen a sitios alostéricos de la enzima PFOR sugiriendo un mecanismo de inhibición modulador más que competitivo impactando negativamente en el metabolismo energético y la viabilidad celular. A pesar de que ninguno de los triterpenos mostró una interacción favorable con la proteína ASPK, su actividad antiprotozoaria revela la existencia de otro mecanismo de muerte celular. Estos hallazgos respaldan el valor del saber tradicional del sureste mexicano en el uso de recursos herbarios para combatir infecciones parasitarias en humanos y animales.

ABSTRACT

The development of new antiparasitic agents remains crucial for both human and animal health, particularly in developing countries where amoebiasis and trichomoniasis cause significant morbidity. The increasing resistance to conventional therapies underscores the urgent need for novel compounds with antiparasitic properties. This study aimed to isolate and characterize metabolites with antiprotozoal activity from *Cordia dodecandra*, *Gaultheria odorata*, *Tagetes nelsonii*, and *Talisia oliviformis*, ethnomedicinal plants native to southeastern Mexico. Aerial parts of the plants were collected in Chiapas during the winter of 2021. Methanolic and hexane extracts were obtained via sonication-assisted maceration, and their in vitro antiprotozoal activity (IC_{50}) was determined against trophozoites of *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax*, and *Tritrichomonas foetus* using probit regression analysis from triplicate independent assays, with metronidazole as the positive control. The most active extracts were fractionated using chromatographic techniques in a chemobioguided approach, and the active metabolites were identified by 1H and ^{13}C NMR spectroscopy. In silico molecular docking was performed to evaluate compound interactions with adenosyl phosphosulfate kinase (ASPK) from *E. histolytica* and pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFOR) from *Trichomonas* spp. All eight organic extracts exhibited antiprotozoal activity, particularly amoebicidal and trichomonacidal effects, with *T. nelsonii* and *G. odorata* showing the strongest activity. Chemobioguided fractionation of the *T. nelsonii* hexane extract led to the isolation of betulin and stigmasterol, while β -sitosterol was isolated from the non-polar extract of *G. odorata*, exhibiting the highest biological activity anti-*E. histolytica* ($IC_{50} = 21.52 \pm 2.22 \mu g/mL$) and anti-*T. vaginalis* ($IC_{50} = 33.87 \pm 2.57 \mu g/mL$). *T. foetus* was less susceptible, showing <30% inhibition at 35 $\mu g/mL$. Docking analysis suggested that betulin and stigmasterol bind to allosteric sites of the PFOR enzyme, indicating a modulatory inhibition mechanism that disrupts energy metabolism and cell viability. Although none of the triterpenes showed favorable interactions with ASPK, their antiprotozoal activity suggests alternative mechanisms of cell death. These results highlight the pharmacological potential of traditional medicinal plants from southeastern Mexico as promising sources of antiparasitic compounds.

INTRODUCCIÓN

Las parasitosis son enfermedades infecciosas de gran relevancia mundial que afectan a cerca de tres mil millones de personas y a numerosos animales domésticos y silvestres. Representan un grave problema sanitario y económico, especialmente en países en desarrollo donde son endémicas y una de las principales causas de muerte. Entre sus agentes causales destacan los protozoarios, patógenos unicelulares responsables de infecciones cutáneas, sanguíneas, gastrointestinales y sexuales en humanos y animales. (Werner 2014).

Las parasitosis gastrointestinales representan un importante problema de salud pública que afecta de manera significativa a comunidades indígenas de América Latina. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que entre el 20 y el 30 % de la población presenta algún tipo de parasitosis intestinal, lo que evidencia la persistencia de condiciones sanitarias deficientes, limitado acceso a servicios médicos y prácticas de higiene inadecuadas en estos entornos. (Navone et al. 2006). Los protozoos del género *Entamoeba*, especialmente *E. histolytica*, son los principales parásitos intestinales responsables de diarrea, disentería y amebiasis extraintestinal. Aunque la mortalidad por parasitosis gastrointestinal es baja, se estima que la amebiasis causa alrededor de 100 mil muertes anuales (Norhayati et al. 2003; Becerril 2019).

Dentro de las enfermedades de transmisión sexual, la tricomoniasis destaca por su elevada prevalencia y repercusiones clínicas. Esta infección es causada por el protozoo *Trichomonas vaginalis*, una de las principales causas de vaginitis, cervicitis y uretritis en mujeres. En los hombres, origina prostatitis, uretritis y diversos síndromes asociados al tracto genitourinario inferior, afectando así la salud reproductiva y la calidad de vida de ambos sexos (Soper 2004). Su control es importante, teniendo en cuenta la elevada incidencia de infecciones agudas, complicaciones y el papel que puede jugar en la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del papiloma humano (VPH), además de favorecer la coinfección con bacterias responsables de otras enfermedades de transmisión sexual (Guenthner et al. 2005). En los animales de interés

pecuario, *Tritrichomonas foetus* ocasiona tricomoniasis bovina, una infección venérea que afecta principalmente a las vacas. La enfermedad es cosmopolita, incrementándose en países ganaderos. El aborto, la producción de crías con bajo peso y el destete temprano, son secuelas de la parasitosis. La infección acarrea pérdidas económicas considerables debido a la disminución de la productividad, el incremento de los costos veterinarios y la necesidad de reposición frecuente de animales (Villarreal 2020).

En los últimos años, el interés científico y sanitario por las infecciones parasitarias que afectan tanto a humanos como a animales de importancia pecuaria ha aumentado considerablemente. Este incremento se atribuye, en gran medida, a factores como la migración, la creciente movilidad con fines recreativos y las deficiencias en las prácticas de higiene dentro del ámbito agropecuario, los cuales favorecen la diseminación y persistencia de diversos parásitos en diferentes entornos ecológicos y poblacionales. En las últimas décadas se ha reportado farmacorresistencia comprometida al metronidazol, principal fármaco convencional desde 1960 (Dunne et al. 2005). El fallo en el tratamiento de la tricomoniasis ha sido atribuido a: la baja absorción del fármaco, el incumplimiento del régimen terapéutico prescrito, la ocurrencia de reinfecciones y mecanismos moleculares de defensa desarrollados por el parásito. (Brunton et al. 2007; Sariego et al. 2011). Debido a esto, la búsqueda sistemática de nuevas y/o mejores terapias antiparasitarias es apremiante en el mundo, siendo la investigación de productos naturales de plantas, una de las estrategias tradicionales (Panda y Luyten 2018).

México cuenta con una notable diversidad vegetal, albergando alrededor de 30,000 especies, lo que representa cerca del 10 % de la flora mundial (Bucay y Haiat 2005). En el sureste del país se concentran más de 8,000 especies de plantas vasculares, muchas de las cuales se emplean en la medicina tradicional (Arias 1993). Aunque entre 15 y 20 millones de mexicanos recurren a este tipo de prácticas, más del 90 % de las especies herbarias aún no han sido estudiadas a fondo respecto a la actividad biológica de sus metabolitos (Estrada 2007). Por ello, se plantea evaluar la actividad antiprotozoaria de plantas etnomedicinales del sureste mexicano para identificar compuestos bioactivos que sirvan de base en el desarrollo de nuevas terapias antiparasitarias y respalden científicamente el conocimiento tradicional.

ANTECEDENTES

Parasitosis intestinales y sexuales en salud humana y pecuaria.

La amebiasis y tricomoniasis son patologías de distribución global, con una mayor prevalencia en países en desarrollo, donde constituyen una causa significativa de morbilidad. En contraste, en las naciones desarrolladas, su incidencia ha experimentado un aumento en las últimas décadas, atribuido principalmente al crecimiento de los viajes recreativos, los flujos migratorios y los procesos de adopción internacional. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (WHO), ha estimado 500 millones de personas con amebiasis y 156 millones con tricomoniasis alrededor del mundo (WHO 1997, 2021).

Entre las patologías por parásitos intestinales, la amebiasis forma parte de las principales causas de muerte en países de América Latina, África y Asia. Anualmente cerca de 50 millones de personas contraen la infección, de las cuales más del 90 % son individuos asintomáticos, lo que contribuye a su alta morbilidad y mortalidad en países con economías en crecimiento, ocurriendo hasta 100,000 decesos al año (Chacín 2013; Werner 2014).

La amebiasis es causada por el protozoo *Entamoeba histolytica*, la cual se transmite mediante mecanismo oral fecal, La forma infectiva, quistes maduros, se adquieren al ingerir alimentos, bebidas o al introducir a la boca manos o fómites contaminados con heces de personas parasitadas, figura 1. Además, se ha sugerido la transmisión del parásito a través de la práctica sexual oro-anal (Chacín 2013).

El trofozoíto de *E. histolytica* afecta principalmente el intestino grueso, aunque puede migrar a otros órganos, principalmente el hígado (Flores et al. 2018). La enfermedad cursa con diarrea aguda en niños o crónica en adultos, disentería, colitis fulminante y formación de amebomas en tejidos extraintestinales (Werner 2014).

Durante el año 2020, en México se reportaron 111,831 casos de amebiasis intestinal y un total de 540 casos con absceso hepático amebiano, siendo las entidades de Chiapas, Oaxaca y Veracruz, las regiones de mayor prevalencia (DGE 2020).

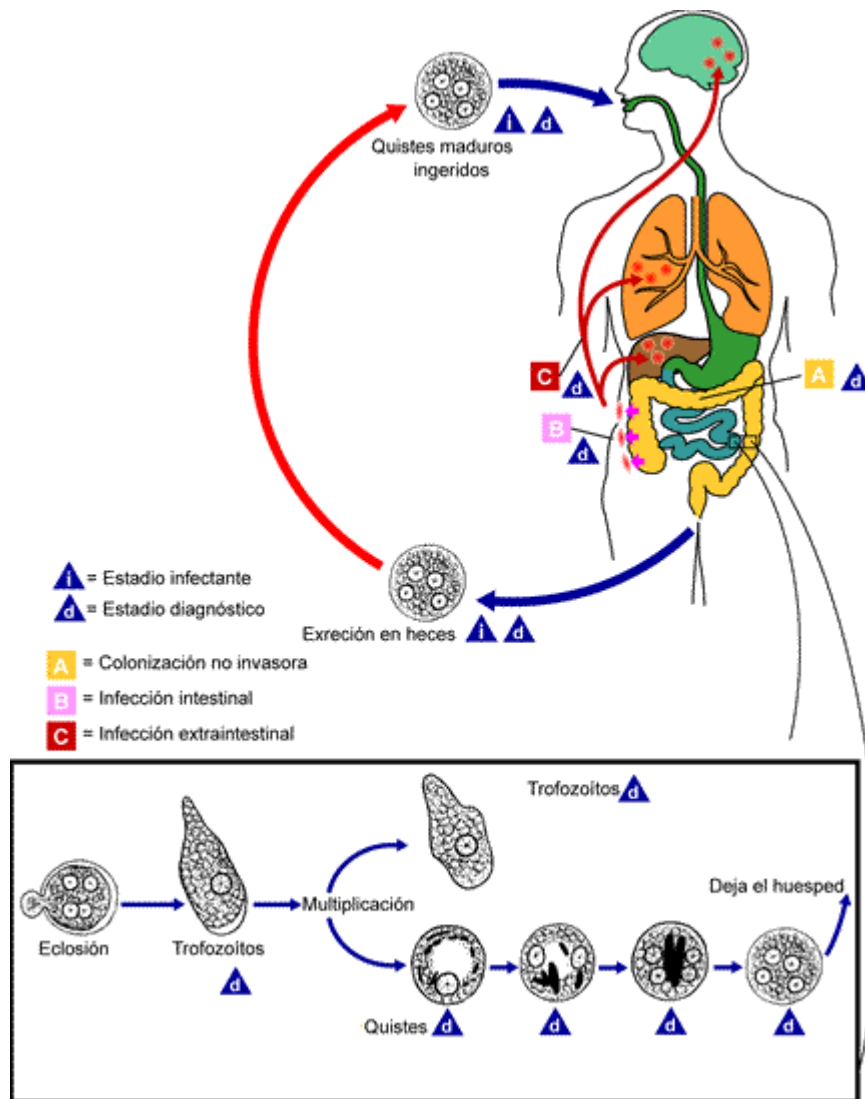


Figura 1. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*. (CDC, 2019).

Po otra parte, dentro del género *Trichomonas*, se encuentran tres especies parásitas del hombre, *T. homminis*, *T. tenax* y *T. vaginalis*. *T. homminis* es considerado un comensal del intestino grueso, sin embargo, ha sido referido como agente responsable de cuadros gastrointestinales diarreicos en infantes sobre todo en periodo de lactancia. Su mecanismo de transmisión suele ser fecalismo en donde el trofozoito quiescente es ingerido a través del consumo de alimentos amortiguados por el pH de la leche, tales como atoles o papillas (Becerril 2019).

En cuanto a *T. tenax*, su hábitat es la cavidad oral, específicamente el tejido gingival, pero puede encontrarse a lo largo del tracto gastrointestinal y en otros tejidos. Es un parásito inocuo cosmopolita de humanos, perros y gatos (Issa 2014). Las infecciones en individuos sanos son poco frecuentes encontrándose principalmente en pacientes inmunosuprimidos. Además, se presume juega un rol importante en la degradación e inflamación del tejido periodontal sin embargo los mecanismos patológicos no son contundentes (Dybicz et al. 2018; Bisson et al. 2019).

Los trofozoítos de *T. tenax* se transmiten de manera directa a través del contacto oral o mediante fómites como los utensilios para comer, incluso a través de agua contaminada, figura 2. Su colonización se incrementa en personas de edad adulta y la mala higiene bucal principalmente en personas con manifestaciones de enfermedad periodontal con una prevalencia de hasta el 50% de la población (Pereyra y Pérez 2003; Acurero et al. 2009).

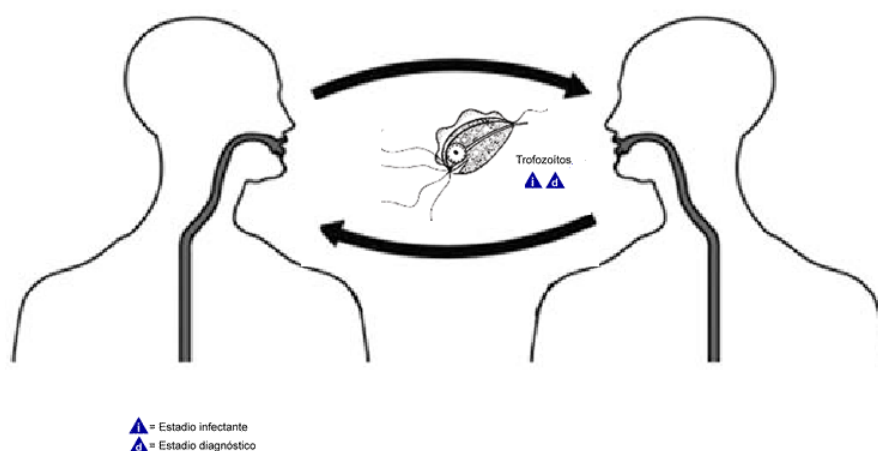


Figura 2. Ciclo biológico de *Trichomonas tenax*.

T. tenax era considerado como no patógeno hasta el año 1867 en que se confirmó su invasión en el tracto respiratorio. A la fecha, se han registrado casos de invasión a otros tejidos como pulmones, glándula submaxilar, nódulo linfático vertical con diagnósticos de neumonía, bronquitis, absceso pulmonar, fibrosis pulmonar, empiema y meningitis (Issa 2014; Becerril 2019).

Por otro lado, la tricomoniasis por *T. vaginalis* es la única enfermedad de transmisión sexual por protozoarios en humanos. Por su bajo índice de letalidad, es considerada una enfermedad desatendida que causa más de 270 millones de infecciones alrededor del mundo (Ibáñez y Gómez 2017; González et al. 2018).

La parasitosis sexual afecta a hombres y mujeres, sin embargo, tiene una alta prevalencia en mujeres de mediana edad y en etapa sexualmente activa. En la mayoría de los casos, la enfermedad no presenta síntomas, especialmente en los hombres, lo que favorece su alta tasa de propagación y morbilidad (Arroyo 2017; Muñoz et al. 2017).

La infección es ocasionada directamente por el protozoario *T. vaginalis* que habita en las vías genitourinarias del humano, único hospedero, figura 3. La transmisión es propiamente sexual a excepción de la vía vertical perinatal por la cual se han reportado casos de infección genitourinaria o neumonía neonatal, Además, en personas con practica sexual oral, se ha encontrado el parásito en vías respiratorias bajas (Santos 2013; Arroyo 2017).

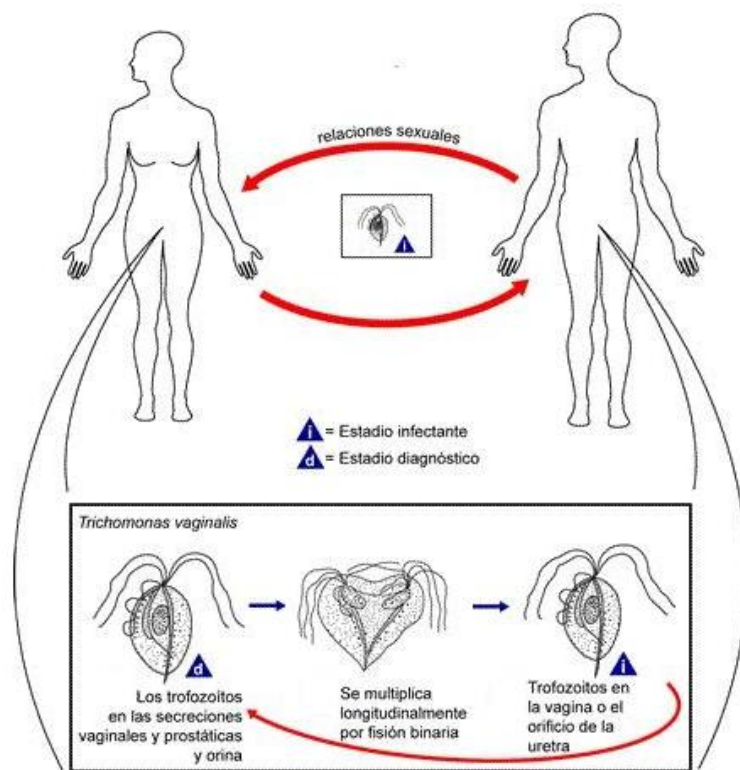


Figura 3. Ciclo biológico de *Trichomonas vaginalis*. (CDC 2019)

T. vaginalis coloniza la vagina, cuello uterino, uretra y próstata en cuyas condiciones adversas ocasiona infección crónica curable pero que puede comprometer la fertilidad y el parto prematuro (Arroyo 2017). La infección se manifiesta con inflamación de la zona afectada, descamación, secreción maloliente, prurito, dolor hipogástrico y molestias durante la micción urinaria (Cancelo et al. 2005).

La tricomoniasis vaginal es preocupante por su asociación con infecciones como VPH, VIH, herpes, gonorrea, clamidiasis y por aumentar el riesgo de cáncer cervicouterino. (Muñoz 2017; Núñez 2020)

En el año 2019, se reportaron poco más de 38,000 casos de tricomoniasis urogenital en México. Durante el año 2020, se reportó un descenso de casos, en total de 22,717 de los cuales el 95 % fueron pacientes femeninos. Los estados con mayor reporte de tricomoniasis fueron Puebla con 3403 casos, seguido por Veracruz y Chiapas con 3250 y 1659 casos, respectivamente (Barón 2020; DGE 2020).

Por otra parte, en los animales domésticos de interés pecuario, existe la parasitosis sexual tricomoniasis bovina, la cual es causada por el protozoo *Tritrichomonas foetus*. *T. foetus* es un parásito que coloniza el sistema reproductivo de vacas y tracto gastrointestinal de gatos, aunque puede encontrarse en diferentes hospederos como comensal, especialmente en los cerdos (Dabrowska et al. 2019).

T. foetus es un parásito distribuido a nivel mundial, encontrándose en países con sistema de producción ganadera, en áreas donde la práctica de reproducción bovina es natural, regiones de Asia, Australia, España, el sur de África, EUA y América latina. El trofozoíto está presente en las secreciones del pene y mucosa de la cavidad prepucial de toros, así como en la vagina de la vaca, quien lo adquiere durante el coito, las vacas preñadas pueden transmitir el parásito vía vertical mientras que la infección mecánica por inseminación artificial también es posible, figura 4. La existencia de solo un toro semental portador asintomático puede ocasionar tricomoniasis bovina hasta en un 95 % de la población pecuaria (Rojo et al. 2014; Ginter et al. 2018).

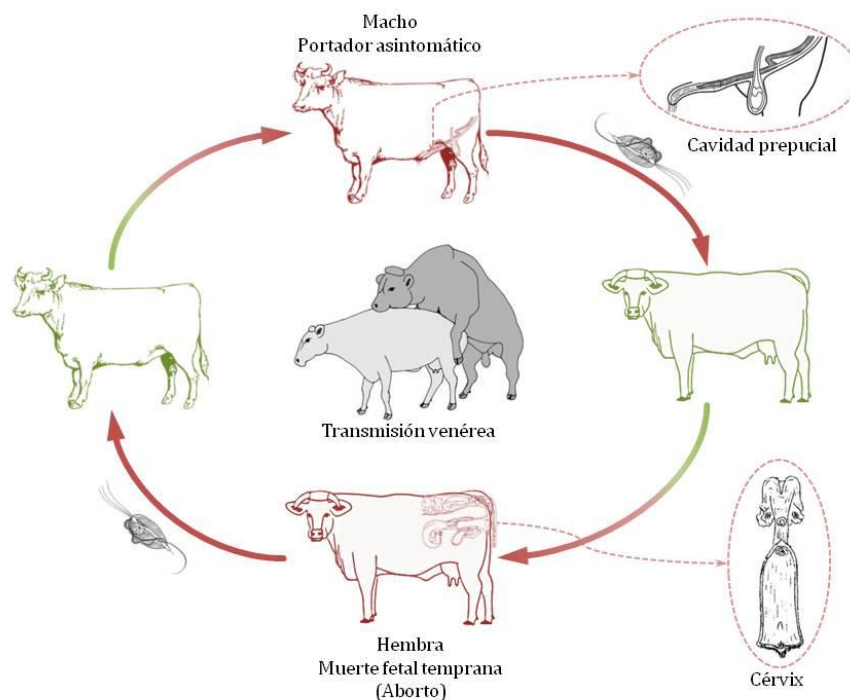


Figura 4. Ciclo biológico de *Tritrichomonas foetus* (Rojo et al. 2014).

La tricomoniasis bovina es una de las principales causas de infertilidad temporal y permanente, aborto prematuro y destete temprano. Las hembras presentan vaginitis y endometriosis mientras que, en los machos la infección puede limitarse a lesiones nodulares purulentas, en su mayoría sin sintomatología aparente (Islam et al. 2017).

Las pérdidas económicas pecuarias por tricomoniasis bovina son severas, tan solo EUA se calcula un decremento de 650 millones de dólares al año. En México, las infecciones reproductivas siguen siendo un importante problema zoonosanitario en el ganado bovino, cuya prevalencia y pérdidas económicas aún no se han cuantificado con certeza. Un estudio realizado en el año 2017 en el sector ganadero de Chihuahua, México se encontró una prevalencia del 23% con 171 bovinos infectados. Durante el año 2020 Villarreal informó la prevalencia y asociación de la tricomoniasis felina y del ganado en el centro de Veracruz, México encontrando una prevalencia del 36% en vacas, 14% en toros y 37 % en gatos y una relación entre la tricomoniasis felina y bovina sin embargo dicha asociación no es significativa estadísticamente (Ramírez et al. 2017; Villarreal 2020).

Tratamiento contra la Amebiasis y la Tricomoniasis.

Comúnmente, tanto la amebiasis como la tricomoniasis son tratadas con fármacos 5-nitroimidazoles, siendo el metronidazol el más empleado alrededor del mundo. Los 5-nitroimidazoles pertenecen al grupo de profármacos nitroheterocíclicos con amplio espectro biocida para bacterias y protozoarios patógenos anaeróbicos, a este grupo corresponden también, el Ornidazol y Tinidazol (López et al. 2008; Hernández 2016).

En los organismos anaerobios como *E. histolytica* y *T. vaginalis*, los 5-nitroimidazoles son activados por reducción de su grupo nitro en un proceso que involucra a las enzimas Piruvato ferredoxina oxido reductasa y ferredoxina, operantes de la respiración celular en el hidrogenosoma, originando radicales aniónicos con potencial oxidante de biomoléculas esenciales como ADN y proteínas, figura 5 (López et al. 2008; Leitsch et al. 2011; Santos, 2013).

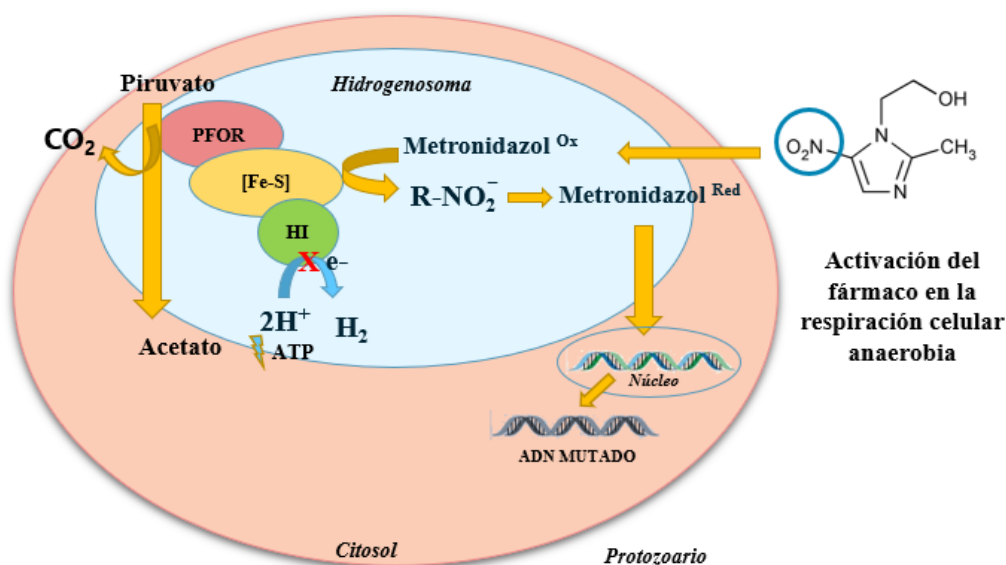


Figura 5. Mecanismo de acción antiprotozoaria del metronidazol (imagen propia).

En la amebiasis, el metronidazol es administrado en la enfermedad extraintestinal. Sin embargo, es necesario el empleo de otros antiparasitarios tales como: la paromomicina, un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro que interviene en la síntesis de proteínas; el furoato de diloxanida, un derivado dicloroacetamídico de acción desconocida

y el yodoquinol, una 8-hidroxiquinolina quelante del hierro indispensable para el crecimiento y motilidad de la ameba; entre otros fármacos que ayudan a completar el esquema terapéutico de amebiasis intestinal (Chacín 2012; Becerril 2019).

Por otra parte, *T. vaginalis* es altamente sensible al metronidazol y tinidazol, su administración es por vía sistemática u oral, pues una terapia tópica sería ineficaz debido a la internalización del parásito en conductos como la uretra. Es de importancia la aplicación del tratamiento al paciente y su pareja, independientemente de la existencia o no de manifestaciones clínicas, para asegurar una eficacia de cese de la parasitosis en un 90% (Cancelo et al. 2005; Arroyo 2017).

A pesar de la eficacia de los nitroimidazoles en el tratamiento de las parasitosis digestivas y sexuales, la resistencia de los parásitos a estas drogas ha ido incrementándose a razón de ser los fármacos típicamente administrados, falla en tratamiento por dosis inapropiadas en individuos asintomáticos y el decline de la terapia debido a los efectos secundarios como son: dolor abdominal, sabor metálico, náuseas, vomito, cefalea, vértigo, entre otros. Además, existe controversia sobre los efectos mutagénicos en bacterias y carcinogénicos en animales y cultivo celular sanguíneo, así como en espermatozoides, sin embargo, a las dosis clínicas recomendadas, la respuesta clínica suele ser satisfactoria (Chacín 2012).

Productos naturales y medicina tradicional frente a parasitosis.

Los productos naturales son compuestos orgánicos derivados del metabolismo secundario de los organismos vivos. Estas sustancias son alcaloides, aminoácidos no proteicos, carbohidratos, polifenoles, terpenos, compuestos azufrados o halogenados que exhiben diversas propiedades biológicas de interés para el desarrollo de nuevos fármacos. Entre los recursos bióticos, las plantas han sido exhaustivamente empleadas en la obtención de productos naturales. Sin embargo, las bacterias, los hongos, los animales, los insectos y organismos marinos son también investigados (Cooper y Nicola 2015), la Tabla 1 recoge algunos recursos bióticos y sus derivados empleados en la investigación de productos naturales con actividad antiparasitaria.

Tabla 1. Recursos bióticos y productos naturales con potencial antiparasitario.

Recurso biótico	Potencial antiparasitario	Compuesto activo	Referencia
Vegetal			
Planta <i>Kleinia odora</i>	antileshmania, antiplasmodium y antitripanosoma	Breina	Al Musayeib et al. 2012
Resina de <i>Boswellia serrata</i>	antileshmania	Ácido 3-O-acetyl-11-keto- β -boswellico, Ácido 11-keto- β -boswellico y Ácido β -boswellico	Greve et al. 2021
Exudado de <i>Ferulla narthex</i>	antileshmania, antiplasmodium y antitripanosoma	Feselol Asacoumarin A 10'R-Karatavacinol	Amin et al. 2016
Animal			
Exudado de <i>Rinbella alata</i>	antitripanosoma	Bufotalina y Cinobufagina	Rodríguez et al. 2021
Fúngico			
<i>Exserohilum rostratum</i>	antiplasmodium y antitripanosoma	Ravenelina	Pina et al. 2021
Bacteriano			
<i>Streptomyces cannus</i>	antitoxoplasma y antiplasmodium	Ácido 1-phenazinecarboxílico	Pagmadulam et al. 2020
Insecto			
Propóleo de abeja	antitripanosoma		
Marino			
Alga <i>Bifurcaria bifurcata</i>	antiplasmodium	Eleganolone	Gallé et al. 2013
Esponja <i>Ircinia wistarii</i>	antileshmania	Ircinianina	Majer et al. 2022

La flora, sus infusiones y extractos, han sido empleados en la medicina tradicional por sus propiedades antiparasitarias. La artemisina, emetina y quinina son ejemplos de principios activos herbarios empleados en el tratamiento de diversas parasitosis (Neira et al. 2014).

Uno de los hallazgos más relevantes del siglo XX en el ámbito de la medicina tradicional se atribuye a la científica Tu Youyou, quien a partir de la planta *Artemisia annua*, de origen chino y cuyas infusiones eran comúnmente empleadas contra la fiebre, aisló la artemisinina, un sesquiterpeno lactona con puente peróxido con actividad biológica contra protozoarios del género *Plasmodium* contribuyendo al tratamiento de la malaria. (Acosta y Castro 2009; Gamboa 2015).

La especie herbaria *Cephaelis ipecacuana* sirvió para el desarrollo del clorhidrato de emetina, fármaco empleado en el tratamiento contra la amebiasis. *Cephaelis ipecacuana* se encuentra distribuida en los bosques tropicales del centro y sur de América, su raíz y rizomas tienen importancia en la medicina tradicional por sus propiedades eméticas, expectorantes, antiparasitarias y antivirales y han sido utilizados en la obtención de emetina, un alcaloide isoquinoleínico que ha servido para el desarrollo de fármacos como la dehidroemetina con eficacia en algunas leishmaniasis humanas (Cazorla et al. 2001; Rosales et al. 2020). A pesar de los atributos medicinales de la emetina, su forma pura, muestra alta citotoxicidad en animales y levaduras por interrupción en la síntesis de ADN y proteínas (Alves et al. 2004).

Por otra parte, la quinina un alcaloide quinolínico fue extraído de la corteza del árbol quina. *Cinchona calisaya* o árbol quina es nativo de América del sur, extendiéndose su crecimiento entre los bosques húmedos de Costa Rica hasta Bolivia. La corteza de quina ha sido empleada desde el siglo XVII para tratar la fiebre asociadas a la malaria. En el año de 1820, la quinina fue aislada por J. Caventou y J. Pelletier y desde entonces ha servido en el desarrollo de fármacos antipalúdicos como la cloroquina, primaquina, mefloquina, entre otros. Sin embargo, la resistencia a estas drogas por los hemoparásitos del género *Plasmodium* ha ido en aumento (Amurrio 2001; Mesa et al. 2013).

Otras plantas han servido como modelo de estudio en la obtención de antiparasitarios, entre las cuales se encuentra el Epazote o pico (*Chenopodium ambrosioides*) un arbusto originario de América, cuyo zumo de hojas es utilizado como desparasitante contra gusanos intestinales gracias a su principio activo 1,4-peróxido-p-menteno-2 o ascaridol (Giove 1996). El uso de los bulbos de ajo (*Allium sativum*) en infusiones ha sido empleado en parasitosis intestinales. Los bulbos de *Allium sativum* poseen compuestos S-alquenil cisteínil sulfóxidos que, por acción enzimática, ante daño mecánico, son transformados en allicina, dialil-trisulfuro y ajoeno, compuestos responsables de las propiedades amebicidas, giardicidas y tripanomicidas (Hagg et al. 2012). Las semillas de *Cucurbita*

moschata o calabaza contienen glucósidos de cucurbaticina, derivados esteroideos con acción antihelmíntica (González et al. 2017).

A pesar de la existencia de registros literarios sobre la elucidación de antiparasitarios naturales, queda mucho por estudiar debido a la vasta diversidad herbaria en las distintas regiones geográficas del planeta y al conocimiento empírico y tradicional que prevalece en algunas regiones con prácticas etnomedicinales.

Etnomedicina en el sureste mexicano.

La etnomedicina es una forma de medicina tradicional o no convencional que busca prevenir y mantener la salud, así como diagnosticar, aliviar o tratar enfermedades físicas y mentales, mediante un conjunto de conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las creencias, experiencias y teorías culturales de cada comunidad (OMS 2013).

La herbolaria, una de las prácticas etnomedicinales, ha sido un recurso fundamental de atención medica en ciudades y regiones rurales de México para un 90% de la población. En este contexto, el país mexicano es privilegiado por contener diversos ecosistemas que albergan más de 26 mil especies herbarias, siendo la región sur donde se concentra una vasta vegetación debido a su localización intertropical. Del total de la flora mexicana, poco más del 13 % tiene uso medicinal por más de 50 etnias distribuidas a lo largo del país, imperando la medicina tradicional en la región sureste. La región sureste de México la integran las entidades federativas de Chiapas, Guerrero, Oaxaca y Tabasco. Tan sólo en Chiapas existen 11 grupos étnicos con valiosos saberes ancestrales en el uso y manejo de plantas curativas, acervo que ha prevalecido por generaciones como herencia oral (Muñetón 2009; Lara et al. 2019). En Chiapas se han registrado alrededor de 8,000 especies vegetales lo que representa cerca del 31 % de la flora mexicana (CONABIO 2013). Sin embargo, los registros herbarios de uso medicinal son escasos, hasta el año 2008 se habían registrado aproximadamente 2017 especies con uso medicinales siendo las familias de las asteráceas y fabáceas las mejor representadas con plantas como mesté, aceitillo, flor de muerto, timbre, ajeno, monte amargo, árnica, taray, guachipilín, sosa, chaya, chichited, dulcete, cuchunuc y huapinol. Son comúnmente empleadas por

chamanes, curanderos, hueseros y parteras para curar enfermedades gastrointestinales, respiratorias, dérmicas y óseo musculares. En su preparación y uso predomina la decocción. La mayoría de las plantas son conservadas en huertos familiares, solares, milpas o áreas de vegetación natural. Sin embargo, pueden ser adquiridas en tianguis, hierberías o mejor aún, de manera gratuita (CONABIO 2013).

A pesar de contar con ésta amplia riqueza etnomedicinal, numerosas propiedades curativas como la antiparasitaria son aún desconocidas; lo que refleja la necesidad de un análisis exhaustivo a través de métodos científicos integrales.

Plantas etnomedicinales del sureste mexicano de interés antiparasitario.

Entre las diferentes etnias de Chiapas se tiene el conocimiento curativo de enfermedades gastrointestinales y dérmicas mediante el uso de plantas como Cupapé (*Cordia dodecandra*), Chilchahua (*Tagetes nelsonii*), Guash (*Leucaena collinsi*) y Guaya (*Talisia oliviformis*). Sin embargo, no hay registros científicos que aporten información suficiente sobre posibles propiedades amebicidas y tricomonicidas de los compuestos activos implicados (De la Cruz et al. 2014). A continuación, se describe la botánica, usos etnomedicinales y reportes científicos existentes para la flora mencionada o género taxonómico.

Arrayán (*Gaultheria odorata* Wild).

Sinonimia: *G. odorata var mexicana* DC, *G. odorata* Kunth, *G. cordifolia* Kunth, *G. hirtiflora* Benth, *G. hidalguensis* Loes, *G. erecta* Vent.

Taxonomía:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Ericales

Familia: Ericaceae

Género: *Gaultheria* L

Especie: *Gaultheria odorata*

Descripción: es un arbusto con follaje postrado y siempre verde, de tamaño entre 0.5 y 3 metros pudiendo alcanzar hasta los cinco metros de altura. El tallo maduro es terete, verde y glabro, a menudo áspero con finos pelos rectos y quebradizos en su base, la corteza suele quebrarse longitudinalmente tornándose marrón rojizo cuando seco. Posee ramas subteretas, flexibles, glabras y blancas. Las hojas son coriáceas, planas, ovadas, de borde aserrado, con una longitud entre 2 y 6.5 cm, anchas en la base y agudas en la punta. Presenta frutos rojizos a manera de cápsula globosa de cinco mm y comestibles. Sus flores son solitarias, dispuestas en ramilletes, de color blanco a rosa rojizo, con cáliz glabro y corola ovoide de 5 a 7 mm, figura 6 (Stanley y Williams 1966; Fonseca et al. 2020).



Figura 6. Hojas y flor de *Gaultheria odorata* (Franz 2010).

Se distribuye en los estados del sur de México y en países aledaños como: El Salvador, Guatemala, Honduras, así como en el norte Sudamericano.

La planta es conocida como arrayán, ajalté, axocopaque o gaulteri. El té preparado por infusión de sus hojas es consumido para sanar dolor, diarreas y tuberculosis. El aceite esencial es solo para uso tópico ya que suele ser tóxico (Fonseca et al. 2020). En la cocina Tzeltal y Tzotzil, sus hojas son empleadas para sazonar la carne (Chávez et al. 2009). Por otro lado, en la comunidad indígena Nahuatl en Tequila, Veracruz es asociado con la práctica de la partería como sahumero, preparación de baño medicinal y elaboración de tejido de vendaje. Sin embargo, no existen suficientes reportes científicos que avalen sus propiedades medicinales.

Diversas especies del género *Gaultheria* han manifestado usos terapéuticos y actividad biológica, tal es el caso de *G. procumbens*, fuente del aceite esencial “Wintergreen” cuyo contenido de salicilato de metilo lo ha convertido en ingrediente en la preparación de ungüentos para tratar dolor reumático o por contusión (Ribnicky et al. 2003); *G. yunnanensis*, especie asiática, es empleada como tratamiento en la inflamación por artritis reumática, traumatismos, traqueítis crónica y vértigo encontrándose en sus extractos la presencia de flavonoides, diterpenos y salicilatos (Zhang et al. 2006). En el año 2007, Zeng y colaboradores notificaron actividad antioxidante y antiinflamatoria para *G. laucocarpa* var. *yunnanensis* con presencia de (+)-catequina, rutina, ácido gentísico, ácido vainílico, ácido salicílico, quercetina y ácido protocatéquico (Zeng et al. 2007).

Cupapé (*Cordia dodecandra* DC).

Sinonimia: *Cordia angiocarpa* A. Rich

Taxonomía:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Boraginales

Familia: Boraginaceae

Género: *Cordia* L

Especie: *Cordia dodecandra*

Descripción: árbol frutal de hoja caduca presente en Chiapas, Veracruz y la península de Yucatán, en el sur de México. De lento crecimiento, alcanza un tamaño promedio de 9 m de altura y 8 m de diámetro en su copa con forma piramidal voluminosa, con diámetro troncal entre 40-60 cm. Su corteza exterior seccionada de aspecto fibrosa y laminada de color gris blanco. Sus hojas son oblongas, ovaladas o elípticas, de tamaño variable (3-8 cm de ancho y 7-15 cm de largo), con el haz de color verde oscuro y el envés más pálido, y presentan una textura áspera debido a la presencia de tricomas rígidos. Las hojas se disponen en espiral hacia las puntas de las ramas. Las flores, acampanadas y de color naranja, miden 5-10 cm con corolas de 4-6 cm, presentan 11-13 estigmas y cáliz tubular verde amarillento, agrupándose en panículas axilares o terminales. Los frutos son drupas cónicas amarillas, comestibles y de sabor ligeramente dulce, de hasta 5 cm, figura 7 (Jankiewicz et al. 1986; Morales y Herrera 2007).



Figura 7. Corteza, hojas, flor y fruto de *Cordia dodecandra* (Morales y Herrera 2007).

En la medicina tradicional, la decocción de su corteza y fruto es empleada frente al resfriado, la gripe y la tos, así como tratamiento para la diarrea (De la cruz et al. 2014; Orantes et al. 2015, 2018).

En el año 2010, Indalí y su grupo de trabajo evaluaron las propiedades antimicrobianas de extractos metanólicos a partir de hojas de *Cordia dodecandra* evidenciando efecto positivo contra bacterias Gram (+) como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. Sin embargo, se registró toxicidad *in vitro* para células de riñón canino (Indalí et al. 2010).

Por otra parte, no existe evidencia científica sobre la evaluación de las propiedades antimicrobianas por extractos a partir de la corteza del árbol cupapé. No obstante, otras investigaciones han hecho contribuciones científicas con especies del género *Cordia* reportando la presencia de quinonas, triterpenos, flavonoides y alcaloides pirrolizidínicos. Además, en la corteza y raíz se han encontrado quinonas terpenoides e hidroquinonas (Silva 1993; Ioset 2000).

Chilchahua (*Tagetes nelsonii* Greenm).

Sinonimia: *T. sororia* Standl. & Steyerl.

Taxonomía:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Tagetes* L

Especie: *Tagetes nelsonii*

Descripción: especie herbácea perenne no maderable distribuida en la región montañosa de Chiapas, México y Guatemala. Crece como arbusto entre 1 y 2 m de altura, con follaje denso y aromático, presenta hojas pinadas divididas con un tamaño de 5 a 12 cm, foliolos cortos (6 a 12 cm de largo y de 0.6 a 2 cm de ancho), exhibe numerosas cabezuelas turbinadas con abundantes glándulas oscuras y con cimas terminales con 5 flores, los pedúnculos miden entre 3 y 15 mm de largo, las flores son radiales con lígulas de color amarillo-oro de hasta 15 mm de longitud, figura 8 (Serrato 2014).



Figura 8. *Tagetes nelsonii* (Culbert 2007; Serrato 2014)

La familia Asteraceae es una de las más representativas en la medicina tradicional mexicana, con poco más de 130 especies herbarias empleadas entre la comunidad chiapaneca, entre ellas destaca el género *Tagetes*. Las hojas, tallo y flores de *T. erecta*, *T. filifolia* y *T. lucida* son decocidas y empleadas para tratar vía oral principalmente la gastroenteritis y dolor estomacal, entre otras afecciones (González et al. 2005; Orantes et al. 2018). En otros saberes, las hojas frescas de *T. nelsonii* son maceradas y el zumo es ingerido durante una semana como tratamiento para la diarrea, dolor de cabeza y fiebre (Cruz et al. 2021).

Al final de la primera década del año 2000, Ruiz y colaboradores evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos, diclorometánicos y hexánicos de *T. nelsonii* encontrando actividad fungicida para el extracto diclorometánico frente a *Candida albicans*, actividad bactericida frente a *Proteus mirabilis* por el extracto metanólicos mientras que los tres extractos mostraron actividad biológica contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Ruiz et al. 2009).

Diversas investigaciones han reportado actividad biológica bactericida, fungicida, nematocidas, acaricida e insecticida de especies herbarias del género *Tagetes* gracias a sus compuestos activos como alilanol, β -cariofileno, ocimenones, piperitona, tagetona y trans-anetol. En 2021, Cruz y su equipo realizaron un análisis del perfil volátil de *T. nelsonii* utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, identificando la presencia de tagetona y dihidrotagetona como compuestos mayoritarios, β -ocimeno, eucaliptol, limoneno y β -cubebeno, α y β -pineno, trans- β -ocimeno, y linalool, con potencial cosmético, plaguicida y farmacéutico (Maroti et al. 2004; Cruz et al. 2021).

Guaya (*Talisia oliviformis* Kunth).

Sinonimia: *Melicoccus bijugatus*.

Taxonomía:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Sapindaceae

Género: *Talisia* Aubl

Especie: *Talisia oliviformis*

Descripción: árbol frutal de hoja caduca, que se distribuye desde el sur de México hasta el norte de Suramérica, con una altura de 6 a 18 m, tronco recto y copa semiesférica con follaje denso. La corteza externa es lisa y de color pardo con cicatrices en media luna mientras que la corteza interna es granular, color crema anaranjado y olor fresco. Presenta hojas color verde oscuro, paripinadas de 5 a 15 cm, compuestas por dos hojuelas que miden entre 4.5 y 8.5 cm son lanceoladas u abovadas, con margen entero sostenidas por un peciolo de 2 a 5 mm de largo. Las flores son pequeñas, organizadas en panículas terminales de hasta 3-4 mm de longitud, con sépalos ovados y agudos, y pétalos blancos con bordes ciliados. Los frutos miden entre 1 y 2 cm son bayas globosas de cubierta amarillo naranja de pulpa amarilla translúcida, de olor y sabor dulce y son comestibles, figura 9 (Pennington 1968; Ramírez et al. 2017; García 2018).



Figura 9. Flor, follaje y fruto de *Talisia oliviformis* (Valencia et al. 2014).

En la etnomedicina chiapaneca la infusión de las hojas de *T. oliviformis* es empleada para tratar la fiebre, gastroenteritis, dolor abdominal y la diarrea (Argueta y Mata 2009; De la Cruz et al. 2014).

Bystrom, en el año 2009 evaluó los extractos acuosos acetónicos, metanólicos y etanólicos de la pulpa y semilla del fruto encontrando actividad biológica en los extractos de pulpa frente a *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Stapylococcus aureus* y *Candida albicans*. Además, se reportó la presencia de ácido cumárico y derivados de carbohidratos en la pulpa, así como flavonoide catequina en la cubierta de la semilla (Bystrom 2009).

En cuanto a la actividad biológica de las hojas de guaya, no existe soporte científico que corrobore sus saberes de la etnomedicina en el sureste de México.

JUSTIFICACIÓN

Las infecciones digestivas y sexuales causadas por protozoarios representan un desafío significativo y constante para la salud humana y la sanidad animal a nivel global. Su alta morbilidad, sumada al impacto socioeconómico que generan, especialmente en países en vías de desarrollo, evidencia la urgencia de nuevas estrategias de control y tratamiento. Estos cuadros parasitarios se ven agravados en regiones rurales y urbano-marginales debido a factores como la migración, la deficiente infraestructura sanitaria y la insuficiente e incomprensiva educación en salud pública. Un factor crítico que complica el manejo de estas infecciones es la creciente farmacorresistencia observada en cepas de protozoarios como *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, lo que ha disminuido la eficacia de los tratamientos convencionales y subraya la necesidad de desarrollar nuevas terapias seguras y eficaces. México, y particularmente su región sureste, alberga una notable diversidad de plantas utilizadas en la medicina tradicional para tratar diversas afecciones, incluidas enfermedades diarreicas y de la piel. Sin embargo, la validación científica de muchas de estas especies, en términos de su composición química y actividad biológica específica, aún es limitada o inexistente. Además, a diferencia del desarrollo de nuevos antibacterianos o tratamientos para enfermedades crónico-degenerativas, la investigación y desarrollo de nuevos antiparasitarios ha tenido un avance lento y escaso. Ante esta brecha, el presente proyecto propone realizar un estudio quimiobiodirigido para el aislamiento e identificación de compuestos con actividad amebicida y tricomonicida a partir de *Cordia dodecandra*, *Gaultheria odorata*, *Tagetes nelsonii* y *Talisia oliviformis*, plantas de uso etnomédico en el sureste mexicano. La elección de estas especies se fundamenta tanto en su uso tradicional como en su potencial fitoquímico poco explorado. El propósito es generar evidencia científica que permita valorizar estos recursos naturales como fuentes de nuevos principios activos con aplicaciones en medicina humana y veterinaria, contribuyendo así a la diversificación de opciones terapéuticas contra enfermedades parasitarias de alta prevalencia.

HIPÓTESIS

Los extractos obtenidos de *Cordia dodecandra*, *Gaultheria odorata*, *Tagetes nelsonii* y *Talisia oliviformis* contienen metabolitos secundarios con potencial actividad antiprotozoaria, capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax* y *Tritrichomonas foetus*, además de mostrar interacciones moleculares relevantes *in silico* con enzimas clave del metabolismo del azufre y energético de estos parásitos.

OBJETIVO

Objetivo general

Aislar e identificar los compuestos responsables de la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax* y *Tritrichomonas foetus* a partir de extractos de *Cordia dodecandra*, *Gaultheria odorata*, *Tagetes nelsonii* y *Talisia oliviformis*, así como evaluar su interacción *in silico* con las enzimas ASPK y PFOR.

Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los extractos polares y no polares de *C. dodecandra*, *G. odorata*, *T. nelsonii* y *T. oliviformis* frente a trofozoítos de *E. histolytica*, *T. vaginalis*, *T. tenax* y *T. foetus*.
2. Fraccionar el extracto con mayor actividad antiprotozoaria y aislar los compuestos químicos responsables de la actividad a través de técnicas cromatográficas quimiobiodirigidas.
3. Elucidar los compuestos químicos aislados mediante Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C y análisis bidimensional (RMN-2D): COSY, HSQC y HMBC.
4. Determinar la actividad antiprotozoaria *in vitro* (CI_{50}) de los compuestos aislados frente a trofozoítos de *E. histolytica* y *Trichomonas*.
5. Evaluar la actividad *in silico* de los compuestos aislados frente a las proteínas Adenosín-5-fosfosulfato cinasa (ASPK) de *Entamoeba histolytica* y Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) de *Trichomonas spp.*, mediante estudios de acoplamiento molecular.

METODOLOGÍA

Actividad antiprotozoaria *in vitro*.

Colecta de plantas medicinales y obtención de extractos orgánicos.

Las plantas fueron colectadas durante el invierno del año 2021 en Tuxtla Gutiérrez y Zinacatán en el estado de Chiapas, México. Se adquirieron hojas de *G. odorata* y *T. oliviformis*, así como tallo con corteza de *C. dodecandra* y *T. nelsonii* y especímenes completos para su identificación. Los especímenes fueron identificados a nivel especie por el herbario de la FCB-UANL. De manera individual, el material vegetal se limpió, cortó, secó a temperatura ambiente sin iluminación directa, y trituró en un molino de mano. Extractos hexánicos y metanólicos se obtuvieron mediante maceración mezclando una parte de vegetal con tres partes de solvente durante 18 días a temperatura ambiente y sin agitación, realizando procesos de extracción cada seis días con hexano y aplicando sonicación por 15 minutos, seguido por extracción con metanol en las mismas condiciones. En cada ocasión, los extractos se filtraron y concentraron a presión reducida empleando un rotavapor Yamato, Modelo RE2000. Finalmente, se secaron en una estufa a 40°C hasta peso constante para calcular el % de rendimiento a partir de la masa de vegetal empleada en la extracción y la masa del extracto obtenido, aplicando la fórmula matemática 1:

$$\% \text{ de rendimiento de extracción} = \frac{\text{masa del extracto obtenido}}{\text{masa de tejido vegetal}} (100)$$

Fórmula 1. % de rendimiento de extracción.

Los extractos obtenidos se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Cultivo de trofozoítos parásitos.

Trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS, *T. vaginalis*, *T. tenax* cepa ATCC-30207 y *T. foetus* UT ATCC-30232 fueron cultivados en medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino hasta una concentración de 10 % v/v (Keister 1983). Los tubos inoculados se incubarán a 36.5°C manteniéndolos en su fase exponencial. Todos los cultivos se procesaron y mantuvieron bajo condiciones axénicas.

Ensayo *in vitro* de actividad antiprotozoaria de los extractos crudos.

Los extractos se evaluaron a una concentración de 150 µg/mL siguiendo la metodología propuesta por Mata-Cardenas (Mata et al. 2008). Para ello, cada extracto fue disuelto en DMSO (Dimetilsulfóxido 99.5 % para cultivo celular, Sigma Aldrich), posteriormente se realizó una dilución con agua desionizada, se colocaron 50 µL de esta dilución en microviales cónicos Wheaton de 1 mL; y se agregaron 950 µL de medio de cultivo TYI-S-33 suplementado con suero bovino al 10% previamente inoculado con concentraciones de 2×10^4 ó 1×10^5 trofozoítos/mL de ameba y tricomonas, respectivamente; todos los cultivos se incubaron a 36.5 °C, las trichomonas por 24 h y *E. histolytica* durante 72 h. Al cumplirse el tiempo de incubación, los microviales fueron enfriados durante 30 minutos en un baño de agua-hielo para desprender las células adheridas a las paredes de los microviales, en el caso de las trichomonas, se realizó una dilución 1:10 con formalina con la finalidad de fijar los trofozoítos, para luego realizar conteo celular en cámaras de Neubauer, donde se tomó como referencia el número de trofozoítos/mL del tubo testigo (medio TYI-S-33 inoculado y DMSO) para obtener el porcentaje de inhibición mediante las fórmulas matemáticas 2 y 3. Los ensayos se realizaron por triplicado.

$$\% \text{ de crecimiento de trofozoítos} = \frac{\# \text{ trofozoitos/mL en medio con extracto}}{\# \text{ trofozoitos/mL en tubo testigo}} (100)$$

Fórmula 2. % de crecimiento de trofozoítos

$$\% \text{ inhibición de proliferación celular} = (100) - (\% \text{ de crecimiento de trofozoitos})$$

Fórmula 3. % de inhibición de proliferación celular

Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀).

La Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) de extractos, particiones y fracciones fue determinada a partir del % de inhibición de crecimiento celular de una serie de soluciones con concentración entre 37.5 y 450 µg/mL. El metronidazol (Grado estándar analítico, Sigma Aldrich) fue usado como control positivo evaluando soluciones de concentración entre 0.078 y 1.25 µg/mL.

Análisis estadístico.

Para determinar la actividad antiprotozoaria (variable dependiente) *in vitro* de las plantas y sus extractos (variable independiente) en estudio se realizó un diseño experimental 4 x 2 x 4 (4 plantas, 2 extractos, 4 protozoarios parásitos) sobre la variable dependiente % de inhibición de crecimiento celular. Los resultados del diseño experimental fueron sometidos a un análisis de varianza multifactorial y comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, empleando el software SPSS Statistics, versión 20.0 (IBM Corp. Released 2011).

La concentración que inhibe el crecimiento del trofozoíto en un 50 % (CI₅₀) se determinó mediante la transformación Probit/log del modelo de curva dosis/respuesta y la pendiente de la fórmula de regresión $Y = m x + b$, utilizando el software estadístico antes mencionado.

Se utilizó ANOVA bifactorial para un diseño experimental de 4 x 2 (4 plantas y 2 extractos) para comparar las medias de la CI₅₀ de los distintos extractos de cada planta frente a cada protozoario utilizado en el estudio. La comparación de medias de la CI₅₀ originada por las plantas y tipo de extracto se realizó mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

La significancia en la actividad antiprotozoaria de los compuestos aislados fue analizada mediante un ANOVA bifactorial. Con ello y la prueba de Tukey, se comparó las medias de la CI₅₀ originada por los compuestos frente a los diferentes protozoarios, $p < 0.05$.

Aislamiento de los compuestos con actividad antiprotozoaria a través de fraccionamiento quimiobiodirigido.

Partición del extracto metanólico de *T. nelsonii* y *G. odorata*.

Tomando como base el rendimiento en masa y su actividad antiprotozoaria, el extracto metanólico de *T. nelsonii* y *G. odorata* fueron sometidos a partición con solvente diclorometano, mezclando una parte del extracto con cinco partes de solvente y se aplicó sonicación durante 15 minutos, obteniéndose dos particiones de cada extracto: parte soluble en diclorometano (PSDM) y la parte insoluble en diclorometano (PISDM). El solvente en ambas particiones fue eliminado por evaporación y los extractos se secaron en una estufa a 40°C. El extracto de las particiones fue disuelto en DMSO y se determinó su actividad antiprotozoaria (CI₅₀), mediante el método antes descrito.

Fraccionamiento quimiobiodirigido del extracto hexánico de *T. nelsonii* y *G. odorata*.

Con base en la actividad antiprotozoaria de la parte soluble en diclorometano del extracto metanólico de *T. nelsonii* (TnM-PSDCM), 1.3 g del extracto hexánico (TnH) se fraccionó mediante cromatografía en columna con Sephadex LH-20 (300×70 mm), empleando como eluyente 1L del sistema *n*-Hex:DCM:AceOEt en proporción 2:1:1, respectivamente, resultando 33 fracciones; las fracciones fueron sometidas a cromatografía en capa fina (TLC Sílica gel 60 F₂₅₄, Merck) y eluidas con *n*-Hexano:AceOEt en proporción 8:2. La revelación de las TLC se hizo empleando una solución de CoCl₂ al 2% en HCl al 10 %, posteriormente fueron visualizadas con luz visible y luz UV a 254 y 356 nm de longitud de onda. El análisis de la TLC permitió formar cuatro fracciones (Figura,10) que fueron analizadas mediante RMN-¹H (Bruker Spectrospin 500 UltraShield, 500 MHz, CDCl₃) y se determinó su actividad antiprotozoaria.

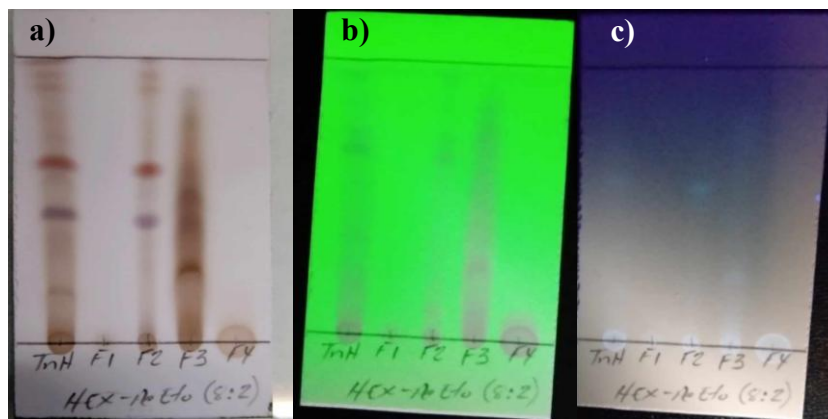


Figura 10. TLC-Fracciones del extracto hexánico de *T. nelsonii*: a) CoCl_2 2% en HCl 10 %, b) UV 254 nm, c) UV 356 nm.

La baja complejidad de los desplazamientos químicos en el espectro RMN- ^1H de la fracción 2 (Figura, 11) y su actividad antiprotozoaria, permitieron su posterior fraccionamiento por cromatografía en columna de gel de sílice (250×50 mm) utilizando un gradiente escalonado de *n*-Hexano y Acetato de etilo obteniendo y de la cual resultaron 74 subfracciones.

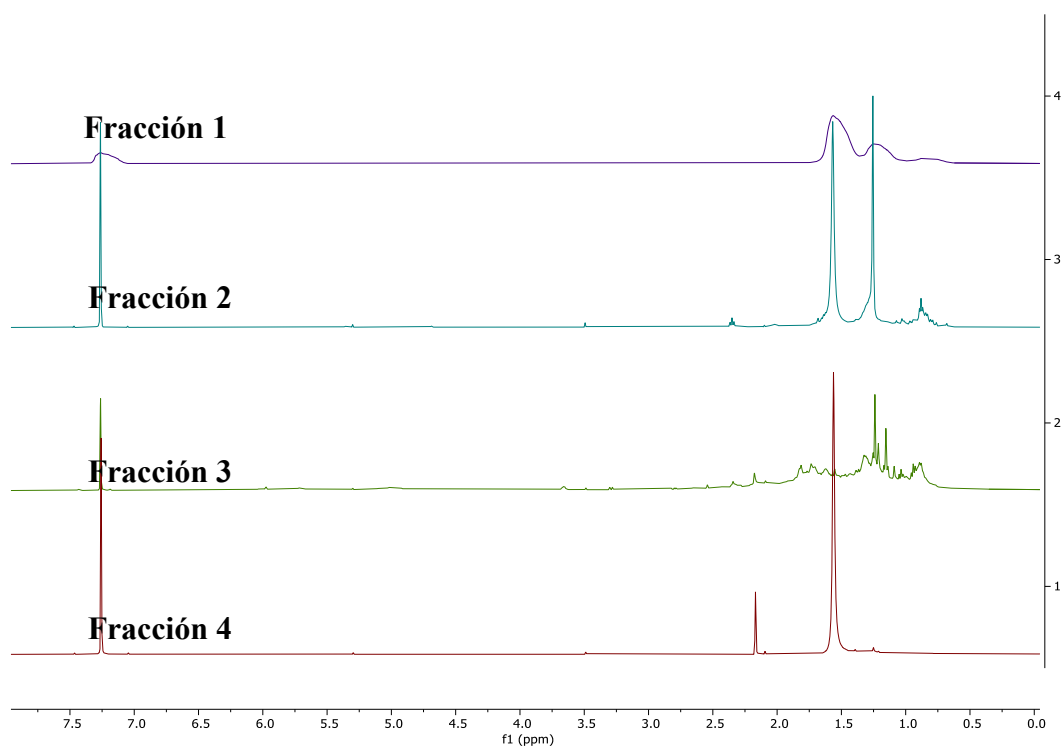


Figura 11. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz) de las fracciones de TnH.

Las subfracciones fueron analizadas a través de TLC y RMN- ^1H permitiendo formar 8 subfracciones. El cromatograma (Figura, 12) y el espectro de RMN- ^1H de alta resolución de las subfracciones 3 y 6 revelaron el aislamiento de dos compuestos puros. El solvente de elución de las subfracciones fue eliminado empleando un rotaevaporador BUCHI R200 con bomba de vacío BUCHI V-700. Finalmente, se midió la masa de cada compuesto aislado.

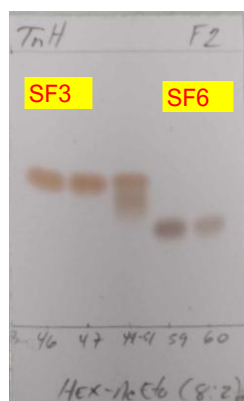


Figura 12. TLC-Subfracciones 3 y 6 de TnH.

Con respecto a *G. odorata*, 1.3 g del extracto hexánico (GoH) se fraccionaron mediante cromatografía en columna con Sephadex LH-20 (300×70 mm), empleando como eluyente 1 L del sistema *n*-Hex:DCM:AcOEt en proporción 2:1:1, respectivamente, resultando 71 fracciones; las fracciones fueron sometidas a cromatografía en capa fina (TLC Sílica gel 60 F₂₅₄, Merck) y eluidas con *n*-Hexano:AcOEt en proporción 8:2. La revelación de las TLC se hizo empleando una solución de CoCl₂ al 2% en HCl al 10 %, posteriormente fueron visualizadas con luz visible y UV a 254 y 356 nm de longitud de onda. El análisis de la TLC permitió formar cuatro fracciones, figura,13. La fracción dos presentó un patrón similar de migración al extracto crudo. Además, las fracciones fueron analizadas mediante RMN- ^1H (Bruker Spectrospin 500 UltraShield, 500 MHz, CDCl₃) obteniéndose para la fracción dos un espectro con alta complejidad química.

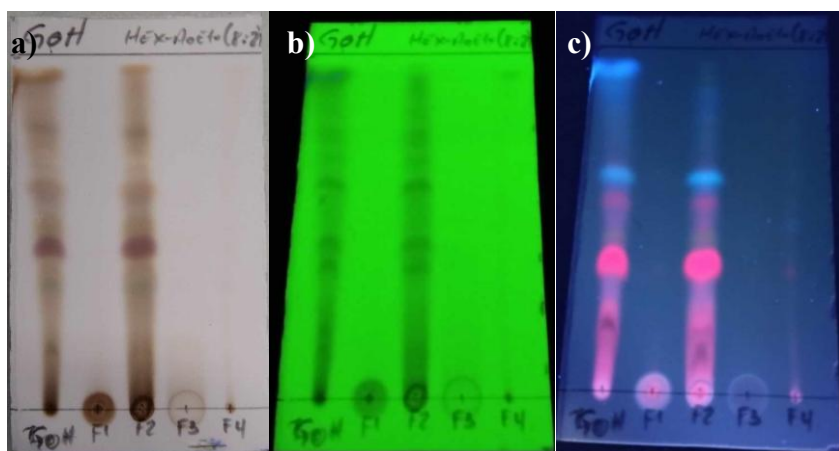


Figura 13. TLC-Fracciones del extracto hexánico de *G. odorata*: a) CoCl_2 2% en HCl 10 %, b) UV 254 nm, c) UV 356 nm.

La fracción dos fue separada por cromatografía en columna de gel de sílice (250×50 mm) utilizando un gradiente escalonado de *n*-Hexano y Acetato de etilo obteniendo 68 subfracciones. La cromatografía en capa fina permitió unificar las 68 subfracciones en 10, mostrando la subfracción dos y cinco como manchas parcialmente “limpias”, figura 14.

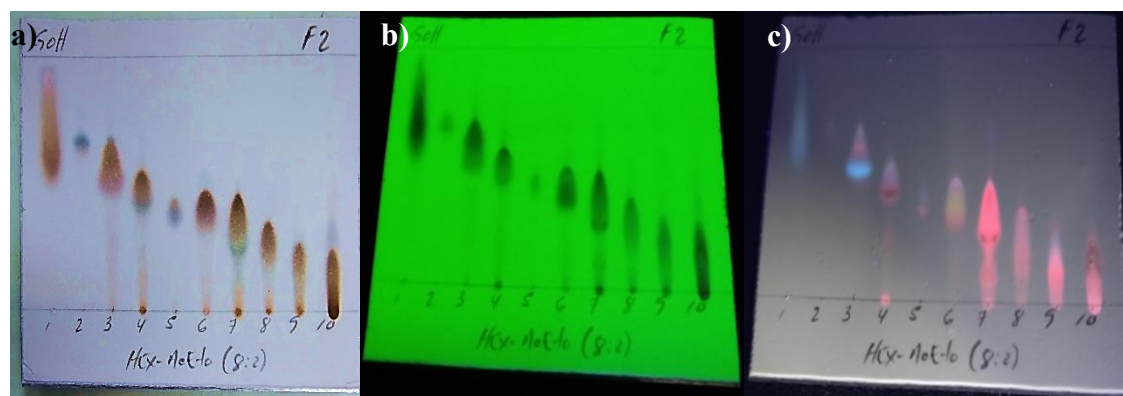


Figura 14. TLC-Subfracciones derivadas de la fracción 2 de GoH: a) CoCl_2 2% en HCl 10 %, b) UV 254 nm, c) UV 356 nm.

El espectro RMN- ^1H de las diez subfracciones fue de alta complejidad estructural, sin embargo, la subfracción cinco mostró señales multipletes mejor definidas, figura 15.

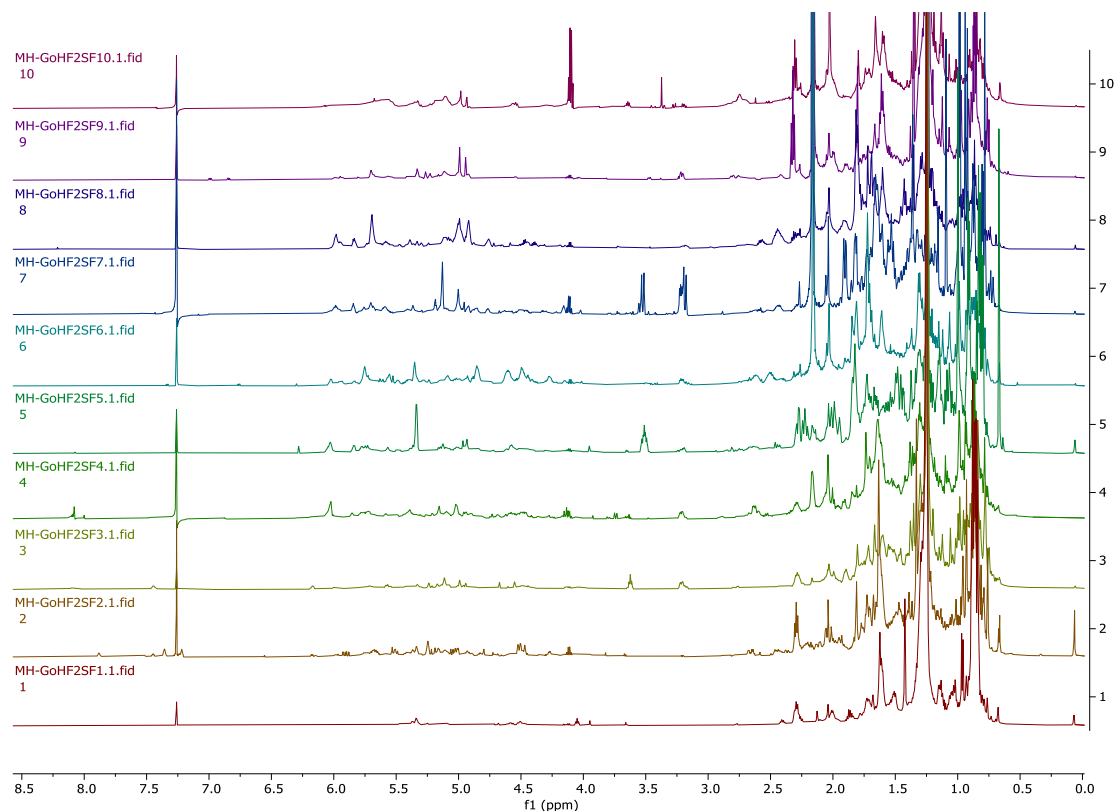


Figura 15. Espectro de RMN- H^1 (600 MHz) de las subfracciones derivadas de la fracción 2 de GoH.

De acuerdo con la TLC y espectro RMN- H^1 , la subfracción cinco fue purificada mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) en un equipo Agilent 1260 Infinity Quaternary LC equipado con un Detector de arreglo de diodos Waldbronn, Germany Infinitely Better. La columna de fase normal usada fue Luna 5 μm Sílica 100 Å, 250 $\times$ Ø 10 mm. El sistema de elución fue un gradiente escalonado de n-Hex:AcOEt (90:10 a 0:100) durante 60 min y un flujo de 2 mL/min. Las fracciones se colectaron mediante un colector automático obteniéndose un compuesto de acuerdo con el análisis RMN.

Elucidación de los compuestos aislados de *T. nelsonii* y *G. odorata* mediante Resonancia Magnética Nuclear.

La identificación estructural de los compuestos aislados provenientes de *T. nelsonii* y *G. odorata* se determinó por medio de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón y de Carbono 13 (1H -RMN, ^{13}C -RMN) y sus correspondientes análisis bidimensionales de correlación (HSQC, HMBC) Para ello, los compuestos se disolvieron

en cloroformo deuterado (CDCl₃ al 99.8%, Sigma Aldrich) y se llevaron a un equipo Bruker Avance II 600 RMN con una frecuencia de 600 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C. Los espectrogramas se analizaron vía software MestReNova 14.2.0 (Mestrelab Research, 2020) con desplazamientos químicos (δ) en ppm.

Actividad antiprotozoaria *in vitro* de los compuestos aislados de *T. nelsonii* y *G. odorata*.

Los compuestos aislados provenientes de *T. nelsonii* y *G. odorata* fueron disueltos en etanol absoluto a una concentración de 5 mg/mL. La CI₅₀ de los compuestos frente a trofozoítos de *E. histolytica*, *T. vaginalis* y *T. foetus* fue estimada a partir del porcentaje de % inhibición generada por una serie de soluciones de concentración entre 10 y 50 µg/mL del compuesto aislado.

Actividad biológica *in silico* de los compuestos aislados de *T. nelsonii* y *G. odorata* mediante acoplamiento molecular.

Modelado molecular de las proteínas diana ASPK y PFOR.

En ausencia de la estructura tridimensional de las proteínas Adenosín 5-fosfosulfato kinasa (ASPK) y Piruvato-ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) de *E. histolytica* y *T. vaginalis* respectivamente, determinadas experimentalmente a través de Resonancia magnética nuclear (RMN) o cristalografía de rayos X, se procedió a realizar un modelo estructural por homología como se describe a continuación:

A partir de la secuencia del dominio EhAPSK APSK (Ile²⁹⁴-Lys⁴⁷⁷) obtenida en formato FASTA de GenBank: BAN39620.1 (Benson et al. 2013). Se modeló la proteína APSK en SWISS-MODEL (Waterhouse et al. 2018) el programa trabajó sobre 50 templados homólogos. La estructura terciaria se evaluó en el servidor de SAVESv6.0 sin embargo, no cumplió con la calidad conformacional necesaria (Ramachandran Plot: 95 %). Posteriormente, se minimizó la estructura en UCSF Chimera a 1000 pasos y se refinó utilizando la aplicación GalaxyRefine (Heo et al. 2013) en el servidor GalaxyWeb; y se evaluó nuevamente con ERRAT en el servidor SAVESv6.0 de UCLA-DOE LAB (Colovos y Yeates 1993).

La proteína PFOR se modeló utilizando el servidor ALPHAFOLD3D (Abramson et al. 2024) empleando la secuencia de entrada Q27088 (*T. vaginalis* pFORA) del servidor UniProt (The UniProt Consortium 2025). La optimización estructural y validación de la estructura modelo fue realizada utilizando el servidor Molprobit (Williams et al. 2018). Por último, la estructura modelo se confirmó usando el servidor SWISS-MODEL.

Obtención estructural y análisis de los ligandos (compuestos aislados)

La estructura tridimensional de los ligandos se obtuvo en archivo Mol2 de la base de datos ZINC20 (Irwin et al. 2020): Betulina, ZINC3978650; Estigmasterol, ZINC4096712 y β -Sitosterol, ZINC4095717. La visualización de los modelos 3D se realizó en el programa Avogadro2 (Hanwell et al. 2012) y se determinó el número de conformaciones posibles y su energía libre.

Predicción de la interacción ligando-proteína mediante acoplamiento molecular

Se realizó un acoplamiento molecular ciego y directo semiflexible para los ligandos Betulina, Estigmasterol y β -sitosterol utilizando el software Autodock (Eberhardt et al. 2021) en la plataforma USCF Chimera (Pettersen et al. 2004) y el servidor CB-dock (Liu et al. 2020).

El acoplamiento de los ligandos con la proteína ASPK se estableció una caja de unión (22 x 22 x 15 Å) a sitios probables de la proteína determinados con el servidor CAVERweb v1.2 (Stourac et al. 2019). Para la proteína PFOR, el servidor CB-dock se empleó para determinar la caja de unión a sitios probables de la proteína. Antes del acoplamiento en USCF Chimera, las estructuras proteicas se prepararon eliminando ligandos, iones y solvente agua. Los valores de energía de unión y los valores de RMSD fueron determinados para cada ligando. Los puntos de contacto ligando-proteína fueron analizados a través de los programas bioinformáticos Find Clashes/Contacts y LigPlot+ v2.2 (Laskowski y Swindells 2011).

RESULTADOS

Actividad antiprotozoaria *in vitro*.

Rendimiento de extracción de la maceración de las plantas etnomedicinales.

Las plantas colectadas fueron identificadas por personal botánico del herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Un ejemplar de cada planta fue montado, registrado y depositado en el herbario. Con respecto a la obtención de extractos mediante maceración, los resultados señalan que se obtuvo mayor rendimiento empleando metanol como solvente, los rendimientos fluctuaron en un rango entre el 5.0 % para *C. dodecandra* y el 14.0 % para *G. odorata*. Por el contrario, el rendimiento de los extractos hexánicos se mostró en un intervalo del 0.4 % para *C. dodecandra* al 2.4 % para *T. oliviformis*. El resumen de identificación, masa empleada en base seca, y rendimientos en masa y % para cada planta se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Recursos herbarios colectados y rendimiento de extracción.

Planta medicinal	Folio de espécimen	Parte de planta Empleada*	Masa base seca (g)	Extracto Metanólico (g)	Extracto Metanólico (%)	Extracto Hexánico (g)	Extracto Hexánico (%)
<i>Tagetes nelsonii</i> (Asteraceae) ¹	25883	TC	349.7	24.0	6.9	2.5	0.7
<i>Gaultheria odorata</i> (Ericaceae) ¹	25884	H	401.2	56.4	14.0	6.5	1.6
<i>Cordia dodecandra</i> (Boraginaceae) ²	25879	TC	254.4	12.7	5.0	0.9	0.4
<i>Talisia oliviformis</i> (Sapindaceae) ³	25881	H	104.1	8.35	8.0	2.5	2.4

¹ 16° 45' 34.0'' N, 92° 43' 18.0'' E, ² 16° 43' 46.2'' N, 93° 06' 0.87'' E, ³ 16° 43' 45.7'' N, 93° 06' 0.70'' E; * TC= Tallo con corteza; H= Hojas.

Actividad antiprotozoaria *in vitro* de los extractos crudos de selectas plantas medicinales.

Un total de ocho extractos, cuatro metanólicos y cuatro hexánicos, provenientes de las plantas medicinales *Cordia dodecandra*, *Gaultheria odorata*, *Tagetes nelsonii* y *Talisia*

oliviformis fueron evaluados para determinar su actividad antiprotozoaria *in vitro* frente a los protozoarios parásitos *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas Vaginalis*, *Trichomonas tenax* y *Tritrichomonas foetus*. El porcentaje de inhibición del crecimiento celular se determinó a una concentración de 150 µg/mL después de 24 y 72 h de incubación frente a tricomonas y amebas, respectivamente.

Siete extractos mostraron actividad inhibitoria de crecimiento amebiano con porcentajes de inhibición superiores al 50 % a la concentración evaluada. Entre los extractos metanólicos, el obtenido de *T. oliviformis* mostró la menor actividad antiprotozoaria con un % de inhibición de 50.37 ± 1.13 %, mientras que el derivado de *T. nelsonii* exhibió la mayor actividad inhibitoria con 60.53 ± 10.30 %. Con respecto a los extractos hexánicos, el procedente de *C. dodecandra* mostró la actividad más baja con un 41.69 ± 12.37 % mientras que, el obtenido de *T. nelsonii* presentó el mayor % de inhibición celular con un valor de 71.66 ± 4.11 . Por otra parte, la actividad inhibitoria del crecimiento celular por las plantas frente a las cepas de tricomonas fue variable y no superior al 50.89 % exhibido por el extracto metanólico de *T. nelsonii*. Frente a *T. vaginalis*, la actividad inhibitoria de los extractos metanólicos se presentó en un rango entre 25.54 ± 7.20 % por *T. oliviformis* y 48.10 ± 3.06 % por *T. nelsonii*. Los extractos hexánicos presentaron el mismo patrón de actividad, con 21.93 ± 3.26 % para *T. oliviformis* y 49.09 ± 6.22 % para *T. nelsonii*. Con respecto a *T. tenax*, los extractos metanólicos presentaron una actividad inhibitoria entre 15.32 ± 5.75 % y 50.89 ± 4.11 % originados por *T. oliviformis* y *T. nelsonii*, respectivamente. Mientras que, para los extractos no polares, la actividad se mantuvo entre 27.88 ± 13.72 % y 44.44 ± 3.55 % por *C. dodecandra* y *T. nelsonii*, respectivamente. Por último, *T. foetus* se mostró menos susceptible a la actividad inhibitoria de los extractos de las cuatro plantas. Los extractos metanólicos exhibieron inhibición de crecimiento en un rango entre 10.45 ± 3.90 % y 23.50 ± 8.87 % por *C. dodecandra* y *G. odorata*, respectivamente. La actividad inhibitoria de los extractos hexánicos fluctuó entre 10.38 ± 5.72 % por *G. odorata* y 33.65 ± 8.76 % por *T. nelsonii*. La información completa de la actividad inhibitoria por las plantas y sus extractos frente a los diferentes protozoarios parásitos se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Actividad antiprotozoaria *in vitro* de selectas plantas etnomedicinales del sureste mexicano.

Planta medicinal	% de Inhibición de los extractos crudos frente a trofozoítos protozoarios parásitos*							
	<i>E. histolytica</i> ^c		<i>T. vaginalis</i> ^b		<i>T. tenax</i> ^b		<i>T. foetus</i> ^a	
	Metanólico	Hexánico	Metanólico	Hexánico	Metanólico	Hexánico	Metanólico	Hexánico
<i>Tagetes nelsonii</i> (Asteraceae) ^c	60.53 ± 10.30	71.66 ± 4.11	48.10 ± 3.06	49.09 ± 6.22	50.89 ± 4.11	44.44 ± 3.55	14.56 ± 6.02	33.65 ± 8.76
<i>Gaultheria odorata</i> (Ericaceae) ^b	55.33 ± 6.36	69.48 ± 6.95	34.24 ± 3.00	33.83 ± 4.31	31.87 ± 2.17	39.80 ± 6.07	23.50 ± 8.87	10.38 ± 5.72
<i>Cordia dodecandra</i> (Boraginaceae) ^a	52.04 ± 6.68	41.69 ± 12.37	38.72 ± 1.54	31.33 ± 7.28	25.03 ± 4.11	27.88 ± 13.72	10.45 ± 3.90	22.43 ± 3.62
<i>Talisia oliviformis</i> (Sapindaceae) ^a	50.37 ± 1.13	56.95 ± 11.16	25.54 ± 7.20	21.93 ± 3.26	15.32 ± 5.75	32.53 ± 7.40	21.85 ± 6.10	15.41 ± 4.88

*[Extracto]= 150µg/mL; media de resultados ± DS (n=3); Efectos principales: Planta (F=31.527, p<0.05), Parásito (F=135.799, p<0.05), Extracto (F=4.153, p=0.046). Plantas o Parásitos con la misma letra subíndice son estadísticamente iguales.

El análisis ANOVA multifactorial determinó el efecto de la planta, el tipo de extracto y el parásito sobre la actividad antiprotozoaria medida como porcentaje de inhibición. El modelo fue estadísticamente significativo ($F=19.042$, $p < 0.05$), explicando el 90.2% de la varianza total en la inhibición ($R^2 = 0.902$; R^2 corregido = 0.855). El análisis encontró efectos significativos para todos los factores: planta ($F=31.527$, $p<0.05$), parásito ($F=135.799$, $p<0.05$) y Extracto, aunque de menor magnitud ($F=4.153$, $p=0.046$). El análisis post hoc de Tukey reveló que *Tagetes nelsonii* presentó una inhibición significativamente mayor en comparación con las demás especies vegetales ($p < 0.05$). *Gaultheria odorata* mostró también una inhibición significativamente superior a la de *Talisia oliviformis* y *Cordia dodecandra*, las cuales no difirieron significativamente entre sí. En cuanto a los parásitos, el análisis de comparaciones múltiples (Tukey, $\alpha=0.05$) mostró que *Entamoeba histolytica* fue significativamente más sensible que *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax* y *Tritrichomonas foetus*. Asimismo, *T. foetus* fue significativamente menos sensible que *T. vaginalis* y *T. tenax*, que no difirieron significativamente entre sí. Además, no se encontró interacción significativa entre planta/extracto ($F=1.128$, $p=0.344$) lo que sugiere que el efecto de los extractos es similar entre las plantas. La interacción planta/parásito fue significativa ($F=3.471$, $p<0.05$) indicando que el % de inhibición depende de la planta evaluada. Por otro lado, la interacción extracto/parásito no fue significativa ($F=1.934$, $p=0.133$) sugiriendo que la respuesta medida no depende del extracto. Estos resultados indican que tanto el origen botánico como el tipo de extracción y el tipo de parásito influyen significativamente en la eficacia antiprotozoaria de los extractos vegetales evaluados.

Determinación de la concentración inhibitoria media de crecimiento (CI₅₀) de los extractos crudos de selectas plantas medicinales.

Para concluir la actividad antiprotozoaria de las plantas en función de la concentración del extracto, se determinó la concentración de extracto que inhibe el 50 % de crecimiento del protozoo, CI₅₀. La actividad de antiprotozoaria *in vitro* fue mayor frente a *E. histolytica* mientras que la actividad anti-tricomonas de los extractos fue mejor para *T. vaginalis*, seguida de *T. tenax* y finalmente, *T. foetus*.

Con respecto a *E. histolytica*, la mejor actividad fue exhibida por el extracto hexánico de *G. odorata* con $CI_{50} = 113.33 \pm 6.11 \mu\text{g/mL}$ seguido por el extracto metanólico de *T. nelsonii* con $CI_{50} = 132.09 \pm 19.69 \mu\text{g/mL}$. El análisis de varianza bifactorial reveló efectos significativos de la planta ($F = 9.511$, $p < 0.05$) y del tipo de extracto ($F = 6.804$, $p < 0.05$) sobre la actividad anti-*E. histolytica*. Además, no se observó interacción significativa entre ambos factores ($F = 3.114$, $p = 0.056$). Estos resultados sugieren que tanto la especie vegetal como el tipo de extracto influyen de manera independiente en la actividad anti-*E. histolytica*, sin evidencia concluyente de interacción entre ambos factores. Por otro lado, aunque el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las plantas, la comparación de medias a través de la prueba de Tukey indicó que algunas especies vegetales comparten la misma actividad biológica. *G. odorata* presentó la mayor actividad, mientras que *T. oliviformis* mostró la más baja. Sin embargo, sólo estas dos especies se diferenciaron estadísticamente entre sí ($p < 0.05$). Las especies *T. nelsonii* y *C. dodecandra* mostraron valores intermedios, sin diferencias significativas claras respecto a las otras especies, Tabla 4.

Tabla 4. Actividad anti-*E. histolytica* de selectas plantas medicinales y sus extractos.

Nombre de Planta (familia)	Actividad anti- <i>E. histolytica</i> ($\mu\text{g/mL}$) ¹	
	Ext. Metanólico	Ext. Hexánico
<i>Tagetes nelsonii</i> (Asteraceae) ^{a,b}	132.09 ± 19.69	140.46 ± 7.61
<i>Gaultheria odorata</i> (Ericaceae) ^a	143.24 ± 13.97	113.33 ± 6.11
<i>Cordia dodecandra</i> (Boraginaceae) ^{b,c}	160.13 ± 13.17	148.42 ± 6.54
<i>Talisia oliviformis</i> (Sapindaceae) ^c	179.95 ± 4.20	152.03 ± 10.28

¹ Media de resultados $\pm$ DS, (n=3); Efectos analizados: Plantas ($F = 9.511$, $p < 0.05$), Extracto ($F = 6.804$, $p < 0.05$), Planta*extracto ($F = 3.114$, $p = 0.056$).

Frente a *T. vaginalis* los extractos de *T. nelsonii* mostraron la mejor actividad tricomónica con una CI_{50} menor a $157.07 \pm 8.89 \mu\text{g/mL}$, seguido del extracto metanólico de *G. odorata* quien mostró una CI_{50} de $190.37 \pm 7.73 \mu\text{g/mL}$. Al analizar los resultados

mediante un ANOVA de dos vías, el estudio mostró efectos significativos de la especie vegetal ($F = 94.351$, $p < 0.05$), del tipo de extracto ($F = 16.697$, $p = 0.05$) y de su interacción ($F = 5.550$, $p < 0.05$) sobre la actividad anti-*T. vaginalis*. Estos resultados sugieren que tanto la planta como el tipo de extracto influyen en la actividad antiprotozoaria, y que, además, el efecto del extracto varía en función de la planta utilizada. La prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) confirmó diferencia significativa entre las cuatro plantas evaluadas. *T. nelsonii* presentó la mayor actividad antiprotozoaria, mientras que *T. oliviformis* mostró la más baja. Las demás especies ocuparon posiciones intermedias y también difirieron entre sí. Este patrón de agrupamiento sugiere una progresión clara en la actividad anti-*T. vaginalis* según la planta utilizada, y respalda la existencia de variaciones bioactivas entre plantas, Tabla 5.

Tabla 5. Actividad anti-*T. vaginalis* de selectas plantas medicinales y sus extractos.

Nombre de Planta (familia)	Actividad anti- <i>T. vaginalis</i> ($\mu\text{g/mL}$) ¹	
	Metanólico	Hexánico
<i>Tagetes nelsonii</i> (Asteraceae) ^a	157.07 $\pm$ 8.89	153.15 $\pm$ 9.01
<i>Gaultheria odorata</i> (Ericaceae) ^b	190.37 $\pm$ 7.73	219.70 $\pm$ 3.09
<i>Cordia dodecandra</i> (Boraginaceae) ^c	234.46 $\pm$ 13.63	241.38 $\pm$ 6.33
<i>Talisia oliviformis</i> (Sapindaceae) ^d	241.87 $\pm$ 15.97	289.53 $\pm$ 20.96

¹ Media de resultados $\pm$ DS, (n=3); Efectos analizados: Plantas ($F = 94.351$, $p < 0.05$), Extracto ($F = 16.697$, $p < 0.05$), Planta*extracto ($F = 5.550$, $p < 0.05$).

Frente a *T. tenax*, los extractos polares de *T. nelsonii* y *G. odorata* presentaron mejor actividad con un $\text{CI}_{50} = 161.70 \pm 13.87 \mu\text{g/mL}$ y $243.44 \pm 19.54 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, mientras que el extracto no polar de *T. nelsonii* mostró actividad tricomonocida con una CI_{50} de $162.90 \pm 5.26 \mu\text{g/mL}$ seguido de *G. odorata* con $\text{CI}_{50} = 185.00 \pm 19.57 \mu\text{g/mL}$. La actividad anti-*T. tenax* por las plantas y sus extractos se muestra en la tabla 5. El análisis de varianza bifactorial mostró efectos significantes en el tipo de planta ($F = 151.540$, $p < 0.05$), tipo de extracto ($F = 61.078$, $p < 0.05$), así como de su interacción ($F = 27.568$, $p < 0.05$) sobre la actividad anti-*T. tenax*. La comparación múltiple mediante la prueba de

Tukey mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las plantas evaluadas. En especial, *T. nelsonii* presentó la mayor actividad anti-*T. tenax*, significativamente superior al resto de los recursos medicinales, mientras que *T. oliviformis* mostró la menor actividad. Los resultados sugieren que tanto la especie vegetal como el tipo de extracto influyen de manera significativa en la actividad anti-*T. tenax*, y que existe una interacción específica entre ambos factores, Tabla 6.

Tabla 6. Actividad anti-*T. tenax* de selectas plantas medicinales y sus extractos.

Nombre de Planta (familia)	Actividad anti- <i>T. tenax</i> ($\mu\text{g/mL}$) ¹	
	Ext. Metanólico	Ext. Hexánico
<i>Tagetes nelsonii</i> (Asteraceae) ^a	161.70 $\pm$ 13.87	162.90 $\pm$ 5.26
<i>Gaultheria odorata</i> (Ericaceae) ^b	243.44 $\pm$ 19.54	185.00 $\pm$ 19.57
<i>Cordia dodecandra</i> (Boraginaceae) ^c	323.42 $\pm$ 22.11	315.83 $\pm$ 16.55
<i>Talisia oliviformis</i> (Sapindaceae) ^d	449.71 $\pm$ 23.64	278.46 $\pm$ 20.75

¹ Media de resultados $\pm$ DS, (n=3); Efectos analizados: Plantas (F= 151.540, $p < 0.05$), Extracto (F= 61.078, $p < 0.05$), Planta*extracto (F= 27.568, $p < 0.05$).

La actividad anti-*T. foetus* de los extractos polares de *G. odorata* y *T. oliviformis* exhibieron mejor actividad tricomonocida con una CI_{50} de $337.35 \pm 18.75 \mu\text{g/mL}$ y $453.96 \pm 25.70 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. De los extractos no polares, *T. nelsonii* exhibió la mayor actividad tricomonocida con una CI_{50} de $275.75 \pm 26.66 \mu\text{g/mL}$ seguido por *C. dodecandra* con $\text{CI}_{50} = 348.52 \pm 25.08 \mu\text{g/mL}$. La actividad anti-*T. foetus* se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Actividad anti-*T. foetus* de selectas plantas medicinales y sus extractos.

Nombre de Planta (familia)	Actividad anti- <i>T. foetus</i> (µg/mL) ¹	
	Ext. Metanólico	Ext. Hexánico
<i>Tagetes nelsonii</i> (Asteraceae) ^a	> 500	275.75 ± 26.66
<i>Gaultheria odorata</i> (Ericaceae) ^b	337.35 ± 18.75	> 500
<i>Cordia dodecandra</i> (Boraginaceae) ^b	> 500	348.52 ± 25.08
<i>Talisia oliviformis</i> (Sapindaceae) ^c	453.96 ± 25.70	> 500

¹ Media de resultados ± DS, (n=3); Efectos analizados: Plantas (F= 27.932, p < 0.05), Extracto (F= 35.600, p < 0.05), Planta*extracto (F= 161.295, p < 0.05).

El ANOVA bifactorial evidenció efectos favorables de la planta (F = 27.932, p < 0.05), del tipo de extracto (F = 35.600, p < 0.05) y de su interacción (F = 161.295, p < 0.05) sobre la actividad anti-*T. foetus*. La interacción significativa indica que el efecto del extracto varía según la planta evaluada, lo que sugiere una relación específica entre especie vegetal y el solvente de extracción. Al comparar las medias (Tukey, α = 0.05) se encontró diferencia significativa en la actividad anti-tricomonas entre las especies vegetales evaluadas. *T. oliviformis* mostró la menor actividad y se diferenció significativamente de *T. nelsonii*, que presentó la mayor eficacia. Las especies *G. odorata* y *C. dodecandra* ocuparon posiciones intermedias y no difirieron estadísticamente de las otras especies, formando un grupo homogéneo con ambas. Estos resultados apoyan la existencia de variabilidad anti-*T. foetus* relevante entre las plantas medicinales, que podría relacionarse con su perfil químico.

Aislamiento de los compuestos con actividad antiprotozoaria a través de fraccionamiento quimiobiodirigido.

Partición y fraccionamiento quimiobiodirigido de los extractos de *T. nelsonii* y *G. odorata*.

Siendo *T. nelsonii* la planta con la mayor actividad antiprotozoaria, seguido de *G. odorata* y tomando como punto de partida el rendimiento de cada extracto, se realizó la partición de los extractos metanólico con Diclorometano.

La parte soluble en Diclorometano (PSDCM) de los extractos metanólicos de *T. nelsonii* y *G. odorata* presentaron la mejor actividad antiprotozoaria frente a *E. histolytica* y *T. vaginalis*. La actividad antiprotozoaria del proceso de partición se resume en la Tabla 8.

Tabla 8. Actividad antiprotozoaria de las particiones del extracto metanólico de *T. nelsonii* y *G. odorata*.

Planta	Actividad antiprotozoaria (CI ₅₀ µg/mL)			
	<i>E. histolytica</i>		<i>T. vaginalis</i>	
	PSDCM	PISDCM	PSDCM	PISDCM
<i>T. nelsonii</i>	100.90 ± 8.68	> 200	131.04 ± 1.98	> 200
<i>G. odorata</i>	138.80 ± 4.48	> 200	161.56 ± 0.45	> 200

* Partición: PSDCM= parte soluble; PISDCM= parte insoluble

Los resultados sugieren que los compuestos con actividad antiprotozoaria son de naturaleza no polar y han de encontrarse en mayor proporción en los extractos hexánicos por lo cual, TnH y GoH se sometieron a fraccionamiento quimiobiodirigido aislándose dos compuestos de alta pureza, como sólidos cristales de color blanco a partir de *T. nelsonii* y un compuesto con las mismas características físicas a partir de *G. odorata*. El proceso de fraccionamiento quimiobiodirigido de los extractos se presenta en las figuras 16, 17, 18 y 19.

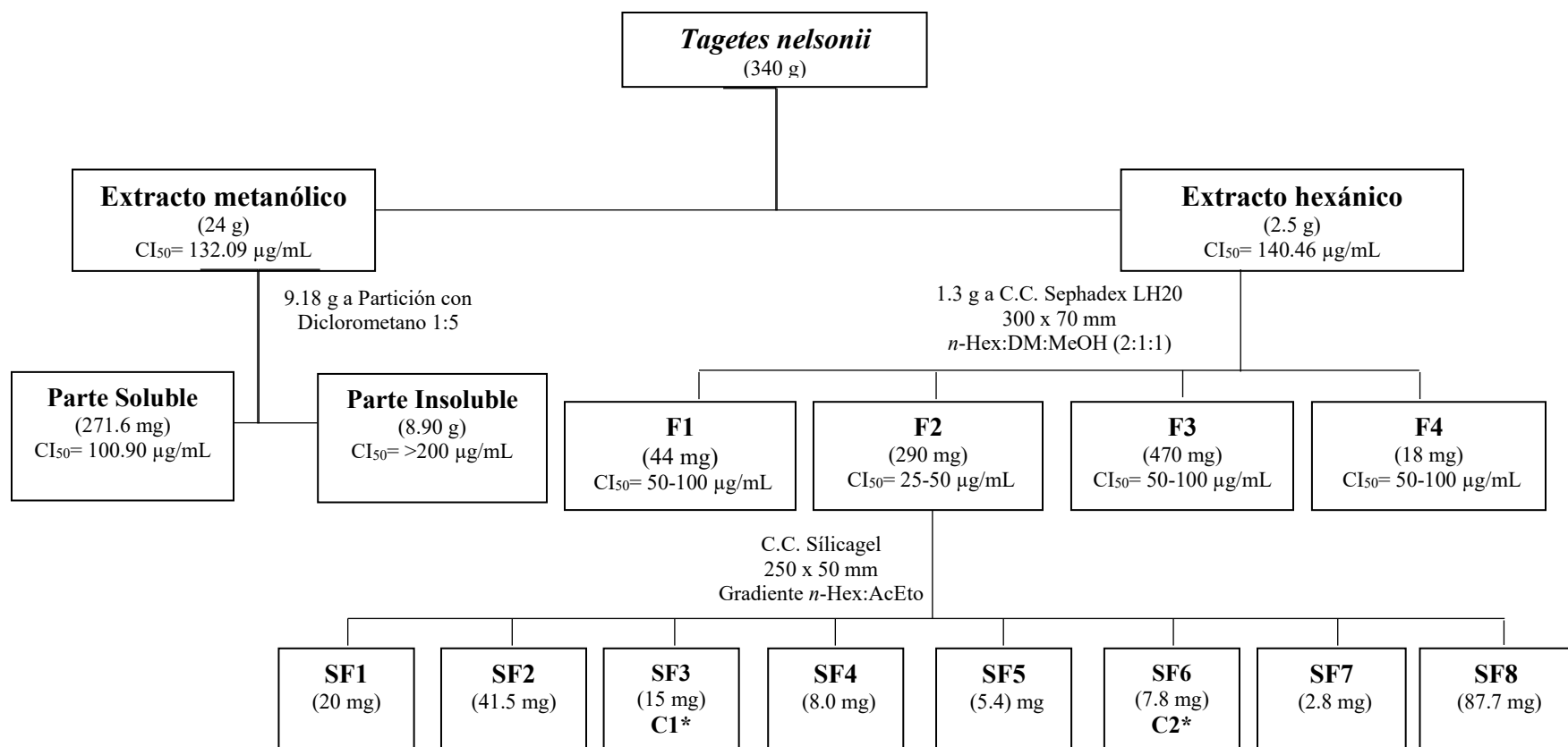


Figura 16. Esquema de fraccionamiento quimiobiodirigido de *T. nelsonii* frente a *E. histolytica*: F1-4: fracciones, SF1-8: subfracciones. * Compuesto aislado de alta pureza indicado mediante RMN- ^1H

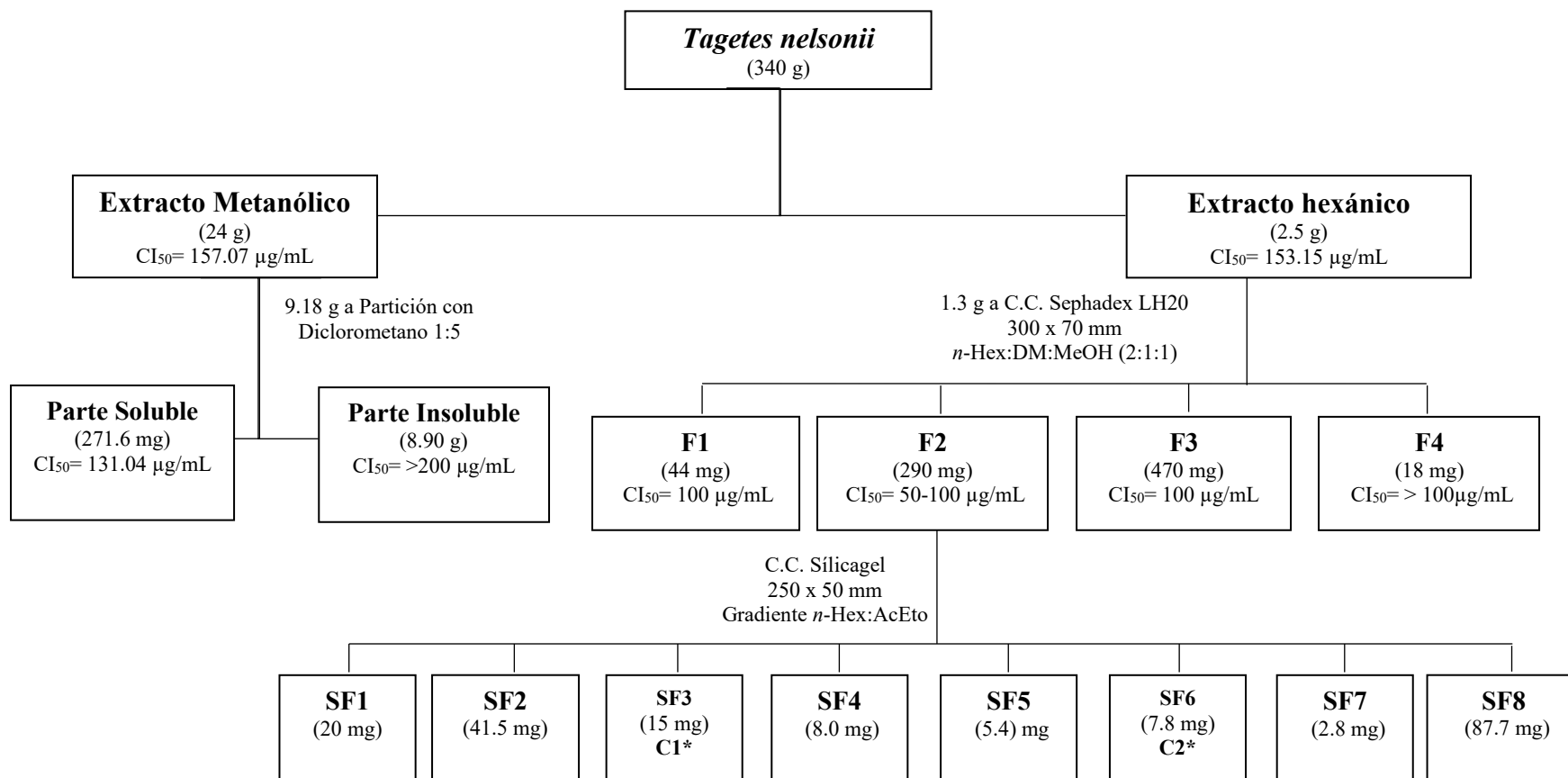


Figura 17. Esquema de fraccionamiento quimiobiodirigido de *T. nelsonii* frente a *T. vaginalis*: F1-4: fracciones, SF1-8: subfracciones. * Compuesto aislado de alta pureza indicado mediante RMN- H^1

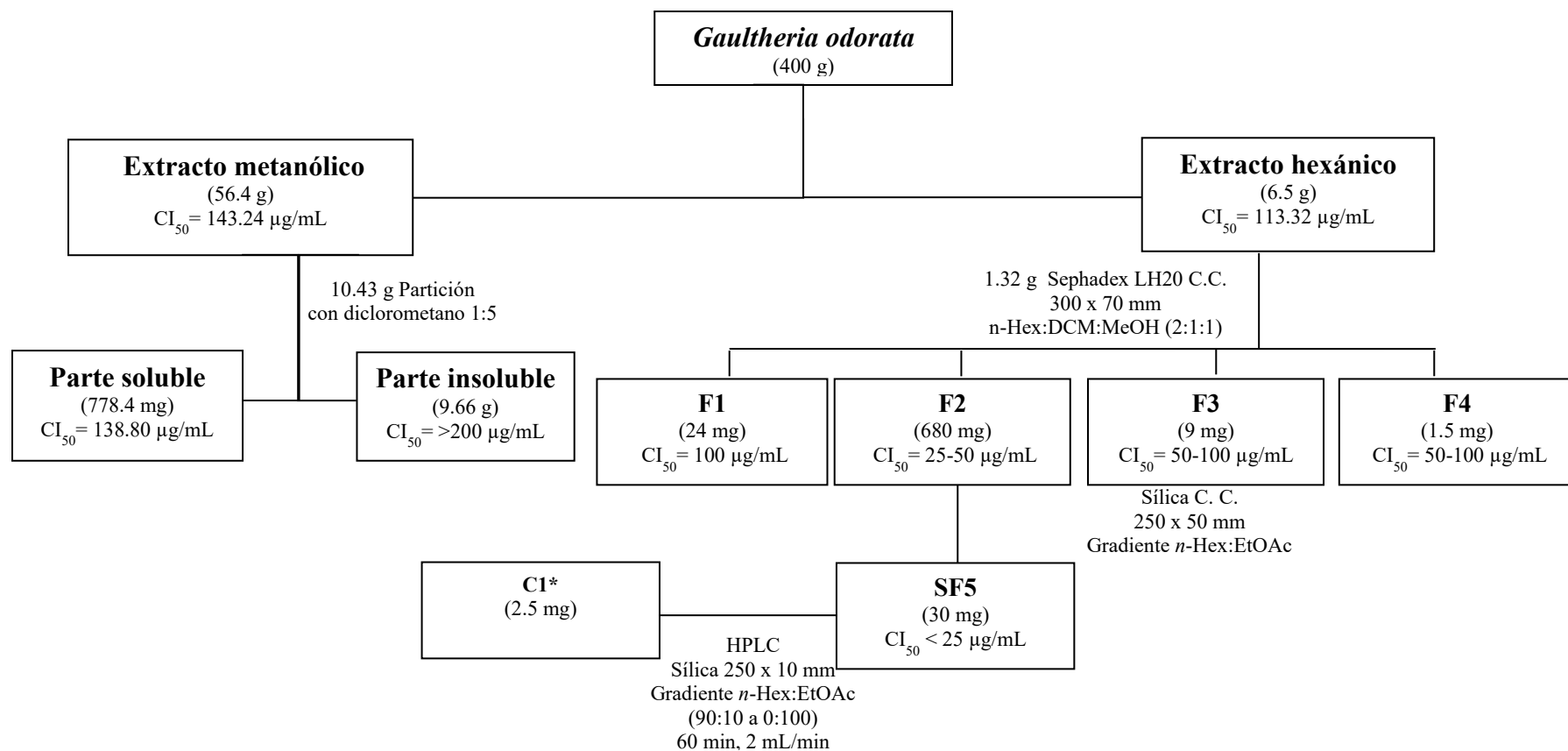


Figura 18. Esquema de fraccionamiento quimiobiodirigido de *G. odorata* frente a *E. histolytica*: F1-4: fracciones, SF5: subfracción 5. * Compuesto aislado de alta pureza indicado mediante RMN- ^1H

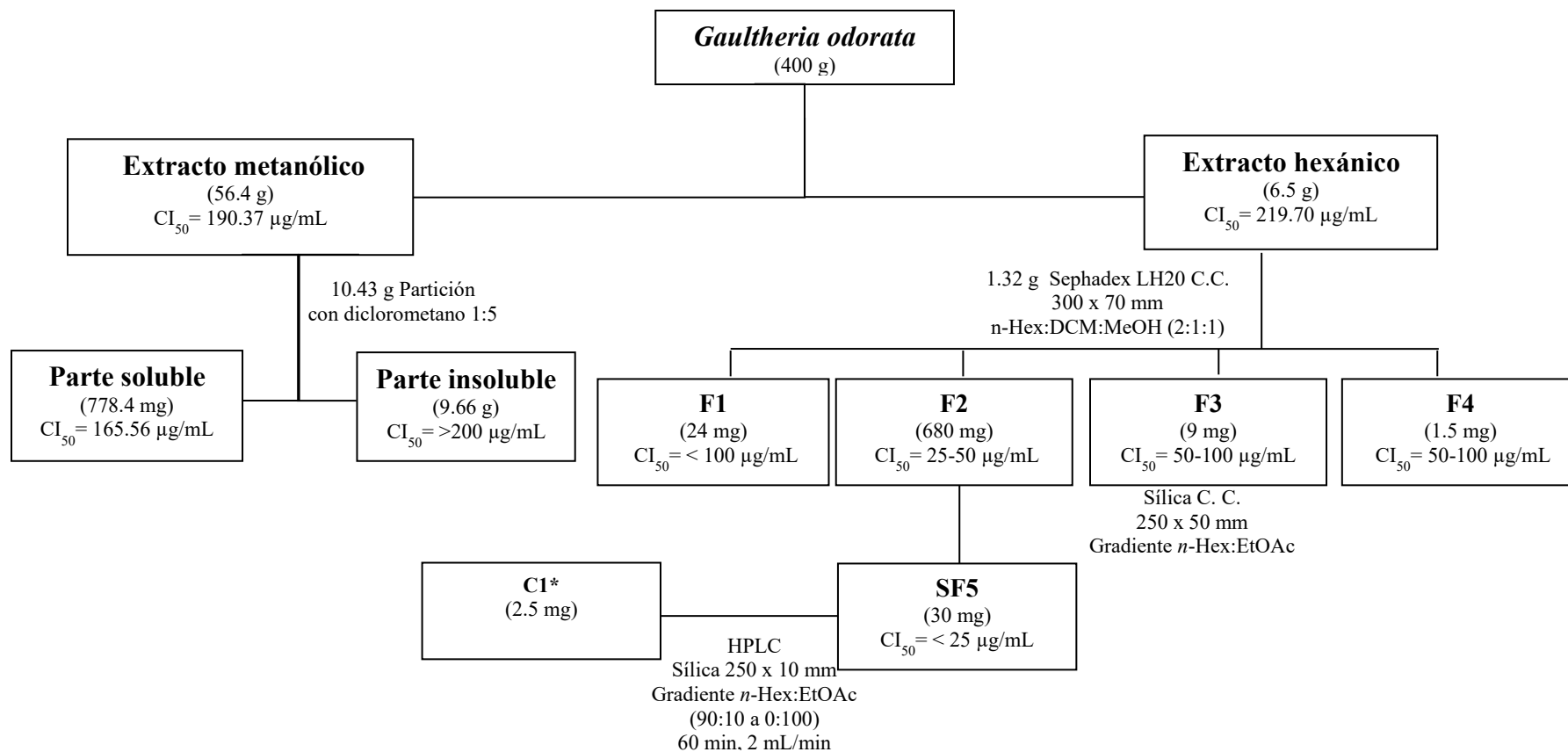


Figura 19. Esquema de fraccionamiento quimiobiodirigido de *G. odorata* frente a *T. vaginalis*: F1-4: fracciones, SF5: subfracción 5. * Compuesto aislado de alta pureza indicado mediante RMN- ^1H

Elucidación de los compuestos aislados mediante Resonancia Magnética Nuclear.

Análisis espectroscópico RMN del compuesto 1 de *T. nelsonii*.

La estructura de los compuestos aislados fue elucidada mediante espectroscopia por resonancia magnética nuclear RMN- H^1 (600 MHz, $CDCl_3$), RMN- C^{13} (125 MHz $CDCl_3$) y análisis bidimensional de correlación nuclear (RMN-2D: HSQC, HMBC).

El espectrograma del compuesto **1** reveló la existencia de señales para protones con desplazamientos químicos (δ_H) menores a 5 ppm, de las cuales se distinguen dos señales como singuletes que integran un protón cada una (δ_H) de 4.69 y 4.57 ($J = 2.5$ Hz y $J = 1.5$, 2.7 Hz, respectivamente); una señal a δ_H de 3.64 como doble triplete integra un protón ($J = 1.2$, 6.7, 6.7 Hz), una señal a δ_H de 3.18 como doble doblete que integra un protón ($J = 4.7$, 11.6 Hz); seis señales como singuletes que integran para tres protones cada una con δ_H a 1.65, 1.03, 1.01, 0.97, 0.94, 0.83.

El espectro RMN- C^{13} reveló poco más de 30 señales, dos señales con δ_C 151.2 y 109.4 así como una señal con δ_C de 79.1.

El análisis bidimensional de correlación heteronuclear de carbono y protón a un enlace (HSQC) mostró la correlación entre los protones con δ_H de 4.69 y 4.57 y la señal δ_C de 109.4, correlación de una posible agrupación olefina, la señal δ_H 3.64 con δ_C de 63.2 así como también la señal del protón con δ_H de 3.18 y la señal δ_C de 79.1, propia de una relación oximetino. Las siete señales que integran 3 protones cada una, correlacionan con carbonos con desplazamientos químicos en campo alto (< 30 ppm), zona para grupos metilo. La señal de carbono con δ_C de 151.2 no mostró correlación con protones, lo que indica que se trata de un carbono cuaternario. La información descrita es concordante para el compuesto Betulina.

La Tabla 9, muestra la información completa de los espectros RMN- H^1 y RMN- C^{13} del compuesto **1** aislado. La estructura molecular y los espectros descritos se muestran en las figuras 20, 21 y 22.

Tabla 9. Desplazamientos químicos de RMN- H^1 y C^{13} del compuesto 1 aislado de *T. nelsonii*.

Posición	Compuesto 1		
	Tipo	δ_C	δ_H (J Hz)*
1	CH ₂	32.7	2.04
2	CH ₂	25.1	1.68, m
3	CH	79.1	3.18, dd (4.7, 11.6)
4	C	37.1	-
5	CH	55.2	1.41, m
6	CH ₂	18.2	1.51, m
7	CH ₂	34.2	1.39, m
8	C	40.8	-
9	CH	50.4	1.25, m
10	C	37.1	-
11	CH ₂	20.9	1.67, m
12	CH ₂	25.6	1.66, m
13	CH	38.0	2.03, d
14	C	42.8	-
15	CH ₂	27.3	1.87, m
16	CH ₂	29.3	1.47, m
17	C	47.9	-
18	CH	48.3	1.29, m
19	CH	50.4	2.37, td, (5.9, 11.1, 11.1)
20	C	151.2	-
21	CH ₂	29.8	1.18, m
22	CH ₂	39.9	1.66, m
23	CH ₃	27.9	1.03, s
24	CH ₃	15.3	0.94, s
25	CH ₃	16.0	0.83, s
26	CH ₃	15.9	1.01, s
27	CH ₃	14.6	0.97, s
28	CH ₂	63.2	3.64, t (1.2, 6.7, 6.7)
29	CH ₂	109.4	4.69, d (2.5)
			4.57, dd (1.5, 2.7)
30	CH ₃	19.3	1.65, s

* señal: d= doblete, m= multiplete, s= singulete, t= triplete

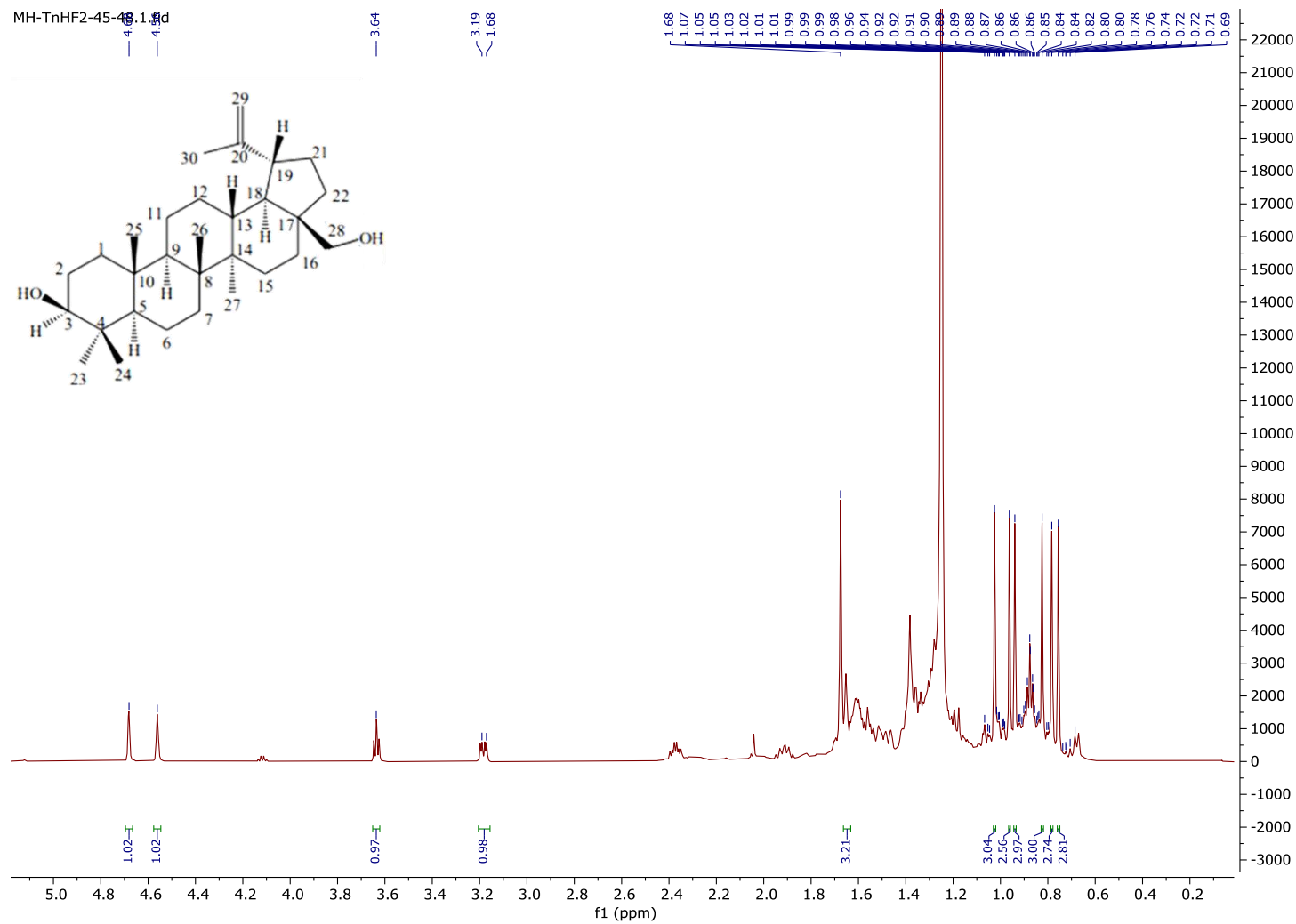


Figura 20. Estructura y Espectro de RMN- H^1 (600 MHz, CDCl_3) del Compuesto 1 aislado del extracto hexánico de *T. nelsonii*.

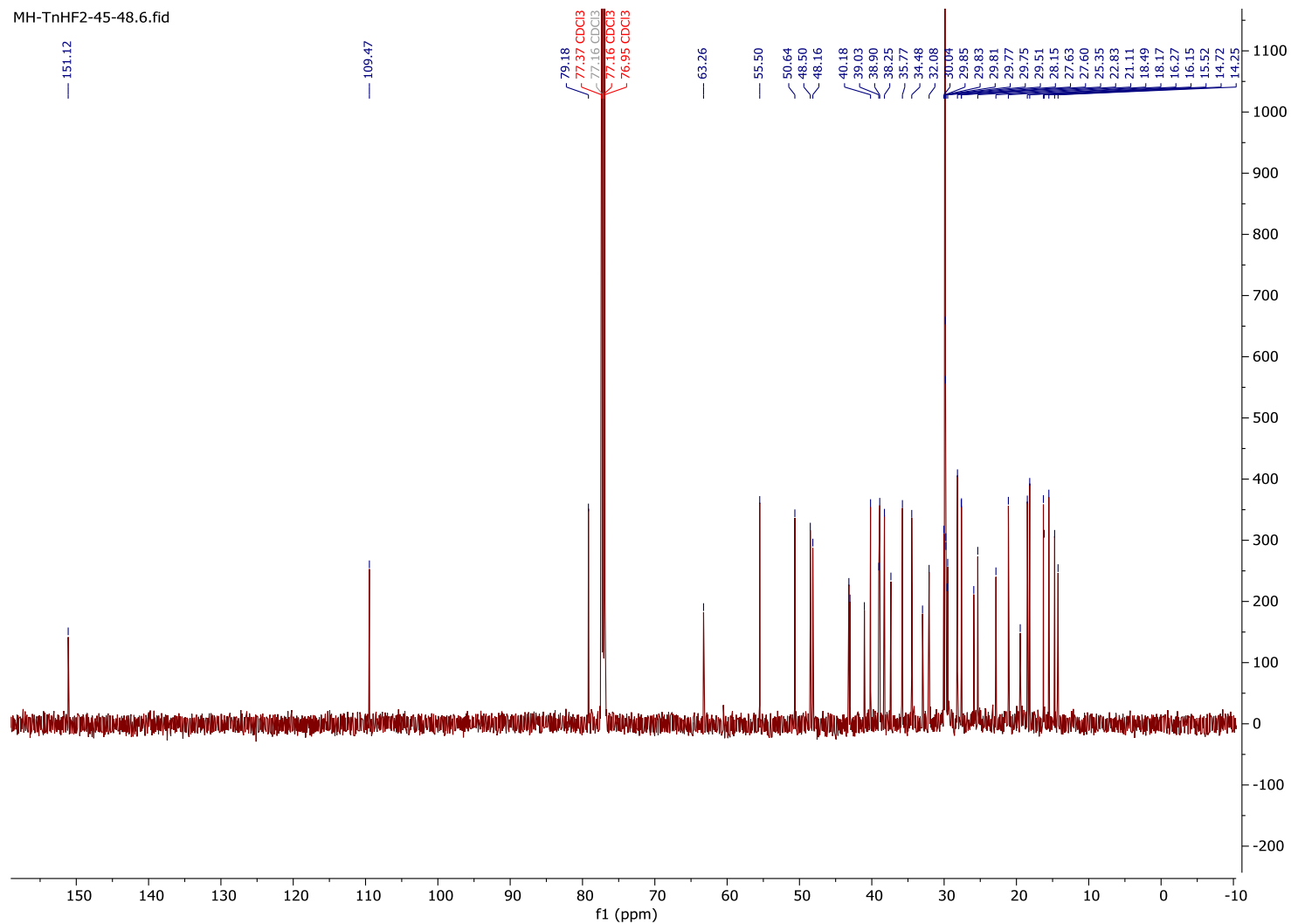


Figura 21. Espectro de RMN- C^{13} (151 MHz, $CDCl_3$) del Compuesto 1 aislado del extracto hexánico de *T. nelsonii*.

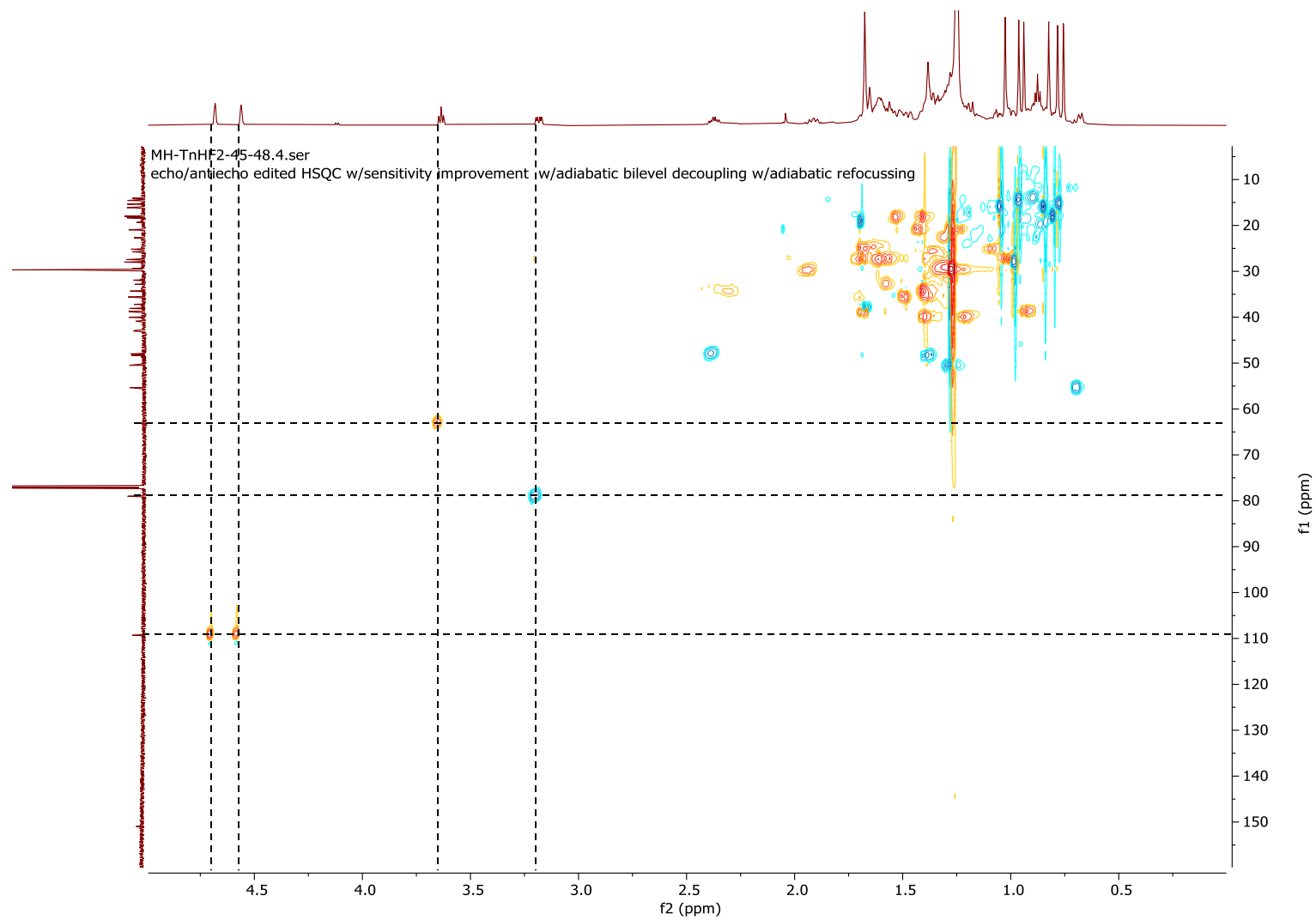


Figura 22. Espectro de HSQC del Compuesto 1 aislado del extracto hexánico de *T. nelsonii*.

Análisis espectroscópico RMN del compuesto 2 de *T. nelsonii*.

El espectro RMN- H^1 del compuesto **2** mostró la existencia de señales para protones con desplazamientos químicos (δ_H) menores a 5.4 ppm, de las cuales se distinguen: una señal como doble doblete para un protón a (δ_H) de 5.35 ($J = 2.3$ Hz y 5.1 Hz); dos señales como dobles dobletes que integran un protón cada una (δ_H) de 5.15 ($J = 8.5$ Hz y 15.2 Hz) y 5.02 ($J = 8.7$ Hz y 15.2 Hz); una señal a δ_H de 3.52 como multiplete que integra un protón; tres señales como singuletes que integran para tres protones cada una con δ_H a 1.02, 1.01, 0.69; tres señales multiplete que integran tres protones a δ_H 0.85, 0.84 y 0.80.

El espectro RMN- C^{13} mostró 29 señales, cuatro señales a campo bajo con δ_C 140.7, 138.2, 129.7 y 121.6 así como una señal con δ_C de 71.7.

Por otra parte, el análisis bidimensional de correlación heteronuclear de carbono y protón a un enlace (HSQC) mostró la correlación entre el protón con δ_H de 5.36 y la señal δ_C de 121.65; la señal de los protones con δ_H de 5.15 y 5.02 con las señales δ_C de 138.2 y 129.7, respectivamente, correlación de una posible agrupación olefina, así como también la señal del protón con δ_H de 3.52 y la señal δ_C de 71.7, propia de una relación oximetino. Las seis señales que integran 3 protones cada una, correlacionan con carbonos con desplazamientos químicos menores a 30 ppm, zona de grupos metilo. La señal de carbono con δ_C de 140.7 no mostró correlación con protones, lo que indica que se trata de un carbono cuaternario. La información descrita es concordante para el compuesto Estigmaesterol.

La Tabla 10, muestra la información completa de los espectros RMN- H^1 y RMN- C^{13} del compuesto **2** aislado. La estructura molecular y los espectros descritos se muestran en las figuras 23, 24 y 25.

Tabla 10. Desplazamientos químicos de RMN- ^1H y ^{13}C del compuesto 2 aislado de *T. nelsonii*.

posición	C2 Estigmasterol		
	Tipo	δ_{C}	δ_{H} (J Hz)
1	CH ₂	37.4	1.01, m
2	CH ₂	31.5	1.85, m
3	CH	71.7	3.52, m
4	CH ₂	42.3	2.23, m
5	C	140.7	-
6	CH	121.6	5.36, dd (2.3, 5.1)
7	CH ₂	31.8	1.85, m
8	CH	31.5	1.83, m
9	CH	50.1	1.01, m
10	C	36.4	-
11	CH ₂	21.1	1.52, m
12	CH ₂	39.5	2.05-2.02, m
13	C	42.2	-
14	CH	56.8	1.02, m
15	CH ₂	24.2	1.60, m
16	CH ₂	29.2	1.70, m
17	CH	55.9	1.13, m
18	CH ₃	12.1	0.69, s
19	CH ₃	19.6	1.01, s
20	CH	39.7	2.02, m
21	CH ₃	21.1	1.02, s
22	CH	138.2	5.15, dd (8.5, 15.2)
23	CH	129.2	5.02, dd (8.7, 15.2)
24	CH	51.2	1.51, m
25	CH	31.8	1.46, m
26	CH ₃	21.1	0.85, m
27	CH ₃	18.7	0.84, t
28	CH ₂	24.9	1.69, m
29	CH ₃	11.8	0.80, m
30			

* señal: d= doblete, m= multiplete, s= singulete, t= triplete

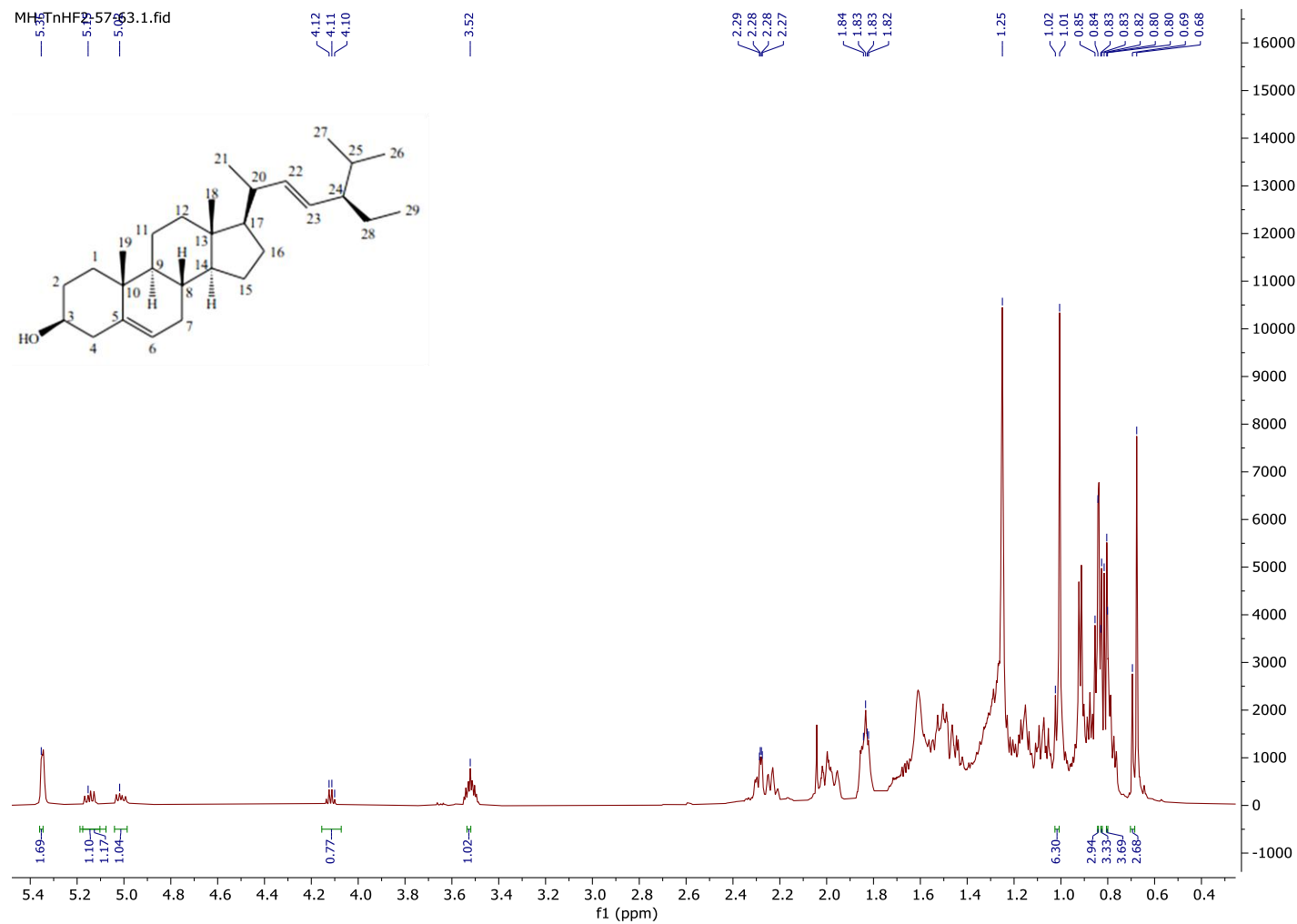


Figura 23. Estructura y Espectro de RMN- H^1 (600 MHz, CDCl_3) del Compuesto 2 aislado del extracto hexánico de *T. nelsonii*.

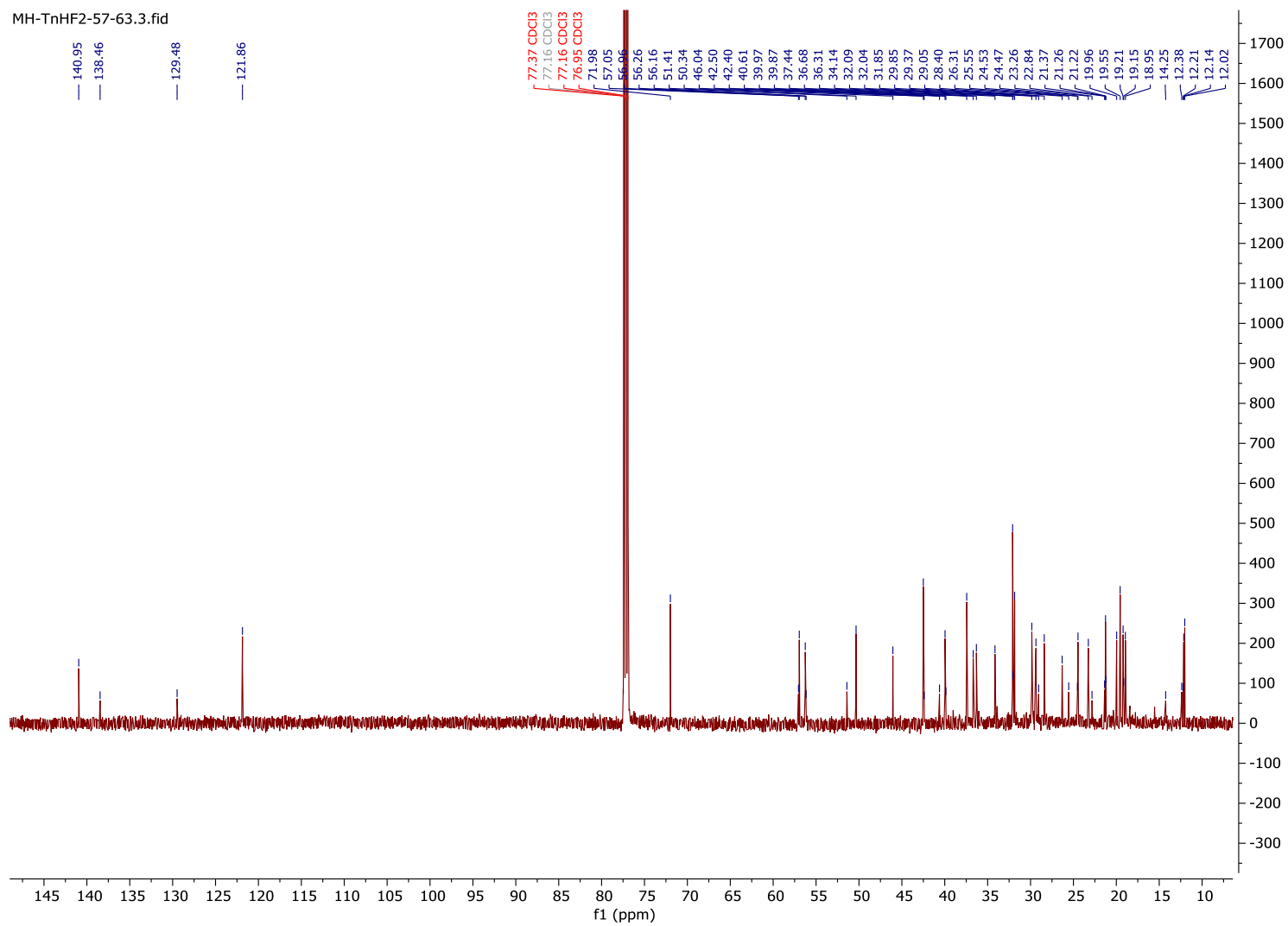


Figura 24. Espectro de RMN- C^{13} (151 MHz, $CDCl_3$) del Compuesto 2 aislado del extracto hexánico de *T. nelsonii*.

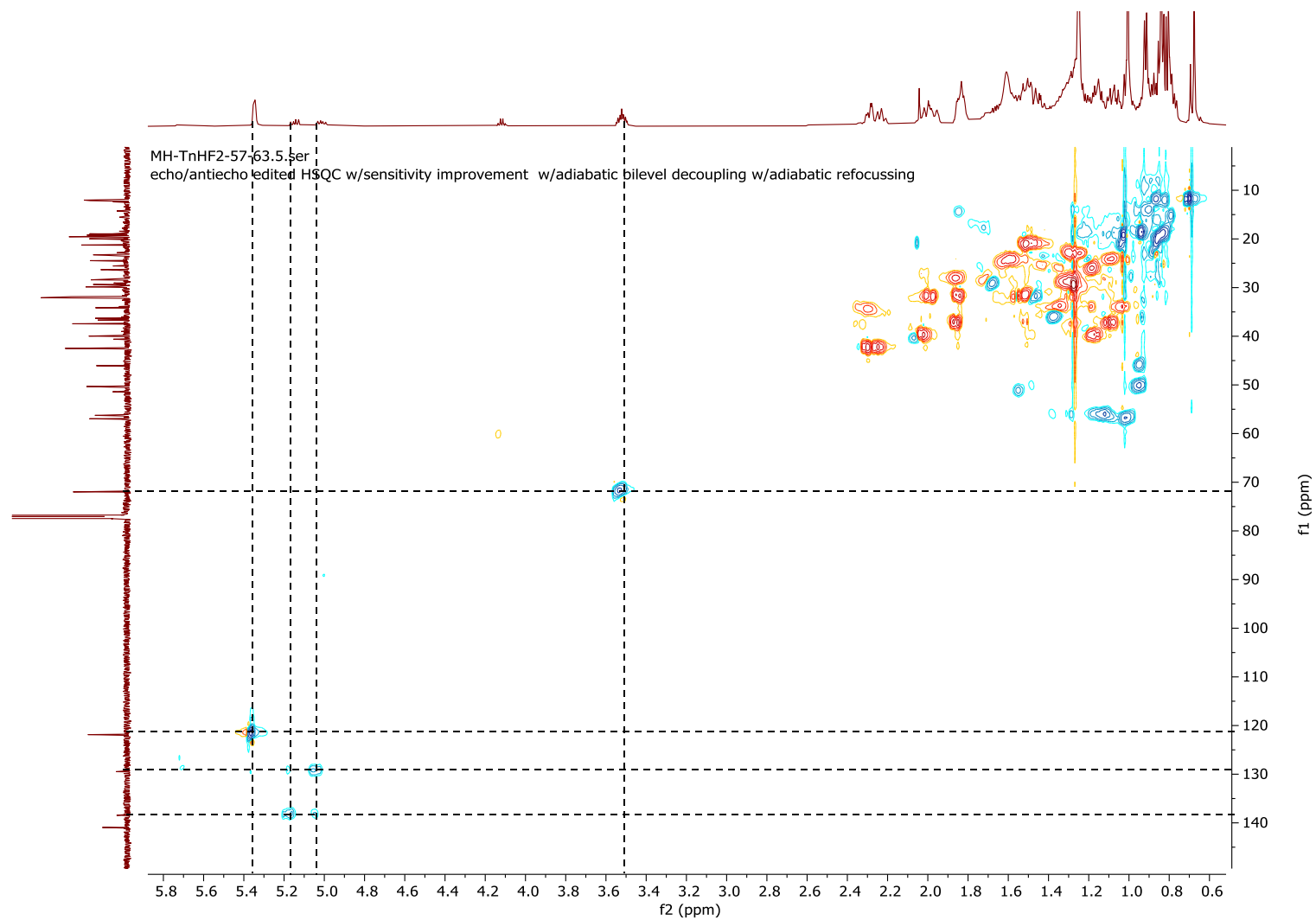


Figura 25. Espectro de HSQC del Compuesto 2 aislado del extracto hexánico de *T. nelsonii*.

Análisis espectroscópico RMN del compuesto aislado de *G. odorata*.

El espectro RMN- H^1 del compuesto mostró la existencia de señales para protones con desplazamientos químicos (δ_H) menores a 5.4 ppm, de las cuales se distinguen: una señal como doble doblete para un protón a (δ_H) de 5.36 ($J = 2.3$ Hz y 5.1 Hz); una señal a δ_H de 3.50 como multiplete que integra un protón; tres señales como singuletes que integran para tres protones cada una con δ_H a 0.82, 0.84, 0.85; tres señales multiplete que integran tres protones a δ_H 0.88, 0.84 y 0.80.

El espectro RMN- C^{13} mostró 29 señales, dos señales a campo bajo con δ_C 140.7 y 121.7 así como una señal con δ_C de 71.8.

Por otra parte, el análisis bidimensional de correlación heteronuclear de carbono y protón a un enlace (HSQC) mostró la correlación entre el protón con δ_H de 5.36 y la señal δ_C de 121.7, así como también la señal del protón con δ_H de 3.50 y la señal δ_C de 71.8, propia de una relación oximetino. Las seis señales que integran 3 protones cada una, correlacionan con carbonos con desplazamientos químicos menores a 30 ppm, zona de grupos metilo. La información descrita es concordante para el compuesto β -Sitosterol.

La Tabla 11, muestra la información completa de los espectros RMN- H^1 y RMN- C^{13} del compuesto aislado. La estructura molecular y los espectros descritos se muestran en las figuras 26, 27 y 28.

Tabla 11. Desplazamientos químicos de RMN- H^1 y C^{13} del compuesto aislado de *G. odorata*.

posición	B-Sitosterol		
	Tipo	δ_C	δ_H (J Hz)
1	CH ₂	37.2	1.10, m
2	CH ₂	31.9	1.84, m
3	CH	71.8	3.50, m
4	CH ₂	42.3	2.32, m
5	C	140.7	-
6	CH	121.7	5.36, dd (2.3, 5.1)
7	CH ₂	31.9	1.87, m
8	CH	31.7	1.83, m
9	CH	50.1	1.01, m
10	C	36.5	-
11	CH ₂	21.1	1.53, m
12	CH ₂	39.8	2.05-2.03, m
13	C	42.3	-
14	CH	56.8	1.03, m
15	CH ₂	24.3	1.60, m
16	CH ₂	28.2	1.70, m
17	CH	56.1	1.13, m
18	CH ₃	11.8	0.71, s
19	CH ₃	19.3	1.01, s
20	CH	36.1	2.02, m
21	CH ₃	18.7	1.02, s
22	CH ₂	33.9	1.20, m
23	CH ₂	26.1	1.19, m
24	CH	45.8	0.96, m
25	CH	29.2	1.46, m
26	CH ₃	19.8	0.85, m
27	CH ₃	19.0	0.85, t
28	CH ₂	26.1	1.69, m
29	CH ₃	11.9	0.88, m

* señal: d= doblete, m= multiplete, s= singulete, t= triplete

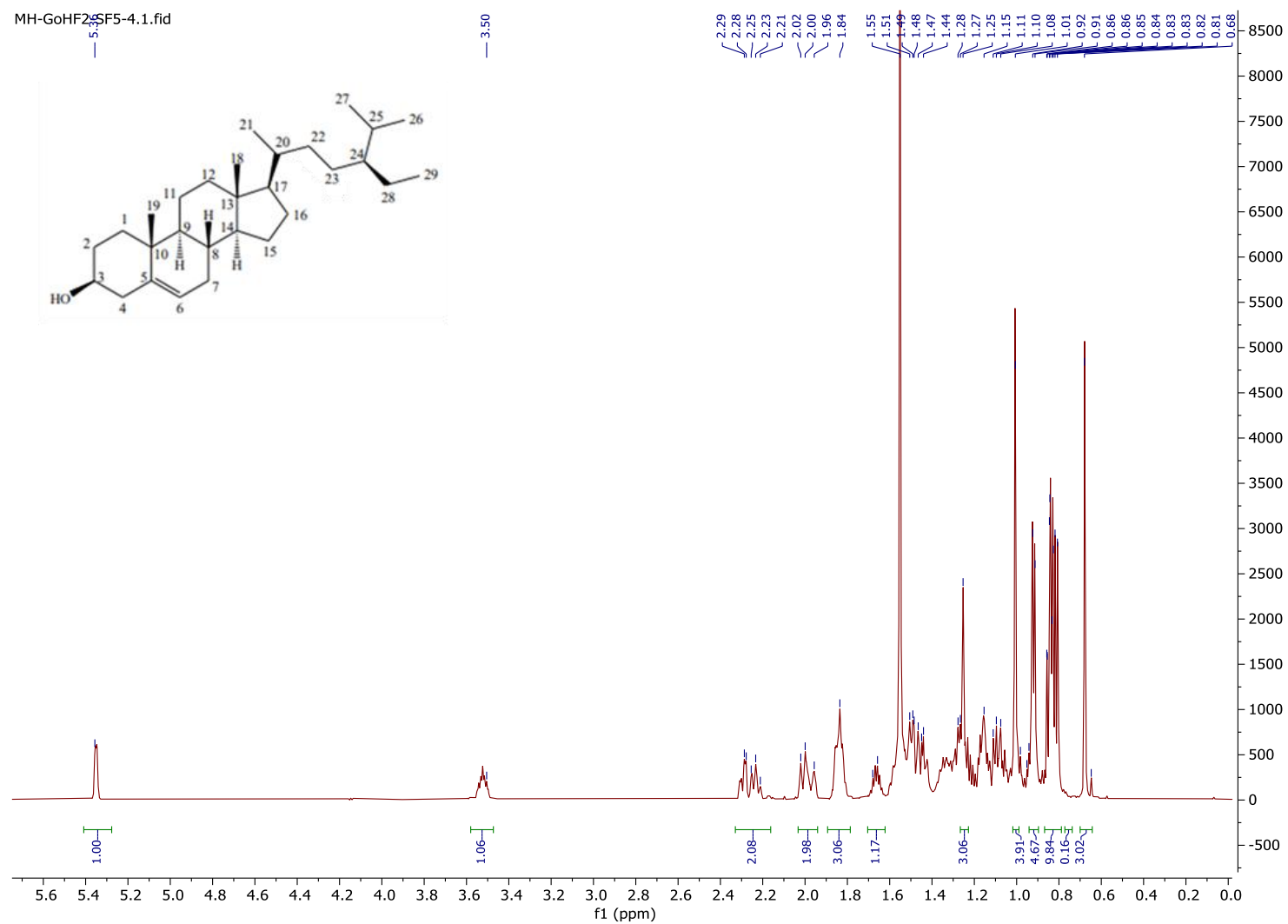


Figura 26. Espectro de RMN- H^1 (600 MHz, CDCl_3) del Compuesto aislado del extracto hexánico de *G. odorata*.

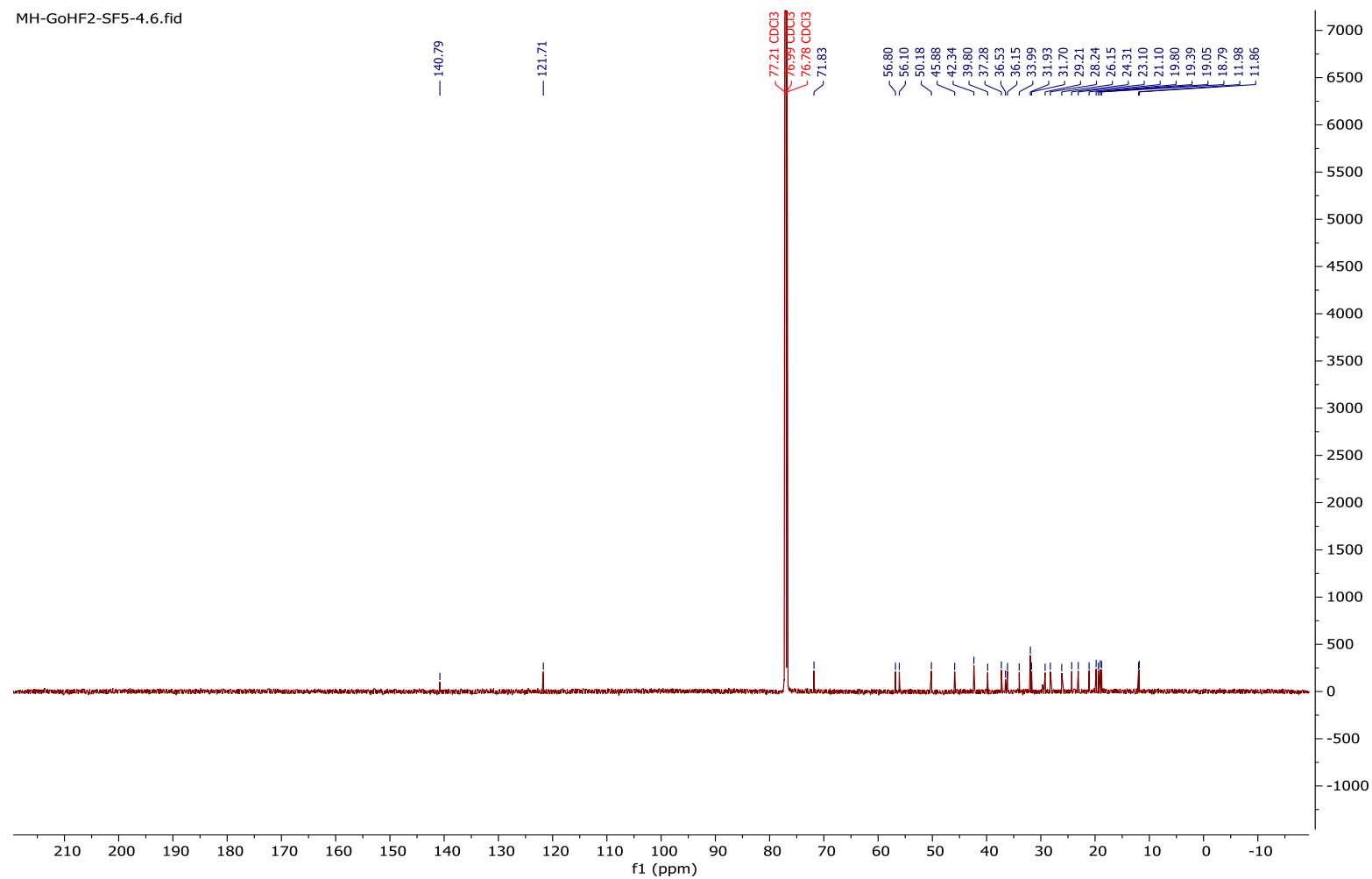


Figura 27. Espectro de RMN- C^{13} (151 MHz, $CDCl_3$) del Compuesto aislado del extracto hexánico de *G. odorata*.

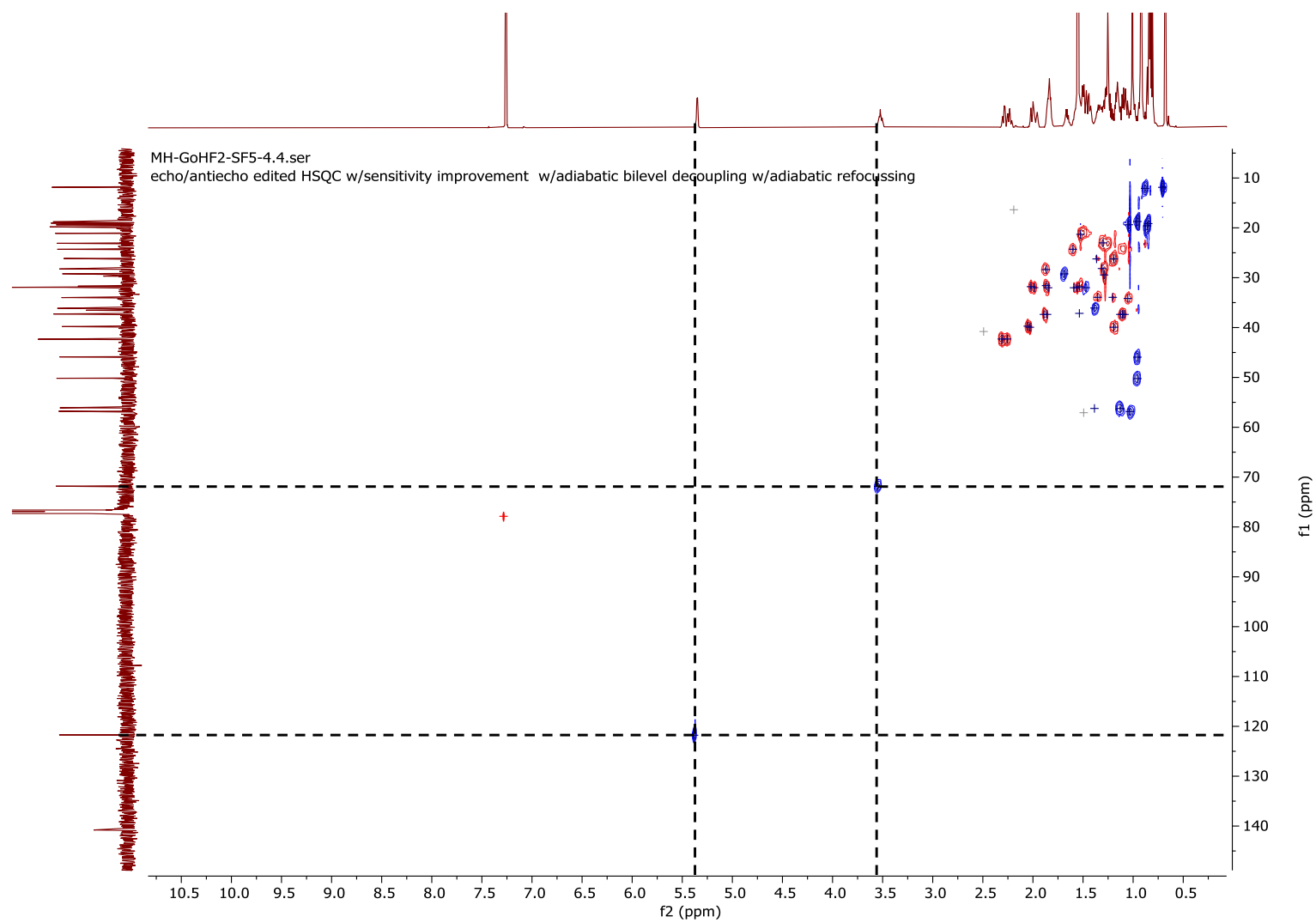


Figura 28. Espectro de HSQC del Compuesto aislado del extracto hexánico de *G. odorata*.

Actividad antiprotozoaria *in vitro* de los compuestos aislados de *T. nelsonii* y *G. odorata*.

Los triterpenos aislados a partir de los extractos hexánicos de *T. nelsonii* y *G. odorata* fueron disueltos en etanol absoluto debido a su baja solubilidad en DMSO y con ello determinar su actividad antiprotozoaria frente a trofozoítos de *E. histolytica*, *T. vaginalis* y *T. foetus*. La actividad antiprotozoaria de los triterpenos (CI₅₀) se determinó menor a 55 µg/mL para *E. histolytica* y *T. vaginalis* mientras que para *T. foetus* solo se alcanzó a determinar el % de inhibición a 35 µg/mL. β-sitosterol presentó la mayor actividad antiprotozoaria frente a los tres protozoarios con una CI₅₀ de 21.52 ± 2.22 µg/mL frente a *E. histolytica* mientras que para *T. vaginalis* la CI₅₀ fue de 33.87 ± 2.57 µg/mL. Además, se realizó un ANOVA factorial de dos vías sobre la actividad antiprotozoaria de los compuestos sobre los dos protozoarios. El análisis no encontró interacción significativa entre compuesto y protozoario (F= 2.79, p = 0.101), lo que indica que la eficacia de los compuestos fue consistente entre ambas especies. Se observaron efectos significativos para compuesto, (F= 31.555, p < 0.05) y para especie de parásito (F = 113.217, p < 0.05). Comparaciones post-hoc (Tukey) mostraron que el triterpeno β-sitosterol difiere significativamente de Estigmasterol y de Betulina (p < 0.05), Tabla 12.

Tabla 12. Actividad antiprotozoaria *in vitro* de los compuestos aislados.

Compuesto	Actividad antiprotozoaria (CI ₅₀ µg/mL) ¹		
	<i>E. histolytica</i>	<i>T. vaginalis</i>	<i>T. foetus</i> % (35 µg/mL)
Betulina^c	33.37 ± 4.58	54.50 ± 4.23	6.30 ± 1.54
Estigmasterol^b	23.35 ± 2.85	43.81 ± 4.30	23.84 ± 4.42
β-sitosterol^a	21.52 ± 2.22	33.87 ± 2.57	28.22 ± 0.52
Metronidazol	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.04	0.34 ± 0.04

¹ Media de resultados ± DS, (n=3); Efectos analizados: compuestos (F= 31.555, p < 0.05), Protozoario (F= 113.217, p < 0.05), compuesto*protozo (F= 2.789, p = 0.101).

Actividad antiprotozoaria *in silico* de los compuestos aislados de *T. nelsonii* y *G. odorata* mediante acoplamiento molecular.

Modelado molecular de las proteínas diana ASPK y PFOR.

Con la intención de elucidar un probable mecanismo de acción de los compuestos aislados de *T. nelsonii* y *G. odorata*, se realizó un análisis *in silico* de acoplamiento molecular con las enzimas Adenosín fosfosulfo quinasa (ASPK) y Piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR). Sin embargo, al no disponer de la estructura cristalizada experimentalmente, fue necesario construir y evaluar un modelo estructural de ambas proteínas. La estructura modelo desarrollada en SWISS-MODEL para la secuencia catalítica APSK (Ile294-Lys477 de BAN39620.1) y su evaluación por SAVESv6.0 se presentan en la Figura 29.

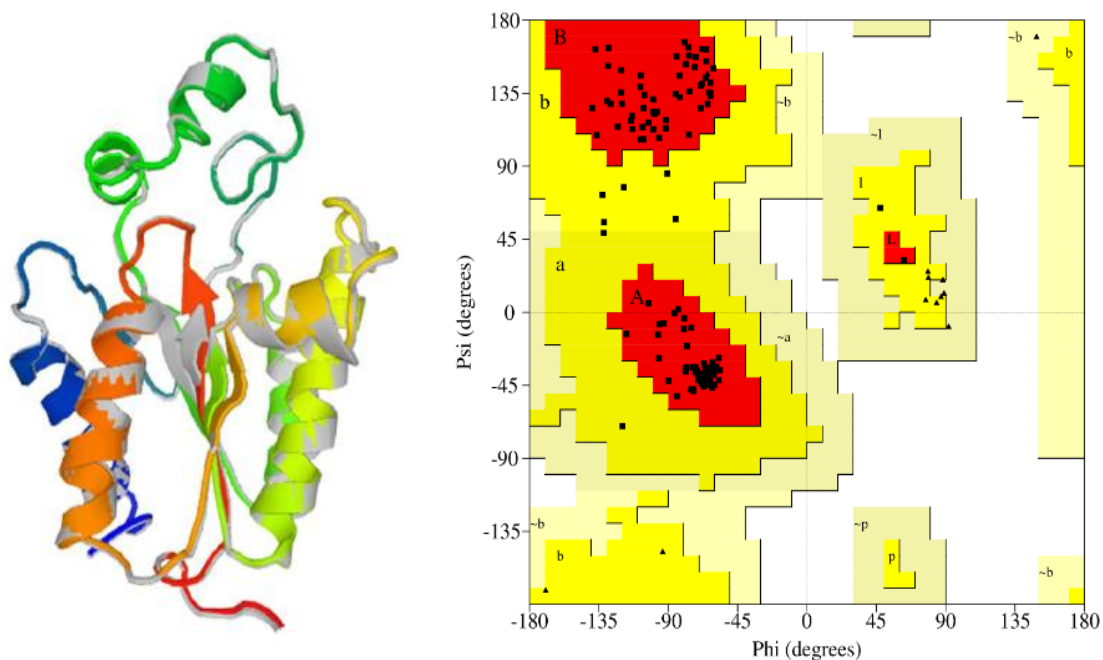


Figura 29. Estructura molecular modelo del dominio catalítico de ASPK de *E. histolytica* y su evaluación conformacional (gráfico de Ramachandran).

La calidad estructural basada en un análisis de 118 estructuras con resolución de 2.0 Å de la secuencia catalítica fue de un 95 %, es decir, 151 residuos de 184 que componen el dominio catalítico se situaron en la región favorable (zona roja) mientras que el 5 % de residuos en regiones permitidas (zona amarilla).

Por otra parte, la estructura molecular de la proteína homodimérica PFOR (UniProt: Q27088) se modeló en ALPHAFOLD3D, además se realizó un homólogo estructural con PFOR de *Desulfovibrio africanus*, Figura 30.

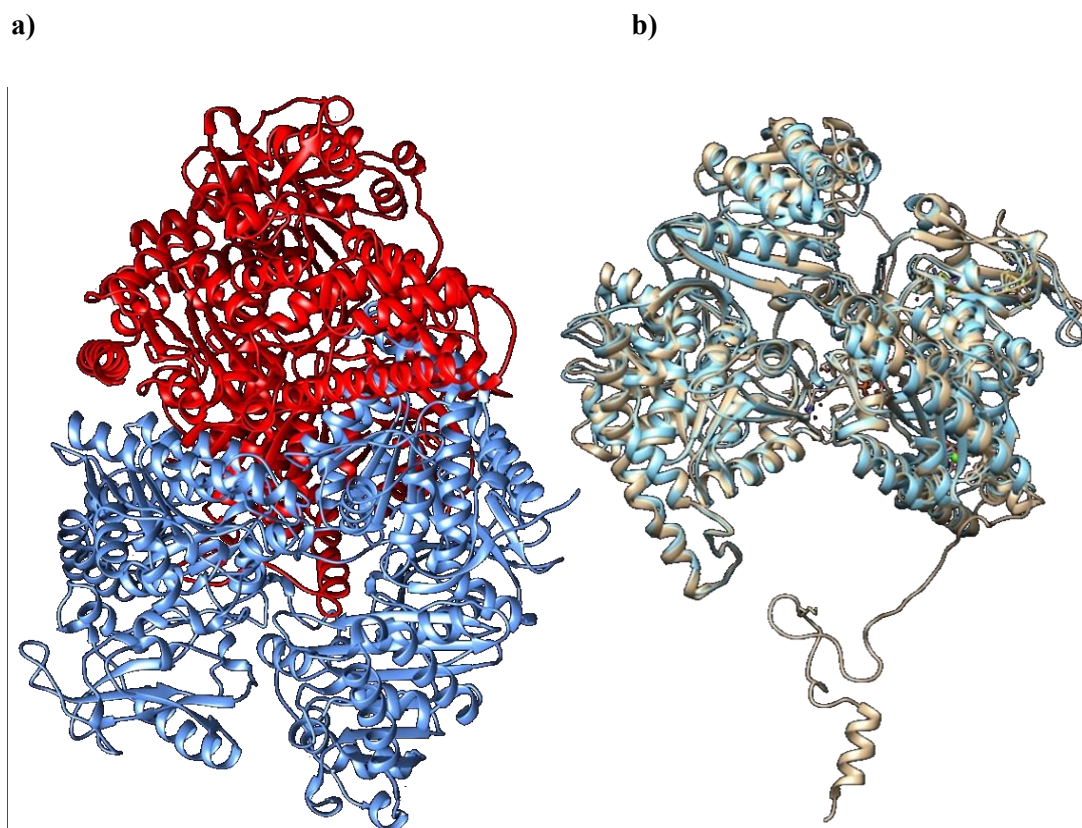


Figura 30. Estructura molecular modelo de PFOR de *T. vaginalis*: a) estructura homodímero, b) Homólogo de la estructura predicha con PFOR de *Desulfovibrio africanus*.

La calidad conformacional de la estructura modelo de PFOR, se analizó en Molprobit, el análisis informático señaló que todos los residuos pertenecen a las regiones favorecidas y permitidas (sin valores atípicos) en esta estructura de 3,7 Å. Visualmente, el gráfico de Ramachandran, Figura 31, no genera ninguna alarma importante, salvo que los residuos parecen estar distribuidos casi aleatoriamente dentro de las regiones favorecidas, con solo el 98 % dentro de estas regiones. Una puntuación Rama-Z -0.15 ± 0.16 (<2.0) y una puntuación Molprobit de 1.37.

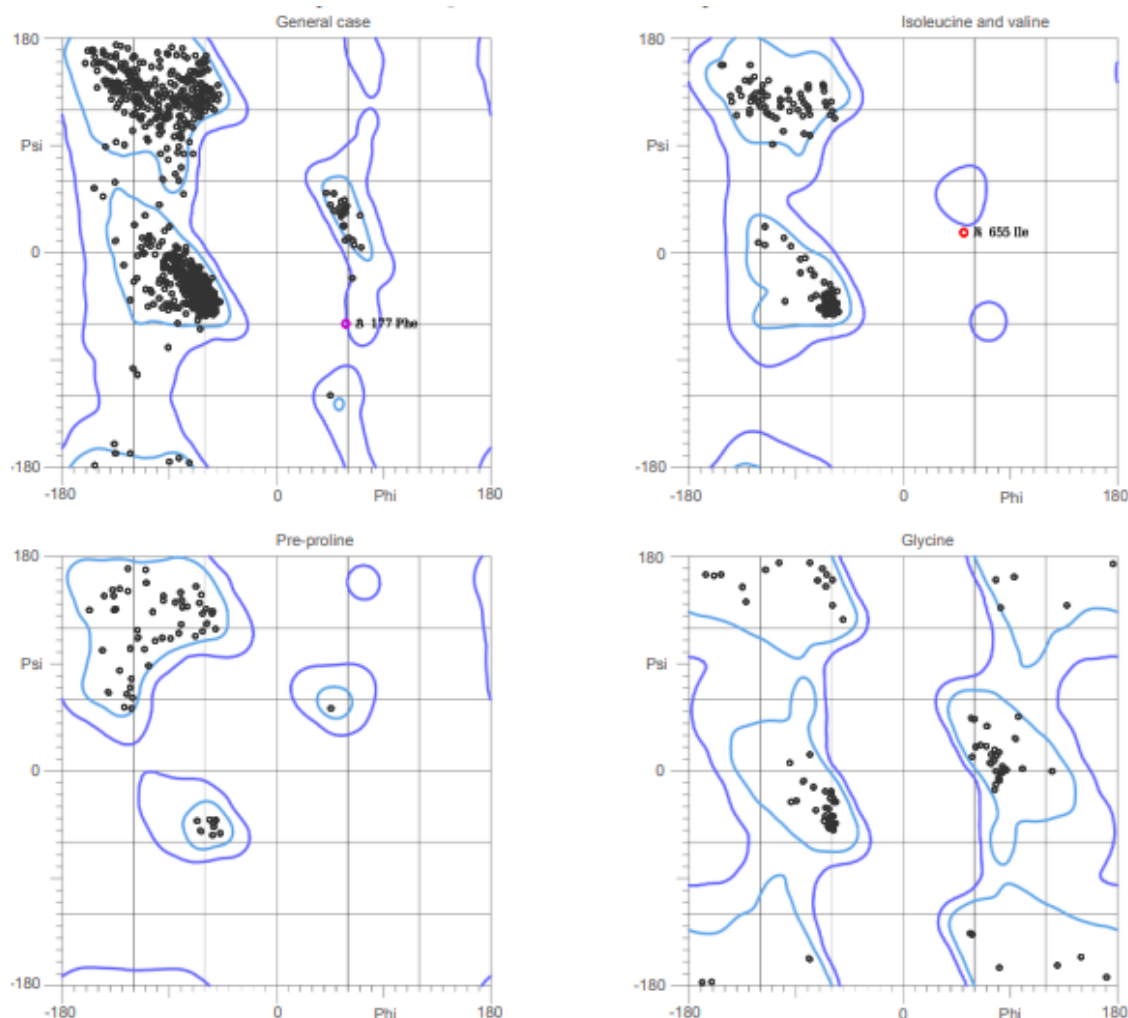


Figura 31. Gráfico de Ramachandran para el modelo proteico PFOR de *T. vaginalis*.

Acoplamiento molecular de los compuestos aislados de *T. nelsonii* y *G. odorata* con las proteínas ASPK y PFOR.

El acoplamiento molecular ciego semiflexible y dirigido semiflexible para los ligandos Betulina, Estigmasterol y β -sitosterol frente al dominio catalítico ASPK se ajustó utilizando Autodock en USCF Chimera. Para ello, se seleccionan las zonas que están cercanas al sitio de interés (ADX: adenosine-5'-phosphosulfate) y con buen ΔG . Este centro de acoplamiento ($x=22$, $y=22$ y $z=15$) fue determinado utilizando el servidor CAVERweb v1.2, por homología con secuencias de proteínas homólogas. Los residuos del sitio de unión de interés fueron: 46, 47, 50, 59, 64, 67, 68, 89, 90, 91, 92, 128, 130, 140, 141, 142, 148, Figura 32.

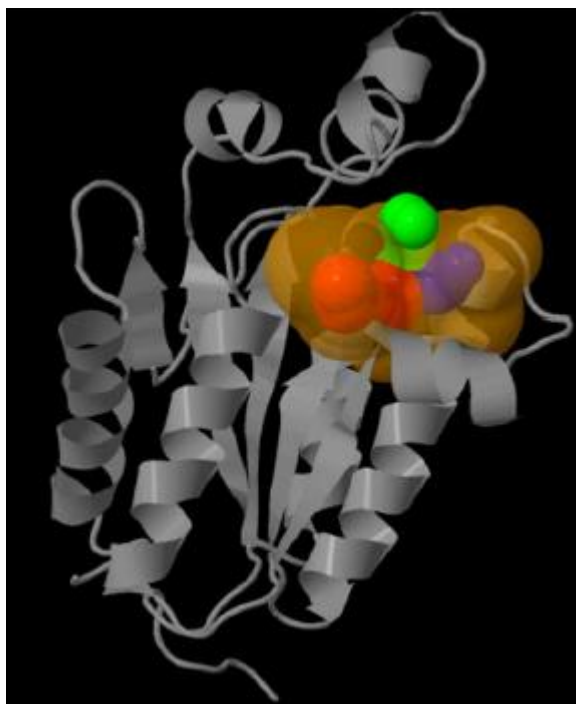


Figura 32. Centro de acoplamiento seleccionado del sitio activo del dominio catalítico de la proteína ASPK.

Al realizar el acoplamiento molecular, solamente se encontró interacción del ligando β -sitosterol con el centro de acoplamiento seleccionado, la energía de unión fue de -3.95 ± 0.26 para un total de tres conformómeros del ligando, Tabla 13.

Tabla 13. Acoplamiento molecular semiflexible de los compuestos aislados frente a dominio catalítico ASPK de *E. histolytica*.

Compuesto ^a	Sitio de unión de ligando ^b	Caja acoplamiento (Å)	Energía de unión (kcal/mol)	Puntuación de unión RMSD	Puentes de Hidrógeno	Interacciones Hidrofóbicas
Betulina ZINC3978650	ADX	22, 22, 15	-6.07 ± 0.27	6.38 ± 3.66	Sin interacciones	Sin interacciones
Estigmasterol ZINC4096712	ADX	22, 22, 55	-6.32 ± 0.62	0.96 ± 1.36	Sin interacciones	Sin interacciones
β-Sitosterol ZINC4095717	ADX	22, 22, 15	-3.95 ± 0.26	1.69 ± 0.26	Sin interacciones	Asp47, Asp50, Ile90, Lys128

^a Identidad de ligando en servidor ZINC20; ^b sitio de unión a Adenosín fosfosulfato.

La figura 33, muestra el acoplamiento molecular ciego y dirigido semiflexible para los ligandos Betulina y Estigmasterol con ASPK sin observación de interacción ligando-sitio de interés.

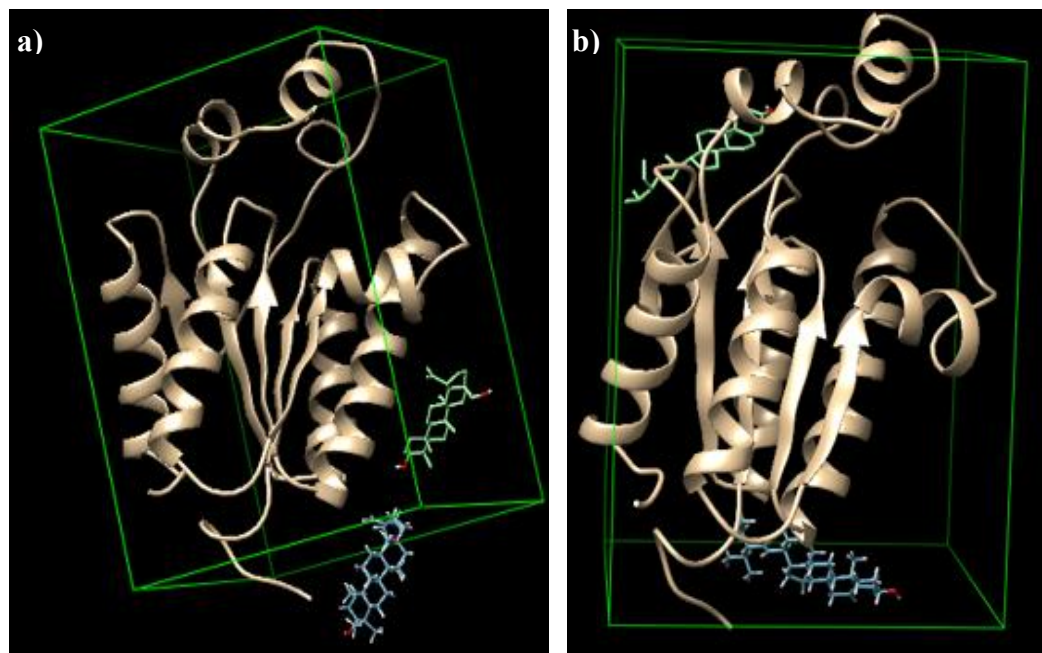


Figura 33. Acoplamiento molecular ciego y dirigido entre ligando-ASPK: a) Betulina, b) Estigmasterol: tamaño de caja ciego (x= 30, y= 32 y z= 44).

Después de analizar las poses del acoplamiento entre β -sitosterol y ASPK en UCSF Chimera, utilizando FindHBond y Find Clashes/Contacts, se encontraron 41 contactos o interacciones para uno de los conformómeros. Find Clashes/Contacts mostró interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales de los residuos S18, S23, D47, R127 e I48 de la proteína blanco y β -sitosterol, Figura 34.

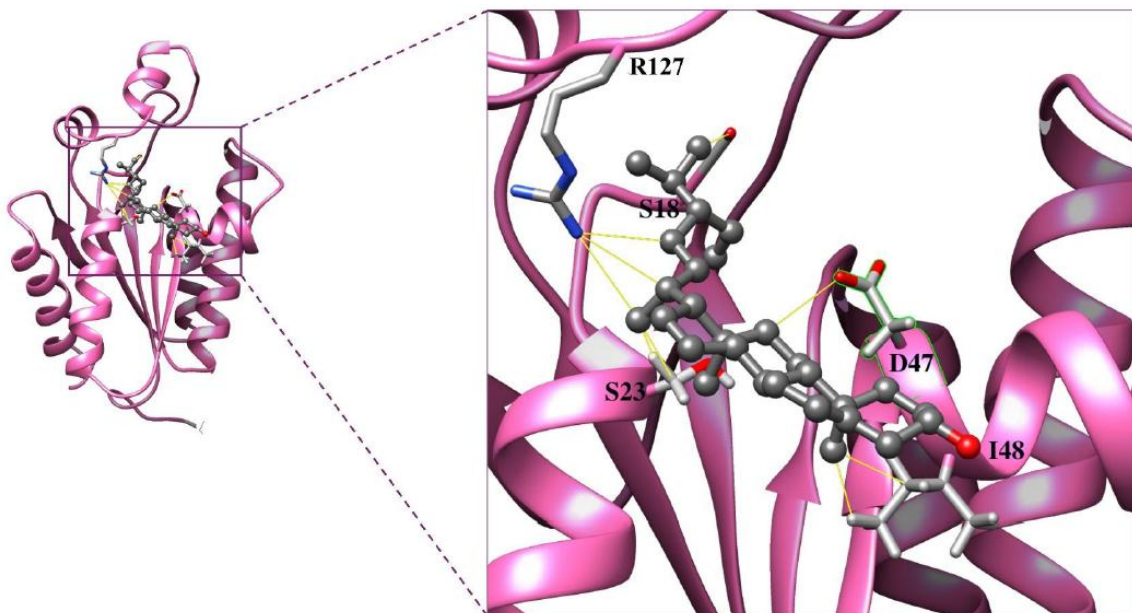


Figura 34. Interacciones hidrofóbicas en el acoplamiento molecular entre β -sitosterol y proteína ASPK.

Los contactos hidrofóbicos entre los carbonos de β -sitosterol y los residuos del dominio catalítico ASPK se visualizaron con el software LigPlot+ v2.2, Figura 35.

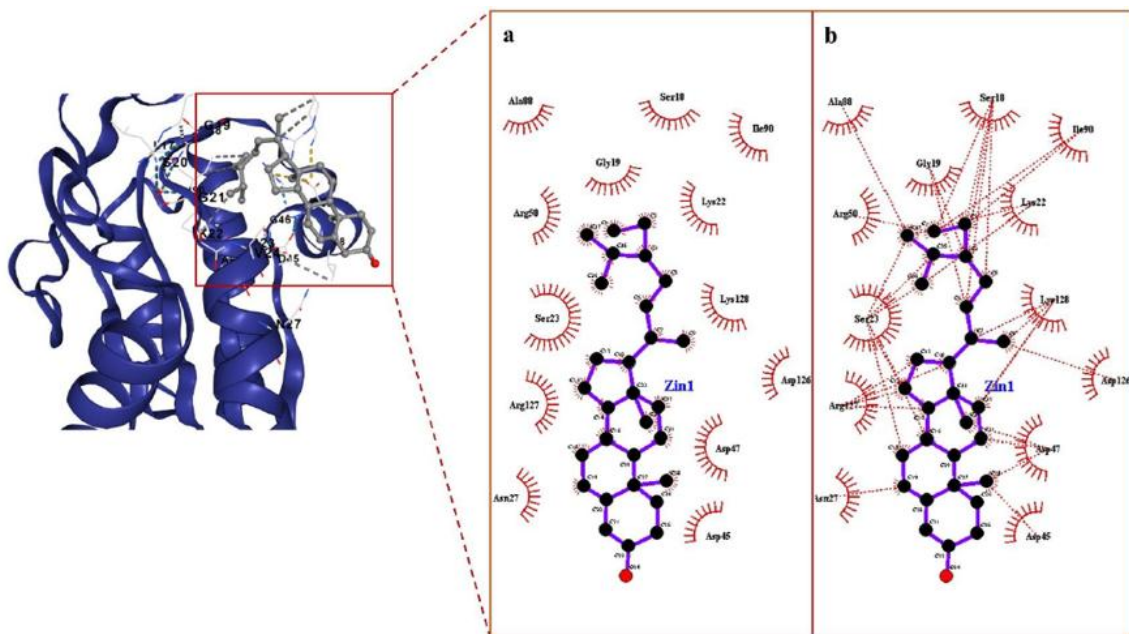


Figura 35. Contactos hidrofóbicos en el acoplamiento molecular entre β -sitosterol y proteína ASPK.

Para el acoplamiento molecular de los tres compuestos y la proteína PFOR se ejecutó un acoplamiento ciego y dirigido semiflexible con Autodock en USCF Chimera y en el servidor CB-DOCK. CB-DOCK proporcionó la caja de acoplamiento de interés en la cadena A del homodímero, Figura 36.

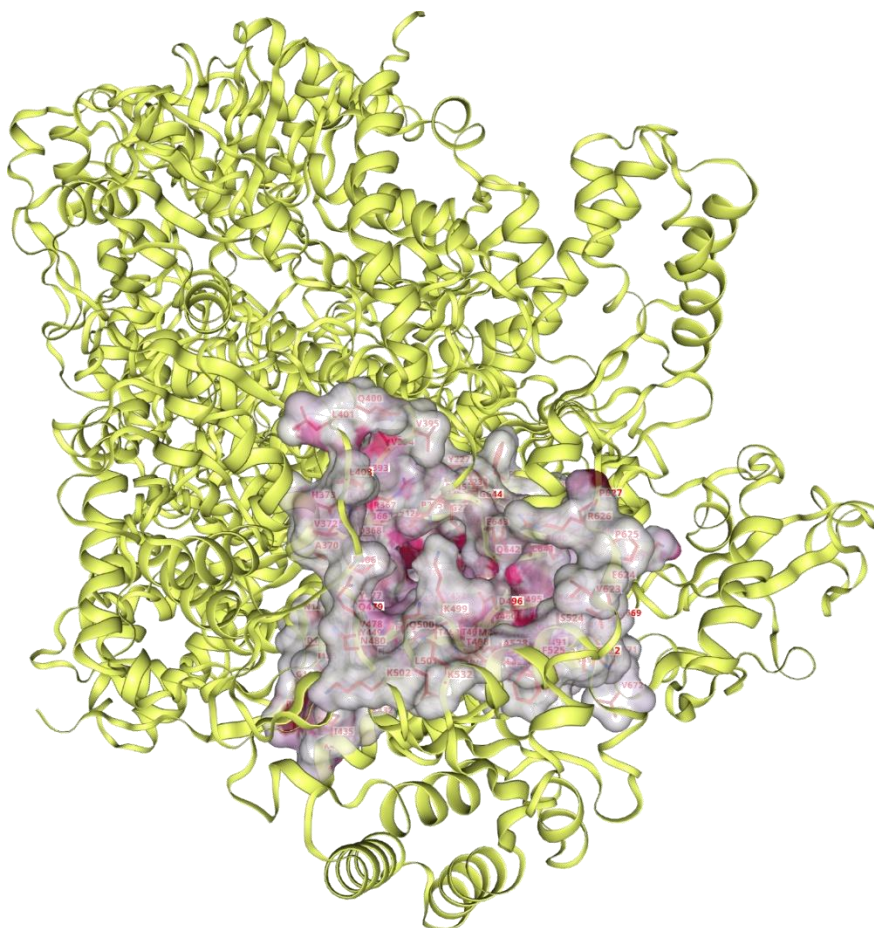


Figura 36. Centro de acoplamiento seleccionado del sitio activo de la cadena A de la proteína PFOR.

El acoplamiento molecular ciego por Autodock mostró que Betulina y Estigmasterol mantienen interacción con PFOR dentro de una caja con dimensiones: $x = 95$, $y = 121$ y $z = 89$. La energía libre de unión fue de -8.04 y -8.01 kcal/mol, respectivamente, Figura 37.

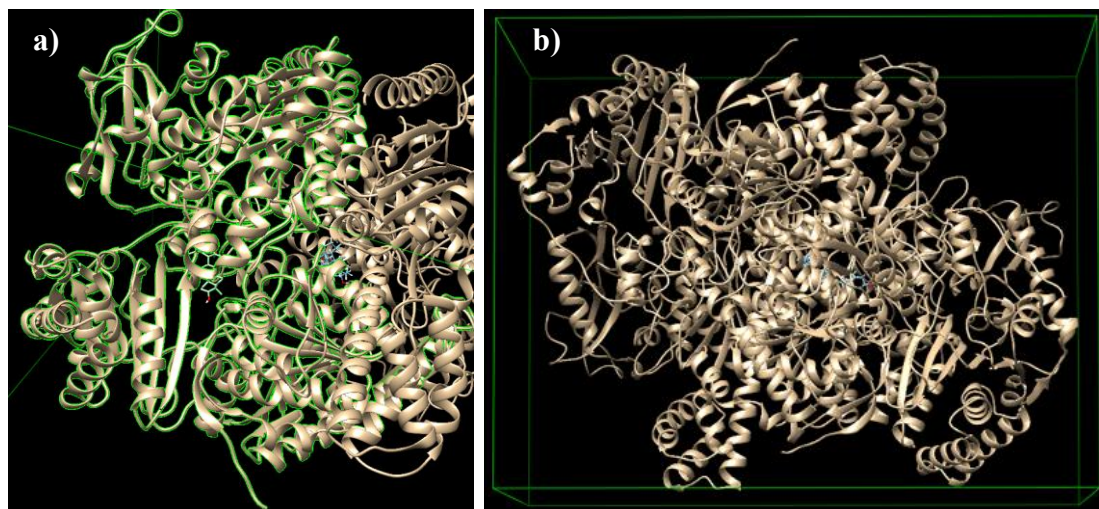


Figura 37. Acoplamiento molecular ciego entre ligando (en azul al centro) y PFOR: a) Betulina, b) Estigmasterol.

Al analizar las poses del acoplamiento molecular con Find Clashes/Contacts se encontró interacción del ligando Betulina con los residuos: T34, T38, I126, F177, H181, Y452, A454, H455, K456, V831 y I1063 de la subunidad A. Con respecto a Estigmasterol mostró unión no covalente con los residuos T34, T38, E41, I126, Y127, F177, H181, I222, Y452, A454, K456, V831 y T988, Figura 38.

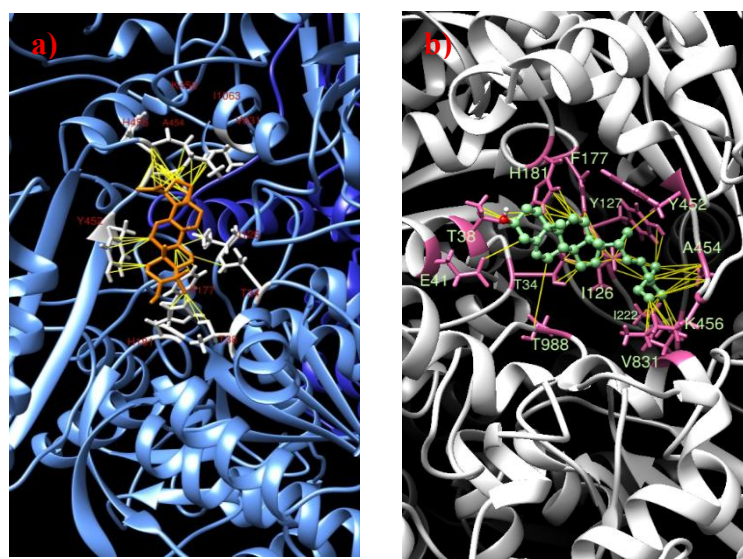


Figura 38. Interacciones en el acoplamiento molecular ligando-PFORa: a) Betulina, b) Estigmasterol.

Por otro lado, el acoplamiento molecular semiflexible montado en CB-DOCK evidenció la unión de Betulina a través de cuatro enlaces de hidrógeno convencionales con los residuos del dominio activo de la enzima PFOR. Además, este modo de unión se complementa con 53 interacciones hidrofóbicas. En el caso del Estigmasterol, la unión es principalmente a través de interacciones hidrofóbicas con 52 contactos en el mismo sitio activo. Ambos acoplamientos mostraron una energía libre de unión mayor a -8.1 kcal/ mol dentro de una cavidad con dimensiones: x= 95, y= 121 y z= 89 sobre la subunidad A. La Figura 39 muestra el acoplamiento molecular entre Estigmasterol y la proteína piruvato ferredoxina oxidorreductasa. La Tabla 14 resume el acoplamiento molecular entre los triterpenos y PFOR.

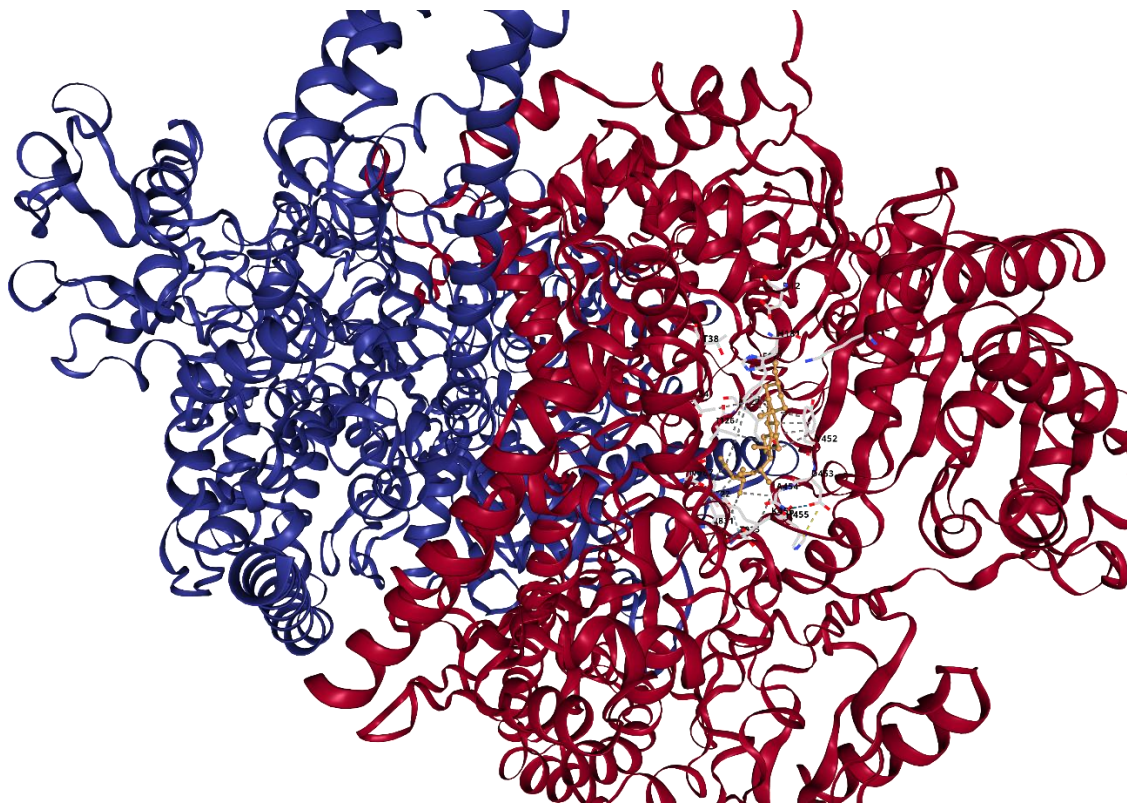


Figura 39. Acoplamiento molecular entre Estigmasterol (naranja) y PFORa (rojo) por CB-DOCK.

Tabla 14. Acoplamiento molecular semiflexible de los compuestos aislados frente a sitio catalítico PFOR de *T. vaginalis*.

Compuesto ^a	Caja Acoplamiento (Å)	Energía de unión (kcal/mol) ^b	Puntuación de unión RMSD ^c	Puentes de Hidrógeno (Å)	Interacciones Hidrofóbicas
Betulina ZINC3978650	34, 35, 35	-8.04 ± 0.28	0.58 ± 0.82	Thr38 (2.99), Glu41 (3.09), Tyr127 (3.15) Asp453 (3.20)	Cadena A : Asp12, Asn14, Thr34, Pro35, Ala36, Thr37, Thr38, Glu41, Ile126, Tyr127, Phe177, His181, Asp368, Gly393, Met418, Trp420, Leu422, Gly423, Ser424, Asp425, Gly426, Val428, Lys432, Ala451, Tyr452, Asp453, Ala454, His455, Lys456, Ser457, Thr461, Thr462, His464, Tyr477, Gln479, Asp496, Met497, Gln500, Gln642, Glu643, Glu645, Cys800, Val831, Ser986, Asn987, Thr988, Gly989, Gln991, Asn1003, Ile1063, Asn1064. Cadena B : Ile222, Glu226.
Estigmasterol ZINC4096712	34, 35, 35	-8.07 ± 0.32	1.20 ± 1.71	Sin interacción	Cadena A : Asp12, Asn14, Thr34, Thr37, Thr38, Glu41, Ile126, Tyr127, Phe177, His181, Asp368, Met418, Trp420, Leu422, Gly423, Ser424, Asp425, Gly426, Thr427, Val428, Gly429, Ala430, Lys432, Ala451, Tyr452, Asp453, Ala454, His455, Lys456, Gly459, Val460, Thr461, Thr462, His464, Tyr477, Val478, Gln479, Lys499, Gln500, Gln642, Glu643, Gly644, Glu645, Val831, Thr835, Asn987, Thr988, Gly989, Gln991. Cadena B : Ile222, Pro225, Glu226.
β-Sitosterol ZINC4095717	34, 35, 35	-8.40 ± 0.35	0.72 ± 1.02	Sin interacción	Sin interacción

^a Identidad de ligando en servidor ZINC20; ^b Media ± DS, n=2; ^c Media + DS, n=2 por AutoDock.

Al analizar las poses del acoplamiento molecular entre Betulina y PFOR en CB-DOCK se encontraron 53 interacciones hidrofóbicas, algunas uniones entre las cadenas laterales de los residuos de PFOR y el ligando pueden observarse en la Figura 40.

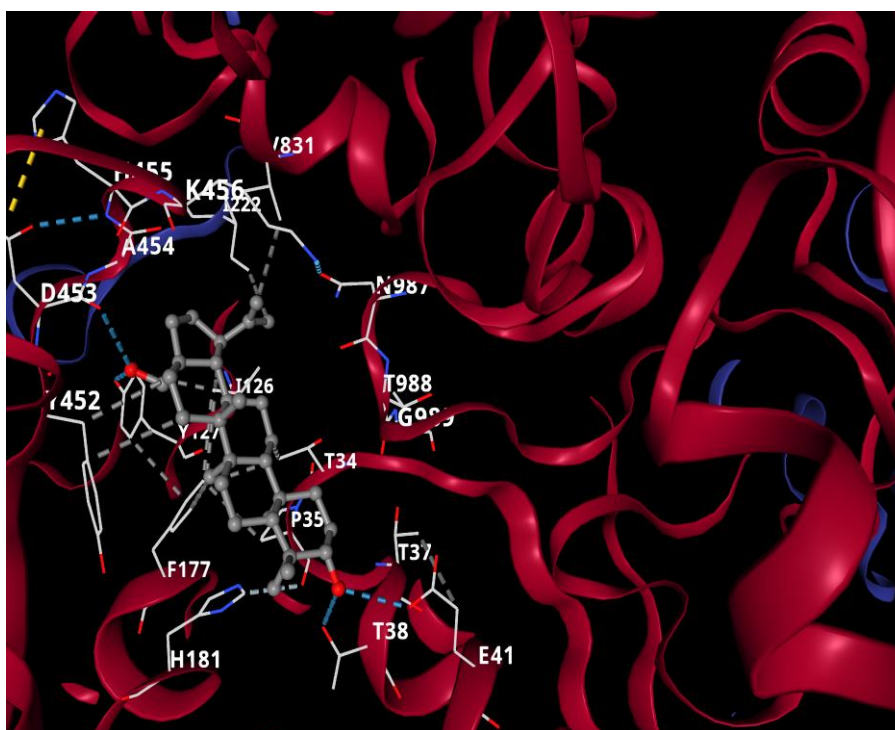


Figura 40. Interacciones en el acoplamiento molecular Betulina-PFOR.

Los contactos a través de puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas entre los átomos de Betulina y PFOR se visualizaron con el software LigPlot+ v2.2, Figura 41.

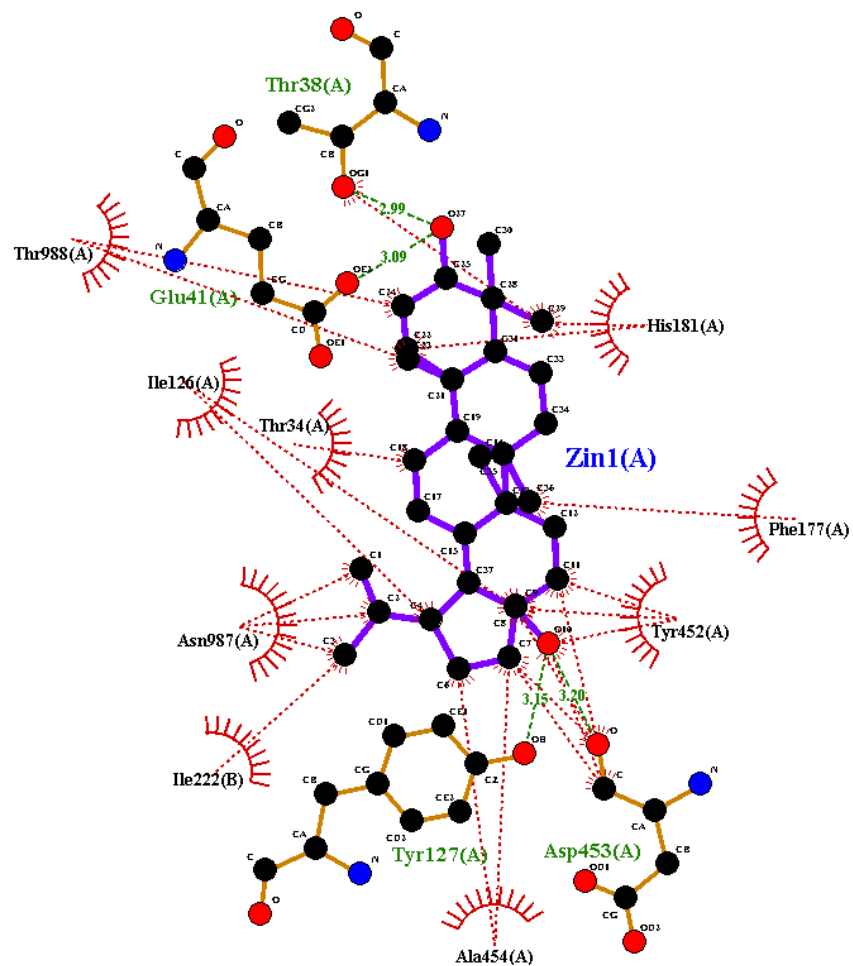


Figura 41. Contactos hidrofílicos (verde) e hidrófobos (rojo) en el acoplamiento molecular entre Betulina y la proteína PFOR.

Con respecto al modo de unión entre Estigmasterol y PFOR, CB-DOCK indicó 52 interacciones de tipo hidrófobas. Este modo de unión entre algunos grupos “R” de los residuos y el triterpeno puede visualizarse en la Figura 42.

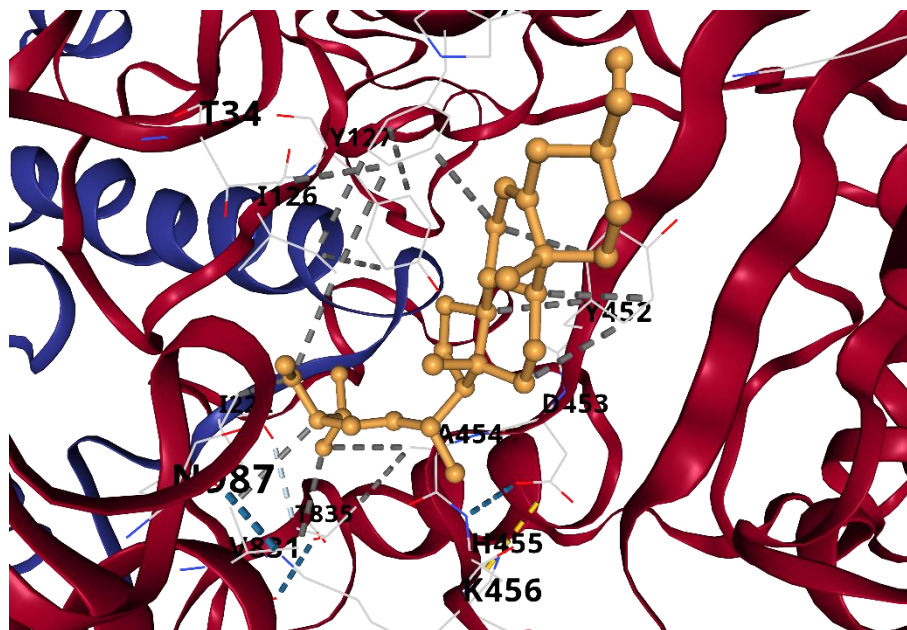


Figura 42. Interacciones en el acoplamiento molecular Estigmaterol-PFOR

Los contactos hidrofóbicos entre los carbonos de Estigmaterol y las cadenas laterales de los residuos en el sitio catalítico de PFOR se evidenciaron con la plataforma LigPlot+ v2.2, Figura 43.

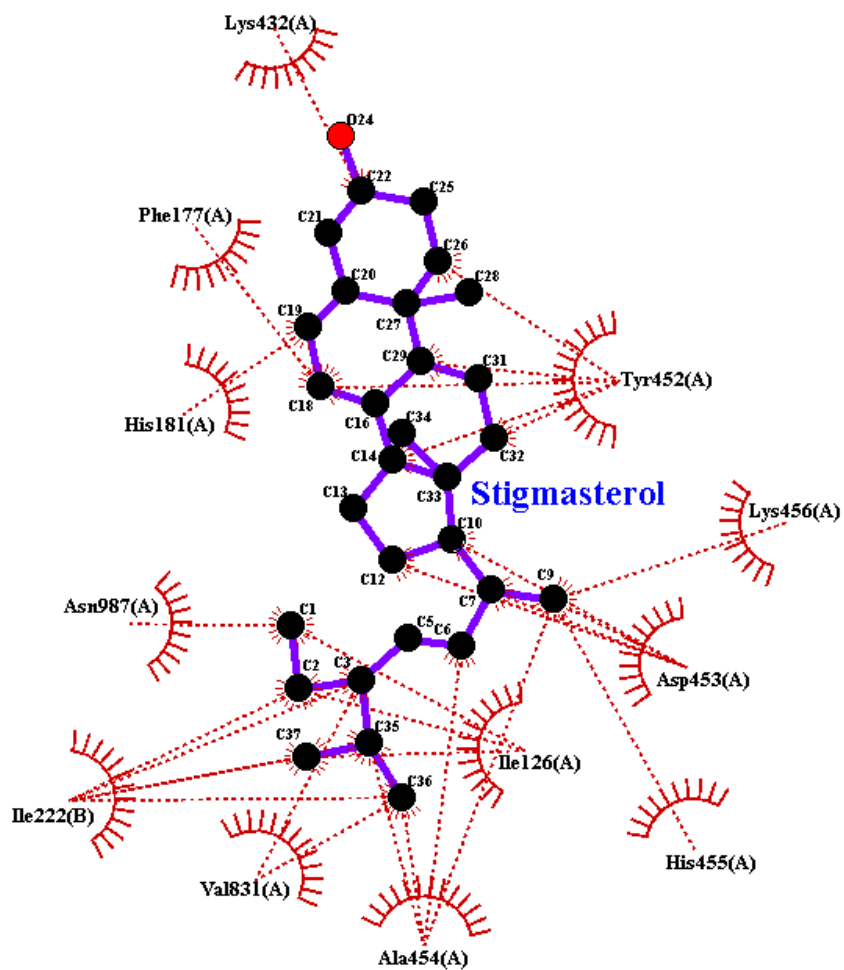


Figura 43. Contactos hidrófobos en el acoplamiento molecular entre Estigmasterol y la proteína PFOR.

DISCUSIÓN

Los productos naturales de plantas, microorganismos y fauna marina han desempeñado un papel importante en el control de las enfermedades causadas por protozoarios parásitos, en particular, contra especies de los géneros: *Leishmania*, *Plasmodium* y *Trypanosoma* (Ndjonka et al. 2013; Cheuka et al. 2017). Desde 1980 a la fecha, un total de veinte antiparasitarios, nueve a partir de productos naturales, han sido aprobados por la FDA (Newman y Cragg 2020). Sin embargo, resulta apremiante disponer de fármacos para combatir estos y otros parásitos de alta morbilidad cuya atención ha sido insuficiente.

En este trabajo, un total de ocho extractos, cuatro metanólicos y cuatro hexánicos, provenientes de las plantas medicinales: *Cordia dodecandra*, *Gaultheria odorata*, *Tagetes nelsonii* y *Talisia oliviformis*, fueron sometidas a bioprospección anti-*E. histolytica* y anti-*Trichomonas*. Los mayores rendimientos de extracción fueron obtenidos empleando metanol, en un rango entre 5.0 % para *C. dodecandra* y 14 % para *G. odorata*. En contraste, el rendimiento de los extractos hexánicos fluctuó en un rango comprendido entre 0.4 % para *C. dodecadra* y 2.4 % para *T. oliviformis*. El bajo rendimiento de los hexánicos refleja que los metabolitos lipofílicos (terpenos, ceras, esteroides) son menos abundantes en comparación con los extractos metanólicos, cuya polaridad solubiliza metabolitos polares y semipolares (flavonoides, alcaloides, taninos, ácidos fenólicos), presentes en mayor abundancia en estas especies. No obstante, mayor rendimiento no siempre implica mayor actividad biológica; el hecho de que los extractos hexánicos de *T. nelsonii* mostraran alta actividad antiprotozoaria, sugiere que metabolitos lipofílicos como esteroides, tiopenos y terpenos pueden jugar un papel clave en la actividad amebicida y tricomonicida.

Al evaluar la actividad antiprotozoaria de los ocho extractos frente a trofozoítos de *E. histolytica* y diferentes especies de *Trichomonas*. Siete extractos mostraron actividad anti-*E. histolytica* con porcentajes de inhibición superiores al 50 % a la concentración de 150 µg/mL. Entre los extractos metanólicos, el obtenido de *T. oliviformis* mostró la menor actividad amebicida con un % de inhibición de 50.37 ± 1.13 %, mientras que el derivado de *T. nelsonii* exhibió la mayor actividad inhibitoria con 60.53 ± 10.30 %. Con respecto a

los extractos hexánicos, el procedente de *C. dodecandra* mostró la actividad amebicida más baja con un 41.69 ± 12.37 % mientras que, el obtenido de *T. nelsonii* presentó el mayor % de inhibición con un valor de 71.66 ± 4.11 . Estos hallazgos son particularmente relevantes, ya que refuerza la evidencia previa sobre el potencial de las especies de *Tagetes* como fuente de compuestos bioactivos con acción antiparasitaria. La actividad observada podría relacionarse con la presencia de terpenos o tiopenos, conocidos por comprometer la viabilidad de los protozoarios y hongos mediante daño oxidativo y alteración de estructuras celulares esenciales (Romagnoli et al. 1994; Escobar et al. 2009).

En contraste, la actividad frente a *T. vaginalis* y *T. tenax* fue moderada, con porcentajes de inhibición en el rango del 20–50 %. Frente a *T. vaginalis*, la actividad inhibitoria de los extractos metanólicos se presentó en un rango entre 25.54 ± 7.20 % por *T. oliviformis* y 48.10 ± 3.06 % por *T. nelsonii*. Los extractos hexánicos presentaron inhibición del 21.93 ± 3.26 % para *T. oliviformis* y 49.09 ± 6.22 % para *T. nelsonii*. Con respecto a *T. tenax*, los extractos metanólicos presentaron una actividad entre 15.32 ± 5.75 % y 50.89 ± 4.11 % originados por *T. oliviformis* y *T. nelsonii*, respectivamente. Mientras que los extractos hexánicos, exhibieron actividad entre 27.88 ± 13.72 % y 44.44 ± 3.55 % por *C. dodecandra* y *T. nelsonii*, respectivamente. La actividad inhibitoria de los extractos hexánicos fluctuó entre 10.38 ± 5.72 % por *G. odorata* y 33.65 ± 8.76 % por *T. nelsonii*. Una vez más, los extractos de *T. nelsonii* fueron los más efectivos, lo que indica que esta especie concentra tanto metabolitos polares como no polares con capacidad de afectar el metabolismo y la integridad de membrana de estos protozoos. Sin embargo, la menor potencia observada frente a estos protozoarios sugiere que existen diferencias en la composición de celular o en las vías de defensa antioxidante que podrían limitar la eficacia de los extractos. Respecto a *T. foetus*, se observó la menor susceptibilidad, con porcentajes de inhibición inferiores al 35 % en todos los casos. Este resultado indica una resistencia intrínseca de este protozoario a los metabolitos presentes en las plantas evaluadas, lo cual podría explicarse por adaptaciones metabólicas particulares que reducen la acción del estrés oxidativo o minimizan la penetración de compuestos lipofílicos.

En conjunto, los hallazgos señalan a *T. nelsonii* como la especie con mayor potencial antiprotozoario, destacando especialmente su efecto frente a *E. histolytica*. La actividad

significativa observada tanto en los extractos metanólicos como en los hexánicos sugiere la participación de un mecanismo de acción multifactorial: por un lado, los compuestos polares, como flavonoides y ácidos fenólicos, podrían interferir enzimáticamente en rutas redox; mientras que los metabolitos apolares, como esteroides, terpenos y tiopenos, inducirían estrés oxidativo y alteraciones en la membrana celular. A pesar de lo prometedor de estos resultados, es indispensable profundizar en la caracterización química de los extractos más activos, ya que un fraccionamiento biodirigido podría modificar la actividad observada en el extracto crudo, ya sea incrementándola, reduciéndola o revelando posibles sinergias entre metabolitos.

En términos de concentración inhibitoria media (CI_{50}) los extractos orgánicos obtenidos del tallo y corteza de *T. nelsonii* mostraron la mejor actividad antiprotozoaria *in vitro* con una $CI_{50} = < 141.0 \mu\text{g/mL}$ frente a trofozoítos de *E. histolytica* y $CI_{50} = < 152.0$ y $163.0 \mu\text{g/mL}$ frente a *T. vaginalis* y *T. tenax*, respectivamente. *T. foetus* se mostró menos sensible a esta planta con una $CI_{50} = > 275.0 \mu\text{g/mL}$.

La actividad anti-*E. histolytica* de plantas de la medicina mexicana ha sido documentada desde hace dos décadas por Calzada y su grupo de investigación, reportando actividad amebicida de extractos metanólicos de 26 plantas con CI_{50} entre 2.5 y $233.2 \mu\text{g/mL}$ para *Chiranthodendron pentadactylon* y *Hippocratea excelsa*, respectivamente (Calzada et al. 2006). Recientemente, Herrera y colaboradores en el año 2016 quienes demostraron la actividad *in vitro* ($CI_{50} = 230 \mu\text{g/mL}$) e *in vivo* (hasta un 89% de reducción de ameboma hepático) del extracto etil-acetato de la raíz de *Adenophyllum aurantium* comúnmente conocida como árnica silvestre (Herrera et al. 2016). Dos años más tarde, Elizondo y colaboradores notificaron la actividad biológica del extracto metanólico de las hojas de *Argemone mexicana* con un valor $CI_{50} = 78.39 \mu\text{g/mL}$ (Elizondo et al. 2018). Por otro lado, los extractos orgánicos de las semillas de aguacate (*Persea americana*) han mostrado mayor actividad amebicida, $CI_{50} = 0.5 \mu\text{g/mL}$ (Jiménez et al. 2013). *Elaeodendron trichotomum* (chechen blanco) ha sido un eficaz antiamebiano al exhibir una $CI_{50} = 0.80 \mu\text{g/mL}$ (Roca et al. 2016).

Por otro lado, La actividad anti-*T. vaginalis* de plantas de la medicina mexicana fue estudiada por Calzada y colaboradores en el año 2007. El grupo investigador evaluó 22

plantas entre las que destacó la actividad anti-*Trichomonas* de la fibra de coco (*Cocus nucifera*) y la semilla de papaya (*Carica papaya*) con una CI_{50} = 5.8 y 5.6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Camacho et al. 2015 extendieron el acervo mexicano al analizar 11 especies vegetales, señalando potencial actividad tricomonocida del orégano *Hyptis albida* con CI_{50} = 11.42 $\mu\text{g/mL}$. Así mismo, Jiménez y colaboradores informaron la alta actividad anti *T. vaginalis* (CI_{50} = < 6 $\mu\text{g/mL}$) de la semilla de *Persea americana* (Jimenes et al. 2013). Lara et al. 2009 estudiaron el extracto acuoso acidificado del frijol perla negra distribuido en gran parte de Latinoamérica, la actividad anti-*T. vaginalis* fue de 176.8 $\mu\text{g/mL}$. En el año 2012, en Brasil, Frasson y su grupo de investigación analizaron 23 plantas medicinales provenientes del Desierto de Caatinga encontrando que, solo el extracto acuoso de la raíz de *Polygala decumbens* mostró efecto negativo en la viabilidad de *T. vaginalis* con una CI_{50} = de 1.5 mg/mL (Frasson et al. 2012). Recursos herbarios de la medicina natural africana también han sido evaluados frente a *T. vaginalis*. Fernandes et al. 2008 notificaron cuatro plantas con efecto tricomonocida de un total de 29 especies vegetales destacando la actividad del extracto acuoso del árbol violeta (*Securidaca longepedunculata*) con CI_{50} = 100 $\mu\text{g/mL}$. Recientemente, Niknam et al. 2020 reportaron una aceptable actividad tricomonocida (400-800 $\mu\text{g/mL}$) del extracto metanólico de los frutos del sauco negro (*Sambucus nigra*), una actividad menor a la registrada en este trabajo.

La investigación de plantas medicinales para el tratamiento de infecciones por *T. tenax* es sumamente escasa. No obstante, se ha reportado actividad anti-*Trichomonas* de la mejorana (*Origanum majorana*) frente a *Pentatrichomonas hominis*, un protozooario comensal del tracto intestinal humano asociado con casos de tricomoniasis intestinal (Kozłowska et al. 2010).

Respecto a *T. tenax*, se ha documentado la actividad anti-trichomonas del extracto etanólico de la cáscara de granada (*Punica granatum*), con una concentración efectiva reportada de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (El-Sherbini y Shoukry 2012). Así mismo, estudios *in vivo* han demostrado la eficacia de la infusión de hojas de *Eugenia caryophyllata* frente a *T. tenax*, con una concentración activa de 300 mg/mL (Shlash y Kadhum 2020).

En contraste con la escasa información disponible sobre tratamientos naturales para *T. tenax*, el aprovechamiento de plantas medicinales en el tratamiento de tricomoniasis en animales domésticos ha sido más ampliamente documentado. Diversos estudios han reportado la eficacia de productos naturales frente a *T. gallinae*, agente etiológico de la tricomoniasis aviar; entre ellos destacan los bulbos de ajo (*Allium sativum*) y las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) (Seddiek et al. 2014; Akbarian et al. 2022).

Asimismo, se ha demostrado la actividad antiprotozoaria de varios extractos y compuestos aislados a partir de recursos herbarios frente a *T. foetus*: Vemula y colaboradores en el año 2022 reportaron que el extracto metanólico del cactus *Caramulla precumbens* presentó actividad anti-*T. foetus* con una CI_{50} de 2 mg/mL (Vemula et al. 2022). De manera similar, Liu y colaboradores durante el año 2016 describieron el efecto inhibitorio del glicoalcaloide α -tomatina, aislado del tomate, con una CI_{50} de 2.79 μ g/mL (Liu et al. 2016). Noritake y su grupo de investigación evaluaron extractos de *Camellia sinensis*, encontrando que el extracto de té negro, a una concentración de 200 μ g/mL, logró inhibir el crecimiento de *T. foetus* en un 41 ± 13 % (Noritake et al. 2017).

Por su parte, Friedman et al. 2018 observaron que los extractos acuosos de cáscara de papa de las variedades morada y russet, a 100 mg/mL, inhibieron el crecimiento de *T. foetus* en 41.0 ± 6.3 % y 41.4 ± 5.6 %, respectivamente, atribuyéndose dicha actividad a la presencia de ácido cafeico y del glicoalcaloide α -solanina. En un estudio posterior, los mismos autores reportaron que extractos de cáscara de tomate de las variedades Cherry Kumato y cerisiforme mostraron actividad anti-*T. foetus* del 79.4 ± 5.9 % y 81.3 ± 9.4 %, respectivamente, a una concentración de 200 μ g/mL (Friedman et al. 2021).

Lo anterior resalta la relevancia de los hallazgos obtenidos en el presente estudio, dado que las cuatro especies vegetales evaluadas exhibieron actividad frente a *E. histolytica* y parásitos *Trichomonas*. Particularmente destacable resulta la actividad antiprotozoaria observada por *T. nelsonii* y *G. odorata*, lo que subraya su potencial como fuentes de compuestos bioactivos con aplicación terapéutica.

El género *Tagetes*, perteneciente a la familia Asteraceae, comprende una diversidad de especies herbáceas comúnmente conocidas como cempasúchil, clavel de muerto o, simplemente, *Tagetes*. Estas plantas son originarias del continente americano, y se

reconoce a México como el principal centro de origen y diversidad de este género, caracterizado por sus flores vistosas y su distintiva fragancia. Diversas especies del género *Tagetes* han sido cultivadas y empleadas en la medicina tradicional por distintas culturas, en virtud de sus reconocidas propiedades terapéuticas. Entre los usos reportados se encuentran el tratamiento de afecciones cutáneas, así como su acción antiinflamatoria, analgésica, antiespasmódica, antipirética, antidiarreica, y en el manejo de enfermedades dentales. También, se le atribuyen efectos como antiabortivo y antiséptico vaginal (Alonso y Desmarchelier 2005; Ata et al. 2011; Serrato 2014; Paravaiz 2014, 2015; Rahman et al. 2016).

Los extractos de especies del género *Tagetes* se distinguen por la presencia de una amplia variedad de metabolitos secundarios, entre los que se incluyen monoterpenos, fenilpropanoides, carotenoides, flavonoides y tiofenos, entre otros (Marotti et al. 2004; Singh et al. 2015). Diversos estudios han documentado las propiedades biológicas de estos compuestos, se ha reportado su efecto repelente, particularmente contra insectos como moscas, chinches y escarabajos (López et al. 2011; Toribio y Grande, 2020; Zhang et al. 2022); actividad nematocida (Álvarez et al. 2016; Zárate et al. 2018); actividad antioxidante con potencial antineoplásico (Kashif et al. 2014), así como actividad citotóxica (Ibrahim y Mohamed 2016, 2017). Así mismo, destaca su actividad antimicrobiana frente a una amplia gama de microorganismos patógenos, incluidos bacterias, hongos (Igwaran et al. 2017; Vedam et al. 2019). La actividad antiprotozoaria de los extractos de *Tagetes* ha sido demostrada por Gupta y Vasudeva 2010 frente a *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina señalando al extracto de la raíz de *T. erecta* con actividad antiplasmodium $CI_{50} = 70 \mu\text{g/mL}$. 58. Al-Musayeib et al. 2012 informaron que el extracto metanólico de *T. minuta* mostró una actividad altamente prometedora contra tripomastigotes de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*, con valores de CI_{50} de 2.2 ± 1.5 y $9.2 \pm 1.9 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. También, reportaron una actividad moderada frente a *Plasmodium falciparum* ($CI_{50} = 14.0 \pm 2.8 \mu\text{g/mL}$) y amastigotes de *Leishmania infantum* ($CI_{50} = 30.1 \pm 4.6 \mu\text{g/mL}$). Por su parte, Lima et al. 2009 notificaron actividad leishmanicida por parte de los extractos orgánicos de *T. mendocina* a una concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ frente a promastigotes de *L. amazonensis* y *L. brasiliensis*.

Con respecto al género *Gaultheria* (Ericaceae), en América su presencia es particularmente abundante en la región andina y en zonas montañosas de América del Norte y Mesoamérica. Las especies de este género se distinguen por sus hojas aromáticas, ricas en salicilato de metilo, compuesto responsable de su característico aroma mentolado, además de contener flavonoides, glicósidos flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, procianidinas, triterpenos y esteroides (Middleton 1991; Liu et al. 2013) En la medicina tradicional mexicana y andina, se utilizan infusiones y ungüentos elaborados con hojas de *Gaultheria* para tratar dolores musculares, reumatismo, contusiones, úlceras, diarrea, enfermedades respiratorias y como purgante (Bussmann y Sharon, 2006; Fonseca et al. 2020). Este conocimiento ancestral ha sido respaldado por estudios farmacológicos que confirman su actividad anti-inflamatoria, antipirética, analgésica, antioxidante y antibacteriana y antifúngica (Magiera et al. 2019; Michel et al. 2022; Alam et al. 2023; Zaman et al. 2022). La actividad antiprotozoaria por especies del género *Gaultheria* ha sido escasamente estudiada. Un estudio realizado por Schnitzler et al. 1996 reportó actividad anti-*Leishmania* de los extractos etanólico y en DMSO de *Gaultheria procumbens* frente a *L. mexicana*, con porcentajes de inhibición inferiores al 43 % y 5 %, respectivamente.

Por otra parte, el análisis espectroscópico de RMN de los compuestos aislados a partir de los extractos hexánicos de *T. nelsonii* y *G. odorata* reveló señales características de triterpenos policíclicos. El espectro de RMN- ^1H mostró señales en campo alto (δ 0.7–2.0), correspondientes a protones metílicos terciarios, así como una señal en campo medio (δ 3.15–3.55) atribuible a un protón hidroximetino. Esta última presentó correlación con desplazamientos en el rango de δ 71–78 en el espectro de RMN- ^{13}C y en los experimentos bidimensionales (RMN-2D), lo cual es consistente con la presencia de un carbono carbonílico. La ausencia de señales de protones aromáticos en el rango δ 6.0–8.0 refuerza la propiedad de que los compuestos aislados pertenecen a la clase de los triterpenos policíclicos (Natthapat y Suttiorn, 2014).

La betulina es un triterpeno de tipo lupano, caracterizado por la presencia de un anillo de cinco miembros y un grupo isopropenil en configuración α unido al carbono 19, lo cual constituye una característica distintiva de esta serie de compuestos. Además del perfil RMN- H^1 descrito por Natthapat y Suttiporn, las dos señales con δ de 4.69 y 4.56 encontradas en este trabajo, son correspondientes a protones olefinicos exacíclicos en H-29, con constantes de acoplamiento $J = 2.5$ Hz y $J = 2.7, 1.5$ Hz, respectivamente. Asimismo, el análisis de RMN- C^{13} reveló la presencia de carbonos olefinicos con desplazamientos químicos en δ 151.12 ppm (C-20, carbono cuaternario) y δ 109.27 ppm (C-29), lo cual es característico de este tipo de compuesto (Tijjani et al. 2012; Takibayeva et al. 2023). En contraste, estigmasterol y β -sitosterol son un tipo de esteroles insaturados tetracíclicos, caracterizado por la presencia de un grupo etilo en el carbono 24 de la cadena lateral. Ambos terpenos comparten una vía biosintética común, en la cual el estigmasterol se forma a partir del β -sitosterol mediante un proceso de oxidación en el carbono 22 (Valitova et al. 2024). Esta diferencia estructural entre ambos compuestos pudo identificarse mediante espectroscopía de RMN- C^{13} . En el espectro del estigmasterol, los desplazamientos químicos en las posiciones C-22 y C-23 se registraron en 138.24 y 129.27 ppm, respectivamente, lo que es indicativo de un grupo alqueno. En contraste, en el β -sitosterol las señales correspondientes a estos mismos carbonos se observaron en 33.99 y 26.15 ppm, respectivamente, desplazamientos típicos de un grupo alquilo, como lo señala Kamal et al. 2016. Como soporte a esto, el espectro RMN- H^1 y HSQC del estigmasterol mostraron la presencia de protones olefinicos, H22 y H23 con valores en 5.15 ($J = 15.2, 8.5$ Hz) y 5.02 ($J = 15.2, 8.7$ Hz) en correlación con C-22 y C-23 como lo describe Erwin et al. 2020.

Los triterpenos policíclicos son compuestos esteroides derivados del escualeno, ocurren en casi todos los organismos vivos. Este grupo de metabolitos secundarios es una de las clases más prometedoras de productos naturales de origen vegetal debido a su diversidad estructural y sus múltiples actividades biológicas. Entre las propiedades biológicas destacadas se encuentran sus efectos: antiinflamatorio, antioxidante, antimicrobiana, antifúngico, antineoplásico y antiprotozoario (Bilbao et al. 2020).

Betulina, estigmaesterol, β -sitosterol y otros triterpenos policíclicos han sido aislados de distintas especies de *Gaultheria* y *Tagetes* (Liu et al. 2013. Lal et al. 2019; Shetty et al. 2015; Xu et al. 2011).

En apoyo al potencial bioactivo de los terpenos, se ha documentado que al menos 258 esteroides y triterpenos, tanto de origen natural como sintético, exhiben actividad antiprotozoaria y antihelmíntica (Kuzminac et al. 2023). De manera concordante, en el presente estudio se observó que la betulina, el estigmasterol y el β -sitosterol presentaron una actividad moderada frente a *E. histolytica*, con valores de CI_{50} de 33.37, 23.35 y 21.52 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Frente a *T. vaginalis*, los mismos compuestos mostraron valores de CI_{50} de 54.50, 43.81 y 33.87 $\mu\text{g/mL}$, en ese orden. En contraste, *T. foetus* resultó menos sensible a los triterpenos, registrando menos del 30 % de inhibición del crecimiento celular a una concentración de 35 $\mu\text{g/mL}$. Esta menor susceptibilidad podría explicarse por características morfológicas y fisiológicas, ya que *T. foetus* posee mayor tamaño y movilidad en el medio de cultivo, mientras que *T. vaginalis* y *T. tenax* presentan un menor tamaño y tienden a adherirse a las paredes del vial, lo que podría facilitar la absorción de los terpenos. Adicionalmente, un mayor contenido de quitina en la superficie celular de *T. foetus* podría favorecer la integridad de la membrana al limitar el tránsito de estas moléculas lipofílicas (Travassos, 1998).

La betulina, el estigmasterol y el β -sitosterol resultaron entre 300 y 500 veces menos activos que el metronidazol, fármaco de referencia en el tratamiento contra estos protozoarios. A diferencia de los 5-nitroimidazoles, cuyo mecanismo se basa en actuar como aceptores de electrones generando radicales libres citotóxicos que dañan proteínas y ácidos nucleicos, ninguno de los triterpenos evaluados reproduce esta vía metabólica. En su lugar, es probable que su acción esté relacionada con su naturaleza lipofílica, lo que les permite insertarse en la bicapa lipídica y alterar la organización de la membrana celular y de organelos, afectando procesos como el transporte de nutrientes, la homeostasis iónica, el metabolismo energético y la integridad estructural, lo cual explicaría la inhibición moderada observada frente a *E. histolytica* y *Trichomonas* spp.

La betulina, el estigmasterol y el β -sitosterol han sido previamente evaluados frente a diversos protozoarios parásitos de los géneros *Leishmania*, *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Trypanosoma*. Recientemente, Calzada et al. 2017 estudiaron la actividad del β -sitosterol contra *E. histolytica* y *Giardia lamblia*, reportando una actividad antiprotozoaria moderada, con un valor de CI_{50} superior a 50 $\mu\text{g/mL}$, lo cual resulta mayor en comparación con los valores obtenidos en esta investigación.

Particularmente, betulina ha mostrado actividad anti-*Toxoplasma gondii* con $CI_{50}= 5.6$ $\mu\text{g/mL}$ (Darme et al. 2022). Frente a promastigotes de *L. infantum*, de Jesus et al. 2021 reportaron baja actividad con un $CI_{50}= 56.6$ $\mu\text{g/mL}$. Por su parte, Alakurti et al. 2010 informaron un 35% de inhibición de amastigotes de *L. donovani* al emplear una solución de 21.3 $\mu\text{g/mL}$ del triterpeno. En el mismo año, Domínguez y colaboradores, confirmaron la débil actividad leishmanicida frente a *L. amazonensis* y *L. brasiliensis* ($CI_{50}= 85$ $\mu\text{g/mL}$). Además, extendieron la investigación antiprotozoaria al evaluar la propiedad tripanomicida y antiplasmodial reportando una actividad de $CI_{50}= 73.7$ y > 20 $\mu\text{g/mL}$ frente a *T. cruzi tulahuen* y *P. falciparum*, respectivamente (Domínguez et al. 2010). Sin embargo, se ha observado actividad tripanomicida con valores de CI_{50} inferiores a 26.6 $\mu\text{g/mL}$ frente a cepas sensibles y farmacorresistentes de *Trypanosoma brucei brucei* y *T. congolense*, lo que sugiere que la actividad antiprotozoaria de la betulina puede variar significativamente entre especies dentro de un mismo género (Alenezi et al. 2022).

En cuanto al estigmasterol, diversos estudios han reportado una actividad biológica débil, con valores de CI_{50} superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$, frente a hemoprotozoarios pertenecientes a los géneros *Leishmania*, *Plasmodium* y *Trypanosoma* (Waechter et al. 1999; del Rayo et al. 2002; Frezza et al. 2020). No obstante, se ha observado incremento de actividad leishmanicida y tripanomicida ($CI_{50} < 15$ $\mu\text{g/mL}$) en combinación con β -sitosterol (Kamal et al 2016; Amang et al. 2023).

Con relación a β -sitosterol Mwangi et al. 2010 notificaron prometedora actividad antiprotozoaria frente a *L. donovani* y *P. falciparum* con valores CI_{50} de 3.20 y 8.50

µg/mL. Así mismo, de moderada a débil actividad frente a *T. cruzi* y *T. brucei rhodesiense* con registros CI_{50} superiores a 30 y 90 µg/mL. En contraste, Kirmizibekmez et al. 2010 reportaron una actividad biológica similar frente a los mismos parásitos; sin embargo, la actividad leishmanicida fue menor, con un valor de CI_{50} de 27.8 µg/mL. Recientemente, Majid et al. 2019 reportaron actividad antipromastigote significativa frente a *L. tropica*, con un valor de CI_{50} de 9.2 µg/mL, lo que refuerza el potencial anti-*Leshmania* del β-sitosterol.

En relación con lo anterior, De Jesús et al. 2021 señalan que, debido a su elevada lipofilia, los triterpenos pueden insertarse en la bicapa lipídica y modificar la fluidez y la integridad de la membrana plasmática, generando desbalance iónico, pérdida de homeostasis celular y facilitando su acceso al interior de la célula. Asimismo, se ha propuesto que triterpenos pentacíclicos, como la betulina, son capaces de inducir apoptosis a través de la vía mitocondrial, promoviendo la pérdida del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), el incremento de especies reactivas de oxígeno y la activación de caspasas. Estas alteraciones desencadenan cambios morfológicos en la membrana mitocondrial y comprometen su función energética. Es posible que un mecanismo análogo ocurra en el hidrogenosoma, organelo encargado de la producción energética en los protozoarios evaluados.

En cuanto al análisis *in silico* las enzimas Adenosil fosfosulfoquinasa (ASPK) y piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) representan dos blancos potenciales para el diseño de fármacos contra patógenos anaerobios como *E. histolytica* y *Trichomonas spp.* ASPK es una proteína involucrada en la captación y activación del azufre, proceso esencial para la biosíntesis de sulfolípidos de membrana necesarios para la división y el enquistamiento de la ameba (Mi-ichi et al. 2017, 2019). Mientras que la proteína PFOR, además de participar en el metabolismo energético de *T. vaginalis*, podría estar involucrada en procesos clave como la adhesión celular al hospedero, la proliferación parasitaria y la formación de abscesos, siendo además una diana de los fármacos 5-nitroimidazoles (Meza, et al. 2011; Soung 2016; Ang et al. 2017).

Aunque ninguno de los compuestos con actividad anti-*E. histolytica* en este trabajo mostró una afinidad de unión certera frente a la proteína ASPK, el análisis de acoplamiento molecular ofrece información valiosa para betulina y estigmasterol y su acción con la proteína PFOR, también presente en la ameba.

Estudios *in silico* revelan que el metronidazol logra una conformación de unión más cercana al centro hierro-azufre, interactuando con los residuos Phe 174, His 178, Lys 435, Phe 453 y Tyr 455 de la PFOR de *D. africanus* a través de puentes de hidrógeno (Calzada et al. 2017). En contraste, betulina y estigmasterol evaluados en este estudio parecen adoptar una conformación de unión distinta, mediada principalmente por interacciones hidrofóbicas y, en el caso de la betulina, por enlaces de hidrógeno adicionales con los residuos participantes en la unión de piruvato y el cofactor tiamina de pirofosfato: Thr 34, Asp 99, Arg 117, Ile 126, Tyr 127, Phe 177, His 181, Tyr 452, Ala 454, Lys 456, Val 831, Phe 857, Asn 987 y Thr 988 de la cadena A; Ile 222 y Glu 226 de la cadena B (Chabrière et al. 1999). Este modo de interacción sugiere que ambos compuestos podrían modular la actividad enzimática mediante efectos estéricos o alostéricos, en lugar de imitar el comportamiento aceptor de electrones de los 5-nitroimidazoles. Respecto a β -sitosterol, es posible que la rigidez rotacional por la saturación de C22 y C23 no permita el modo de conformación establecido por Estigmasterol. Sin embargo, la energía de acoplamiento sugiere que la interacción con la proteína ocurre posiblemente en una región adyacente al sitio activo. Considerando la función esencial de la PFOR en la conservación de energía y las poses de acoplamiento observadas, la alteración de este proceso podría contribuir al deterioro del metabolismo energético y, en consecuencia, a la disminución de la viabilidad de *E. histolytica* y *T. vaginalis* por acción de los triterpenos, en particular del estigmasterol.

CONCLUSIONES

Este trabajo documenta el primer reporte de actividad antiprotozoaria de las plantas *T. nelsonii*, *G. odorata*, *Cordia dodecandra* y *T. oliviformis* con los siguientes hallazgos:

La obtención de extractos orgánicos mediante maceración asistida con sonicación reveló que los extractos metanólicos presentaron un rendimiento superior al 7% en peso seco. En particular, los extractos de las hojas de *G. odorata* y *T. oliviformis* destacaron por sus altos rendimientos, alcanzando 14.0% y 8.0%, respectivamente.

Las plantas evaluadas presentaron mayor actividad amebicida y variable actividad tricomonicida a una concentración de 150 µg/mL, destacando la actividad anti-*E. histolytica* y anti-*T. vaginalis* de los extractos hexánicos de *T. nelsonii* y *G. odorata*.

Los extractos orgánicos de *T. nelsonii* exhibieron la mayor actividad antiprotozoaria: Frente a *E. histolytica*, el extracto metanólico presentó una $CI_{50}=132.09 \pm 4.74$ y una $CI_{50}=140.46 \pm 7.61$ para el extracto hexánico; Frente a *T. vaginalis* el extracto metanólico, y el extracto hexánico una $CI_{50}=153.15 \pm 9.01$ µg/mL; Frente a *T. tenax* se determinó una $CI_{50} =162.90 \pm 5.26$ µg/mL; Por último, frente a *T. foetus* una CI_{50} de 275.75 µg/mL ± 26.66 .

La partición del extracto metanólico de *T. nelsonii* y *G. odorata* con diclorometano mostró a la parte soluble con la mayor actividad amebicida y tricomonicida.

El fraccionamiento químiobiodirigido de los extractos hexánicos de *T. nelsonii* y *G. odorata* condujo al aislamiento de tres compuestos como sólidos cristalinos de color blanco.

El análisis espectroscópico de 1H -RMN, ^{13}C -RMN y 2D-RMN, permitió la identificación estructural de triterpenos en extractos hexánicos de *T. nelsonii* y *G.*

odorata. De *T. nelsonii* se aisló Betulina y Estigmasterol, mientras que de *G. odorata* se identificó β -sitosterol.

E. histolytica fue el protozoo más sensible a los triterpenos aislados, seguido por *T. vaginalis* y luego *T. foetus*.

β -sitosterol demostró la mayor actividad antiprotozoaria frente a *E. histolytica*, *T. vaginalis* y *T. foetus*, posicionándose como el compuesto más activo contra los parásitos.

Los estudios de acoplamiento molecular revelaron que el β -sitosterol tiene interacción débil al sitio activo de la enzima ASPK, mientras que la Betulina y el Estigmasterol se asocian favorablemente a sitios alostéricos de la enzima PFOR. Estas interacciones sugieren un mecanismo de inhibición alostérica en lugar de competitivo, lo cual podría ejercer un efecto modulador sobre la actividad enzimática, impactando en la conservación de energía y el metabolismo central de los protozoarios.

Estos hallazgos respaldan el valor del saber tradicional del sureste mexicano en el uso de recursos herbarios para combatir infecciones parasitarias en humanos y animales.

P E R S P E C T I V A S

Evaluación de sinergias: Investigar el efecto de combinaciones de extractos/productos naturales + fármacos existentes para potenciar actividad.

Estudio de mecanismos moleculares: Realizar ensayos de acoplamiento y dinámica molecular para identificar dianas terapéuticas.

Estudios *in vivo*: Validar eficacia de los compuestos aislados en modelos animales *ex vivo* o *in vivo* especialmente en enfermedad de amebiasis extraintestinal.

Optimización: Crear derivados de terpenoides para mejorar potencia y selectividad.

Aplicaciones de Nanotecnología: Desarrollar nanoformulados a base de triterpenos para mejorar su solubilidad y potenciar su actividad de manera sostenida o dirigida.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramson J, Adler J, Dunger J. et al. 2024. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 630:493–500.
- Acosta LL, Castro AR. 2009. Botánica, biología, composición química y propiedades farmacológicas de *Artemisia annua* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 14(4).
- Acurero EM, Maldonado AB, Maldonado CB, Mora AM, Parra, J, Urdaneta Y, Urdaneta M. 2009. *Entamoeba gingivalis* y *Trichomonas tenax* en cavidad bucal de pacientes de la Clínica Integral del Adulto de la Facultad de Odontología, Maracaibo, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 29(2):122-127.
- Aderibigbe SA, Adetunji OA, Odeniyi MA. 2011. Antimicrobial and pharmaceutical properties of the seed oil of *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit (Leguminosae). *African Journal of Biomedical Research* 14: 63-68.
- Aguilar J, Cereser P, Torralba F, Mendez E, Sanchez R, Zazueta Y, Maldonado P. 2019. Prevalencia y caracterización de parasitosis intestinal en una comunidad indígena. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 6(4):86-92.
- Akbarian J, Youssefi MR, Tabari MA. 2024. In vitro evaluation of anti-trichomonal potential of *Psidium guajava* leaf essential oil and its main components against trophozoites of *Trichomonas gallinae*. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 27(1):68-78.
- Alakurtti S, Bergström P, Sacerdoti-Sierra N, Jaffe LC, Yli-Kauhaluoma. 2010. Anti-leishmanial activity of betulin derivatives. *The Journal of Antibiotics* 63:123–126.
- Alam F, Hanif M, Rahman AU, Ali S, Jan S. 2023. *In vitro*, *in vivo* and *in silico* evaluation of analgesic, anti-inflammatory, and anti-pyretic activity of salicylate rich fraction from *Gaultheria trichophylla* Royle (Ericaceae). *Journal of ethnopharmacology* 301:115828.

Alenezi, SS, Alenezi ND, Ebiloma GU, Natto MJ, Ungogo MA, Igoli JO, Ferro VA, Gray AI, Fearnley J, de Koning HP. 2022. The Antiprotozoal Activity of Papua New Guinea Propolis and Its Triterpenes. *Molecules* 27:1622.

Al-Musayeb NM, Mothana RA, Matheussen A, Cos P, Maes, L. 2012. In vitro antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12:49.

Alonso J, Desmarchelier C. 2005. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud, 1st ed.; Ed. Lola: Buenos Aires, Argentina, pp. 249-252.

Álvarez S, Botina DE, Ortiz JA, Jarminton A, Botina LL. 2016. Evaluación nematocida del aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis* en el manejo del nematodo *Meloidogyne* spp. *Revista de Ciencias Agrícolas* 33(1):22-33.

Alves RM, De Oliveira LO, Alves M, Silva W. 2004. Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). *Biochemical Systematics and Ecology* 33:233–243.

Amang à Ngnoung GA, Nganso Ditchou YO, Leutcha PB, Dize D, Tatsimo SJN, Tchokouaha LRY, Kowa TK, Tembeni B, Mamoudou H, Poka M, Demana PH, Siwe Noundou X, Fekam Boyom F, Meli Lannang A. 2023. Antiplasmodial and Antileishmanial Activities of a New Limonoid and Other Constituents from the Stem Bark of *Khaya senegalensis*. *Molecules* 28(20):7227.

Amin A, Tuentner E, Cos P, Maes L, Exarchou V, Apers S, Pieters L. 2016. Antiprotozoal and Antiglycation Activities of Sesquiterpene Coumarins from *Ferula narthex* Exudate. *Molecules* 21:1287.

Amurrio D. 2001. La Quinina. Historia y Síntesis. *Acta Nova* 1(3):241-247.

Ang CW, Jarrad AM, Cooper MA, Blaskovich MAT. 2017. Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* 60(18):7636–7657.

Argueta CZA, S. Mata. 2009. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. UNAM.

Arias J. 1993. Del indiicidio al consumo de las indignidades o ¿indiofagia? Revista de difusión científica tecnológica y humanística 3:14.

Arroyo R. 2017. Tricomoniasis. Ciencia 68(1): 58-61.

Ata S, Farooq F, Javed S. 2011. Elemental profile of 24 common medicinal plants of Pakistan and its direct link with traditional uses. Journal of Medical Plants Research 5(26):6164-6168.

Barón Pichardo MG, Gómez García J, Duque Montaña BE, Segundo Arizmendi N, y Torres Angeles O. 2020. Aislamiento y axenización de *Trichomonas vaginalis* a partir de una muestra de orina. Revista De Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina 32.

Becerril MA. 2019. Parasitología Médica. McGraw Hill: México, pp.21-30;69-75.

Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers, EW. 2013. GenBank. Nucleic acids research 41:D36–D42.

Bilbao Ramos P, Serrano DR, Ruiz Saldaña HK, Torrado JJ, Bolás-Fernández F, Dea-Ayuela MA. 2020. Evaluating the Potential of Ursolic Acid as Bioproduct for Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. Molecules 25(6):1394.

Bisson C, Dridi SM, Machouart M. 2019. Assessment of the role of *Trichomonas tenax* in the etiopathogenesis of human periodontitis: systematic review. PLoS ONE 14(12):1-20.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. 2007. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. McGraw Hill Interamericana: México, pp.1057-1060.

Bussmann R, Sharon D. 2006. Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. Journal of ethnobiology and ethnomedicine 2:47.

Bucay J, Haiat S. 2005. Algunas plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de enfermedades respiratorias. Parte I. ORL MEX 5 N° 4.

Bystrom LM, Lewis BA, Brown DL, Rodríguez E, Obendorf RL. 2009. Phenolics, Sugars, Antimicrobial and Free-Radical-Scavenging Activities of *Melicoccus bijugatus* Jacq. Fruits from the Dominican Republic and Florida. Plant Foods Human Nutrition 64:160–166.

Calzada F, Basurto JC, Barbosa E, Velázquez C, Hernández NG, Ordoñez Razo RM, Mendez Luna D, Yepez Mulia L. 2017. Antiprotozoal activities of tiliroside and other compounds from *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. Pharmacognosy Research 9(2):133-7.

Calzada F, Yépez Mulia L, Aguilar A. 2006. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology 108(3):367–370.

Calzada F, Yépez L y Tapia A. 2007. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites, Journal of Ethnopharmacology 113(2):248-251.

Camacho Corona MD, Garcia A, Mata Cardenas BD, Garza Gonzalez E, Ibarra Alvarado C, Rojas Molina A, Rojas-Molina I, Bah M, Sanchez MAZ, Gutierrez SP. 2015. Screening for antibacterial and antiprotozoal activities of crude extracts derived from Mexican medicinal plants, African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 12(3):104–112.

Cancelo MJ, Cancelo C, Chavida F. 2005. Vaginitis por *Trichomonas*. SEMERGEN 31(3):121-124.

Cazorla DY, José AN, Sánchez MA. 2001. Efecto del Tratamiento Intralesional con Clorhidrato de Emetina sobre *Leishmania (Viannia) Braziliensis* en Hámsteres. Investigación Clínica 42(1):05-21.

Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos, CDC. 2017. Trichomoniasis. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/>

- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos, CDC. 2019. Amebiasis. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>
- Chabrière E, Charon MH, Volbeda A, Pieulle L, Hatchikian EC, Fontecilla-Camps, JC. 1999. Crystal structures of the key anaerobic enzyme pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, free and in complex with pyruvate. *Nature Structural & Molecular Biology* 6(2):182–190.
- Chacín L. 2012. Farmacoterapia actual de la amibiasis, avances en nuevas drogas y diseño de una vacuna. *Investigación Clínica* 53(3):301-314.
- Chacín L. 2013. Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección. *Revista Médica de Chile* 141: 609-615.
- Chávez MC, White L, Moctezuma S, Herrera F. 2017. Prácticas curativas y plantas medicinales: un acercamiento a la etnomedicina de San Nicolás, México. *Cuadernos Geográficos* 56(2):26-47.
- Chávez QE, Roldán TJ, Sotelo OBE, Ballinas DJ, López ZEJ. 2009. Plantas comestibles no convencionales en Chiapas, México. *Revista Salud Publica y Nutrición* 10(2).
- Cheuka PM, Mayoka G, Mutai P, Chibale K. 2017. The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. *Molecules* 22(1):58.
- Colovos C, Yeates TO. 1993. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science* 2:1511-1519.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2013. La biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/Gobierno del Estado de Chiapas: México, pp. 121.
- Cooper R, Nicola G. 2015. Natural products chemistry : sources, separations, and structures. Boca Raton, Florida, pp. 9-15.

- Cox FEG. 2002. "History of human parasitology". Clin. Microbiol. Res 15: 595-612.
- Cruz O, Espinoza M, Santiesteban A, Cruz L. 2021. Caracterización Química De Los Volátiles De *Tagetes nelsonii*. Polibotánica 51: 203-211.
- Culbert D. 2007. *Tagetes nelsonii*, the citrus scented marygold [Fotografía]. Wikimedia Commons. <https://images.app.goo.gl/9bewxz1rMh4c5nUAA>
- Dabrowska J, Karamon J, Kochanowski M, Sroka J, Zdybel J, Cencek T. 2019. *Tritrachomonas foetus* as a causative agent of tritrichomonosis in different animal hosts. Journal of Veterinary Research 63:533-541.
- Darme P, Escotte-Binet S, Cordonnier J, Remy S, Hubert J, Sayagh C, Borie N, Villena I, Voutquenne-Nazabadioko L, Dauchez M, Baud S, Renault J, Aubert D. 2022. Anti-*Toxoplasma gondii* effect of lupane-type triterpenes from the bark of black alder (*Alnus glutinosa*) and identification of a potential target by reverse docking. Parasite 29(7):1-13.
- De la Cruz L, Guzmán M, Viveros E. 2014. Traditional Medicinal Plants Used for the Treatment of Gastrointestinal Diseases in Chiapas, México. World Applied Sciences Journal 31(4): 508-515.
- de Jesus JA, Laurenti MD, Antonangelo L, Faria CS, Lago JHG, Passero LFD. 2021 Related Pentacyclic Triterpenes Have Immunomodulatory Activity in Chronic Experimental Visceral Leishmaniasis. Journal of Immunology Research 6671287.
- del Rayo Camacho M, Phillipson JD, Croft SL, Marley D, Kirby GC, Warhurst DC. 2002. Assessment of the antiprotozoal activity of *Galphimia glauca* and the isolation of new nor-secofriedelanes and nor-friedelanes. Journal of Natural Products 65(10): 1457–1461.
- Dirección General de Epidemiología (DGE). 2020. Boletín Epidemiológico. Secretaría de Salud, México, 37(53).
- Domínguez Carmona DB, Escalante Erosa F, García Sosa K, Ruiz Pinell G, Gutierrez Yapu D, Chan Bacab MJ, Giménez Turba A, Peña Rodríguez LM. 2010. Antiprotozoal

activity of betulinic acid derivatives. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 17(5):379–382.

Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue P, Upcroft J. 2003. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research* 13:239-49.

Dybicz M, Perkowski K, Sędzikowska A, Baltaza W, Chomicz L. 2018. Studies on prevalence of infection with *Trichomonas tenax* identified by molecular techniques – in respect to oral health of patients with various systemic disease requiring immunosuppressive therapy. *Annals Parasitology* 64(3):193-197.

Elizondo Luévano JH, Castro Ríos R, Sánchez García E, Hernández García ME, Vargas Villarreal J, Rodríguez Luis OE, Chávez Montes A. 2018. In Vitro Study of Antiamoebic Activity of Methanol Extracts of *Argemone mexicana* on Trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. *The Canadian journal of infectious diseases & medical* 7453787.

El-Sherbini G, Shoukry NM. 2012. In vitro effect of pomegranate peel extract on *Trichomonas tenax*. *Life Science Journal* 9:791-797.

Erwin U, Pusparohmana WR, Safitry RD, Marlina E, Usman E, Kusuma IW. 2020. Isolation and characterization of stigmasterol and β -sitosterol from wood bark extract of *Baccaurea macrocarpa* Miq. Mull. Arg. *Rasayan Journal Chemistry* 13:2552-2558.

Escobar, P, Herrera LV, Leal SM, Durán C, Stashenko E. 2009. Composición química y actividad anti- tripanosomal de aceites esenciales obtenidos de *Tagetes* (Fam. Asteraceae), recolectados en Colombia. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 280-286.

Estrada LE. 2007. La importancia de las ciencias químico- biológicas en la medicina tradicional. En: Memorias del primer coloquio de “medicina tradicional” ¿Un saber en extinción? México, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza: UNAM. pp:112-5.

- Fernandes L, van Rensburg CEJ, Hoosen AA, Steenkamp V. 2008. *In vitro* activity of medicinal plants of the Venda region, South Africa, against *Trichomonas vaginalis*. Southern African Journal of Epidemiology and Infection 23(2):26–28.
- Fierro AA. 2009. Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Revista Digital Universia 10(9) ISSN: 1067-6079.
- Fonseca Chávez RE, Rivera Levario LA, Vázquez García L. 2020. Guía ilustrada de plantas medicinales del Valle de México. INPI, México, pp. 102-103.
- Flores U, Franco LG, Orozco N, Trejo II, Tlazola RY, Barragan N, Trejo ZA, Ruvakcaba JC. 2018. Enfermedades parasitarias dependientes de los estilos de vida. Journal of negative & no positive results 3(6):398-411.
- Franz X. 2010. *Gaultheria erecta* [Fotografía]. Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f4/Gaultheria_erecta_3.jpg.
- Frasson AP, dos Santos O, Duarte M, da Silva D, Brandt R, Gomes A, Venusa M, Tasca T, Macedo AJ. 2012. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. Parasitology Research 110:2581–2587.
- Frezza C, Venditti A, Bianco A, Serafini M, Pitorri M, Sciubba F, Di Cocco ME, Spinozzi E, Cappellacci L, Hofer A, Maggi F, Petrelli R. 2020. Phytochemical Analysis and Trypanocidal Activity of *Marrubium incanum* Desr. Molecules 25(14):3140.
- Friedman M, Huang V, Quiambao Q, Noritake S, Liu J, Kwon O, Chintalapati S, Young J, Levin CE, Tam C, Cheng LW, Land KM. 2018. Potato peels and their bioactive glycoalkaloids and phenolic compounds inhibit the growth of pathogenic trichomonads. Journal of Agricultural and Food Chemistry 66(30):7942-7947. ISSN: 1520-5118.
- Friedman M, Tam CC, Kim JH, Escobar S, Gong S, Liu M, Mao XY, Do C, Kuang I, Boateng K, Ja H, Tran M, Alluri S, Le T, Leong R, Cheng LW, Land KM. 2021. Anti-parasitic activity of cherry tomato peel powders. Foods 10(2):230.

- Gallé JB, Attioua B, Kaiser M, Rusig AM, Lobstein A, Vonthron-Sénécheau C. 2013. Eleganolone, a Diterpene from the French Marine Alga *Bifurcaria bifurcata* Inhibits Growth of the Human Pathogens *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum*. Mar. Drugs 11:599-610.
- Gamboa D. 2015. Artemisinina: un Producto de la Medicina Tradicional China. Acta Herediana Vol. 57.
- García A. 2018. Álbum informativo de árboles y palmas de Yucatán. Ayuntamiento de Mérida, México, pp, 42.
- Garza RA, Verde MA, Morales ME, Oranday A, Rivas C, Nuñez A, Barrón MP. 2010. Actividad Amebicida, Antioxidante y Perfil Fitoquímico de Extractos Metanólicos de *Astrophytum Myriostigma* Obtenidos de Cultivo de Callo y del Cactus Silvestre. Polibotánica 30: 111-121.
- Ginter C, Hairgrove T, Schroeder M, Conley R, Bounpheng M. 2018. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 30(4): 603–608.
- Giove R. 1996. Medicina tradicional en el tratamiento de enteroparasitosis. Revista de gastroenterología del Perú: órgano oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Perú 16:197-202.
- Gómez JC, Cortes JA, Cuervo SI y Consuelo M. 2007. Amibiasis Intestinal. Asociación Colombiana de Infectología 11(1): 36-45.
- Gonzáles-Espinosa M, Ramírez-Marcial N, Ruiz-Montoya, L. 2005. Diversidad biológica en Chiapas. Editorial Plaza y Valdés. México, pp. 378.
- González EM, Pérez C, Pérez Y, Palacios JA. 2017. Medicina Natural y Tradicional en Parasitología Médica. Rev. Ciencias Médicas de Pinar del Río 22(1): 49-59.
- González Z, Montezuma R, Tasón M. 2018. Aislamiento y Cultivo de *Trichomonas vaginalis*. Plus (+) Economía 7(1):65-71.
- Greve HL, Kaiser M, Mäser P, Schmidt TJ. 2021. Boswellic Acids Show In Vitro Activity against *Leishmania donovani*. Molecules 26:3651.

- Gupta P, Vasudeva N. 2010. In vitro antiplasmodial and antimicrobial potential of *Tagetes erecta* roots. *Pharmaceutical biology* 48(11):1218–1223.
- Guenthner PC, Secor WE, Dezzutti CS. 2005. *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infection and Immunity* 73:4155-60.
- Hagg G, Marin G, Errecalde J, Mestorino N. 2012. *Etnomedicina: Antiparasitarios naturales en la República Argentina. El caso del Allium sativum (ajo)*. Asociación Médica Argentina.
- Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Geoffrey RH. 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics* 4(17).
- Hernández M. 2016. *Metodologías avanzadas para la determinación de 5-nitroimidazoles en muestras alimentarias, ambientales y clínicas*. Universidad de Granada, España.
- Hernández H, Ricker M, Rodríguez S, Castillo MA, Hernández R, Hernández D. 2020. *Atlas de las leguminosas arbóreas de México*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México y Petróleos Mexicanos: México, pp. 244.
- Herrera Martínez M, Hernández Ramírez VI, Hernández Carlos B, Chávez Munguía B, Calderón Oropeza MA, Talamás Rohana P. Antiamoebic Activity of *Adenophyllum aurantium* (L.) Strother and Its Effect on the Actin Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Pharmacology* 7:169.
- Heo L, Park H, Seok C. 2013. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking, *Nucleic Acids Research* 41:(W1)W384-W388.
- Ibáñez A, Gómez A. 2017. *Trichomonas vaginalis*: The versatility of a tenacious parasite. *Anales de la Real Academia de Farmacia* 83(1): 10-47.
- IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Ibrahim SRM, Mohamed GA. 2016. Thiotagetin A, a new cytotoxic thiophene from *Tagetes minuta*. Natural Product Research 31(5):543–547.

Ibrahim SRM, Mohamed GA. 2017. Tagetones A and B, new cytotoxic monocyclic diterpenoids from flowers of *Tagetes minuta*. Chinese journal of natural medicines 15(7):546–549.

Igwaran A, Iweriebor BC, Ofuzim Okoh S, Uchechukwu NU, Chikwelu OL, Ifeanyi OA. 2017. Chemical constituents, antibacterial and antioxidant properties of the essential oil flower of *Tagetes minuta* grown in Cala community Eastern Cape, South Africa. BMC Complementary and Alternative Medicine 17:351.

Indalí R, Sánchez A, Ayora T, Ventura L, Abud M. 2010. Actividad antimicrobiana y citotoxicidad celular de extractos metanólicos de cupapé (*Cordia dodecandra*). División de Estudios de Posgrado e Investigación. ITECH. VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. VIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular.

Ioset JR, Marston A, Gupta MP, Hostettmann K. 2000. Anti- fungal and larvicidal compounds from the root bark of *Cordia alliodora*. Journal of Natural Products 63(3):424-6.

Irwin JJ, Tang K.G, Young J, Dandarchuluun C, Wong BR, Khurelbaatar M, Moroz, YS, Mayfield J, Sayle RA. 2020. ZINC20-A Free Ultralarge-Scale Chemical Database for Ligand Discovery. Journal of chemical information and modeling 60(12):6065–6073.

Islam MR, Talukder MH, Hossain MB, Karim MA. 2017. Investigation of sexually transmitted protozoan parasite *Tritrichomonas foetus* in cattle in Bangladesh. Journal Bangladesh Agricultural University 15(1): 47–54, 2017.

Issa R. 2014. Non-pathogenic protozoa (review article). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6(3): 30-40.

Jankiewicz L, Colinas MT y Martínez VM. 1986. Cupapé (*Cordia dodecandra* DC., Boraginaceae) a fruit tree in the process of domestication in Mexico. *Acta Societatis Bitanorum Poloniae* 55(1):115-127.

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* 13:109.

Kamal N, Clements C, Gray A, Edrada-Ebel R. 2016. Anti-infective Activities of Secondary Metabolites from *Vitex pinnata*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 6(01):02-106.

Kashif M, Bano S, Naqvi S, Faizi S, Lubna, Mesaik MA, Shamsuddin Azeemi K, Farooq AD. 2014. Cytotoxic and antioxidant properties of phenolic compounds from *Tagetes patula* flower. *Pharmaceutical Biology* 53(5):672–681.

Kirmizibekmez H, Atay I, Kaiser M, Brun R, Cartagena MM, Carballeira NM, Yesilada E, Tasdemir D. 2011. Antiprotozoal activity of *Melampyrum arvense* and its metabolites. *Phytotherapy research: PTR* 25(1):142–146.

Kozłowska M, Laudy A, Starościak BJ, Napiorkowski A, Chomicz L, Kazimierczuk, Z. 2010. Antimicrobial and antiprotozoal effect of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 9:133-141.

Kuzminac I, Savić MP, Ajduković JJ, Nikolić AR. 2023. Steroid and Triterpenoid Compounds with Antiparasitic Properties. *Curren Topics in Medicinal Chemistry* 23(9):791-815.

Lal M, Kadam A, Padole AS. 2019. HPTLC method development and validation of stigmasterol from different extracts of *Tagetes erecta* and *Capsicum annum*. *Journal Drug Delivery Therapy* 9(6):169-172.

Laskowski RA, Swindells MB. 2011. LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling* 51: 2778-2786.

Lara Díaz VJ, Gaytán Ramos ÁA, Dávalos Balderas AJ, Santos Guzmán J, Mata-Cárdenas BD, Vargas Villarreal J, Barbosa Quintana A, Sanson M, López Reyes AG, Moreno Cuevas JE. 2009. Microbiological and Toxicological Effects of Perla Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Extracts: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 104: 81-86.

Lara E, Fernández E, Zepeda JM, Lara D, Aguilar A, Van P. 2019. Etnomedicina en Los Altos de Chiapas, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 18(1):42 - 57.

Leitsch D, Burgess A, Dunn L, Krauer K, Tan K, Duchene M, Upcroft P, Ecmann L, Upcroft J. 2011. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66: 1756–1765.

Lima B, Agüero MB, Zygadlo JA, Tapia A, Solís C, Arias AR, Yaluff G, Zacchino S, Feresin GE, Schmeda Hirschmann G. 2009. Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. *J. Chil. Chem. Soc* 2009, 54, 68-72.

Liu J, Kanetake S, Wu YH, Tam C, Cheng LW, Land KM, Friedman M. 2016. Antiprotozoal effects of the tomato tetrasaccharide glycoalkaloid tomatine and the aglycone tomatidine on mucosal trichomonads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64(46):8806-8810.

Liu WR, Qiao WL, Liu ZZ, Wang XH, Jiang R, Li SY, Shi RB, She GM. 2013. *Gaultheria*: Phytochemical and pharmacological characteristics. *Molecules* 18:12071–12108.

Liu Y, Grimm M, Dai WT, Hou MC, Xiao ZX, Cao Y. 2020. CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein-ligand blind docking. *Acta pharmacologica Sinica* 41(1):138–144.

López MM, Carballo MA. 2008. Los nitroimidazoles como modelo de Mutagénesis química y muerte celular. *Theoria* 17(2): 47-62.

López JA, Pérez J. 2010. Etnobotánica medicinal y parasitosis intestinales en la isla de Ometepe, Nicaragua. *Polibotánica* 30:137-161.

López SB, López ML, Aragón LM, Tereschuk ML, Slanis AC, Feresin GE, Zygadlo J, Tapia AA. 2011. Composition and anti-insect activity of essential oils from *Tagetes* L. species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(10):5286-5292.

Magiera A, Sienkiewicz M, Olszewska MA, Kicel A, Michel P. 2019. Chemical profile and antibacterial activity of essential oils from leaves and fruits of *Gaultheria procumbens* L. cultivated in Poland. *Acta Polonica Pharmaceutica.-Drug Research* 76(1):93–102.

Majer T, Bhattarai K, Straetener J, Pohlmann J, Cahill P, Zimmermann MO, Hübner, MP, Kaiser M, Svenson J, Schindler M, et al. 2022. Discovery of Ircinianin Lactones B and C—Two New Cyclic Sesterterpenes from the Marine Sponge *Ircinia wistarii*. *Mar. Drugs* 20:532.

Majid Shah S, Ullah F, Ayaz M, Sadiq A, Hussain S, Ali Shah AU, Adnan Ali Shah, S, Wadood A, Nadhman A. 2019. β -Sitosterol from *Ifloga spicata* (Forssk.) Sch. Bip. as potential anti-leishmanial agent against leishmania tropica: Docking and molecular insights. *Steroids* 148:56–62.

Marotti M, Piccaglia R, Biavati B, Marotti I. 2004. Characterization and yield evaluation of Essentials oil from different *Tagetes* Species. *Journal of Essential Oil Research* 16:440-44.

Mata Cárdenas, BD, Vargas Villarreal J, González Salazar F, Palacios Corona R, Salvador SF. 2008. A new vial microassay to screen antiprotozoal drugs. *Pharmacologyonline* 1:529–537.

Mesa Vanegas AM, Quinto Quinto A, Blair Trujillo S. 2013. Cuantificación de quinina en extractos de *Cinchona pubescens* y evaluación de la actividad antiplasmodial y citotóxica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12(6):592 – 602.

Meza Cervantez P, González Robles A, Cárdenas Guerra RE, Ortega López J, Saavedra E, Pineda E, Arroyo R. 2011. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology* 157(12):3469-3482.

Michel P, Granica S, Rosińska K, Glige M, Rojek J, Poraj Ł, Olszewska MA. 2022. The Effect of Standardised Leaf Extracts of *Gaultheria procumbens* on Multiple Oxidants, Inflammation-Related Enzymes, and Pro-Oxidant and Pro-Inflammatory Functions of Human Neutrophils. *Molecules* 27(10), 3357.

Middleton DJ. Infrageneric classification of the genus *Gaultheria* L. 1991. (Ericaceae) *Botanical Journal of the Linnean Society* 106:229–258.

Mi-ichi F, Miyamoto T, Yoshida H. 2017. Uniqueness of *Entamoeba* sulfur metabolism: sulfolipid metabolism that plays pleiotropic roles in the parasitic life cycle. *Molecular Microbiology* 106:479-491.

Mi-ichi F, Ishikawa T, Tam VK, Deloer S, Hamano S, Hamada T, Yoshida H. 2019 Characterization of *Entamoeba histolytica* adenosine 5-phosphosulfate (APS) kinase; validation as a target and provision of leads for the development of new drugs against amoebiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(8):e0007633.

Moaty EH. 2009. Identification and characterization of flavonoid and coumarin compounds of *Leucaena leucocephala* (Lam.) Dewit plant. *Bulletin of Faculty of Agriculture, Cairo University* 60(4):388-397.

Morales ER, Herrera LG. 2007. CIRICOTE (*Cordia dodecandra* A.DC.) Protocolo para su Colecta, Beneficio y Almacenaje. CONAFOR: México, pp. 4-7.

Muñetón P. 2009. Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Dr. Erick Estrada Lugo. *Revista Digital Universitaria UNAM*.10(9):1-9.

Disponible en:

<http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>

- Muñoz A, López A, Ramos A, Méndez B, Guapillo MRB. 2017. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* and Human papillomavirus in female sex workers in Central Veracruz, México. *Revista Argentina de Microbiología* 50(4):351-358.
- Mwangi ESK, Keriko JM, Machochi AK, Wanyonyi AW, Malebo HM, Chhabra SC, Tarus PK. 2010. Antiprotozoal activity and cytotoxicity of metabolites from leaves of *Teclea trichocarpa*. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(9):726–731.
- Natthapat S, Suttiporn P. 2014. Isolation and Characterization of 3 β -lup-20(29)-en-3-ol (Lupeol) from the Leaves and Twigs of *Diospyros phuketensis* Phengkklai. *Journal of Professional Routine to Research* 1:6-11.
- Navone GT, Gamboa MI, Oyhenart EE, Orden AB. 2006. "Parasitosis intestinales en poblaciones Mbyá-Guaraní de la Provincia de Misiones, Argentina: aspectos epidemiológicos y nutricionales". *Cad. Saúde Pública* 22(5): 1089-1100.
- Ndjonka D, Rapado LN, Silber AM, Liebau E, Wrenger C. 2013. Natural Products as a Source for Treating Neglected Parasitic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 14(2):3395-3439.
- Neira LF, Stashenko E, Escobar P. 2014. Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia *Euphorbiaceae*. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud* 46 (1): 15-22.
- Newman DJ, Cragg GM. 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* 83(3):770-803.
- Niknam A, Rahimi Esboei B, Chabra A. 2020. Anti-*Trichomonas vaginalis* Effect of Methanolic Extracts of *Sambucus nigra* in Comparison with Metronidazole. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 15(4):e65872.
- Norhayati M, Fatmah MS, Yusof S, Edariah AB. 2003. "Intestinal parasitic infections in man: a review". *Medical Journal of Malaysia* 58(2):296-305.

Noritake SM, Liu J, Kanetake S, Levin CE, Tam C, Cheng LW, Land KM, Friedman M. 2017. Phytochemical-rich foods inhibit the growth of pathogenic trichomonads. BMC Complementary and Alternative Medicine 17(461):e2024-37.

Núñez JT. 2020. Diagnóstico de la *Tricomonas vaginalis* en la mujer. Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología 85(2): 175 – 184.

OMS. 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud. Ginebra. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241506096>.

Orontes GC, Moreno MR, Caballero RA, Farrara SO. 2018, Plantas Utilizadas en la Medicina Tradicional De Comunidades Campesinas e Indígenas de la Selva Zoque, Chiapas, México. Boletín Latinoamericano del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 17 (5): 503 – 521.

Pagmadulam B, Tserendulam D, Rentsenkhand T, Igarashi M, Sawa R, Nihei CI Nishikawa Y. 2020. Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing *Streptomyces* species from Mongolian soils. Parasitology international 74:101961.

Orantes-García C, Moreno-Moreno RA, Verdugo Valdez AG, Farrera-Sarmiento O. 2015. Plantas útiles en comunidades campesinas de la Selva Zoque-Chiapas. Ed Colección Jaguar-UNICACH, Chiapas, México, pp. 73-74.

Orantes-García C, Moreno-Moreno RA, Caballero-Roque A, Farrera-Sarmiento O. 2018. Plantas utilizadas en la medicina tradicional de comunidades campesinas e indígenas de la Selva Zoque, Chiapas, México. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 17(5):503–521.

Panda SK, Luyten W. 2018. Antiparasitic activity in Asteraceae with special attention to ethnobotanical use by the tribes of Odisha, India. Parasite 25:10.

Parvaiz M. 2014. Ethnobotanical studies on plant resources of Mangowal, District Gujrat, Punjab, Pakistan. Avicenna Journal of Phytomedicine 4(5):364-370.

- Pina JRS, Silva-Silva JV, Carvalho JM, Bitencourt HR, Watanabe LA, Fernandes, JMP, Souza GE, Aguiar ACC, Guido RVC, Almeida-Souza F, et al. 2021. Antiprotozoal and Antibacterial Activity of Ravenelin, a Xanthone Isolated from the Endophytic Fungus *Exserohilum rostratum*. *Molecules* 26:3339.
- Pennington TD, Sarukhan J. 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México. INIF-ONU, pp. 413.
- Pereyra A, Pérez M. 2003. Tricomoniasis. *OFFARM* 22(4): 130-135.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25(13):1605-12.
- Rahman IU, Ijaz F, Iqbal Z, Afzal A, Ali N, Afzal M, Khan MA, Muhammad S, Qadir G, Asif MA. 2016. A novel survey of the ethno medicinal knowledge of dental problems in Manoor Valley (Northern Himalaya), Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology* 194:877–894.
- Ramírez JA, Lastra CC, González E, Grado A, Leyva I, Baxter J. 2017. La Tricomoniasis Bovina y sus Efectos en la Fertilidad. Ponencia. Estudio y proyecto presentado en la EXPOGAN de Chihuahua, Chih. Septiembre, 2017.
- Ramírez MC, Urdaneta A, Urdaneta CV, García D. 2017. Efecto de los tratamientos pregerminativos en la emergencia y en el desarrollo inicial del cotoperiz [*Talisia oliviformis* (Kunth) Radlk]. *Pastos y Forrajes* 40(1):16-22.
- Ribnicky DM, Poulev A, Raskin I. 2003. The determination of salicylates in *Gaultheria procumbens* for use as a natural aspirin alternative, *Journal of Nutraceuticals Functional & Medical Foods* 4(1):39-52.
- Roca Mézquita C, Graniel Sabido M, Moo Puc RE, Leon Déniz LV, Gamboa León R, Arjona Ruiz C, Tun Garrido J, Mirón López G, Mena Rejón GJ. 2016. Antiprotozoal activity of extracts of *Elaeodendron trichotomum* (celastraceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 13(4):162-165.

- Rodriguez C, Ibáñez R, Mojica L, Ng M, Spadafora C, Durant-Archibold AA, Gutiérrez M. 2021. Bufadienolides from the Skin Secretions of the Neotropical Toad *Rhinella alata* (Anura: Bufonidae): Antiprotozoal Activity against *Trypanosoma cruzi*. *Molecules* 26:4217
- Rojo S, Sánchez R, Ortega LM, Osoro K, Collantes E. 2014. Prevalencia de la tricomonosis bovina en las razas Asturiana de la Montaña y Asturiana de los Valles. *Tecnología Agroalimentaria* 13: 45-48.
- Romagnoli C, Mares D, Fasulo MP, Bruni A. 1994. Antifungal effects of α -terthienyl from *Tagetes patula* on five dermatophytes. *Phytotherapy Research* 8: 332–336.
- Rosales C, Muñoz R, Abdelnour A. 2020. Contenido de Emetina y Cefaelina en Plantas de *Psychotria ipecacuanha* en Costa Rica. *Revista Colombiana de Química* 49(2):18-22.
- Ruiz M, Rodas MA, Salazar I, Domínguez S, Canseco LM. 2009. Análisis preliminar de la actividad antimicrobiana de la planta medicinal Chik chawa (*Tagetes nelsonii* Greenm.). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 14(4).
- Santos I. 2013. Tricomoniasis: una visión amplia. *IATREIA* 27(2): 198-205.
- Sariego RI, Rojas RL, Fraga NJ. 2011. Estudio de la susceptibilidad al metronidazol en aislamientos cubanos de *Trichomonas vaginalis*. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología* 37(2): 271-276.
- Seddiek S, Elshorbagy M, Khater H, Asy A. 2014. The antitrichomonal efficacy of garlic and metronidazole against *Trichomonas gallinae* infecting domestic pigeons. *Parasitology Research*. 113:1319-1329.
- Serrato MA. 2014. El recurso genético cempoalxóchitl (*Tagetes spp.*) de México (Diagnóstico). Universidad Autónoma de Chapingo: México, pp. 15.
- Serrato MA. 2014. Extracción de aceite esencial de la ‘chik chawua’ (*Tagetes nelsonii* Greenm.), endémica de los Altos de Chiapas, para obtención de bioplaguicidas y de medicamento y como parte de una estrategia para la conservación in situ en la región: Propuesta. Universidad Autónoma de Chapingo: México, pp. 3-4.

Shetty LJ, Sakr FM, Al-Obaidy K, Patel MJ, Hidayatullah S. 2015. A brief review on medicinal plant *Tagetes erecta* Linn. Journal Applied Pharmaceutical Science 5(3):091-095.

Silva FA, Correa R, Do Nascimento S, Silva E, Andrade M, Lins S, Bieber L. 1993. Biological Activity of Cordiaquinones A and B, Isolated from *Cordia corymbosa*, Fitoterapia 64(1): 78-80.

Singh P, Krishna A, Kumar V, Krishna S, Singh K, Gupta M, Singh, S. 2015. Chemistry and biology of industrial crop *Tagetes Species*: a review. *Journal of Essential Oil Research*, Journal of Essential Oil Research 28(1):1–14.

Solano L, Acuña I, Barón MA, Morón A, Sánchez A. 2008. Influencia de las parasitosis intestinales y otros antecedentes infecciosos sobre el estado nutricional antropométrico de niños en situación de pobreza. *Parasitología Latinoamericana* 63:12-19.

Soung HO. 2016. Influence of 120 kDa Pyruvate:Ferredoxin Oxidoreductase on Pathogenicity of *Trichomonas vaginalis*. *Korean Journal of Parasitology* 54(1):71-74.

Soper D. 2004. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 190:28190.

Shlash S, Kadhum H. 2020. A vital role of aqueous extract of the plant *Eugenia caryophyllata* (clove) in treated *Trichomonas tenax* infection for patients attended dental clinics, Kufa University. *Indian Journal of Public Health Research & Development* 10.

Schnitzler AC, Nolan LL, Labbe R. 1996. Screening of medicinal plants for antileishmanial and antimicrobial activity. *Acta Horticulturae* 426: 235-242.

Stanley, P.C. y L.O. Williams. 1966. *Flora of Guatemala*. Fieldiana Botany. Chicago Natural History Museum. V24.Part. VIII(2):74-210.

Stourac J, Vavra O, Kokkonen P, Filipovic J, Pinto G, Brezovsky J, Damborsky J, Bednar D. 2019. Caver Web 1.0: identification of tunnels and channels in proteins and analysis of ligand transport. *Nucleic acids research*, 47(W1):W414–W422.

Takibayeva AT, Zhumabayeva GK, Bakibaev AA, Demets OV, Lyapunova MV, Mamaeva EA, Yerkassov RS, Kassenov RZ, Ibrayev MK. 2023. Methods of Analysis and Identification of Betulin and Its Derivatives. *Molecules* 28(16):5946.

Tapia ME, Tapia A, Cedillo R, Osuna L. y Meckes M. 2003 Screening of Mexican Medicinal Plants for Antiprotozoal Activity – Part II, *Pharmaceutical Biology* 41(3): 180-183.

The UniProt Consortium, UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025, *Nucleic Acids Research* 53(D1,6):D609–D617.

Tijjani A, Ndukwe I, Ayo R. 2012. Isolation and Characterization of Lup-20(29)-ene-3, 28- diol (Betulin) from the Stem-Bark of *Adenium obesum* (Apocynaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 11:259-262.

Toribio Hernández E, Grande Romero YC. 2020. Bioinsecticidal effect of *Tagetes erecta* (Asteraceae) on the pine sawfly *Zadiprion vallicola* (Diprionidae). *Madera y Bosques* 26(1):e2611564.

Travassos LUR. 1998. *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*: Expression of Chitin at the Cell Surface. *Experimental Parasitology* 89:195-204.

Valencia MC, Bolívar NJ, Velázquez RM, García MJ. 2014. Árbol, Flor Y Fruto De Recursos Florísticos De Origen Tropical Dibujando El Patrimonio Natural. TECCSIS: México, pp. 38.

Valitova J, Renkova A, Beckett R, Minibayeva F. 2024. Stigmasterol: An Enigmatic Plant Stress Sterol with Versatile Functions. *International Journal of Molecular Science* 25(15):8122.

Vedam VVA, Xavier AS, David DC. 2019. In-Vitro Evaluation of Antifungal and Anticancer Properties of *Tagetes Erecta* Petal Extract. *Biomedical and Pharmacology Journal* 12(2):815-823

Vemula R, Pachipala G, Reddy PVB, Kota S, Raman M, Allam US, Manikanta KN, Chadipiralla K. 2022. In vitro anti-protozoan activity of methanolic extracts of

Caralluma procumbens against *Tritrichomonas foetus*. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy 16(2):144-154.

Villarreal AA. 2020. Asociación de Tricomonirosis felina y bovina en unidades de producción pecuaria en la zona central del Estado de Veracruz. Universidad Veracruzana, México.

Waechter AI, Cavé A, Hocquemiller R, Bories C, Muñoz V, Fournet A. 1999. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). Phytotherapy research: PTR 13(2):175–177.

Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic Acids Research 46: W296-W303.

WHO/PAHO/UNESCO report. 1997. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January 1997. Epidemiological bulletin 18(1):13–14.

WHO. 2021. Global progress report on HIV, viral hepatitis, and sexually transmitted infections. Accountability for the global health sector strategies 2016–2021: actions for impact. World Health Organization: Geneva, Suiza, pp. 8-10.

Werner A. 2014. Infecciones por parásitos más frecuentes y su manejo. Revista Médica Clínica Las Condes 25(3):485-528.

Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau, LL, Deis LN, Verma V. Keedy DA, Hintze BJ, Chen VB, Jain S, Lewis SM, Arendall WB, Snoeyink J, Adams PD, Lovell SC, Richardson JS, Richardson DC. 2018. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. Protein science: a publication of the Protein Society 27(1):293–315.

Xu LW, Wang GY, Shi YP. 2011. Chemical constituents from *Tagetes erecta* flowers. Chemical Natural Compounds 47:281–283.

Zaman S, Al-Joufi FA, Zafar M, Zahoor M. 2022. Phytochemical, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Gaultheria Trichophylla* Royle. Applied Sciences, 12(14): 6921.

Zarate EJ, Castañeda GEL, Cuevas SJA, Carrillo FCL, Mendoza GEE, Serrato CMA. 2018. Concentraciones e intervalos de aplicación del aceite esencial de *Tagetes lucida* Cav. contra *Nacobbus aberrans*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 9(3):589-600.

Zhang B, He XL, Ding Y, Du GH, Gaultherin, a natural salicylate derivative from *Gaultheria yunnanensis*: Towards a better non-steroidal anti-inflammatory drug, European Journal of Pharmacology 530:166–171.

Zhang WJ, Liu QY, Li DW, Zhang ZM, You CX. 2022. Antagonistic storage potential of *Tagetes minuta*, *Eupatorium fortunei* and *Ocimum basilicum* oils with volatile secondary metabolites against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*. Industrial Crops and Products 187:115502.

Zeng Y, Tang Z, Wang Q, He P, y Fang Y. 2007. Simultaneous determination of active ingredients in ethnomedicine *Gaultheria leucocarpa* var. *yunnanensis* and its medicinal preparation by capillary electrophoresis with electrochemical detection. Journal of chromatographic science 45(9):610–615.