

## Actividad antiprotozoaria de extractos derivados de plantas utilizadas en Cuba como antiparasitarias

Antiprotozoal Activity of Extracts Derived from Plants Used in Cuba as Antiparasitics

Aymé Fernández-Calienes Valdés<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3905-2962>

Lianet Monzote Fidalgo<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1958-809X>

Idalia Sariego Ramos<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3986-4960>

Judith Mendiola Martínez<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8009-3398>

Ramón Scull Lizama<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6401-221X>

<sup>1</sup>Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), Departamento de Parasitología. La Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Universidad de La Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Departamento de Farmacia. La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [aymef@cim.sld.cu](mailto:aymef@cim.sld.cu)

### RESUMEN

**Introducción:** Los productos naturales han mostrado una buena actividad antiparasitaria.

**Objetivo:** Evaluar la actividad antiprotozoaria de plantas utilizadas en Cuba como antiparasitarias.

**Métodos:** Se prepararon extractos etanólicos de nueve especies de plantas y fracciones de alcaloides y sin alcaloides de *Mammea americana* L. Se evaluó la inhibición del crecimiento de promastigotes de *Leishmania amazonensis*, trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* y de la esquizogonia de *Plasmodium berghei*. Se determinó el índice de selectividad (IS) midiendo citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón.

**Resultados:** El extracto crudo de hojas de *M. americana* fue el único en mostrar IS superiores a 4 (frente a *L. amazonensis* y *P. berghei*). La fracción enriquecida en alcaloides mostró un valor de  $CI_{50}$  sobre *P. berghei* similar al extracto crudo con una selectividad superior (IS = 7,5). La fracción sin alcaloides mantuvo igual actividad y selectividad que el extracto frente a *Leishmania*, pero fue cinco veces más potente que el extracto frente a *Plasmodium*, con un IS siete veces mayor. Ningún extracto mostró actividad significativa frente a *Trichomonas*.

**Conclusiones:** El extracto de hojas de *M. americana* muestra actividad antiprotozoaria aceptable. Se revela por primera vez la actividad antiplasmodial de alcaloides de las hojas de *M. americana*.

**Palabras clave:** Cuba; plantas; medicina tradicional; actividad antiplasmodial; *Plasmodium berghei*.

## ABSTRACT

**Introduction:** Natural products have shown good antiparasitic activity.

**Objective.** To evaluate the antiprotozoal activity of plants used in Cuba as antiparasitics.

**Methods:** Ethanolic extracts of 9 plant species, alkaloid and alkaloid-free fractions of *Mammea americana* L. were prepared. The growth inhibition of *Leishmania amazonensis* promastigotes, *Trichomonas vaginalis* trophozoites and *Plasmodium berghei* schizogony was evaluated. Selectivity index (SI) were determined by measuring cytotoxicity against macrophages from mice.

**Results:** The crude extract of *M. americana* leaves was the only one to show IS higher than 4. The alkaloids rich fraction showed an  $IC_{50}$  value against *P. berghei* similar to the crude extract with a higher selectivity (IS=7.5). The fraction without alkaloids maintained the same activity and selectivity against *Leishmania* but was five times more potent than the extract against *Plasmodium* with seven times higher IS. No extract showed significant activity against *Trichomonas*.

**Conclusions:** The extract of *M. americana* leaves shows acceptable antiprotozoal activity. For the first time, the antiplasmodial activity of alkaloids from *M. americana* leaves is revealed.

**Keywords:** Cuba; plants; traditional medicine; antiprotozoal activity; *Plasmodium berghei*.

Recibido: 13/03/2023

Aceptado: 21/09/2023

## Introducción

Los protozoos parásitos constituyen un serio desafío para la salud mundial. *Trichomonas vaginalis* es la infección de transmisión sexual no viral más prevalente en el mundo;<sup>(1)</sup> mientras que los parásitos de los géneros *Plasmodium*, *Leishmania* y *Trypanosoma* son colectivamente responsables de millones de muertes cada año.<sup>(2)</sup> Debido a la aparición y propagación de la farmacorresistencia, las opciones de tratamiento para estas parasitosis con frecuencia son limitadas con reducida eficacia.<sup>(1,2)</sup>

Los productos naturales muestran una buena actividad frente a un amplio espectro de parásitos.<sup>(3,4)</sup> Algunos de esos productos provienen de plantas tradicionalmente utilizadas en medicina popular contra infecciones causadas por helmintos.<sup>(3)</sup>

Varias especies de la flora medicinal cubana se emplean como vermífugo, antihelmíntico o parasiticida.<sup>(5)</sup> En este estudio, se evaluó la actividad antiprotozoaria *in vitro* sobre *Plasmodium berghei*, *Trichomonas vaginalis* y *Leishmania amazonensis* de extractos de nueve especies de estas plantas utilizadas en Cuba como antiparasitarias.

Las especies de plantas se seleccionaron luego de la revisión de la literatura etnobotánica cubana.<sup>(5,6,7)</sup> La identificación y recolección de las nueve especies de plantas se realizó por un especialista en botánica (Dr. Pedro Pablo Herrera). Se conservó un ejemplar de cada especie en el Herbario del Instituto de Ecología y Sistemática, de La Habana. La información sobre las especies recolectadas se muestra en la tabla 1.

La preparación de los extractos etanólicos se realizó según se describió por Fernández-Calienes y otros.<sup>(8)</sup> El extracto enriquecido en alcaloides de *Mammea*

*americana* L. se preparó a partir del extracto etanólico liofilizado. Este se disolvió en metanol a una razón 1:10 masa de producto/volumen de solvente; posteriormente, se lavó con éter de petróleo. La fase etérea se denominó fracción sin alcaloides. La fracción metanólica se concentró a sequedad, se añadió ácido sulfúrico (1 %) y se filtró. La fracción ácida se basificó y se lavó con cloroformo. Finalmente, la fracción clorofórmica se concentró y se obtuvo la fracción rica en alcaloides.<sup>(9)</sup> Mediante la reacción del Dragendorff, se verificó la presencia (reacción positiva) o ausencia de alcaloides (reacción negativa). Se removió el solvente por evaporación a presión reducida y el residuo restante se congeló a -20 °C hasta su liofilización.

Los extractos y las fracciones se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, BDH, Reino Unido) a 20 mg/mL. Los fármacos de referencia se disolvieron en agua destilada estéril, sulfato de cloroquina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 1 µg/mL y anfotericina B (AmB; IMEFA, La Habana, Cuba) a 2 mg/mL; mientras que el metronidazol (Sigma, St. Louis, MO, EUA) se disolvió en DMSO a 3,4 mg/mL.

Se obtuvieron ratones hembra BALB/c, con un peso corporal de aproximadamente 20 a 22 g, del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Mayabeque, Cuba). El mantenimiento y cuidado de los ratones se siguió de acuerdo con las directrices del Comité de Ética para el Uso Humano de Animales de Laboratorio (proyecto IPK-0603021). Se controló la temperatura y la humedad, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y se proporcionó agua y alimento a todos los animales para ser consumidos libremente.

La cepa ANKA de *Plasmodium berghei* se mantuvo por pases sucesivos en ratones BALB/c: se infectaron ratones sanos por la ruta intraperitoneal con 10<sup>6</sup> eritrocitos de ratones parasitados. El ensayo para evaluar la actividad antiplasmodial se hizo en placas de 96 pocillos. Se realizó el conteo directo de esquizontes en láminas teñidas con Giemsa para calcular el porcentaje de inhibición de la esquizogonia en relación con los controles tratados con DMSO.<sup>(8)</sup>

El aislamiento T-H7 de *T. vaginalis* se axenizó a partir exudados vaginales de una mujer sintomática.<sup>(10)</sup> Los parásitos se cultivaron en medio TYI suplementado con 10 % de suero bovino (LABIOFAM, La Habana, Cuba), bajo condiciones anaeróbicas a 37 °C. Para los experimentos se utilizaron los cultivos en fase exponencial. El

ensayo de actividad trichomonocida se realizó con un método colorimétrico utilizando una sal de tetrazolio (MTT). Se ensayaron varias concentraciones de productos, entre 1,56 y 200 µg/mL y se calculó el porcentaje de inhibición con relación al control tratado con DMSO.<sup>(11)</sup>

Los parásitos de *L. amazonensis* (MHOM/77BR/LTB0016) se aislaron de lesiones en ratones BALB/c y se mantuvieron en estadio promastigote a 26 °C en medio Schneider (SIGMA, St. Louis, MO, USA) con 10 % de suero fetal bovino (SIGMA, St. Louis, MO, USA), 100 µg de estreptomina/mL and 100 U penicilina/mL. La actividad antipromastigote se determinó usando un método colorimétrico con sal de tetrazolio (MTT) y se calculó el porcentaje de inhibición con relación a los controles tratados con DMSO.<sup>(12)</sup>

Los extractos y fracciones de plantas se probaron a siete concentraciones (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 y 200 µg/mL). La concentración final de DMSO en las pruebas no superó el 0,5 %. En todos los casos la actividad se expresó como la concentración que reduce el 50 % de la absorbancia o de la esquizogonia (en el caso de *P. berghei*). Los valores de concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) o concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) se determinaron a partir de curvas dosis-respuesta. Los resultados se expresaron como media y desviación estándar (DE). La selectividad de la actividad se evaluó mediante la evaluación simultánea de la citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c también usando el método colorimétrico del MTT.<sup>(12)</sup> Se calculó el índice de selectividad (IS) como la razón CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>. El criterio de actividad fue una CI<sub>50</sub> menor que 100 µg/mL con un IS superior a cuatro.<sup>(13)</sup>

Las especies con algún antecedente de actividad antiprotozoaria de sus extractos son *M. americana*,<sup>(14)</sup> *Mentha x villosa* Huds.,<sup>(15)</sup> *Quisqualis Indica* L.<sup>(16)</sup> y *Sonchus oleraceus* L.<sup>(17)</sup> (tabla 1). Los extractos de *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose, *M. americana*, *M. villosa*, *Q. indica* y *S. oleraceus* exhibieron valores de CI<sub>50</sub> inferiores a 100 µg/mL; mientras que los extractos de *Centrosema virginianum* (L.) Benth., *Crescentia cujete* L., *Hamelia patens* Jacq. y *Polypodium aureum* L. no mostraron actividad a la máxima concentración evaluada (tabla 2). Esto coincide con lo reportado en la literatura donde *C. cujete* y *H. patens* resultaron inactivas sobre *Trypanosoma cruzi*<sup>(18)</sup> o *Trichomonas*, *Giardia*, *Entamoeba histolytica*, *T.*

*cruzi* y *L. mexicana*,<sup>(19)</sup> respectivamente. Sobre *C. virginianum* y *P. aureum* no se hallaron reportes de actividad (tabla 1).

El extracto crudo de hojas de *M. americana* exhibió la menor  $CI_{50}$  en los tres modelos y fue el único que mostró IS de su acción antiprotozoaria por encima de 4 (tabla 2). Por esta razón, se procedió a obtener fracciones de este extracto que pudieran guiar la identificación de la naturaleza de los componentes activos, La fracción enriquecida en alcaloides de *Mammea* resultó inactiva frente a *T. vaginalis* y promastigotes de *Leishmania*; pero, mostró un valor de  $CI_{50}$  contra *P. berghei* similar al extracto crudo con una selectividad superior (IS = 7,5). La fracción sin alcaloides mantuvo igual actividad y selectividad frente a *Leishmania*; sin embargo, fue cinco veces más potente que el extracto crudo frente a *Plasmodium* con un SI siete veces mayor (SI = 33,9).

**Tabla 1** - Especies de plantas utilizadas en Cuba como antiparasitarias, incluidas en el estudio

Especie (familia)	Nombre común	Uso antiparasitario en Cuba	Parte utilizada	Fecha de la colecta	Lugar de la colecta	Número de especimen
<i>Centrosema virginianum</i> (L.) Benth. (Papilionaceae)	Papito de la reina	Buena contra las lombrices Roig <sup>(5)</sup>	Semilla	Octubre/2010	La Chata, La Habana	HAC 43030
<i>Crescentia cujete</i> L. (Bignoniaceae)	Güira cimarrona	Contra parásitos intestinales Volpato y otros <sup>(7)</sup>	Fruto	Febrero/2011	Güira de Melena, Artemisa	ROIG4855
<i>Hamelia patens</i> Jacq. (Rubiaceae)	Ponásí	Contra la sarna Roig <sup>(5)</sup>	Parte aérea	Junio/2011	Ceiba del agua, Artemisa	HAC 43060
<i>Hylocereus undatus</i> (Haw.) Britton & Rose (Cactaceae)	Flor de cáliz o pitahaya	Vermicida externo e interno Roig <sup>(5)</sup>	Tallo	Octubre/2010	Santos Suárez, La Habana	HAC 43045

<i>Mammea americana</i> L. (Clusiaceae)	Mamey de Santo Domingo	Contra los parásitos de la piel Roig <sup>(5)</sup>	Corteza	Octubre/2010	La Chata, La Habana	HAC 43056
<i>Mentha x villosa</i> Huds. (Lamiaceae)	Yerba buena	Antiparasitaria y contra afecciones estomacales Fuentes y Granda <sup>(6)</sup>	Parte aérea	Junio/2011	Santos Suárez, La Habana	HAC 43035
<i>Polypodium aureum</i> L. (Polipodiaceae)	Calaguala	Antihelmíntico Roig <sup>(5)</sup>	Raiz	Octubre/2011	Arroyo Arenas, La Habana	HAC 43032
<i>Quisqualis indica</i> L. (Combretaceae)	Piscuala	Expulsar tricocéfalos Roig <sup>(5)</sup>	Semilla	Junio/2011	Víbora, La Habana	HAC 43036
<i>Sonchus oleraceus</i> L. (Asteraceae)	Cerraja	Contra parásitos del hígado. Fuentes y Granda <sup>(6)</sup>	Planta completa	Abril/2011	Ceiba del agua, Artemisa	HAC 43051

**Tabla 2 - Actividad antiprotozoaria de extractos de plantas utilizadas en Cuba como antiparasitarias**

Extracto	Parte	CI <sub>50</sub> ± DE (µg/mL)			CC <sub>50</sub> ± DE (µg/mL)	Índice de selectividad (IS)		
		<i>P. bergh ei</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. vaginalis</i>	Macrófagos peritoneales de ratón BALB/c	<i>P. bergh ei</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. vaginalis</i>
<i>C. virginianum</i>	Parte aérea	> 100	178,7 ± 7,4	> 200	-	-	-	-
<i>C. cujete</i>	Fruto maduro	> 100	124,7 ± 6,2	> 200	-	-	-	-

	Fruto no maduro	> 100	>200	> 200	-	-	-	-
<i>H. patens</i>	Parte aérea	> 100	> 200	> 200	-	-	-	-
<i>H. undatus</i>	Tallo	> 100	75,8 ± 4,5	> 200	158,5 ± 6,2	-	2,1	-
<i>M. americana</i>	Cortez a	68,2 ± 7,3	> 200	> 200	> 200	> 2,9	-	-
	Hoja	24,9 ± 4,1	22,9 ± 2,2	99,3 ± 1,2	112,2 ± 3,9	4,5	4,9	1,1
<i>M. villosa</i>	Parte aérea	35,1 ± 3,7	140,3 ± 3,8	> 200	102,0±1,1	2,9	-	-
<i>P. aureum</i>	Planta completa	> 100	> 200	> 200	-	-	-	-
<i>Q. indica</i>	Parte aérea	> 100	> 200	>200	-	-	-	-
	Fruto	68,6	> 200	>200	165,4 ± 5,0	2,4	-	-
<i>S. oleraceus</i>	Parte aérea	> 100	84,2 ± 1,3	>200	157,3 ± 1,9	-	1,9	-
Fracción de alcaloides <i>M. americana</i>	Hoja	26,6 ± 3,5	> 200	>200	> 200	7,5	-	-
Fracción sin alcaloides <i>M. americana</i>	Hoja	4,6 ± 1,2	38,8 ± 1,4	> 200	155,8 ± 7,1	33,9	4,0	-
Sulfato de cloroquina	-	0,018 ± 0,001	-	-	-	-	-	-

Anfoterici na B	-	-	0,03 ± 0,003	-	-	-	-	-
Metronida zol	-	-	-	0,64 ± 0,05	-	-	-	-

La información recopilada por Roig<sup>(5)</sup> recoge el uso en Cuba de la corteza de *M. americana* contra parásitos de la piel. Sin embargo, los estudios etnobotánicos en otros países revelan el uso antihelmíntico de las semillas<sup>(5)</sup> y el uso antipalúdico o contra fiebres intermitentes de las hojas.<sup>(14)</sup> Estudios farmacológicos no clínicos demostraron la actividad antimicrobiana y tripanocida de esta especie.<sup>(14)</sup> Nuestros resultados confirman el efecto antiprotozoario de los extractos de hojas de *M. americana*; este es el primer reporte de actividad antiplasmodial, trichomonocida y leishmanocida.

El tamizaje fitoquímico del extracto seco de la tintura 20 % de hojas de *M. americana* cultivada en Cuba reveló la presencia de alcaloides, cumarinas, fenoles o taninos, quinonas y flavonoides.<sup>(20)</sup> El fraccionamiento del extracto de hojas de *M. americana* demuestra la presencia de varios compuestos con actividad antiprotozoaria en las hojas de esta planta. Aparentemente, los alcaloides están específicamente involucrados en la actividad antiplasmodial; mientras, compuestos de una categoría diferente, son responsables de una actividad antiprotozoaria y citotóxica más potente. Se conoce poco de los alcaloides de esta especie, por lo que este sería el primer hallazgo de actividad antiplasmodial de alcaloides de las hojas de *M. americana*.

La mayoría de las propiedades farmacológicas de *M. americana* se atribuyen a las cumarinas.<sup>(14)</sup> Estas se han estudiado profundamente, se conoce que al menos cuarenta tipos están presentes en las semillas y las hojas de esta especie.<sup>(14)</sup> En particular, mammea B/BA, mammea A/BA y mammea A/BB, muestran una potente actividad frente a epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.<sup>(14)</sup> Sin embargo, no se hallaron reportes de actividad frente a otros protozoos. Nuestros resultados sugieren que las cumarinas son los responsables de la potente actividad mostrada por el extracto sin alcaloides.

El presente estudio puede considerarse como una contribución al descubrimiento de fármacos antiprotozoarios. La mayoría de los descubrimientos anteriores de fármacos

líderes que adoptaron el enfoque etnofarmacológico se basaron en estudios de detección *in vitro* que luego fueron seguidos mediante estrategias de fraccionamiento guiadas por bioensayos, investigaciones de los mecanismos de acción, y experimentos de toxicidad y antiprotozoarios *in vivo*. El estudio identificó extractos derivados de una planta de uso medicinal en Cuba con una actividad antiprotozoaria significativa *in vitro*. La limitación de este estudio es el uso del extracto completo o fracciones para confirmar la actividad antiprotozoaria, Se recomienda identificar los compuestos que componen los extractos de hojas de *M. americana* y evaluar su eficacia antiprotozoaria para el futuro descubrimiento de un nuevo fármaco potencial contra los protozoos evaluados.

## Conclusiones

El extracto de hojas de *M. americana* exhibió actividad antiprotozoaria aceptable. El fraccionamiento reveló la existencia de compuestos activos de naturaleza alcaloide y no alcaloide en las hojas de *M. americana*. Por primera vez, se revela la actividad antiplasmodial de alcaloides de las hojas de *M. americana*.

## Agradecimientos

Los autores dedican el trabajo a la memoria del Dr.C Pedro Pablo Herrera quien colaboró atentamente en la colecta e identificación de las especies vegetales. Se agradece además a los curadores de los herbarios HAC (Instituto de Ecología y Sistemática) y ROIG (Estación de plantas medicinales Juan Tomás Roig) por facilitarnos el procesamiento de las muestras vegetales.

## Referencias bibliográficas

1. Ferrari M, Sabine A, Simoes-Barbosa A. *Trichomonas vaginalis*. Trends Parasitol. 2020;36(7):646-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.01.010>

2. Ang ML, Murima P, Pethe K. [Next-generation antimicrobials: from chemical biology to first-in-class drugs](#). Arch Pharm Res. 2015;38(9):1702-17. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0645-0>
3. Ndjonka D, Rapado LN, Silber AM, Liebau E, Wrenger C. [Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases](#). Int J Mol Sci. 2013;14(2):3395-439. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms14023395>
4. Singh A, Mishra A, Chaudhary R, Kumar V. Role of herbal plants in prevention and treatment of parasitic diseases. J Sci Res. 2020;64(1). DOI: <https://dx.doi.org/10.37398/JSR.2020.640106>
5. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba (segunda edición). La Habana, Cuba: Editorial Científico-Técnica; 1974.
6. Fuentes VR, Granda MM. Estudios de la medicina tradicional en Cuba. I. Rev Plantas Med. 1982;2(1):25-46.
7. Volpato G, Godínez D, Beyra A, Barreto A. [Uses of medicinal plants by Haitian immigrants and their descendants in the Province of Camagüey, Cuba](#). J Ethnobiol Ethnomed. 2009;5:16. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4269-5-16>
8. Fernández-Calienes A, Mendiola J, Scull R, González L, Bécquer E, Herrera PP. Actividad antiplasmodial de especies de plantas utilizadas en la medicina tradicional contra la malaria en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2022 [acceso 01/02/2023];74(3):e909. Disponible en: <https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/909>
9. Cuéllar A, Scull R, Martínez Y, Fernández-Calienes A, Monzote L. Evaluación preliminar de la composición química de las hojas de *Carica papaya* L. y del efecto antiprotozoario de un extracto enriquecido en alcaloides a partir de la misma. Rev Colombiana Ciencia Animal. 2012;4:364-76. DOI: <https://doi.org/10.24188/recia.v4.n2.2012.217>
10. Rojas L, Fraga J, Sariego I. Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. Infect Gen Evol. 2014;4:53-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2003.12.003>
11. Sariego I, Monzote L, Rojas L. Setting a colorimetric assay with MTT for assessment of trichomonocidal activity. Curr Clin Pharmacol. 2014;9:283-7. DOI: <https://doi.org/10.2174/157488470903140806120218>

12. García M, Monzote L, Scull R, Herrera P. Activity of Cuban plants extracts against *Leishmania amazonensis*. ISRN Pharmacol. 2012;2012:104540. DOI: <https://doi.org/10.5402/2012/104540>
13. Al Musayeib NM, Mothana RA, Gamal AA, Al-Massarani SM, Maes L. *In vitro* antiprotozoal activity of triterpenoid constituents of *Kleinia odora* growing in Saudi Arabia. *Molecules*. 2013;18:9207-18. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules18089207>
14. Lemus C, Smith-Ravin J, Marcelin O. *Mammea americana*: a review of traditional uses, phytochemistry and biological activities. *J Herb Med*. 2021;29(5):100466. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100466>
15. Teles NSB, Fechine FV, Viana FAC, Viana IOL, Nascimento DF, Leite ALAS, *et al*. Evaluation of the therapeutic efficacy of *Mentha crispata* in the treatment of giardiasis. *Contemporary Clin Trials*. 2011;32:809-13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cct.2011.08.005>
16. Aye KNL, Thiha M, Linn KS, Wai SS, Bawm S, Htun LL, *et al*. Screening for *in vitro* anticoccidial activity of medicinal plant extracts against *Eimeria tenella*. Proceedings of First International Conference and Annual Meeting of Myanmar Veterinary Association; 2014 [acceso 01/02/2023] Feb 2-3; Yangon, Myanmar. Ref. 32; p.138-49. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173281742>
17. Al Nasr I. *In Vitro* Anti-Leishmanial Assessment of Some Medicinal Plants Collected from Al Qassim, Saudi Arabia. *Acta Parasitológica*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00205-2>
18. Peres RB, Fiuza LF, da Silva PB, Batista MM, Camillo FdC, Marques AM *et al*. *In Vitro* Phenotypic Activity and In Silico Analysis of Natural Products from Brazilian Biodiversity on *Trypanosoma cruzi*. *Molecules*. 2021;26:5676. <https://doi.org/10.3390/molecules26185676>.
19. Núñez MJ, Paz-González AD, Vázquez-Jiménez LK, Castillo UG, Moo-Puc R, Chan-Bacab JM, *et al*. *In vitro* antiparasitic and antibacterial evaluation of organic extracts of Salvadoran flora. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. 2023;22(1):19-36. <https://doi.org/10.37360/blacpma.23.22.1.2>

20. Remón H, Alarcón A, Almeida M, Viera Y, Ramos M, Bazan Y. Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de los extractos secos de tinturas al 20 % de *Mammea americana* L. Rev Cubana Plant Med. 2012 [acceso 01/02/2023];17(4):300-7. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962012000400002&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962012000400002&lng=es)

#### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.