

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TOXICIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE
***Tagetes minuta* L. (ASTERACEAE) OBTENIDO**
DE POBLACIONES SILVESTRES Y CULTIVADAS

Tesinista: Cussa, Lucía

Firma:

Directora: Konigheim, Brenda Salomé

Firma:

Trabajo de Tesina para optar por el título de Bióloga, realizado en el
Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología "Dr. José María Vanella",
Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

29 de Marzo de 2017

**TOXICIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE
Tagetes minuta L. (ASTERACEAE) OBTENIDO DE
POBLACIONES SILVESTRES Y CULTIVADAS**

Tribunal Examinador

Apellido y Nombre: _____

Fecha: _____

Apellido y Nombre: _____

Fecha: _____

Apellido y Nombre: _____

Fecha: _____

Calificación: _____

Fecha: _____

- Φ Al Tribunal Examinador por sus aportes y tiempo para mejorar este trabajo.
- Φ A la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, por brindarme la posibilidad de realizar mis estudios.
- Φ A Brenda y Javier por aceptarme, enseñarme desinteresadamente y apoyarme en mis nuevos proyectos.
- Φ A todos los integrantes de laboratorio de Arbovirus y a Pedro, por ayudarme y enseñarme en cada tarea.
- Φ A mis padres, Miriam y Arturo, por apoyarme y permitirme estudiar la carrera que me gustaba, y por siempre permanecer a mi lado.
- Φ A mis hermanos, Francisco y Josefina, mí cuñada Keyla, y mis sobrinos Luciano e India, por el amor y el apoyo que me brindan.
- Φ A Ezequiel por comprender y estar a mi lado en todo el trayecto de esta tesina.
- Φ A toda mi familia por siempre estar y preocuparse.
- Φ A las amigas que me dio la facultad, Sofía, Karen, Karina, Belén, Helena y Florencia, porque sin ellas no habría sido placentera realizar la carrera.
- Φ A mis amigas del cole, Antonella, Julieta, Gabriel y Andrea, por siempre estar acompañándome.
- Φ A mis compañeros de trabajo, por interesarse y acompañarme en el tramo final.

¡Muchas gracias!

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	4
Introducción	
Las Plantas como productos naturales	7
Aceites Esenciales	8
<i>Tagetes minuta</i> Linn	10
Propiedades de la especie <i>Tagetes minuta</i> L.	13
Estudio de la toxicidad	16
Hipótesis y Objetivos	
Hipótesis, Objetivos Generales, Objetivos Específicos	20
Materiales y Métodos	
A. Material Vegetal y Aceites Esenciales	22
B. Ensayos biológicos	24
B.1. Líneas Celulares	24
B.2. Medio de Crecimiento	25
B.3. Medio de Mantenimiento	25
C. Muestras para Ensayos Biológicos	25
D. Evaluación de Citotoxicidad	26
E. Testigos de Citotoxicidad	27
F. Evaluación de Genotoxicidad	28
F.1. Ensayo de Micronúcleos	28
F.2. Ensayo de Fragmentación de ADN mediante Electroforesis en Gel de	30

Agarosa	
G. Análisis Estadístico	31
Resultados y Discusión	
A. Evaluación de Citotoxicidad	34
B. Evaluación de Genotoxicidad	41
Conclusión	
Conclusión	49
Proyecciones	
Proyecciones	51
Bibliografía	
Bibliografía	53
Anexo 1	
Anexo 1. Curvas de viabilidad del AE de <i>Minthostachys verticillata</i> (rico en Pulegona) y (R)-(+)-Pulegone	66
Anexo 2	
Anexo 2. Ensayos de Micronúcleos y Fragmentación de ADN del AE de <i>Minthostachys verticillata</i> (rico en Pulegona) y (R)-(+)-Pulegone	68

%VC: % Viabilidad Celular

µg/ml: microgramo por mililitro

µl/ml: microlitro por mililitro

µM: Concentración micromolar

A₁: Asíntota Inferior

A₂: Asíntota Superior

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AE/s: Aceites/s esencial/es

ATB: Antibiótico

CC₂₀: Concentración Citotóxica 20

CC₅₀: Concentración Citotóxica Media o 50

CC₈₀: Concentración Citotóxica 80

cel/ml: células por mililitro

D.O._(c), Densidad Óptica del cultivo control.

D.O._(t), Densidad Óptica del cultivo tratado.

DHT: Dihidrotagetona

DL₅₀: Dosis Letal 50

DMEM: Medio Esencial Mínimo modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

EE: Error Estandar

EG: Electroforesis en gel de agarosa

gr/l: gramo por litro

MC: Medio de Crecimiento

MCNC o CC₁₀: Máxima Concentración No Citotóxica o Concentración Citotóxica 10

MEM: Medio Esencial Mínimo

ml: mililitro

MM: Medio de Mantenimiento

MN: Micronúcleo/s

MTS: Método de reducción de sal de tetrazolio: Bromuro de (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio)

MTT: Método de reducción del Bromuro de 3((4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico

°C: Temperatura en grados Celsius

OMS: Organización Mundial de la Salud

Ona: Ocimenona

OTLO: Ocimenonas-Tagetonas-Limoneno-Ocimeno

p: Pendiente

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PEP: *Minthostachys verticillata* (Peperina)

PEROX: Peroxido de Hidrógeno

PL: (R)-(+)-Pulegone

ppm: partes por millón

RN: Rojo Neutro

SCCS: Comité Científico de Seguridad de los Consumidores

SFB: Suero Fetal Bovino

TS: *Tagetes minuta* silvestre

V: voltio

x: Variable independiente

x0: Punto de Inflexión

XTT: Método de reducción de sal de tetrazolio: Bromuro de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido)

α : Nivel de significancia

RESUMEN

Tagetes minuta L. (Asteraceae) popularmente conocida como "Suico", es una hierba aromática anual de la familia Asteraceae. Presenta una distribución cosmopolita, siendo abundante en Córdoba. A su aceite esencial (**AE**) se le atribuyen muchas propiedades como por ejemplo antimicrobiano e insecticida, además de ser utilizado como ingrediente en gastronomía, elaboración de té, perfumes, entre otros. Debido a estos antecedentes y a la poca o nula información sobre su toxicidad, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto citotóxico y genotóxico *in vitro* de **AEs** de *T. minuta*.

Los **AEs** fueron obtenidos de plantas cultivadas y seleccionadas de las que se diferenciaron dos quimiotipos: **Ona** (rico en Ocimenona) y **DHT** (rico en Dihidrotagetona), los cuales se compararon con el **AE** obtenido de la población silvestre. Para evaluar la citotoxicidad de los **AEs**, se midió la viabilidad celular mediante la captación de Rojo Neutro sobre células Vero (línea celular) y fibroblastos (cultivo primario) incubadas con distintas concentraciones de cada **AE**, obteniéndose la concentración citotóxica media (**CC₅₀**) ($R^2 > 0.9$). Los valores de **CC₅₀** fueron de $17,74 \pm 0,92$ ppm en células Vero y $16,15 \pm 0,51$ ppm en fibroblastos para el **AE** de la población silvestre; $13,39 \pm 0,98$ ppm para las células Vero y $35,42 \pm 0,67$ ppm para los fibroblastos para el quimiotipo **DHT**; y el quimiotipo **Ona** presentó los menores valores de citotoxicidad y en consecuencia resultó ser el más citotóxico, con una **CC₅₀** de $8,03 \pm 0,37$ ppm para células Vero y de $10,77 \pm 0,61$ ppm para fibroblastos. Además, se realizaron determinaciones de citotoxicidad en el **AE** de *Minthostachys verticillata* (Peperina) rico en Pulegona y (R)-(+)-Pulegone (SIGMA-ALDRICH), como testigos debido a los antecedentes de toxicidad que presenta este compuesto, obteniendo valores de **CC₅₀** superiores a los presentados por los **AEs** de suico. Para determinar genotoxicidad se realizaron los ensayos de Micronúcleos (**MN**) y Fragmentación de ADN en gel de agarosa, utilizando la Máxima Concentración no Citotóxica (**MCNC**) o **CC₁₀** de cada **AE**, incluido el **AE** de Peperina y Pulegona pura. Los

ensayos realizados demostraron que los **AEs** no generan/provocan daño genotóxico *in vitro*.

Estos resultados producen alerta por la alta citotoxicidad *in vitro* de los **AEs** de suico, particularmente del quimiotipo **Ona**. Pero el hecho de que no se encontrara daño genético, constituye la base para la realización de futuros ensayos sobre bioactividad del **AE** de *T. minuta*.

Palabras claves: Aceite esencial, Ocimenona, Dihidrotagetona, Citotoxicidad, Genotoxicidad.

INTRODUCCIÓN

Las Plantas como Productos Naturales

Desde tiempos prehistóricos, el hombre ha utilizado las plantas con fines curativos y espirituales, alimenticios y cosméticos (Uvidia-Ortiz, 2012). A partir de la segunda mitad del siglo XIX la fitoterapia (del griego *Phytos*, “planta” y *therapeia*, “terapia”, corresponde al uso de productos de origen vegetal con finalidad terapéutica) comenzó a ser desplazada progresivamente por los medicamentos sintéticos (Blanco-Hernández *et al.*, 2006), pero desde hace décadas ha renacido el interés por el estudio de plantas tanto como recurso terapéutico como así también el consumo tradicional de las mismas, basado en la creencia de la inocuidad que presentan y su superioridad ante las drogas sintéticas (Pochettino *et al.*, 2008), principalmente debido a las reacciones adversas que provocan estas últimas y la contaminación ambiental que genera su fabricación (Uvidia-Ortiz, 2012). Este movimiento que se conoce como la “Revolución Verde de la Medicina” se está llevando a cabo, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo (Pochettino *et al.*, 2008; García-Bacallao *et al.*, 2002).

La **OMS** (Organización Mundial de la Salud) estima que el 80% de los habitantes de los países en vía de desarrollo, tienen en las plantas su principal fuente de medicamentos, siendo indispensables para la atención primaria de la salud (Prabuseenivasan *et al.*, 2006; OMS, 1986). Esto podría deberse principalmente a la disponibilidad y asequibilidad de las mismas, sin olvidarse del hecho que representan una fuente de diversidad química y de nuevos metabolitos secundarios bioactivos (Clardy & Walsh, 2004; Tagboto & Townson, 2001). Además del uso medicinal, los productos derivados de plantas poseen especial interés por ser biodegradables a compuestos no tóxicos, por lo tanto se consideran menos perjudiciales para el medio ambiente en contraposición de los compuestos sintéticos (Pérez & Iannacone, 2004).

En Argentina, en consonancia con lo que ocurre en el ámbito mundial, se ha manifestado este proceso en la amplia oferta comercial de plantas y de productos elaborados sobre la base de las plantas medicinales. Las farmacias, herboristerías, dietéticas, supermercados promueven su consumo, lo que ha motivado la elaboración y

comercialización a gran escala de una extensa variedad de productos vegetales de consumo masivo, que contribuyen a que la circulación y uso de hierbas medicinales se realicen sin un conocimiento profundo y desprovisto de estricto control oficial, implicando peligros para la salud de la sociedad (Guaglio *et al.*, 1985).

Por ello, es que el estudio de los productos naturales es un objetivo prioritario tanto para la **OMS** como para numerosas instituciones (Pochettino *et al.*, 2008).

Aceites esenciales

Las plantas producen una amplia variedad de compuestos como resultado de su metabolismo secundario en respuesta a las condiciones ambientales. Una de las funciones de este tipo de productos es la defensa de la planta contra depredadores y patógenos. Otros, están involucrados en los mecanismos de defensa contra el estrés abiótico (por ejemplo, exposición a rayos UV-B), o tienen implicancia en la interacción de las plantas con otros organismos, como por ejemplo, atracción de los polinizadores (Bagetta *et al.*, 2015; Gleiser & Zygadlo, 2009; Schäfer & Wink, 2009). Los Aceites Esenciales (**AEs**) son una variedad de estos productos secundarios (Bagetta *et al.*, 2015).

El término aceite esencial se utilizó por primera vez en el siglo XVI por Paracelso von Hohenheim, quien se refirió al componente eficaz de una droga como "Quinta esencia", aunque existen registros que hacen referencia sobre el uso de los **AEs** con fines terapéuticos en el papiro de Ebers que data del 1500 a.C. En este documento se enumeran en detalle más de 800 remedios y tratamientos en base a **AEs** (Bagetta *et al.*, 2015).

Los **AEs** se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen principalmente a las Asteráceas, Lamiaceae, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Apiaceae (Martínez-M, 2003).

Son popularmente utilizados por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales e insecticidas. Así mismo, la industria ofrece una amplia gama de productos que contienen **AEs** como por ejemplo en cosméticos y perfumes, productos

odontológicos, alimenticios, agrícolas, conservantes, etcétera. Esto hace que los productos naturales y entre ellos los **AEs** sean cada vez más utilizados como alternativas a los productos químicos sintéticos. En la actualidad, se conocen aproximadamente 3000 **AEs** de los cuales solo el 10% son de importancia comercial (Reichling *et al.*, 2009; Bakkali *et al.*, 2008).

La extracción se puede realizar por diferentes metodologías como arrastre con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage, extracción con fluidos supercríticos, hidrodestilación, entre otros (Bakkali *et al.*, 2008; Martínez-M, 2003).

Los **AEs** son compuestos volátiles, líquidos a temperatura ambiente, lípidos, derivados de plantas aromáticas o sintéticos. Son solubles en lípidos y en disolventes orgánicos como éter o cloroformo. Poseen densidad generalmente menor que la del agua, elevado índice de refracción y se caracterizan por un fuerte olor, que en su mayoría es agradable. Por lo general son incoloros, aunque algunos presentan colores que van del amarillo pálido al rojo oscuro (Bagetta *et al.*, 2015; Cofre-Santo, 2011).

Una de las características más importante de los **AEs** es su hidrofobicidad. Esto hace que sean capaces de penetrar a través de las membranas celulares, alterando sus estructuras y haciéndolas más permeables, lo cual puede resultar en la muerte de la misma (Burt, 2004). Otra característica relevante, es que son capaces de producir fenómenos sinérgicos entre los diversos metabolitos que los componen, resultando en una bioactividad superior, es decir un aumento en la respuesta del aceite en su conjunto en comparación con sus componentes aislados (Escobar *et al.*, 2012; Hori, 2003). Además, se caracterizan por estar exento de enzimas y taninos, y ser estables si son correctamente almacenados. Sin embargo, se puede destacar como principal desventaja que no contienen antioxidantes naturales por lo tanto se oxidan fácilmente (Tunc *et al.*, 2000).

En general los **AEs** son mezclas complejas de aproximadamente 60 componentes que pueden ser: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanos. Pero, se caracterizan por poseer dos o tres componentes principales, que están presentes en altas concentraciones (20 a 90%) y varios componentes que se encuentran en pequeñas

cantidades. Son sintetizados por distintos órganos de la planta como brotes, flores, hojas, tallos, y se almacenan en células secretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o tricomas glandulares (Bagetta *et al.*, 2015; Reichling *et al.*, 2009; Bakkali *et al.*, 2008).

La composición de los **AEs** no solo depende del perfil químico de la especie vegetal y del tipo de extracción realizada, sino también del clima, la composición del suelo, órgano de la planta, la edad y etapa del ciclo vegetativo de la misma. Así también, puede haber diferencias de quimiotipos entre especies y variedades de plantas aromáticas del mismo género (Massuh, 2014; Masotti *et al.*, 2003; Zygadlo & Juliani, 2003). Todos estos factores le van a conferir cierta variación en las propiedades de dicho **AE** (Bagetta *et al.*, 2015).

El término quimiotipo alude a la variación en la composición del **AE**, incluso dentro de la misma especie. Un quimiotipo es una entidad químicamente distinta, que se diferencia en los metabolitos secundarios. Existen pequeñas variaciones (ambientales, geográficas, genéticas, etcétera) que producen poco o ningún efecto a nivel morfológico, pero grandes cambios a nivel de fenotipo químico (Soria *et al.*, 2008; Juliani *et al.*, 2002).

Tagetes minuta Linn

En el mundo están reconocidas 17500 especies aromáticas, distribuidas en 60 familias (Silvia & Asensio, 2002; Lawrence, 1995) siendo Asteraceae una de las familias más numerosas, compuesta por más de 1700 géneros y unas 24000 especies distribuidas por todo el planeta, excepto en la Antártida (Sadia *et al.*, 2013; Katinas *et al.*, 2007). Esta familia es originaria de Sudamérica, pero actualmente posee distribución cosmopolita, y representa uno de los grupos más ricos en formas de Angiospermas. Incluye hierbas anuales o perennes, raramente árboles y arbustos, algunas con látex. Se reconocen por su estructura reproductiva, con un capítulo donde las flores se disponen en forma sécil sobre un receptáculo ensanchado (Barboza *et al.*, 2006). Dentro de esta familia, uno de los géneros de mayor relevancia, productor de **AEs**, es el género *Tagetes*.

El género *Tagetes* está compuesto por 50 especies, de las cuales 12 se encuentran en Argentina donde 7 de éstas son endémicas (*T. argentina*, *T. biflora*, *T. laxa*, *T.*

mendocina, *T. perezii*, *T. riojana*, *T. rupestris*) (Anton & Zuloaga, 2016). Las especies mejores conocidas son *T. minuta*, *T. erecta*, *T. patula* y *T. terniflora* (Massuh, 2014). Este género posee gran importancia económica e incluye especies comestibles y ornamentales. Los **AEs** de este género se caracterizan por su actividad insecticida y nematocida (Ball-Coelho, 2003), además de sus aplicaciones farmacéuticas.

Tagetes minuta Linn, en latín significa “pequeña” y se refiere al pequeño tamaño de sus capítulos (Bansal *et al.*, 1999), es conocida vulgarmente como “suico” o “chinchilla”. Es una hierba anual erecta que llega a medir 200 cm de altura, con ramificación de su tallo principalmente en la parte superior; con flores dimorfas dispuestas en inflorescencias compuestas, de color amarillo o blanco, con dos tipos de formas posibles: liguladas y tubulares que juntas conforman la inflorescencia cuyo receptáculo presenta glándulas oleíferas (Figura 1). Posee semillas relativamente pequeñas, y los frutos están representados por aquenios alargados de color marrón oscuro (Alonso, 2004). Sus hojas son pinnaticompuestas con márgenes aserrados, en la cara inferior de las mismas hay pequeñas glándulas oleíferas, de color anaranjado, que contienen el **AEs** que se caracteriza por su fuerte aroma (Massuh, 2014; Soule, 1993).



Figura 1. Individuo de *Tagetes minuta* Linn.

Estudios sobre la biología reproductiva de la especie, establecieron que la misma se multiplica de forma sexual y que posee la capacidad de polinizarse por autogamia

(interviene polen de la misma flor), geitonogamia (interviene polen de otra flor de la misma planta) y xenogamia (interviene polen de otra planta) (Visintin & Bernardello, 2005). Estas posibilidades de cruzamientos al azar determinan, entre otros factores, que exista variabilidad intra e interpoblacional, que se manifiesta tanto morfológica como químicamente en la concentración y composición de su **AE** (Massuh, 2007; Ordóñez *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2000).

Es nativa de los pastizales templados y regiones montañosas del sur de Sudamérica, incluidos Argentina, Chile, Bolivia, Ecuador y Perú (Chamorro *et al.*, 2008; Soule, 1993). Particularmente, en la provincia de Córdoba se la encuentra como planta ruderal, en potreros y campos abandonados (Barboza *et al.*, 2006). *T. minuta* es una especie R-estratega, por lo que aparece en zonas de disturbios durante las etapas iniciales de sucesión (de la Fuente *et al.*, 2006). Esta afinidad por los sitios perturbados, con la ayuda de actividades antrópicas, ha permitido a la especie colonizar muchas áreas alrededor del mundo como Europa, África, Asia, Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos (Cofre-Santo, 2011; Naqinezhad & Mehrvarz, 2007), llegando a ser considerada maleza en cultivos tradicionales (Martínez-Ghersa *et al.*, 2000).

Dentro del género, *T. minuta* es una de las especies más estudiadas debido al gran interés económico que representa su **AE**. En Argentina se extraen aproximadamente 0,5 tn/año de **AE** de suico obtenido de poblaciones silvestres y se comercializa a un valor de 80-120 US\$/kg (Bandoni, 2003). Nuestro país, junto con India, Egipto, Sudáfrica y Zimbabwe constituyen los principales países exportadores del **AE** de suico (Baser & Buchbauer, 2010).

Según el índice de prioridad de conservación de especies vegetales elaborado por Martínez (2003) para el Valle de Paravachasca (provincia de Córdoba), el suico se encuentra 8^{va} entre 35 hierbas citadas. Dicho índice considera la sensibilidad ecológica, la demanda comercial y el origen de la especie para el área, lo cual refleja integralmente su estado e importancia respecto a la utilización.

El **AE** de *T. minuta* está compuesto principalmente por los terpenos: limoneno, (E) y (Z)-tagetona, (Z)- β -ocimeno, dihidrotagetona, (E) y (Z)-ocimenona (Massuh, 2014;

Shahzadi *et al.*, 2010; Chamorro *et al.*, 2008; Pichette *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2000). Sin embargo, dicha composición puede variar de acuerdo con la ubicación geográfica, la etapa de crecimiento y la parte de la planta (Chamorro *et al.*, 2008; Moghaddam *et al.*, 2007; Chalchat *et al.*, 1995).

Propiedades de la especie *Tagetes minuta* L.

Se ha estudiado que los **AEs** de *T. minuta* poseen una amplia gama de actividades biológicas (Tabla 1).

Tabla 1. Bioactividades comprobadas científicamente del AE de *Tagetes minuta* L.

Bioactividad	Blanco de acción	Referencias bibliográficas
Antimicrobiano	Bacterias gram-positivas: Géneros <i>Paenibacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> .	Lambrecht-Gonçalves <i>et al.</i> , 2013; González & Marioli, 2010; Eguaras <i>et al.</i> , 2005; Fuselli <i>et al.</i> , 2005; Senatore <i>et al.</i> , 2004
	Bacterias gram-negativas: Géneros <i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas</i>	
Antifúngico	<i>Ascosphaera apis</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Microsporium gypsum</i> , <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus niger</i> , especies del Género <i>Penicillium</i>	Eguaras <i>et al.</i> , 2005; Bii <i>et al.</i> , 2000;
Antiviral	<i>Carnation ring spot</i> (CaRSV), <i>Carnation vein mottle</i> (CaVMV)	Singh <i>et al.</i> , 2002
Varroacida	<i>Varroa destructor</i>	Ruffinengo <i>et al.</i> , 2007; 2001; Eguaras <i>et al.</i> , 2005
Pediculicida	Adultos de <i>Pediculus humanus capitis</i>	Cestari <i>et al.</i> , 2004
Garrapaticida	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Amblyomma cajennense</i> , <i>Argas miniatus</i> , <i>Hyalomma rufipes</i>	Andreotti <i>et al.</i> , 2013; García <i>et al.</i> , 2012; Nchu <i>et al.</i> , 2012
Nematicida	<i>Haemonchus contortus</i> , <i>Meloidogyne incognita</i>	Macedo <i>et al.</i> , 2013; Adekunle <i>et al.</i> , 2007
Inhibidor de la eclosión de huevos y de la emergencia de adultos	<i>Callosobruchus maculatus</i> (Coleoptera)	Boeke <i>et al.</i> , 2004; Kéita <i>et al.</i> , 2000
Repelente, insecticida, larvicida, ovicida, ninficida.	<i>Stegomyia aegypti</i> , <i>Aedes fluviatilis</i> , <i>Premnotrypes vorax</i> , <i>Anopheles stephensis</i> , <i>Triatoma infestans</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , especies de Aphididae	Massuh <i>et al.</i> , 2014; Baldeón-Ordóñez, 2011; López <i>et al.</i> , 2011; Cofre-Santo, 2011; Batallán <i>et al.</i> , 2010; Tomova <i>et al.</i> , 2005; Kéita <i>et al.</i> , 2000; Macêdo <i>et al.</i> , 1997; Green <i>et al.</i> , 1991
Inhibidor del	<i>Zea mays</i> L.; <i>Chenopodium murale</i> L., <i>Phalaris</i>	Arora <i>et al.</i> , 2015; Batish <i>et al.</i> , 2007;

crecimiento de raíces de plántulas, de germinación y herbicida	<i>minor</i> Retz; <i>Amaranthus viridis</i> L.; <i>Echinochloa crus-galli</i> , <i>Cyperus rotundus</i>	Scrivanti <i>et al.</i> , 2003
Fototóxico	Células epidérmicas y ratones	Gakuubi <i>et al.</i> , 2016
Acción similar a ansiolíticos sedantes <i>in vivo</i>	Sistema Nervioso Central de murinos	Rocabado <i>et al.</i> , 2011

Además de las propiedades comprobadas científica y experimentalmente, suico es utilizada como condimento en la gastronomía tradicional peruana, boliviana, chilena y argentina (Ulloa, 2006; Guardia, 2002; Soule, 1993). Asimismo suele utilizarse en huertas y quintas como atrayente de insectos polinizadores (Ulloa, 2006). Se le atribuyen propiedades medicinales como digestivo, diurético, carminativo, diaforético, antiinflamatorio, y para aliviar resfríos y bronquitis (Abbasi *et al.*, 2010; Chamorro *et al.*, 2008; Alonso, 2004; Guardia, 2002). Se ha utilizado para el tratamiento de dermatitis, varices, conjuntivitis, y como antiespasmódico, antimicrobiano y antihelmíntico (Chamorro *et al.*, 2008; Amat, 1983).

De sus hojas se extrae un **AE** utilizado en perfumería y aromaterapia (Guardia, 2002; Soule, 1993). Se hacen téis, bebidas refrescantes tipo cola y bebidas alcohólicas; sirve como saborizante de postres lácteos, dulces y gelatinas (Singh *et al.*, 2003; Soule, 1993; Leung, 1980). El **AE** está aprobado en la categoría de alimentos (nº 172.510) por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos. En Argentina, ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) no hace referencia a esta especie ni a ningún producto natural derivado de ella. Sin embargo, en la norma IRAM-SAIPA (Nº18622, 2003) se describen dos perfiles químicos del **AE** de *T. minuta* considerando los 7 principales compuestos [limoneno, (E) y (Z)-tagetona, (Z)- β -ocimeno, dihidrotagetona, (E) y (Z)-ocimenona], en dicha norma se establecen los estándares de calidad para la comercialización del **AE**. Además, se lo utiliza como base para la síntesis química de nuevos compuestos aromáticos (Singh *et al.*, 2003).

Estudio de la toxicidad

Se ha demostrado científicamente que ciertas plantas medicinales no poseen las propiedades que les atribuye la medicina popular, e incluso han resultado ser peligrosas (Blanco-Hernández *et al.*, 2006). Ensayos con **AEs** utilizados y/o consumidos tradicionalmente han demostrado ser citotóxicos, fototóxicos, hepatotóxico y genotóxicos en estudios *in vivo* e *in vitro* (Gordon & Khojasteh, 2015; Shirazi *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2014; Escobar *et al.*, 2012; NTP, 2011; Di Sotto *et al.*, 2011). Así mismo, no debe dejar de considerarse que los **AEs** son los productos de la extracción de una planta, siendo por lo general más concentrados, por lo cual pueden exhibir mayor toxicidad que la planta original (Bisset, 1994).

El hecho de que el **AE** de *T. minuta* resultara fototóxico en estudios *in vitro* e *in vivo*, fue determinante para que el Comité Científico de Seguridad de los Consumidores (**SCCS**), organismo de la Unión Europea, recomendara que no se utilice este **AE** en productos de protección solar (Gakuubi *et al.*, 2016). Este hecho y sumado a la escasa información que hay en la literatura, sustentan la necesidad de realizar pruebas de toxicidad integrales con el fin de determinar la seguridad del uso del **AE** de suico en productos farmacéuticos, agroquímicos, alimenticios y en prácticas socioculturales, entre otras aplicaciones (Gakuubi *et al.*, 2016).

Lo mencionado anteriormente, señala la importancia de la evaluación toxicológica tanto para comprobar los efectos descritos en la literatura, como para evaluar si estas propiedades son atribuibles en nuestras condiciones ambientales, y para encontrar nuevas especies con propiedades curativas con mínimos efectos tóxicos para el hombre (Blanco-Hernández *et al.*, 2006). Los ensayos de toxicología comprenden pruebas *in vivo* que utilizan animales de experimentación e *in vitro*, que pueden utilizar organismos inferiores (microorganismo, moluscos), reacciones bioquímicas (enzimas, receptores), cultivos de células (animales y humanas), órganos aislados de animales (mamíferos, anfibios, pájaros), entre otros (Konigheim, 2012).

Debido al costo de los ensayos *in vivo* y a la presión ejercida por las sociedades protectoras de animales de experimentación, los métodos *in vitro* han cobrado un gran interés y desarrollo como “alternativa a la experimentación animal” (Arencibia *et al.*, 2003).

Dentro de la batería de ensayos *in vitro*, los ensayos de citotoxicidad que utilizan cultivos celulares primarios o líneas celulares establecidas, permiten evaluar la toxicidad aguda, evaluación de “respuestas inmediatas o de corto plazo”, de una sustancia dada. La citotoxicidad, es la alteración en la estructura y/o funciones celulares básicas que lleva a la producción de un daño el cual puede ser detectado a través de la proliferación y/o supervivencia celular (Repetto, 2002; Riva & López, 1993).

El valor predictivo de los estudios de citotoxicidad se basa en la idea de que cuando se afectan funciones celulares básicas, que son comunes a todas las células, la determinación del daño celular es una medida aproximada de la toxicidad general del compuesto (Konigheim, 2012). De esta manera, es posible cuantificar la viabilidad, mediante la utilización de diferentes técnicas, que en su mayoría son colorimétricas. Estos ensayos miden la viabilidad celular mediante la captación o formación de un colorante por parte de alguna organela celular que permanece funcional, luego de la exposición a un determinado agente/compuesto, por lo cual, la pérdida de viabilidad indica efectos intracelulares nocivos por parte del compuesto, que suceden con anterioridad a cualquier daño que pueda producir en la membrana celular (Konigheim, 2012).

Por otro lado, se encuentran los ensayos de genotoxicidad, que estudian los efectos tóxicos que ejercen los agentes químicos, físicos y/o biológicos sobre el ADN y los procesos genéticos de las células y organismos vivos (Klaassen & Watkins, 2005). Un compuesto es considerado genotóxico si tiene afinidad para interactuar con el ADN e inducir daño genético a concentraciones que no son tóxicas o que están asociadas a un bajo grado de toxicidad (Martínez-González, 2006). Estos ensayos a corto plazo resultan de gran utilidad porque permiten detectar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, daño primario a la estructura del ADN, transformaciones celulares u otras afectaciones (Arencibia & Rosario, 2003).

Para la detección de daño genético se hace uso de los biomarcadores que son cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpretan como reflejo o indicador de la exposición a un agente tóxico; evalúan la magnitud de respuesta del organismo frente al mismo y en alguna medida cuantifican específicamente la exposición, el efecto biológico temprano y la susceptibilidad (Ojeda-Herrera, 2012).

Los antecedentes presentados, demuestran que el **AE** de *Tagetes minuta* L. posee amplias aplicaciones estudiadas tanto *in vivo* como *in vitro*, pero su toxicidad debe ser determinada para proveer seguridad a dichas aplicaciones.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Debido a la multiplicidad de usos que posee esta especie vegetal, al valor popular que presenta y a que no existen antecedentes de estudios científicos sobre su toxicidad, principalmente de las poblaciones de la provincia de Córdoba, se plantea la hipótesis de que los aceites esenciales (**AEs**) de *Tagetes minuta* Linn serían tóxicos a nivel celular y genético.

Objetivo General

Evaluar la toxicidad *in vitro* del **AE** de *Tagetes minuta* L. y los quimiotipos obtenidos, sobre las líneas celulares, Vero (mamífero no humano) y fibroblastos diploides (humanas) para valorar el potencial tóxico de esta especie nativa.

Objetivos Específicos

- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* en distintas concentraciones del **AE** de la población silvestre de *T. minuta* y los quimiotipos obtenidos de las poblaciones seleccionadas en células Vero y fibroblastos.
- Evaluar la genotoxicidad *in vitro* a través del ensayo de Micronúcleos y Fragmentación de ADN, en células Vero y fibroblastos expuestas a diferentes concentraciones de los **AEs** de *T. minuta* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material Vegetal y Aceites Esenciales

Los aceites esenciales (**AEs**) de *Tagetes minuta* utilizados en los experimentos de esta Tesina y su caracterización química son parte de una Tesis Doctoral (Massuh, 2014) realizada en el Grupo de Estudio de Hierbas Medicinales y Aromáticas (Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agropecuaria – Universidad Nacional de Córdoba). Las muestras de **AEs** fueron provistas al Laboratorio de Arbovirus y Arenavirus (Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella, Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba) en el marco de proyectos de colaboración.

Los **AEs** fueron extraídos de plantas de *T. minuta* provenientes de diferentes localidades de la provincia de Córdoba, a las cuales se les realizó un proceso de mejoramiento, selección y domesticación a partir del cual se diferenciaron 3 quimiotipos que fueron nombrados según el/los compuesto/s mayoritario/s: Dihidrotagetona (**DHT**), **OTLO** (Ocimenonas-Tagetonas-Limoneno-Ocimeno) y Ocimenona (**Ona**) (Massuh, 2014). Actualmente los quimiotipos están registrados como cultivares en el INASE (Instituto Nacional de Semillas, Res. N° 000430/2014). Para los estudios realizados en este trabajo se utilizaron los quimiotipos **DHT** y **Ona**, además del **AE** proveniente de la población silvestre.

El material vegetal utilizado para la obtención de los **AEs** fueron inflorescencias, hojas y tallos finos que fueron destilados en un aparato de tipo Clevenger modificado, con cámara de extracción separada (Figura 2) (Massuh, 2014).



Figura 2. Destiladores tipo Clevenger utilizados para la extracción del **AE** de *T. minuta*.

La composición química de los **AEs** se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en un equipo Claruss 600 de Perkin Elmer, con el programa TurboMass 5.4. Se obtuvieron 7 compuestos principales: Dihidrotagetona, Limoneno, Ocimeno, E-Tagetona Z-Tagetona, Z-Ocimenona y E-Ocimenona. La concentración de dichos compuestos se calculó de acuerdo a la integración del área cromatográfica. En su conjunto, constituyeron más del 85% de la composición del **AE**. Los principales compuestos identificados y la media de los porcentajes relativos con su error estándar correspondientes a los quimiotipos estudiados en esta Tesina, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Perfiles químicos de la población silvestre y de los quimiotipos de plantas cultivadas obtenidos de la Tesis Doctoral de Massuh (2014).

COMPONENTES	Quimiotipos – Plantas Cultivadas			Población Silvestre (*)
	DHT (%)*	OTLO (%)	Ona (%)*	
Limoneno	1.71 ± 0.10	4.57 ± 0.75	2.82 ± 0.26	1.95
Ocimeno	18.08 ± 1.27	14.72 ± 1.61	11.87 ± 1.13	42.38
Dihidrotagetona	30.34 ± 0.88	0.42 ± 0.09	0.24 ± 0.07	3.45
E-Tagetona	3.88 ± 1.91	4.13 ± 0.98	0.61 ± 0.10	3.75
Z-Tagetona	10.82 ± 2.03	3.07 ± 0.73	1.02 ± 0.10	1.14
Z-Ocimenona	4.45 ± 0.32	13.73 ± 1.23	10.80 ± 0.68	3.86
E-Ocimenona	30.73 ± 0.93	59.37 ± 1.90	72.64 ± 0.94	43.47

DHT: Dihidrotagetona; OTLO: Ocimenona-Tagetona-Limoneno-Ocimeno; Ona: Ocimenona

(*) Quimiotipos y AE de la población silvestre utilizados para los estudios en esta Tesina.

B. Ensayos biológicos

B.1. Líneas celulares

Se emplearon cultivos de dos líneas celulares: células Vero clon 81 (ATCC CCL-81, riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) con número cromosómico heteroploide, y fibroblastos (línea celular no establecida, proveniente de mucosa oral humana) con número cromosómico diploide (Figura 3). Ambas líneas celulares fueron mantenidas en estufa a 37°C (Sanyo, IncuSafe MCO 17 AC) con atmósfera húmeda conteniendo 5% CO₂.

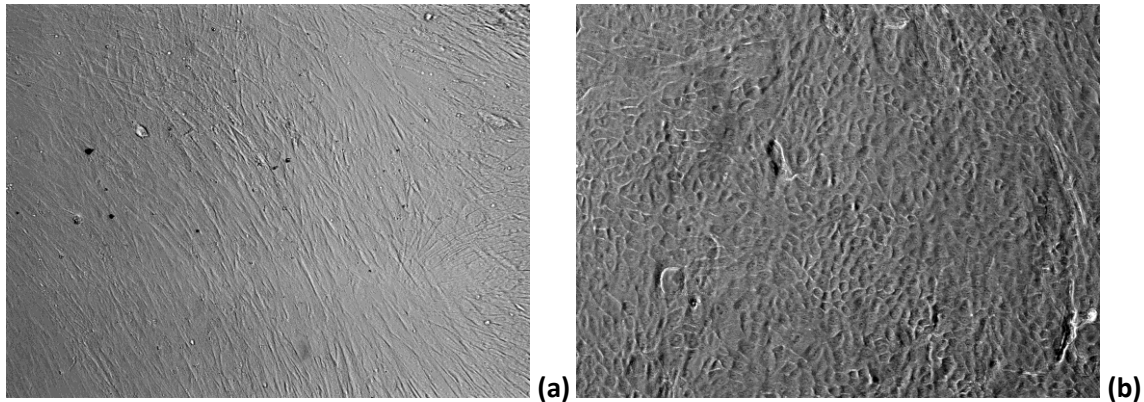


Figura 3. Líneas celulares (x200): Fibroblastos de mucosa oral humana (a); Células Vero clon 81 (ATCC CCL-81, riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) (b)

B.2. Medio de Crecimiento (**MC**)

Las líneas celulares se mantuvieron en Medio Esencial Mínimo (**MEM**) modificado por Dulbecco (**DMEM**) con aminoácidos no esenciales, suplementado con 10% de suero fetal bovino (**SFB**) (Natocor) para células Vero y 20% para fibroblastos, L-glutamina (3gr/L, Gibco) y sulfato de gentamicina (50 µg/ml) como antibiótico (**ATB**).

B.3. Medio de Mantenimiento (**MM**)

La misma formulación que el **DMEM**, pero suplementado con 2% de **SFB**.

C. Muestras para ensayos biológicos

De cada **AE** se preparó una solución stock de 1×10^5 ppm en dimetilsulfóxido (**DMSO**). La concentración de **DMSO** en las células, no superó el 1%, para que la toxicidad del solvente no afecte el resultado final. Los stocks fueron mantenidos a -20°C .

Para los ensayos biológicos, se prepararon diferentes diluciones a partir de los stocks utilizando **MM**.

D. Evaluación de la citotoxicidad

El ensayo de Captación de Rojo Neutro (**RN**) es uno de los ensayos colorimétricos para medir citotoxicidad más empleado. Proporciona una estimación cuantitativa del número de células viables en un cultivo, basándose en la capacidad de incorporar el **RN** como marcador supravital que poseen las células viables. Este colorante catiónico penetra las membranas celulares por difusión pasiva y se concentra en los lisosomas. Posteriormente, el colorante se extrae de las células utilizando una solución de etanol acidificado, y la absorbancia del colorante solubilizado se cuantifica mediante un espectrofotómetro. Cuando la célula muere o el gradiente de pH se reduce, el colorante no puede ser retenido. En consecuencia, la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables (Repetto *et al.*, 2008).

Este ensayo, en comparación con otras pruebas de viabilidad celular, cuenta con un procedimiento muy sensible y fácilmente cuantificable; es económico, presenta menos interferencias, y no utiliza reactivos inestables como se requiere para las pruebas de viabilidad utilizando sales de tetrazolio (**MTT**, **MTS**, **XTT**, etcétera) (Borenfreund *et al.*, 1988).

La cuantificación de la citotoxicidad, permite determinar el valor de concentración que provoca daño celular evidente al 50% de los cultivos tratados (concentración citotóxica media, **CC₅₀**). La obtención de este valor permite posteriormente emplear intervalos de concentración no-tóxicos o sub-tóxicos en los ensayos (Konigheim, 2012).

Para la realización del ensayo se siguió la metodología propuesta por Borenfreund & Puerner (1985), realizando algunas modificaciones al protocolo.

Se preparó una suspensión celular con 2×10^5 cel/ml, células Vero o fibroblastos, a partir de la cual se sembró 0,1 ml por pocillo en una placa de 96 pocillos. A las 24 h se eliminó el medio de crecimiento (**MC**) de la placa y se le agregó medio de mantenimiento (**MM**) con 23 concentraciones diferentes, de cada **AE**, comprendidas en un rango de 0,4 ppm a 80 ppm (n=3); y se dejaron cultivos de células con **MM** solo, como control celular (**CCe**).

Al cabo de 72 h de incubación, el medio fue removido y se agregó una solución de **RN** (33 μ l/ml de **MEM**), incubándose a 37°C con atmósfera húmeda conteniendo 5% CO₂ durante 3 h. El colorante contenido en los lisosomas y endosomas de las células viables, se extrajo con una solución de agua: etanol: ácido acético (50:49:1), durante 15 min en agitación constante. Posteriormente, se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas BioTek.

Los porcentajes de viabilidad celular se determinaron en base a los valores obtenidos en los **CCe**, tomados como 100 % de viabilidad y utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición (\%I)} = [(D.O._{(t)} / D.O._{(c)}) \times 100]$$

Dónde:

- **D.O._(t)**, densidad óptica del cultivo tratado.
- **D.O._(c)**, densidad óptica del cultivo control.

A partir de los valores obtenidos con esta fórmula, se confeccionaron curvas de viabilidad, en las cuales se graficaron las concentraciones (ppm) vs. porcentaje de viabilidad celular (**%VC**). A partir de estos gráficos se calcularon las **CC₅₀**, la Máxima Concentración No Citotóxica (**MCNC**) o concentración citotóxica 10 (**CC₁₀**), la concentración subtóxica o concentración citotóxica 20 (**CC₂₀**) y la concentración citotóxica 80 (**CC₈₀**) para cada **AE**.

E. Testigos de citotoxicidad

Se utilizaron como referencia, el **AE** de *Minthostachys verticillata* (Peperina) rico en Pulegona y (R)-(+)-Pulegone (SIGMA-ALDRICH) dado que existe bibliografía donde se demuestra que la Pulegona es toxico tanto *in vivo* como *in vitro* (Gordon & Khojasteh, 2015; Mendanha *et al.*, 2013; Romero Jimenez, 2013; Escobar *et al.*, 2012; NTP, 2011; Zhou *et al.*, 2007).

Las curvas de viabilidad de los testigos se realizaron con concentraciones de 8 a

1000 ppm de cada.

F. Ensayos de Genotoxicidad

F.1. Ensayo de Micronúcleos

Los micronúcleos (**MN**) son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, que se corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a un agente genotóxico. Existen factores capaces de influir o modificar el número de **MN** presentes en una célula, por ejemplo la exposición diaria a agentes genotóxicos (Zalacain *et al.*, 2005).

El Test de Micronúcleos es un indicador indirecto del daño cromosómico que se origina durante la división celular, tanto por fragmentos acéntricos (evento clastogénico) o por cromátidas enteras o cromosomas rezagados (evento aneugénico) que no han sido incorporados en los núcleos hijos al momento de la citocinesis y que requieren de una división celular para expresarse (Nikoloff, 2014).

El ensayo citogenético para la detección de **MN** (CBMN: cytokinesis-block micronucleus) se basa en la utilización de Citocalasina B (droga aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum*), que es capaz de impedir la citocinesis celular. Inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis al imposibilitar la creación del anillo contráctil, constituido por microfilamentos de actina y miosina, necesarios para la partición celular en telofase mitótica. Esta molécula no afecta a las fibras del huso ni a la división del núcleo, por lo que se originan células binucleadas monodividas (Zalacain *et al.*, 2005).

Los **MN** son contados solo en las células binucleadas, lo cual permite realizar comparaciones confiables de daño cromosómico entre poblaciones celulares que difieren en la cinética de la división nuclear (Fenech & Morley, 1985).

Gracias a su versatilidad, este bioensayo puede llevarse a cabo en diferentes modelos tanto animales como vegetales, así como en distintos tipos de células, dependiendo del modo de acción del agente a caracterizar y del objeto en estudio (Mudry & Carballo, 2006). Debido a su simplicidad, constituye una de las metodologías más empleadas para la identificación de alteraciones en el material genético inducidas por agentes genotóxicos, utilizando diferentes matrices bióticas. Esta técnica está validada internacionalmente y es accesible tecnológicamente (Fenech, 2007; Zalacain *et al.*, 2005).

La realización del ensayo de **MN** se llevó a cabo de acuerdo a Ouanes *et al.*, (2003) con modificaciones, y siguiendo las recomendaciones del 2º Taller Internacional sobre Pruebas de Genotoxicidad (Ouanes *et al.*, 2003; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

Se utilizó, de cada tipo celular, una suspensión de $1,5 \times 10^4$ cel/ml, las cuales fueron crecidas en placas de 24 pocillos. A las 24h se eliminó el **MC** y se le agregó, por triplicado, **MM** conteniendo la **MCNC (CC₁₀)** de cada **AE**. Se dejaron cultivos de células con **MM** solo como control negativo y se utilizó Colchicina (0,3 μ M) como control positivo. Éste es un fármaco natural, obtenido de *Colchicum autumnale* y *Gloriosa superba*, que detiene o inhibe la división celular, actuando sobre las tubulinas, produciendo así la despolarización de los microtúbulos (Bhattacharyya *et al.*, 2008).

Luego de 24 h de tratamiento, el medio fue removido y se agregó, a todos los pocillos, 500 μ l de Citocalasina B (4,5 μ g/ml). Después de 18 h se sometió a las células a una solución salina de fosfatos PBS 10x : Agua destilada, 1:1 por 15 min. Posteriormente, las células se fijaron con una solución de metanol: ácido acético: formaldehído (3:1:0,75) durante 10 min a temperatura ambiente.

Para contabilizar el número de micronúcleos se tiñó con DAPI y se observó en microscopio invertido de fluorescencia Olympus Modelo IX81.

Para la identificación de las células binucleadas, se siguieron los criterios propuestos por Fenech (2007): “una célula binucleada debe presentar intacta la membrana nuclear y citoplasmática; los dos núcleos no deben solaparse, tienen que poseer igual tamaño, forma, patrón e intensidad de tinción”.

Para el análisis de los **MN** también se siguieron los criterios adoptados por Fenech (2007). De acuerdo a este autor, los **MN** deben presentar: diámetro menor a 1/3 respecto al núcleo principal, no ser refractarios, intensidad de tinción similar a los núcleos de la célula binucleada, no estar conectados con ninguno de los núcleos principales, pero puede tocarlos sin solaparse.

F.2. Ensayo de Fragmentación de ADN mediante Electroforesis en Gel de Agarosa

La electroforesis en gel de agarosa (**EG**) permite evaluar distintos niveles de daño ejercido en la molécula de ADN. La técnica consiste en lisar las células para liberar al ADN del sistema de endomembranas. Luego, las mismas son embebidas en un gel de agarosa y sometidas a un campo electroforético. Si hay daño, se formarán fragmentos de ADN capaces de migrar hacia el ánodo del campo eléctrico al cual se encuentra sometido (Singh *et al.*, 1988).

El ensayo es sencillo, de bajo costo y reproducible, permitiendo obtener resultados de manera rápida.

Para la realización del ensayo se utilizó una suspensión de 1×10^6 cel/ml (células Vero y fibroblastos), que fue sembrada en placas de 12 pocillos. A las 24 h se eliminó el **MC** y se le agregó, por triplicado, **MM** conteniendo la **MCNC (CC₁₀)** de cada **AE** obtenida en el ensayo de citotoxicidad. Se dejaron cultivos de células solo con **MM** como control negativo y se utilizó Peróxido de hidrógeno (100 μ M) como control positivo, ya que es un compuesto químico oxidante, muy utilizado como control positivo en estudios de genotoxicidad debido a que produce alteraciones sobre el material genético, expresándose como rupturas de simple y doble cadena (Vergara-García, 2010).

A las 24 h, para realizar la extracción del ADN, las células de cada pocillo fueron levantadas mediante la utilización de un medio enzimático. La extracción se llevó a cabo utilizando el kit PURO-Genomic DNA (PB-L Productos Bio-Lógicos) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Finalmente, las muestras se colocaron en un gel de agarosa al 3% junto con el marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb, y se sometieron a una corrida electroforética a 90 V por 60 min. Los geles se tiñeron con GelRed™ 10000x (0,01 µl/ml) y fueron observados en Transiluminador UVP BioDoc-IT Imaging System.

Debido a que el **AE** de *Minthostachys verticillata* (Peperina) rico en Pulegona y (R)-(+)-Pulegone (SIGMA-ALDRICH) se utilizaron en los ensayos de citotoxicidad como testigos, también se incluyeron en las dos pruebas de genotoxicidad, utilizándose para las mismas las **MCNC (CC₁₀)** obtenidas de los análisis citotóxicos correspondientes.

G. Análisis Estadístico

Los resultados de citotoxicidad obtenidos fueron sometidos a Análisis de Regresión Logística ($R^2 > 0.9$) a partir de las curvas de viabilidad celular Vs. concentración, utilizando el programa estadístico OriginPro 8.6 y la ecuación de Dosis Respuesta:

$$y = A_1 + [(A_2 - A_1) / (1 + 10^{(\log x_0 - x) * p})]$$

Dónde:

A₁: asíntota inferior

A₂: asíntota superior

x: variable independiente

x₀: punto de inflexión

p: pendiente

A partir de las curvas y del análisis, se obtuvieron las Concentraciones Citotóxicas: **CC₈₀, CC₅₀, CC₂₀, CC₁₀**.

A su vez, se realizó un Diseño de bloques completos al azar seguido de prueba de Tuckey ($p < 0,05$) para la comparación de medias a partir de la **CC₅₀** de cada **AE** (InfoStat, 2013). A fin de cumplir con los supuestos del modelo, los datos (**CC₅₀**) debieron ser

transformados a raíz cuadrada. La homogeneidad de la varianza entre grupos se evaluó con la prueba de Levene y la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) (InfoStat, 2013).

Para el ensayo de **MN** se evaluaron 1000 células binucleadas con **MN** asociados, obteniéndose la frecuencia de **MN**. A estos resultados también se les aplicó Diseño de bloques completos al azar seguido de prueba de Tuckey ($p < 0,05$) para la comparación de medias, para determinar la significancia de las diferencias encontradas en los valores de frecuencia de **MN** entre cultivos controles y los expuestos a los **AEs**. Para cumplir con los supuestos del modelo, los datos fueron transformados a Logaritmo en base 10 (Log_{10}) de la frecuencia de **MN**. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza entre grupos se evaluaron utilizando las mismas pruebas que para los ensayos de citotoxicidad.

El análisis de fragmentación de ADN fue comparativo entre los quimiotipos estudiados y los controles (negativos y positivos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Evaluación de la citotoxicidad

Analizando las curvas dosis respuesta (Figura 4), podemos decir que la disminución de la viabilidad celular fue directamente proporcional al aumento de la concentración de los aceites esenciales (**AEs**) evaluados, para las dos líneas celulares (células Vero y fibroblastos) (Figura 4), observándose que no hay grandes diferencias en cuanto a la citotoxicidad entre ambas.

En el Anexo 1 (pág. 66), se observan las curvas de dosis respuesta del **AE** de Peperina y de (R)-(+)-Pulegone utilizados como testigos positivos. En las mismas podemos observar que tampoco hay diferencias de citotoxicidad entre las dos líneas celulares estudiadas.

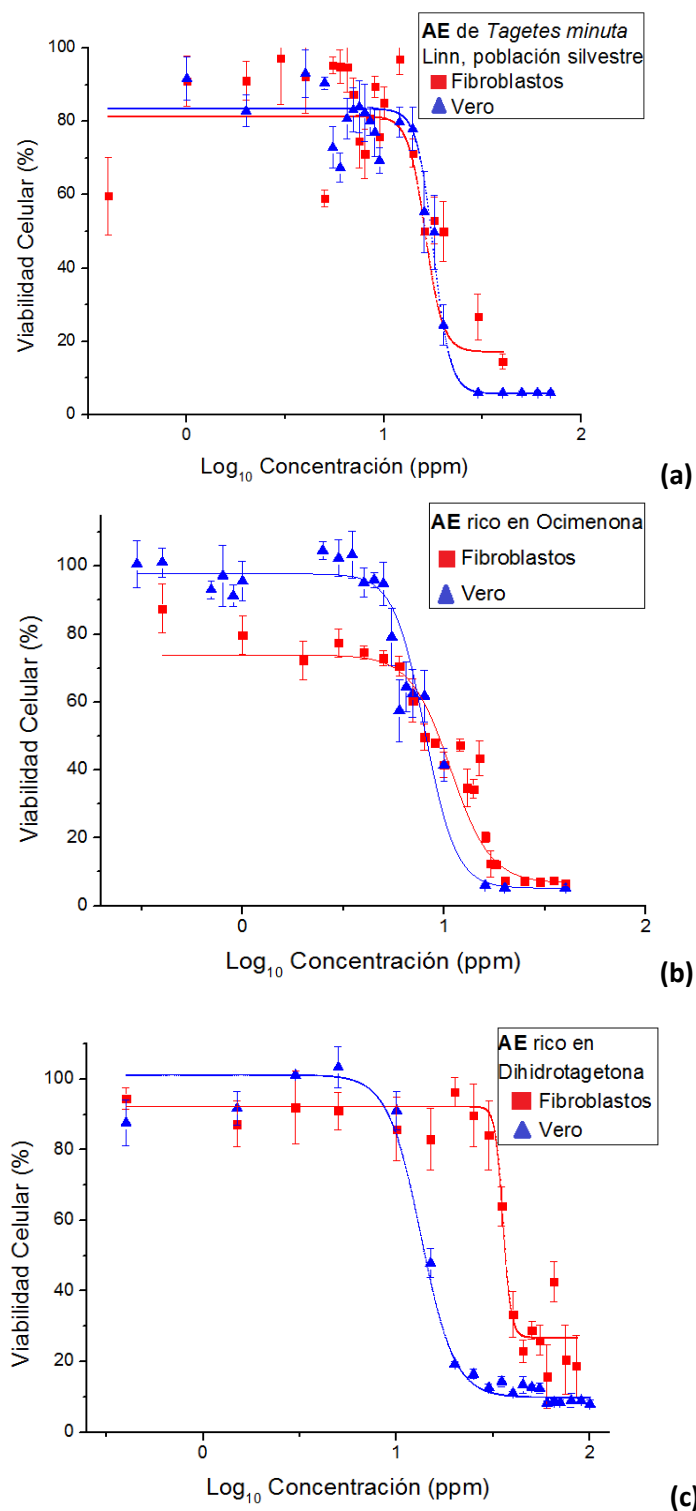


Figura 4. Curvas dosis respuesta (porcentaje de viabilidad celular vs. concentración) de cada aceite esencial: Población silvestre (a); Ocimenona (b); Dihidrotagetona (c).

El análisis de regresión lineal para todas las curvas dio un valor de $R^2 > 0,9$.

Tanto los quimiotipos de las poblaciones seleccionadas (Dihidrotagetona, **DHT** y Ocimenona, **Ona**), como el **AE** de la población silvestre presentaron altos valores de toxicidad para las dos líneas celulares, comparados con los obtenidos en los testigos. En la tabla 3, se muestran los valores de concentraciones citotóxicas, para cada **AE** en cada tipo de célula. En la misma podemos destacar que el quimiotipo **Ona** resultó ser el más citotóxico, con una **CC₅₀** de $8,03 \pm 0,37$ ppm para células Vero y de $10,77 \pm 0,61$ ppm para fibroblastos. El quimiotipo **DHT** mostró valores de **CC₅₀** de $13,39 \pm 0,98$ ppm para las células Vero y $35,42 \pm 0,67$ ppm para los fibroblastos, en tanto que los valores de **CC₅₀** obtenidos para la población silvestre en células Vero fueron de **CC₅₀** $17,74 \pm 0,92$ ppm, y $16,15 \pm 0,52$ ppm en fibroblastos (Tabla 3). Las diferencias obtenidas en los **AEs** de suico no fueron significativas ($p < 0,05$) (R^2 0,9). En la misma tabla, se muestran los valores de citotoxicidad obtenidos para los respectivos testigos: para el **AE** de Peperina, la **CC₅₀** fue de $52,99 \pm 1,60$ para células Vero y $74,11 \pm 2,01$ para fibroblastos, y $456,97 \pm 2,98$ en células Vero y $465,12 \pm 6,00$ en fibroblastos, en (R)-(+)-Pulegone.

Tabla 3. Valores de Citotoxicidad de cada aceite esencial sobre células Vero y fibroblastos, obtenidos por el método de captación de RN.

Aceite Esencial	Tipo celular	Concentración Citotóxica (CC) (ppm) ± EE ^a				
		CC ₈₀ ^b	CC ₅₀ ^c	CC ₂₀ ^d	CC ₁₀ ^e	
<i>Tagetes minuta</i> (población silvestre)	Vero	20,34 ± 1,16	17,74 ± 0,92	15,47 ± 1,20	14,28 ± 1,41	
	Fibroblastos	18,61 ± 2,10	16,15 ± 0,51	14,02 ± 1,33	12,91 ± 1,95	
Ocimenona	Vero	10,26 ± 0,48	8,03 ± 0,37	6,28 ± 0,37	5,44 ± 0,41	
	Fibroblastos	14,80 ± 0,80	10,77 ± 0,61	7,85 ± 0,70	6,52 ± 0,74	
Dihidrotagetona	Vero	17,63 ± 0,62	13,39 ± 0,98	10,17 ± 1,25	8,66 ± 1,32	
	Fibroblastos	37,84 ± 1,77	35,42 ± 0,67	33,16 ± 1,29	31,91 ± 1,90	
<i>Minthostachys verticillata</i> (rico en Pulegona)	Vero	70,44 ± 3,78	52,99 ± 1,60	39,86 ± 0,95	33,75 ± 1,14	
	Fibroblastos	103,05 ± 5,36	74,11 ± 2,01	53,30 ± 2,52	43,95 ± 3,02	
(R)-(+)-Pulegone (SIGMA)	Vero	480,66 ± 5,11	456,97 ± 2,98	434,45 ± 4,27	421,79 ± 5,76	
	Fibroblastos	490,49 ± 12,05	465,12 ± 6,00	441,07 ± 6,24	427,57 ± 8,94	

^aEE: Error Estándar.

^bCC₈₀: Concentración Citotóxica 80; ^cCC₅₀: Concentración Citotóxica 50; ^dCC₂₀: Concentración Subtóxica (o Concentración Citotóxica 20); ^eCC₁₀: Máxima Concentración No Tóxica (o Concentración Citotóxica 10).

Basados en que el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos estipula que un valor de $CC_{50} < 30$ ppm es citotóxico (Zapata *et al.*, 2009), podemos decir que los **AEs** de *T. minuta* aquí estudiados resultan ser tóxicos.

Al comparar los valores de citotoxicidad obtenidos, con otros trabajos científicos que utilizaron el **AE** de suico, se observó que éstos obtuvieron valores de citotoxicidad mayores. Para Shirazi *et al.* (2014) los valores de CC_{50} fueron de 75 ± 5 y 70 ± 4 ppm para células de cáncer nasofangio (KB) y carcinoma hepatocelular (Hep G2), respectivamente; y en el trabajo de Ali *et al.* (2014), se encontró una actividad citotóxica moderada con valor de CC_{50} de $54,7 \pm 6,2$ ppm sobre células MCF-7 de tumor de mama. En todos los casos la evaluación de la citotoxicidad se llevó a cabo mediante la utilización del método colorimétrico de reducción del **MTT** (Método de reducción del Bromuro de 3((4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico). Los **AEs** que se probaron en esas dos investigaciones, también se obtuvieron por hidrodestilación y el análisis químico de los mismos, reveló la presencia de dihidrotagetona, ocimeno, tagetona, E- y Z-ocimenona y limoneno como sus principales componentes, al igual que los **AEs** estudiados en el presente trabajo. Por lo cual, indicaría que esos metabolitos podrían ser los responsables de la citotoxicidad observada, en estos estudios como en el nuestro.

Aunque la metodología utilizada por los autores anteriormente citados para medir citotoxicidad, fue el ensayo de reducción del **MTT**, los resultados obtenidos son comparables, ya que ambas metodologías (**MTT** y **RN**) poseen correlación para la mayoría de los productos químicos (Chiba *et al.*, 1998; Borenfreund *et al.*, 1988).

Como ya se mencionó, el ensayo de **RN**, es un método colorimétrico cuantitativo que se basa en la absorción de un colorante supravital que se acumula en los lisosomas de células viables no lesionadas (Borenfreund & Puerner, 1985). En tanto, el ensayo de **MTT** se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3((4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar el estado funcional de las mitocondrias en las células tratadas (Mosmann, 1983).

Las diferencias en los resultados de citotoxicidad obtenidos en esta tesina y los presentados por otros autores, podrían deberse a variaciones en la composición química de cada **AE**. Aunque presentaron los mismos componentes, los **AEs** se obtuvieron de distintas áreas geográficas, donde las condiciones climáticas, formación y estado nutricional del suelo son diferentes, factores que se sabe producen variación en las proporciones de cada componente (Bagetta *et al.*, 2015). Además, cabe destacarse que los **AEs** tienen que ser considerados como sustancias que actúan como un todo, con fenómenos sinérgicos/antagónicos de sus constituyentes (Escobar *et al.*, 2012), y no hay que dejar de considerar que los sistemas celulares utilizados fueron diferentes.

Por otra parte, para poder determinar la toxicidad de los **AEs** evaluados en este trabajo, se compararon con la citotoxicidad de Pulegona, compuesto reconocido por poseer efectos hemolíticos y citotóxicos sobre fibroblastos humanos y células promielocíticas humanas (HL-60) (Mendanha *et al.*, 2013; Romero Jimenez, 2013), en ratas es hepatotóxico, abortivo, produce daños renales y es carcinógeno (Gordon & Khojasteh, 2015; NTP, 2011; Zhou *et al.*, 2007); y presenta ciertas limitaciones en su comercialización, ya que es considerado como nocivo en caso de ingesta (Decreto 225/012, Reglamento Técnico MERCOSUR sobre Aditivos Aromatizantes/Saborizantes-MERCOSUR/GMC/RES. N° 10/06-; Ficha de datos de seguridad según 1907/2006/CE, Artículo 31). Sorprendentemente a lo que se esperaba, los valores de **CC₅₀** de los **AEs** de *T. minuta* resultaron ser más tóxicos que el **AE** rico en Pulegona obtenido a partir de *Minthostachys verticillata* (Peperina) y que la Pulegona pura (Tabla 3).

Nuestros resultados, estarían en concordancia con los obtenidos por Escobar *et al.* (2012), ya que tampoco resultaron ser tóxicos. Los mismos, demostraron que el **AE** de *M. verticillata*, rico en Pulegona (60,5% v/v) no mostró citotoxicidad mediante el ensayo de captación de **RN** en un rango de concentraciones de 10 a 1000 ppm, con 48 h de exposición al **AE**. De la misma manera, Cariddi *et al.* (2011) observaron mediante el ensayo de reducción de **MTT** que el **AE** de esta misma especie, con 63,4% de Pulegona, no indujo daño temprano en células mononucleares de sangre periférica (**PBMC**), a excepción

de la concentración más alta (6×10^3 ppm), obteniendo el mismo resultado con el **AE** comercial (R)-(+)-Pulegone (SIGMA-ALDRICH).

Las diferencias de toxicidad demostrada en este trabajo, entre los **AEs** de *T. minuta* y los ricos en Pulegona, principalmente con (R)-(+)-Pulegone, causan alerta debido a que el **AE** de suico sería muy citotóxico, y a pesar de su amplio uso, no existen informes que adviertan sobre ello. Así mismo, se deberían realizar más pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* que ratifiquen nuestros resultados.

Además, como ya se mencionó, debe considerarse que la variabilidad en la composición química que presenta cada **AE**, tanto en los componentes como en las cantidades en las que se encuentran, otorga diferencias en las bioactividades de dicho **AE**. Los principales compuestos que presentan los **AEs** aquí estudiados, **Ona** y **DHT**, fueron estudiados por otros autores, quienes observaron que **Ona** es el que posee mayores bioactividades, entre las que podemos destacar actividad larvicida contra *Stegomyia aegypti* L. (Massuh, 2014); insecticida sobre adultos de *Sitophilus zeamais* M. (Herrera *et al.*, 2014); e inhibidor sobre el crecimiento de la raíz de plántulas de *Zea mays* L. (Scrivanti *et al.*, 2003).

Por otra parte, Massuh (2014) observó que cuando el compuesto **Ona** está presente en el **AE** de *T. minuta* silvestre, la actividad larvicida contra *Stegomyia aegypti* aumentó significativamente. En este mismo trabajo, la dosis letal 50 (**DL**₅₀) del quimiotipo rico en **Ona** no tuvo diferencias significativas con el **AE** de la población silvestre (con 43,47% de E-ocimenona).

El **AE** rico en **DHT** (30,34%) tuvo menor actividad larvicida que **Ona** y la población silvestre. Esta diferencia no fue tan marcada, debido a que este quimiotipo presenta también un alto porcentaje de **Ona** (30,73%).

Nuestros resultados estarían en concordancia con Massuh (2014), ya que los valores de citotoxicidad del quimiotipo **Ona** fueron mayores que el quimiotipo **DHT** (que posee similar porcentaje de **DHT** y E-ocimenona, tabla 2). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($p < 0,05$).

A su vez, se ha informado a **DHT**, como un nematicida contra huevos y juveniles de *Meloidogyne incognita* (Adekunle *et al.*, 2007); y como un compuesto antiviral contra *Carnation ring spot* (CaRSV) y *Carnation veinmottle* (CaVMV) (Singh *et al.*, 2002).

B. Evaluación de Genotoxicidad

Los dos ensayos (Ensayo de Micronúcleos, **MN** y Fragmentación de ADN) fueron utilizados para evaluar si los **AEs** de *T. minuta* poseen actividad genotóxica *in vitro* sobre las líneas celulares evaluadas.

La comparación de medias de la frecuencia de **MN**, luego de 24 h de exposición al **AE** correspondiente, demostró que tanto los quimiotipos de las poblaciones mejoradas como la población silvestre, presentaron baja frecuencia de **MN** en comparación con el control positivo (Colchicina), tanto en células Vero como en fibroblastos. No se encontraron diferencias significativas de los **AEs** respecto al control negativo (control celular), pero sí con el control positivo ($p < 0,05$, prueba de Tuckey) ($R^2 > 0,8$), en ambos tipos de células (Figura 5). En la Figura 6 se observan células binucleadas con **MN** asociados, obtenidas de los ensayos correspondientes.

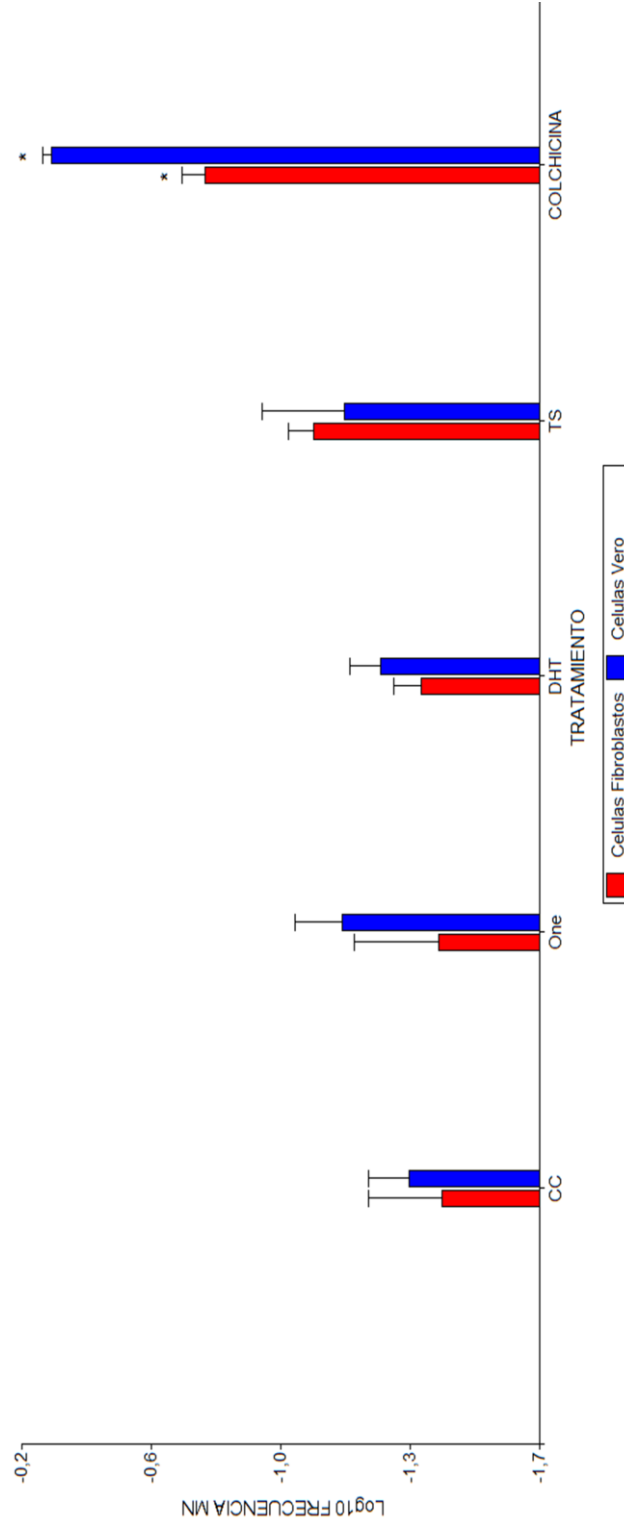


Figura 5. Frecuencia de Micronúcleos de cada Aceite Esencial. * $p < 0,05$.

CC: Control de célula; DHT: Dihidrotagetona; One: Ocimenona; TS: *Tagetes minuta* silvestre.

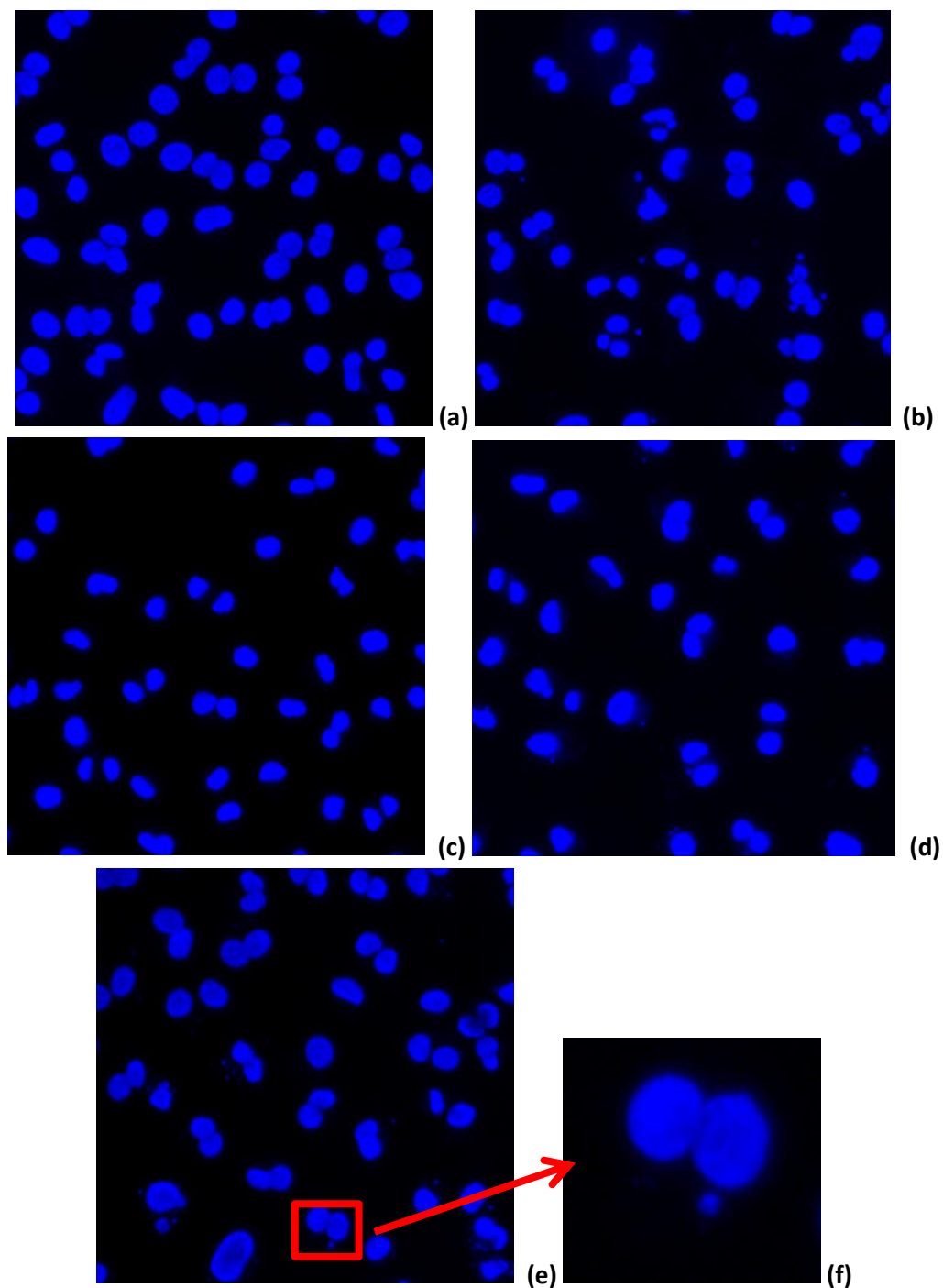


Figura 6. Células Vero binucleadas y Fibroblastos binucleados, y micronúcleos teñidos con DAPI, observadas a través de microscopio invertido de fluorescencia (400x): Control de células Fibroblastos (a); Colchicina ($0,3 \mu\text{M}$) en fibroblastos (b); DHT en Fibroblastos (c); *Tagetes silvestres* en células Vero (d); *Ona* en células Vero (e). Ampliación de un campo con célula binucleada con micronúcleo asociado (f).

Al analizar la fragmentación del ADN luego de exponer los dos modelos celulares a los **AEs** de *T. minuta* por 24 h, se observó que los mismos no poseen efectos genotóxicos. El patrón electroforético de ADN tratado tanto con los quimiotipos **Ona** y **DHT** como con el **AE** de la población silvestre, presentaron una banda al igual que el control celular, a diferencia del control positivo (Peróxido de Hidrógeno a 100 μM) en el cual se observaron dos bandas (Figura 7).

Estos resultados, junto con la evaluación de los micronúcleos, indicarían que los **AEs** de suico no generan/provocan *in vitro*, en el sistema biológico utilizado, daño evidente a nivel de la cadena de ADN.

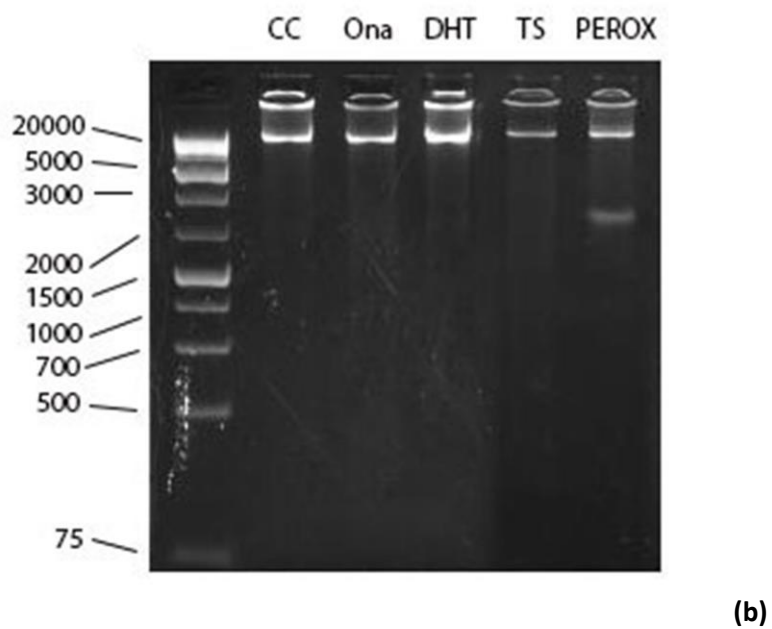
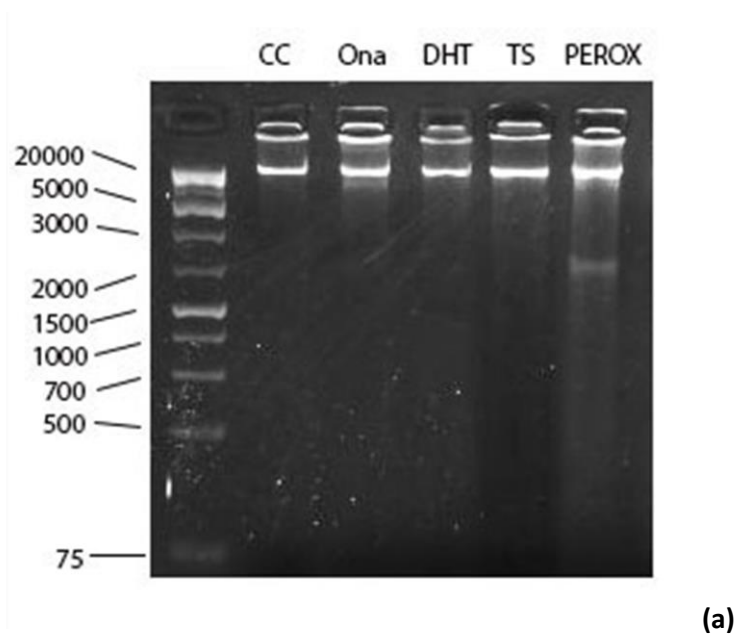


Figura 7. Fragmentación de ADN de cada aceite esencial en células Vero (a) y fibroblastos (b), en un gel de agarosa 3%.

CC: Control de célula; Ona: Ocimenona; DHT: Dihidrotagetona; TS: *Tagetes minuta* silvestre; PEROX: Peróxido de Hidrógeno 100 μ M (control positivo).

Estos resultados constituyen el primer reporte de evaluación de genotoxicidad de **AEs** de *T. minuta*, en el cual se demuestra que los mismos no poseen efecto genotóxico *in vitro*.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para los **AEs** de Peperina y Pulegona pura, pudimos observar que no hay diferencias significativas, resultando que tampoco poseen daño evidente en el ADN (Anexo 2, página 68). Estos resultados concuerdan con Escobar *et al.* (2012), quienes demostraron que el **AE** de *Minthostachys verticillata* (Peperina), con un 60,5% v/v de Pulegona, no posee daño genotóxico *in vitro* e *in vivo*, en un rango de concentraciones de 10 a 1000 ppm.

Además, nuestros resultados concuerdan con otras investigaciones en las cuales evaluaron diferentes **AEs** en los cuales también se demostró la ausencia de efecto genotóxico *in vitro*, por ejemplo en los **AEs** de *Pistacia lentiscus* (L.) var. *Chia* (Duham) (Anacardiaceae) (Vlastos *et al.*, 2015); *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) (Pereira *et al.*, 2014); Carvacrol (5-isopropyl-2-methyl phenol) compuesto aislado de *Origanum hirtum* y **AE** de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (Melušová *et al.*, 2014).

Sin embargo, otros autores utilizando la metodología de **MN** manifiestan que algunos **AEs** sí son capaces de producir genotoxicidad en rangos de concentración de 0,10 a 1000 ppm. Por ejemplo, el **AE** de *Urtica dioica* (Urticaceae) en linfocitos humanos (Gül *et al.*, 2012); α -pineno compuesto de **AEs** de *Pinus* sp y otras especies vegetales cítricas y aromáticas, en células de Hámster chino (Catanzaro *et al.*, 2012); el **AE** de Lavanda (*Lavandula angustifolia* Miller, Lamiaceae), junto con uno de sus principales componentes, Acetato de linalilo en linfocitos periféricos humanos (Di Sotto *et al.*, 2011); el **AE** de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae) en fibroblastos de pulmón de Hámster chino (Péres *et al.*, 2009); el **AE** de *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) rico en Timoquinona en hepatocitos aislados de ratas (Khader *et al.*, 2009); y Timol, principal compuesto del **AE** de *Thymus vulgaris* y *Thymus braspicata* (Lamiaceae) en glóbulos rojos (Buyukleyla & Rencuzogullari, 2009), entre otros.

Estos resultados muestran la variación, en cuanto a las bioactividades, que existe entre **AEs** y que el daño genotóxico que pueden causar depende de la composición que

posean y de la concentración ensayada. Particularmente, los **AEs** de suico obtenidos tanto a partir de plantas silvestres como de las mejoradas, seleccionadas y domesticadas, no presentan daño a nivel de la cadena de ADN, ni durante la división celular, en concentraciones que no producen citotoxicidad *in vitro* en las líneas celulares Vero y fibroblastos.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta tesina sugieren, que los **AEs** de *T. minuta* poseen alta citotoxicidad *in vitro* sobre líneas de células de mamíferos (humanas y no humanas) debido principalmente a la presencia del compuesto Ocimenona.

El hecho que resultaran altamente citotóxicos, incluso más que el **AE** rico en Pulegona de *Minthostachys verticillata* (aproximadamente 6 veces más tóxico) y (R)-(+)-Pulegone (SIGMA-ALDRICH) (aproximadamente 57 veces más tóxico), resulta alarmante debido a los múltiples usos tradicionales que poseen los **AEs** de suico y a la poca o nula información que hay en relación a su toxicidad. Es por ello que, estos resultados constituyen un gran aporte en este sentido, y sientan la base para futuras investigaciones sobre otras potenciales bioactividades, dado que está ampliamente demostrado que regulando la dosis de un principio activo toxico, se puede producir un efecto beneficioso. A esto se le suma, el hecho de tener como respaldo la ausencia de genotoxicidad demostrada, en este trabajo.

PROYECCIONES

Estos resultados nos motivan a:

- ✓ Evaluar la citotoxicidad de los **AEs** de *T. minuta* en otras líneas celulares.
- ✓ Probar si existe genotoxicidad en los **AEs** ensayados en concentraciones más citotóxicas (**CC₈₀**, **CC₅₀**, **CC₂₀**), utilizando el Ensayo de Micronúcleos y Fragmentación de ADN, para proveer de mayor seguridad ante la posible utilización de los **AEs** a mayores concentraciones que las estudiadas.
- ✓ Realizar ensayos que complementen nuestros estudios sobre toxicidad *in vitro*, como estudios sobre mutaciones directas o revertidas, y apoptosis, de fototoxicidad e irritación dérmica.
- ✓ Evaluar si los **AEs** de *T. minuta*, y en especial el quimiotipo **Ona**, poseen propiedades antivirales contra virus de interés sanitario, como por ejemplo los virus Dengue, Encefalitis de St. Louis, Junín, Herpes Simplex, entre otros, para continuar la línea de estudios que lleva acabo el Laboratorio de Arbovirus.
- ✓ Garantizar el uso de los **AEs** estudiados, en las concentraciones **CC₁₀** (máxima concentración no citotóxica), ya que no poseen daño genotóxico evidente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, A. M., Khan, M. A., Ahmad, M., Qureshi, R., Arshad, M., Jahan, S., Zafar, M. & Sultana, S. (2010). Ethnobotanical study of wound healing herbs among the tribal communities in Northern Himalaya Ranges District Abbottabad, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 6, 3747-3753.
- Adekunle, O. K., Acharya, R., & Singh, B. (2007). Toxicity of pure compounds isolated from *Tagetes minuta* oil to *Meloidogyne incognita*. *Australasian Plant Disease Notes*, 2(1), 101-104.
- Ali, N. A., Sharopov, F. S., Al-Kaf, A. G., Hill, G. M., Arnold, N., Al-Sokari, S. S., Setzerc. W. N. & Wessjohann, L. (2014). Composition of essential oil from *Tagetes minuta* and its cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Communications*, 9(2), 265-268.
- Alonso, J (2004). *Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos*. 1ª Edición, Editorial Corpus Libros, Rosario, Argentina.
- Amat, A. G. (1983). Pharmacological research for major taxons of Bonaerenses Compositae. *Acta Farmacéutica Bonaerenses*, 2, 23-36.
- Andreotti, R., Garcia, M. V., Cunha, R. C., & Barros, J. C. (2013). Protective action of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial. *Veterinary Parasitology*, 197(1), 341-345.
- Anton, A. M. & Zuloaga, F. O. (2016). Página web: Flora Argentina, Plantas Vasculares de la República Argentina. Recuperado de: <http://www.floraargentina.edu.ar>. Revisada: 18/11/2016.
- Arencibia, D. & Rosario, I. (2003). Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro. *Revista de Tecnología en Línea*, 20, 18.
- Arencibia, D. F., Rosario, L. A., & Curveco, D. L. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de Toxicología*, 40-52.
- Arora, K., Batish, D. R., Singh, H. P., & Kohli, R. K. (2015). Allelopathic Potential of Essential Oil from Wild Marigold (*Tagetes minuta* L.) Against Some Invasive Weeds. *Journal of Environmental and Agricultural Sciences*, 3, 56-60.
- Bagetta, G., Cosentino, M., & Sakurada, T. (Eds.). (2015). *Aromatherapy: Basic Mechanisms and Evidence Based Clinical Use* (Vol. 2). CRC Press.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.

- Baldeón Ordóñez, X. D. R. (2011). Tesis de Grado: Actividad Insecticida de los Aceites Esenciales de *Tagetes minuta*, *Tagetes terniflora* y *Tagetes zipaquirensis* sobre *Premnotrypes vorax*.
- Ball Coelho, B., Bruin, A. J., Roy, R. C., & Riga, E. (2003). Forage pearl millet and marigold as rotation crops for biological control of root-lesion nematodes in potato. *Agronomy Journal*, 95(2), 282-292.
- Bandoni, A. L. (2003). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. (No. F01 BAN 18089). Ciencia y tecnología para el Desarrollo. Subprograma IV. Biomasa como fuente de productores químicos y energía. Proyecto IV. 6. La flora Iberomaricana y su aprovechamiento para la producción de aromas y fragancias de interindustrias.
- Bansal, R. P., Bahl, J. R., Garg, S. N., Naqvi, A. A., Sharma, S., Ram, M., & Kumar, S. (1999). Variation in quality of essential oil distilled from vegetative and reproductive stages of *Tagetes minuta* crop grown in North Indian plains. *Journal of Essential Oil Research*, 11(6), 747-752.
- Barboza, G. E. C., Núñez, J. J., Espinar, C. O. A., Bonzani, L., Filippa, N. E., Gutiérrez, E. M., & Cantero, J. J. (2006). Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina): Pteridófitas y Antofitas silvestres o naturalizadas.
- Başer, K. H. C., & Buchbauer, G. (2010). Handbook of essential oils: science, technology, and applications.
- Batallán, G., Massuh, Y., Flores, F., Ojeda, M., Almirón, W., Contigiani, M. (2010). Resumen: Actividad larvicida del aceite esencial de *Tagetes minuta* sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 7° Jornadas Regionales sobre Mosquitos, Misiones, Argentina.
- Batish, D. R., Arora, K., Singh, H. P., & Kohli, R. K. (2007). Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. *Crop Protection*, 26(4), 566-571.
- Bhattacharyya, B., Panda, D., Gupta, S., & Banerjee, M. (2008). Anti-mitotic activity of Colchicine and the structural basis for its interaction with Tubulin. *Medicinal Research Reviews*, 28(1), 155-183.
- Bii, C. C., Siboe, G. M., & Mibey, R. K. (2000). Plant essential oils with promising antifungal activity. *East African Medical Journal*, 77(6), 319-322.
- Bisset, N. G. (1994). Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers xvi, 566p.
- Blanco Hernández, N., Ramos Ruiz, A., & Vizoso Parra, Á. (2006). Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Piper auritum* HBK. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11(3-4), 0-0.

- Boeke, S. J., Barnaud, C., van Loon, J. J., Kossou, D. K., van Huis, A., & Dicke, M. (2004). Efficacy of plant extracts against the cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus*. *International Journal of Pest Management*, 50(4), 251-258.
- Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24(2), 119-124.
- Borenfreund, E., Babich, H., & Martin-Alguacil, N. (1988). Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in vitro*, 2(1), 1-6.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Buyukleyla, M., & Rencuzogullari, E. (2009). The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in Human Lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 72(3), 943-947.
- Cariddi, L., Escobar, F., Moser, M., Panero, A., Alaniz, F., Zygadlo, J., Sabini, L. & Maldonado, A. (2011). Monoterpenes isolated from *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling essential oil modulates immediate-type hypersensitivity responses in vitro and in vivo. *Planta Medica*, 77(15), 1687-1694.
- Catanzaro, I., Caradonna, F., Barbata, G., Saverini, M., Mauro, M., & Sciandrello, G. (2012). Genomic instability induced by α -pinene in Chinese hamster cell line. *Mutagenesis*, 27(4), 463-469.
- Cestari, I. M., Sarti, S. J., Waib, C. M., & Branco Jr, A. C. (2004). Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Neotropical Entomology*, 33(6), 805-807.
- Chalchat, J. C., Garry, R. P., & Muhayimana, A. (1995). Essential oil of *Tagetes minuta* from Rwanda and France: chemical composition according to harvesting location, growth stage and part of plant extracted. *Journal of Essential Oil Research*, 7(4), 375-386.
- Chamorro, E. R., Ballerini, G., Sequeira, A. F., Velasco, G. A., & Zalazar, M. F. (2008). Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. *Journal Argentine Chemical Society*, 96, 80-86.
- Chiba, K., Kawakami, K., & Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in vitro*, 12(3), 251-258.
- Clardy, J., & Walsh, C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature*, 432(7019), 829-837.

- Cofre Santo, C. D. (2011). Determinación de la Actividad Insecticida y/o Anti Alimentario del Aceite Esencial de Tzinsu *Tagetes minuta* en *Drosophila melanogaster*.
- de la Fuente, E., Gil, A., Jiménez, P., Kantolic, A. G., López Pereira, M., Ploschuk, E. L., Sorlino, D. M., Vilariño, P., Wassner, D.F., Windauer, L.B. (2006). Cultivos Industriales, Capítulos 1 y 4, 1ª Edición. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, pp: 800.
- Decreto 225/012, Reglamento Técnico MERCOSUR sobre Aditivos Aromatizantes/Saborizantes-MERCOSUR/GMC/RES. N° 10/06.
- Di Sotto, A., Mazzanti, G., Carbone, F., Hrelia, P., & Maffei, F. (2011). Genotoxicity of Lavender oil, Linalyl Acetate, and Linalool on human Lymphocytes in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52(1), 69-71.
- Eguaras, M. J., Fuselli, S., Gende, L., Fritz, R., Ruffinengo, S. R., Clemente, G., Gonzalez, A., Bailac, P. N. & Ponzi, M. I. (2005). An in vitro evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. *Journal of Essential Oil Research*, 17(3), 336-340.
- Escobar, F. M., Cariddi, L. N., Sabini, M. C., Reinoso, E., Sutil, S. B., Torres, C. V., Zanon, S. M. & Sabini, L. I. (2012). Lack of cytotoxic and genotoxic effects of *Minthostachys verticillata* essential oil: Studies in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 50(9), 3062-3067.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 2(5), 1084-1104.
- Fenech, M., & Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1-2), 29-36.
- Ficha de datos de seguridad según 1907/2006/CE, Artículo 31. Producto comercial: (+)-Pulegona ROTICHROM® GC (2013).
- Food and Drug Administration (2016). U. S. Food & Drug, Estados Unidos. Recuperado de: <https://www.accessdata.fda.gov>. Actualizada 01/04/2016.
- Fuselli, S. R., Gende, L. B., de la Rosa, S. G., Eguaras, M. J., & Fritz, R. (2005). Short communication: Inhibition of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* by the essential oils of two wild plants and their emulsifying agents. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 3(2), 220-224.

- Gakuubi, M. M., Wanzala, W., Wagacha, J. M., & Dossaji, S. F. (2016). Bioactive properties of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oils: A review. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 4(2), 27-36.
- García Bacallao, L., Rojo Domínguez, D. M., García Gómez, L. V., & Hernández Ángel, M. (2002). Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(3), 214-216.
- García, M. V., Matias, J., Barros, J. C., Lima, D. P. D., Lopes, R. D. S., & Andreotti, R. (2012). Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(4), 405-411.
- Gil, A., Ghersa, C. M., & Leicach, S. (2000). Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(3), 261-274.
- Gleiser, R. M., & Zygadlo, J. A. (2009). Essential oils as potential bioactive compounds against mosquitoes. *Recent Advances in Phytochemistry*, 37, 53-76.
- González, M. J., & Marioli, J. M. (2010). Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(3), 209-213.
- Gordon, P., & Khojasteh, S. C. (2015). A decades-long investigation of acute metabolism-based hepatotoxicity by herbal constituents: a case study of pennyroyal oil. *Drug Metabolism Reviews*, 47(1), 12-20.
- Green, M. M., Singer, J. M., Sutherland, D. J. & Hibben, C. R. (1991). Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (Marigold) toward *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7(2), 282-286.
- Guaglio R, Rampini A & Imo. (1985). La farmacognosia ieri e oggi. *Fitoterapia* 3 (56): 153-158.
- Guardia, S. B. (2002). *Una Fiesta del Sabor. El Perú y sus comidas*. Edición Bonus, Lima.
- Gül, S., Demirci, B., Başer, K. H. C., Akpulat, H. A., & Aksu, P. (2012). Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(5), 666-671.
- Herrera, J. M., Zunino, M. P., Massuh, Y., Pizzollito, R. P., Dambolena, J. S., Gañan, N. A., & Zygadlo, J. A. (2014). Fumigant toxicity of five essential oils rich in ketones against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). *Agriscientia*, 31(1), 35-41.

- Hori, M. (2003). Repellency of essential oils against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae). *Applied Entomology and Zoology*, 38(4), 467-473.
- IRAM-SAIPA N18622 (2003). Norma Argentina. Productos aromatizantes, Aceites Esenciales. Aceite de *Tagetes*, tipo argentino (*Tagetes minuta* L.). Segunda edición.
- Juliani, H. R., Koroch, A. R., Trippi, V. S., & Zygadlo, J. A. (2002). Intraespecific variation in leaf oils of *Lippia junelliana* (mold.) trunc. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(2), 163-170.
- Katinas, L., Gutiérrez, D. G., Grossi, M. A., & Crisci, J. V. (2007). Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42(1-2), 113-129.
- Kéïta, S. M., Vincent, C., Schmit, J. P., Ramaswamy, S., & Bélanger, A. (2000). Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 36(4), 355-364.
- Khader, M., Bresgen, N., & Eckl, P. M. (2009). In vitro toxicological properties of Thymoquinone. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 129-133.
- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema T, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M Jr, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surrallés J, Vanhauwaert A, Wakata A (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research*, 540: 153–163.
- Klaassen, C. & Watkins, J. (2005). Casarett y Dooll Fundamentos de Toxicología, edición en español. McGraw Hill Interamericana Editores, S.A.U., Aravaca (Madrid).
- Konigheim, B. S. (2012). Tesis Doctoral: Prospección de productos naturales con potencial actividad antiviral obtenidos a partir de especies nativas de género *Larrea*. Facultad de Ciencias Exáctas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.
- Lambrech Gonçalves, C., Almeida Schiavon, D. B., Voigt Mota, F., Faccin, A., Noremborg Schubert, R., Schiedeck, G., & Damé Schuch, L. F. (2013). Actividad antibacteriana de los extractos de *Cymbopogon citratus*, *Elionurus* sp. y *Tagetes minuta* contra bacterias que causan mastitis. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3), 487-494.
- Lawrence, B. M. (1995). *Natural Flavor and Fragrance Materials "Perfumer Flavorist"*. Essential Oils 1992-1994, Editorial Allured Publishing Corporation, Illinois, pp: 219.
- Leung, A.Y., 1980. *Encyclopedia of Common Natural Ingredients*. Wiley, New York.

- Lopez, S. B., M. L. Lopez, L. M. Aragon, M. L. Tereschuk, A. C. Slanis, G. E. Feresin, Zygadlo, J. A. & Tapia, A. A. (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: 5286–5292.
- Macedo, I. T. F., Oliveira, L. M. B. D., Camurça-Vasconcelos, A. L. F., Ribeiro, W. L. C., Santos, J. M. L. D., Morais, S. M. D., Beserra de Paula, H. C. & Bevilaqua, C. M. L. (2013). In vitro effects of *Coriandrum sativum*, *Tagetes minuta*, *Alpinia zerumbet* and *Lantana camara* essential oils on *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(4), 463-469.
- Macêdo, M. E., Consoli, R. A., Grandi, T. S., dos Anjos, A. M. G., de Oliveira, A. B., Mendes, N. M., Queiroz R.O. & Zani, C. L. (1997). Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 565-570.
- Martínez González, V. S., Creus Capdevila, A., & Dauder, M. (2006). Tesis de Doctorado: Biomonitorización genotóxica de poblaciones humanas expuestas ambientalmente al arsénico. Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Martínez, G. J. P. (2003). Tesis de Maestría: Estudio etnobotánico de las plantas vinculadas con la medicina tradicional de los campesinos de Paravachasca y Calamuchita, Provincia de Córdoba: aportes para su conservación. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, pp: 248.
- Martinez-Ghersa, M. A., Ghersa, C. M., Benech-Arnold, R. L., Donough, R. M., & Sanchez, R. A. (2000). Adaptive traits regulating dormancy and germination of invasive species. *Plant Species Biology*, 15(2), 127-137.
- Martinez-M A (2003). Aceites esenciales. Facultad Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.
- Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J. M., & Viano, J. (2003). Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 7115-7121.
- Massuh, Y. (2007). Tesis de Grado: Comparación entre poblaciones de *Tagetes minuta* de la Provincia de Córdoba, una especie aromática promisoría. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, pp: 54.
- Massuh, Y. (2014). Tesis de Doctorado: Estudio de caracteres morfológicos y bioquímicos en Suico (*Tagetes minuta* L.). IMBIV, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, CONICET.

- Melušová, M., Jantová, S., & Horváthová, E. (2014). Carvacrol and rosemary oil at higher concentrations induce apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(4), 189-194.
- Mendanha, S. A., Moura, S. S., Anjos, J. L., Valadares, M. C., & Alonso, A. (2013). Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicology in Vitro*, 27(1), 323-329.
- Moghaddam, M., Omidbiagi, R., & Sefidkon, F. (2007). Changes in content and chemical composition of *Tagetes minuta* oil at various harvest times. *Journal of Essential Oil Research*, 19(1), 18-20.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mudry, M. D., & Carballo, M. A. (2006). *Genética Toxicológica*, De los Cuatro Vientos Editorial. Primera Edición. Buenos Aires, Argentina.
- Naqinezhad, A., & Mehrvarz, S. S. (2007). Some new records for Iran and Flora Iranica area collected from Boujagh National Park, N. Iran. *The Iranian Journal of Botany*, 13, 112-119.
- National Toxicology Program (NTP) (2011). Toxicology and carcinogenesis studies of pulegone (CAS No. 89-82-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). National Toxicology Program Technical Report series, (563), 1.
- Nchu, F., Magano, S. R., & Eloff, J. N. (2012). In vitro anti-tick properties of the essential oil of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) on *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 79(1), 01-05.
- Nikoloff, N. (2014). Tesis de Doctorado: Genotoxicidad de herbicidas de importancia agroeconómica en Argentina. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.
- Ojeda Herrera, D. J. (2012). Tesis de Grado: Actividad citotóxica en líneas celulares tumorales humanas y actividad genotóxica mediante el Ensayo Cometa en linfocitos humanos de: (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a- (metoxicarbonietil), derivados de Argentina B. Escuela de Bioquímica y Farmacia, Universidad Católica de Loja.
- OMS (1986). Directrices sobre la Conservación de Plantas medicinales. OMS, UICN, WWF, pp: 58.
- Ordóñez, A., Massuh, Y. & Ojeda., M. (2006). Variabilidad fenotípica entre poblaciones de *Tagetes minuta* L. de la Provincia de Córdoba. XXXV Congreso Argentino de Genética. San Luis – Argentina.

- Ouanes, Z., Abid, S., Ayed, I., Anane, R., Mobio, T., Creppy, E. E., & Bacha, H. (2003). Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 538(1), 63-70.
- Pereira, T. S., de Sant'Anna, J. R., Silva, E. L., Pinheiro, A. L., & de Castro-Prado, M. A. A. (2014). In vitro genotoxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil in human lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 852-857.
- Péres, V. F., Moura, D. J., Sperotto, A. R. M., Damasceno, F. C., Caramão, E. B., Zini, C. A., & Saffi, J. (2009). Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2389-2395.
- Pérez, D., & Iannaccone, J. (2004). Efecto insecticida de sachá yoco (*Paullinia clavifera* var. *bullata* Simpson) (Sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse) (Commelinaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941, principal vector de Malaria en Ucayali, Perú. *Ecología Aplicada*, 3(1-2), 64-72.
- Pichette, A., Garneau, F. X., Collin, G., Jean, F. I., Gagnon, H., & Arze, J. B. L. (2005). Essential oils from Bolivia. IV. Compositae: *Tagetes* aff. *maxima* Kuntze and *Tagetes multiflora* HBK. *Journal of Essential Oil Research*, 17(1), 27-28.
- Pochettino, M. L., Arenas, P., Sánchez, D., & Correa, R. (2008). Conocimiento botánico tradicional, circulación comercial y consumo de plantas medicinales en un área urbana de Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(3), 141-148.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 1.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., & Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview. *Forschende Komplementärmedizin / Research in Complementary Medicine*, 16(2), 79-90.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3(7), 1125-1131.
- Repetto, M. (2002). *Toxicología Fundamental: Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group Tercera edición, pp 303-305.

- Riva, M. & López, D. (1993). Utilización de las pruebas de citotoxicidad in vitro en la valoración de los efectos de los contaminantes ambientales. Boletín del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial, 104, 59-64.
- Rocabado, G., Gonzáles, E., De La Fuente, F., & Araya, P. (2011). Estudios de la actividad ansiolítica-sedante de la especie *Tagetes minuta* L. Revista Médica La Paz, 17(1), 22-25.
- Romero Jiménez, M. (2013). Tesis de Doctorado: Estudio antigenotoxicológico y de citotoxicidad de plantas medicinales de uso cotidiano y de sus fenoles más característicos. Departamento de Genética, Universidad de Córdoba.
- Ruffinengo, S., Eguaras, M., Bailac, P., Torres, J., Basualdo, M., & Ponzi, M. (2001). Essential oils in the control of *Varroa destructor*. An evaluation in laboratory conditions. Proceeding 37th. International Apicultural Congress of Apimondia, Durban, South Africa. Paper, 223.
- Ruffinengo, S., Maggi, M., Faverin, C., de la Rosa, S. B. G., Bailac, P., Principal, J., & Eguaras, M. (2007). Essential oils toxicity related to *Varroa destructor* and *Apis mellifera* under laboratory conditions. Zootecnia Tropical, 25(1): 63-69.
- Sadia, S., Khalid, S., Qureshi, R., & Bajwa, A. A. (2013). *Tagetes minuta* L., A useful underutilized plant of Family Asteraceae: a review. Pakistan Journal of Weed Science Research, 19(2), 179-189.
- Schäfer, H., & Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. Biotechnology Journal, 4(12), 1684-1703.
- Scrivanti, L. R., Zunino, M. P., & Zygadlo, J. A. (2003). *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. Biochemical Systematics and Ecology, 31(6), 563-572.
- Senatore, F., Napolitano, F., Mohamed, M. A. H., Harris, P. J. C., Mnkeni, P. N. S., & Henderson, J. (2004). Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. Flavour and Fragrance Journal, 19(6), 574-578.
- Shahzadi, I., Hassan, A., Khan, U. W., & Shah, M. M. (2010). Evaluating biological activities of the seed extracts from *Tagetes minuta* L. found in Northern Pakistan. Journal of Medicinal Plants Research, 4(20), 2108-2112.
- Shirazi, M. T., Gholami, H., Kavooosi, G., Rowshan, V., & Tafsiry, A. (2014). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. Food Science & Nutrition, 2(2), 146-155.

- Silvia, P., & Asensio, J. (2002). Additive for performance: organic acids plus botanicals. *Feed International*, 3, 17-19.
- Singh, B., Joshi, V. P., Ram, R., Sharma, A., & Zaidi, A. A. (2002). U.S. Patent No. 6,444,458. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.
- Singh, V., Singh, B., & Kaul, V. K. (2003). Domestication of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) as a potential economic crop in Western Himalaya and North Indian plains. *Economic Botany*, 57(4), 535-544.
- Soria, A. C., Esteban, J., Morales, R., Martín-Álvarez, P. J., & Sanz, J. (2008). Validación estadística de la presencia en plantas de quimiotipos caracterizados por la concentración de componentes volátiles obtenida mediante GC-MS. *Botanica Complutensis*, 32, 225-236.
- Soule, J. A. (1993). *Tagetes minuta*: A potential new herb from South America. *New Crops*. Wiley, New York, 649-654.
- Tagboto, S., & Townson, S. (2001). Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Advances in Parasitology*, 50, 199-295.
- Tomova, B. S., Waterhouse, J. S., & Doberski, J. (2005). The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(1), 153-159.
- Tunc, I., Berger, B. M., Erler, F., & Dağlı, F. (2000). Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 36(2), 161-168.
- Ulloa, C. (2006). Aromas y sabores andinos. *Botánica económica de los Andes Centrales*. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés, pp: 313-328.
- Uvidia Ortiz, R. S. (2012). Tesis de Grado: Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de *Duranta triacantha* Juss, *Callistemon speciosus*, y *Tagetes minuta* L. Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Vergara García, Á. P. (2010). Tesis de Grado: Estandarización del ensayo del cometa alcalino en células de sangre periférica. Facultad de Ciencia, Pontificia Universidad Javeriana.
- Visintin, A., & Bernardello, G. (2005). Morfología y anatomía floral de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae). *ArnaldoA*, 12(1-2), 8-15.

- Vlastos, D., Drosopoulou, E., Efthimiou, I., Gavriilidis, M., Panagaki, D., Mpatziou, K., Kalamara, P., Mademtoglou, D., & Mavragani-Tsipidou, P. (2015). Genotoxic and Antigenotoxic Assessment of Chios Mastic Oil by the In Vitro Micronucleus Test on Human Lymphocytes and the In Vivo Wing Somatic Test on *Drosophila*. *PloS one*, 10(6), e0130498.
- Zalacain, M., Sierrasesumaga, L., & Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 28(2): 227-236).
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Correa-Royero, J., & Betancur-Galvis, L. (2009). Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK y componentes mayoritarios. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 215-222.
- Zhou, S. F., Xue, C. C., Yu, X. Q., & Wang, G. (2007). Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update. *Current Drug Metabolism*, 8(6), 526-553.
- Zygadlo, J. A. & Juliani, H. R. (2003). Recent progress in medicinal plants. In: Majundar, D.K., Govil, J.N., Singh, V.K., Shailaja, M.S., Gangal, S.V. (Eds.), *Phytochemistry and Pharmacology II*, VIII. Studium Press LLC, Texas, pp: 273–281.

ANEXO 1

**Curvas de viabilidad del
*AE Minthostachys
verticillata* (rico en
Pulegona) y (R)-(+)-
Pulegone**

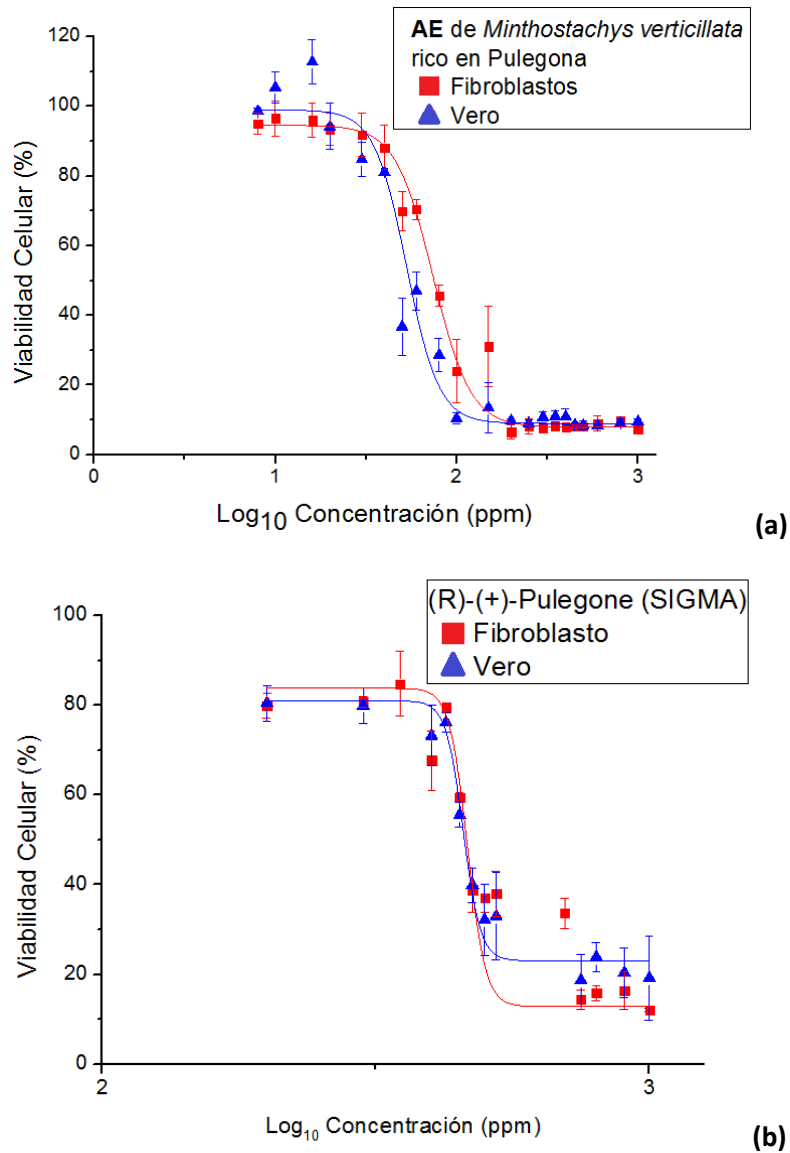


Figura 1. Curvas dosis respuesta (porcentaje de viabilidad celular vs. concentración) del **AE** de *Minthostachys verticillata* (rico en Pulegona) (a); (R)-(+)-Pulegone (SIGMA) (b).

El análisis de regresión lineal para todas las curvas dio un valor de $R^2 > 0,9$.

ANEXO 2

**Ensayos de MN y
Fragmentación de ADN del
AE de *Minthostachys
verticillata* (rico en
Pulegona) y (R)-(+)-
Pulegone**

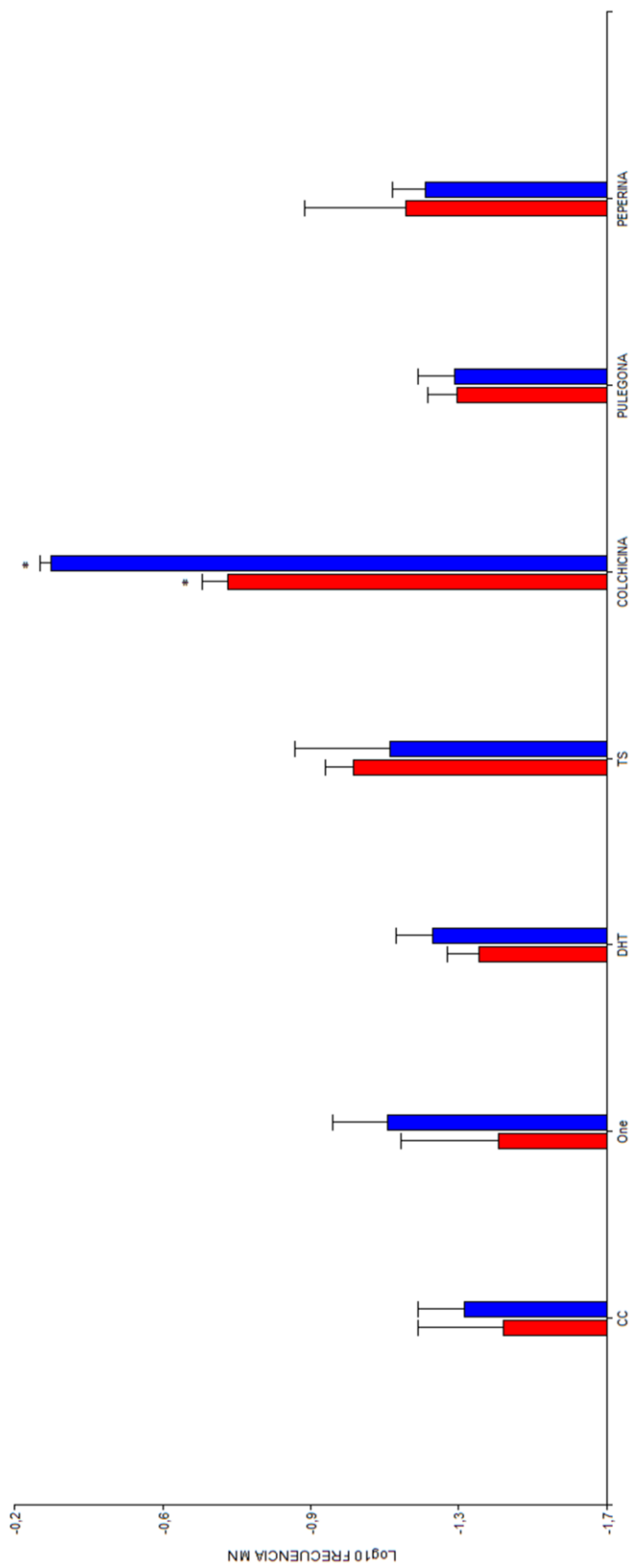


Figura 1. Frecuencia de Micronúcleos de cada Aceite Esencial. * $p < 0,05$.

CC: Control de célula; DHT: Dihidrotagetona; One: Ocimenona; TS: *Tagetes minuta* silvestre.; PULEGONA: (R)-(+)-Pulegone (SIGMA-ALDRICH); PEPERINA: *Minthostachys verticillata*.

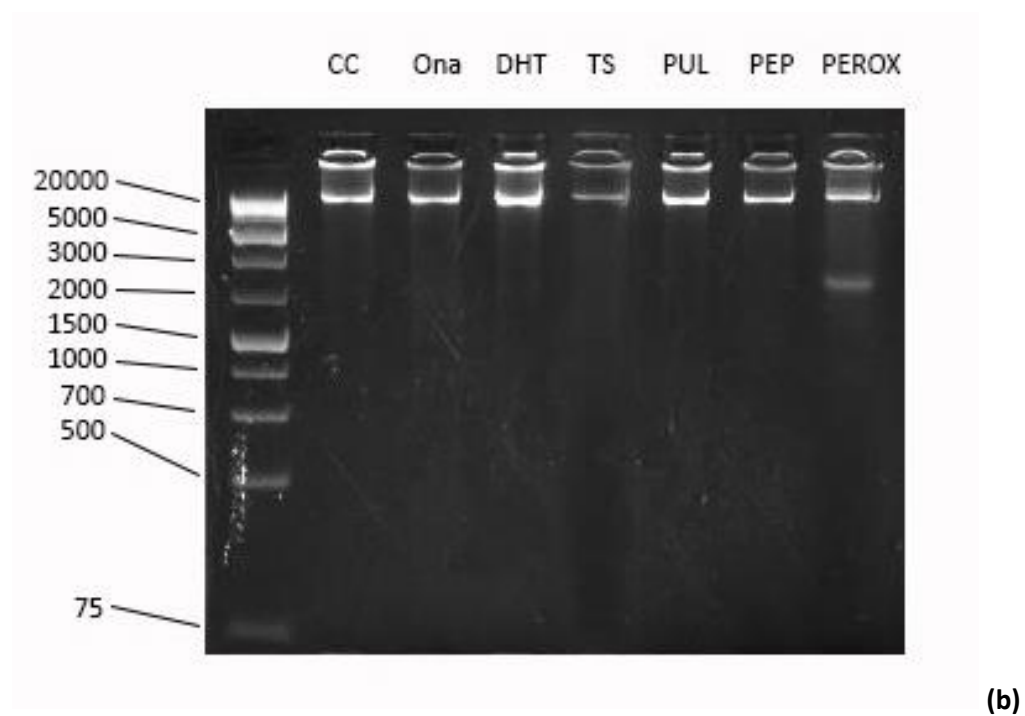
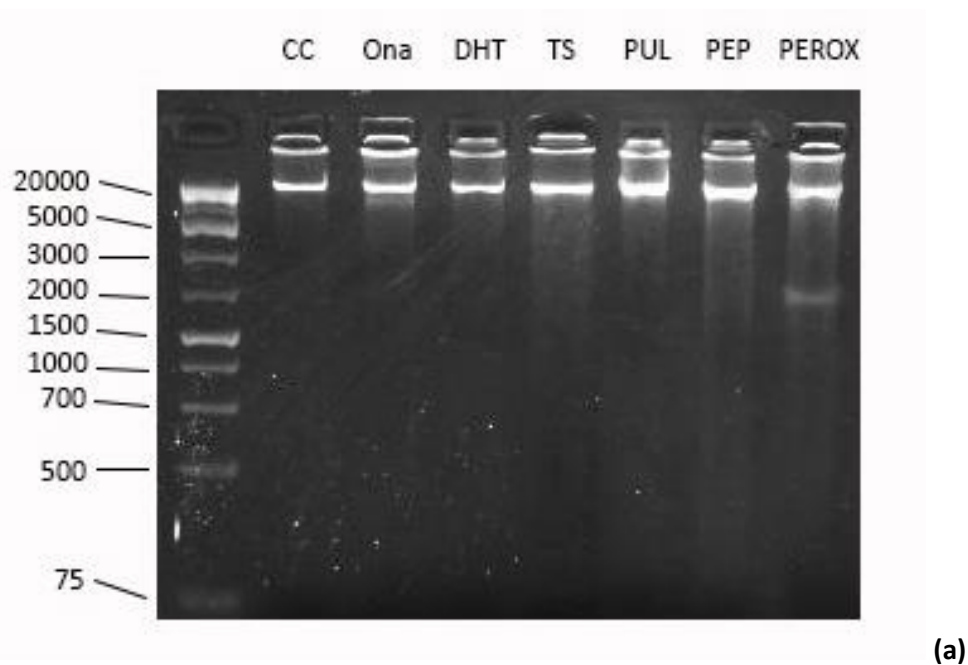


Figura 2. Fragmentación de ADN de cada aceite esencial en células Vero (a) y fibroblastos (b), en un gel de agarosa 3%.

CC: Control de célula; Ona: Ocimenona; DHT: Dihidrotagetona; TS: *Tagetes minuta* silvestre; PUL: (R)-(+)-Pulegone (SIGMA-ALDRICH); PEP: *Minthostachys verticillata* (Peperina); PEROX: Peróxido de Hidrógeno 100 μ M (control positivo).