

Composición química y actividad anti-tripanosomal de aceites esenciales obtenidos de *Tagetes* (Fam. Asteraceae), recolectados en Colombia

Chemical composition and anti-tripanosomal activity of essential oils from *Tagetes* (Asteraceae Fam.) grown in Colombia.

Patricia Escobar¹, Laura Viviana Herrera¹, Sandra Milena Leal¹, Camilo Durán², Elena Stashenko²

RESUMEN

Introducción: La quimioterapia actual para enfermedad de Chagas es precaria con solo dos opciones de tratamiento: nifurtimox y benznidazol. Las plantas representan una fuente inmensa de moléculas potencialmente activas contra agentes infecciosos. **Objetivo:** Determinar la composición química y evaluar la actividad de aceites esenciales de *Tagetes*, recolectados en Colombia, contra *Trypanosoma cruzi* y su célula de mamífero hospedera. **Materiales y métodos:** Los aceites esenciales se obtuvieron de plantas colectadas en diversas regiones de Colombia; se extrajeron por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas y se caracterizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La actividad de siete (7) aceites esenciales se determinó en epimastigotes, amastigotes intracelulares de *T. cruzi* y células Vero. Los resultados fueron expresados como la concentración que inhibe (CI_{50} , CI_{90}) o destruye (CC_{50} , CC_{90}) 50 ó 90 % de parásitos o células. **Resultados:** Los componentes mayoritarios de los aceites fueron estragol, dihidrotagetona y *cis*-tagetona con diferencias de composición entre las especies de *Tagetes* evaluadas. Todos los aceites esenciales fueron activos en epimastigotes de *T. cruzi*. El aceite de *T. heterocarpha* fue activo contra amastigotes intracelulares (CI_{50} 41,35 μ g/mL). Los aceites de *T. caracasana* y *T. heterocarpha* fueron tóxicos para las células Vero. **Conclusiones:** Los aceites esenciales obtenidos de *T. heterocarpha*, *T. caracasana* y *T. zipaquirensis* mostraron capacidad para inhibir el crecimiento de *T. cruzi*. Estudios complementarios de la actividad sus componentes mayoritarios se realizan actualmente. *Salud UIS* 2009; 41: 280-286

Palabras clave: Aceites esenciales, Asteraceae, *Tagetes*, *Trypanosoma cruzi*, células Vero

1. Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP), Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

2. Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Correspondencia: Patricia Escobar, MSc, PhD, CINTROP, Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas, km2 vía refugio, sede UIS Guatiguará, telf.:(57-7) 6344000 Ext. 3550 - 3565, fax (57-7) 6540808

E-mail: pescobarwww@yahoo.co.uk

Recibido: 1 de noviembre de 2009 **Aprobado:** 20 de diciembre de 2009

ABSTRACT

Introduction: The current chemotherapy of Chagas diseases is poor, with only two treatment options: nifurtimox and benznidazole. The plants represent an immense source of potentially active molecules against infectious agents. **Aim:** To determine the chemical composition and biological activity of Colombian *Tagetes* essential oils against *Trypanosoma cruzi* and its mammalian host cell. **Materials and Methods:** Plants were collected in various region of Colombia and essential oils were extracted by microwave-assisted hidrodistillation and characterized by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The activities of seven (7) essentials oils were determinate in epimastigotes and amastigotes of *T. cruzi* and on Vero cells. The result were expressed as the concentration to inhibit (CC₅₀, CC₉₀) or destroy (CC₅₀, CC₉₀) 50 or 90 % of parasites or cells. **Results:** Estragole, dihidrotagetone and *cis*-tagetone were the main components of essential oils, with quantitative differences between the evaluated *Tagetes* species. All essential oils were active in epimastigotes of *T. cruzi*. *T. heterocarpha* essential oil was active in intracellular amastigotes (IC₅₀ 41,35 µg/mL). The oils from *T. caracasana* y *T. heterocarpha* were toxic to Vero cells. **Conclusions:** The essential oils obtained from *T. heterocarpha*, *T. caracasana* and *T. zipaquirensis* inhibit the growth of *T. cruzi*. Additional studies on the major components activities against parasites are now under study. *Salud UIS* 2009; 41: 280-286

Keywords: Essential oils, Asteraceae, *Tagetes*, *Trypanosoma cruzi*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis ampliamente distribuida en Latinoamérica donde 15 millones de personas se encuentran infectadas con el protozoario *T. cruzi* y 75 a 90 millones están expuestas a la infección¹. En Colombia se estima que 1.300.000 habitantes han sido diagnosticados en alguna fase de la enfermedad².

El nifurtimox y el benznidazol son los medicamentos usados para tratar la enfermedad de Chagas. Sin embargo, su baja efectividad en la fase crónica, los prolongados esquemas terapéuticos, la disponibilidad reducida y los efectos adversos que estos medicamentos pueden generar en los pacientes, hacen que los tratamientos disponibles sean insatisfactorios. Algunos medicamentos empleados en otras patologías, tales como: allopurinol, ketoconazol, fluconazol, así como nuevos derivados de los triazoles se encuentran en estudio para ser usados en el tratamiento de esta parasitosis^{3,4}. Frente a este panorama, surge la necesidad de buscar y desarrollar nuevos medicamentos seguros y eficaces en esta patología.

Algunas plantas y sus productos han presentado actividad contra el *T. cruzi* *in vitro*. Extractos de *Annona muricata*, *Desmopsis panamensis*, *Pseudomalmea boyacana*, *Rollinia exsucca*, *Rollinia pittieri*, *Xylopia aromatica*⁵, *Albizia zygia*⁶, así como aceites esenciales de *Thymus vulgaris*⁷, *Syzygium aromaticum*, *Ocimum basilicum*⁸ han mostrado actividad contra formas extracelulares de *T. cruzi*, con valores de IC₅₀ entre 10 y 500 µg/mL. Algunos derivados de productos naturales tales como monoterpenos hidroperóxidos y

cubeibina inhiben el crecimiento de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes axénicos de *T. cruzi* con IC₅₀ de 0.5 a 25 µM^{9,10}.

Las plantas del género *Tagetes* (Familia Asteraceae), conocidas comúnmente como clavelón, maravilla, ruda o estragón, tienen una distribución mundial y comprenden aproximadamente 60 especies, siendo las más comunes *T. minuta*, *T. erecta*, *T. patula*, *T. tenuifolia* y *T. lucida*¹¹. Por las características de sus flores tienen usos ornamentales, por su olor anisado sirven como especies en las comidas. En la medicina folklórica, infusiones y extractos se utilizan como antihelmínticos, antiespasmódicos, diuréticos, antidepressivos, antimaláricos y antiinflamatorios¹²⁻¹⁴. Los aceites esenciales del género *Tagetes* presentan diversidad en su composición entre las especies. Terpenos como ocimeno, cimenona, tagetona, estragol, entre otros, se encuentran más comúnmente^{11,15}.

Extractos de algunas especies de *Tagetes*, tales como *T. patula*, *T. pusila*, *T. minuta*, *T. lucida* y *T. máxima* han presentado efectos nematocida, insecticida, antifúngico, antibacteriano, antiinflamatorio y antioxidante^{12,16-19}. Estas actividades biológicas han sido relacionadas con la presencia de piretrina, flavonoides, tienoles y terpenoides. Sin embargo, la actividad de aceites esenciales de *Tagetes* en protozoarios, como el *T. cruzi*, no ha sido ampliamente estudiada.

El objetivo del presente estudio fue determinar la composición química y evaluar la actividad de aceites esenciales de *Tagetes* recolectados en Colombia contra *T. cruzi* y su célula de mamífero hospedera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas, extracción y composición de los aceites esenciales

Las plantas del género *Tagetes* fueron colectadas en diversos Departamentos de Colombia (Tabla 1) e identificadas por el doctor Jose Luis Fernandez del

Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá); los pliegos testigo de cada planta identificada fueron depositados en el Herbario Nacional de Colombia.

Tabla 1. Lista de plantas y actividad biológica de aceites esenciales de *Tagetes* en *T. cruzi* y células Vero.

Nombre Botánico	Numero Voucher	Lugar de Recolección	Yield %	µg/mL							
				<i>T. cruzi</i>						Células Vero	
				epimastigotes			Amastigotes intracelulares			CC ₅₀ ^c ±DS	CC ₉₀ ^c ±DS
				IC ₅₀ ^a ±DS	IC ₉₀ ^a ±DS	IS ^b	IC ₅₀ ^a ±DS	IC ₉₀ ^a	IS		
<i>T. heterocarpa</i>	519603	Ipiales, Nariño	0,14	12,84 ±0,10	25,41 ±0,44	3,4	41,35 ±0,13	>50	1,0	43,03 ±6,80	>100
<i>T. lucida</i> (1)	512074 ^a	Bolívar, Santander	0,40	18,94 ±0,96	42,00 ±1,62	>15,8	>100	>100	>3	>300	>300
<i>T. lucida</i> (2)	512074 ^a	B/manga, Santander	0,33	13,94 ±0,17	>100	>21,5	99,27 ±2,94	>100	>3,0	>300	>300
<i>T. zipaquirensis</i> (1)	521096	Chíquiza, Boyacá	0,35	21,30 ±0,90	35,78 ±0,31	5,9	149 ±5,68	>150	0,8	126,40 ±12,54	>300
<i>T. zipaquirensis</i> (2)	521028	Sogamoso, Boyacá	0,5	7,69 ±0,27	12,88 ±0,19	25,3	118,41 ±0,03	>150	1,6	194,34 ±15,06	>300
<i>T. zipaquirensis</i> (3)	521087	Toca, Boyacá	1,2	21 ±2,24	43,40 ±4,67	7,5	69 ±14,64	>100	2,3	157,25 ±10,28	>300
<i>T. caracasana</i>	521072	Samacá, Boyacá	1,1	4,56 ±0,34	12,72 ±0,28	5,6	74 ±4,93	>100	0,3	25,73 ±8,68	91,72 ±24,35
Nfx ^d				0,90 ±0,03	1,24 ±0,01	19,6	0,46 ±0,01	5,58	38,3	17,63 ±6,43	>100

^a Concentración Inhibitoria, ^b Índice de selectividad, ^c Concentración citotóxica, ^d Nifurtimox, ^e El número de COL es el mismo porque los cultivos fueron propagados a partir de la misma planta madre.

Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWH) y la composición fue determinada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los componentes de los aceites fueron identificados con base en sus índices de retención (IR) y por comparación de sus espectros de masas con los de las bases de datos (Wiley, NIST, Adams).

Parasitos y células

Epimastigotes de *T. cruzi* (cepa 320I01)^{20,21} fueron cultivados a 28°C en medio de cultivo de *Liver Infusion Tryptose* (LIT) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (SBFi, Gibco). Las células Vero (ATCC) fueron mantenidas en medio de cultivo de RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 5% de SBFi a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad.

Aceites esenciales y medicamentos de referencia

Se evaluaron siete (7) aceites esenciales obtenidos de *T. heterocarpha*, *T. lucida*, *T. zipaquirensis* y *T. caracasana*. Como medicamento de referencia se utilizó el nifurtimox (Bayer). Soluciones *stock* de los aceites y del nifurtimox fueron preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) a una concentración final de DMSO no mayor del 1%. Soluciones de trabajo fueron preparadas en los medios de cultivo antes de los ensayos.

Ensayos de actividad contra el *T. cruzi*

Los epimastigotes de *T. cruzi* fueron tratados con diluciones 1:3 de diferentes concentraciones de los aceites esenciales (3,7-100 µg/mL) y del nifurtimox (0,4-11 µg/mL), por 72 horas a 28°C. Parásitos de control fueron mantenidos sin compuesto. La inhibición del crecimiento fue determinada microscópicamente por conteo directo de parásitos en cámara de Neubauer. Los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* fueron obtenidos por infección de monocapas de células Vero con tripomastigotes de *T. cruzi* durante 24 horas, en un radio de infección parásitos:célula de 10:1. Amastigotes intracelulares de *T. cruzi* fueron tratados con diluciones 1:3 de diferentes concentraciones de los aceites esenciales (3,7-100 µg/mL) y del nifurtimox (0,1-3,7-µg/mL) por 120 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% humedad. Parásitos de control fueron mantenidos sin

compuesto. El porcentaje de infección fue determinado por conteo microscópico en células fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa.

Ensayos de toxicidad en células Vero

Se determinó por el método de MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difenil-tetrazolio bromuro)²². Monocapas de células Vero fueron tratados con diluciones 1:3 de concentraciones de aceites esenciales (11,1-300 µg/mL) e incubados por 72 horas a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad. Células control fueron mantenidos sin compuesto. Se adicionó el MTT a los pozos con células y se incubó por 4 horas a 37°C para permitir la formación de los cristales de formazán, que fueron disueltos posteriormente con DMSO para la lectura de la Densidad Óptica. La concentración fue determinada espectrofotométricamente usando un lector de microplacas (Anthos 2020) y DO de 580 nanómetros (nm) La concentración citotóxica se calculó usando la fórmula: % citotoxicidad=100 x (DO grupo control-DO grupo tratado)/ DO grupo control.

Análisis de resultados

La actividad de los compuestos en epimastigotes y amastigotes intracelulares de *T. cruzi* fue expresada como la concentración de aceite esencial que inhibe el 50% o 90% de los parásitos (CI₅₀, CI₉₀). La toxicidad en células Vero fue expresada como la concentración citotóxica para el 50% o 90% de las células (CI₅₀ CC₉₀). Los anteriores parámetros fueron calculados usando regresión sigmoideal (Mxslfit™; ID Business Solution,UK). El índice de selectividad de los aceites fue calculado como el cociente de la CC₅₀ y la IC₅₀. Cada concentración se evaluó por triplicado y los ensayos fueron realizados dos veces.

RESULTADOS

Componentes de los aceites esenciales

Se identificaron 19 componentes principales (Tabla 2). Estragol fue el componente mayoritario en *T. lucida* (91,4 y 96,6%); dihidrotagetona en *T. zipaquirensis* (42,0; 24,4 y 35,7%); *cis*-tagetona en *T. caracasana* (58,4%). En el aceite esencial de *T. heterocarpha* los componentes *cis*-tagetona y dihidrotagetona alcanzaron cantidades relativas de 16,0 y 13,3%, respectivamente.

Tabla 2. Composición química de aceites esenciales de especies de *Tagetes* recolectadas en diversas regiones de Colombia.

Componentes mayoritarios	Cantidades relativas (%)						
	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d	5 ^e	6 ^f	7 ^g
<i>cis</i> -β-Ocimeno	3,0	-	-	-	6,1	20,0	11,7
<i>trans</i> -β-Ocimeno	-	2,19	1,0	12,1	-	-	0,3
<i>allo</i> -Ocimeno	-	-	-	2,0	-	2,8	1,8
<i>cis</i> -Ocimenona	6,3	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Ocimenona	12,3	-	-	-	-	-	1,8
β-Bisaboleno	3,0	-	-	-	-	-	-
Espatulenol	5,4	-	-	-	-	-	-
Estragol	1,9	91,4	96,0	-	-	-	-
β-Mirceno	-	4,0	2,0	5,3	10,9	5,8	-
Dihidrotagetona	13,3	-	-	42,0	24,4	35,7	15,6
<i>cis</i> -Tagetona	16,0	-	-	3,3	3,6	5,8	58,4
<i>trans</i> -Tagetona	1,7	-	-	3	4,6	4,3	-
6,7-epoxi-Mirceno	1,0	-	-	13,0	31,0	10,7	-
Linalool	1,0	1,0	-	1,3	1,6	1,4	-
Timol	1,0	-	-	-	-	-	-
Biciclogermacreno	1,3	-	-	-	-	-	-
Canfeno	-	-	-	1,0	-	-	-
Limoneno	-	-	-	1,0	1,0	-	-
p-Cimeno	-	-	-	1,0	1,0	-	-

^a *T. heterocarpa*, ^b *T. lucida* (1), ^c *T. lucida* (2), ^d *T. zipaquirensis* (1), ^e *T. zipaquirensis* (2), ^f *T. zipaquirensis* (3), ^g *T. caracasana*

Actividad contra el *T. cruzi*:

Todos los aceites esenciales fueron activos en las formas de epimastigotes de *T. cruzi* con valores de CI_{50} entre 4,56 y 21,30 $\mu\text{g/mL}$; el aceite esencial de *T. caracasana* fue el más activo, sin embargo con relación al nifurtimox fue 5 veces menos activo (Tabla 1). Los IS en epimastigotes fueron >3 en todos los aceites.

En amastigotes intracelulares el aceite esencial de *T. heterocarpa* fue activo (CI_{50} 41,36 $\mu\text{g/mL}$), pero con relación al nifurtimox (CI_{50} 0,46 $\mu\text{g/mL}$) este aceite fue aproximadamente 90 veces menos activo. Los aceites esenciales de *T. lucida*, *T. caracasana* y *T. zipaquirensis* fueron parcialmente activos (Tabla 1).

Actividad en células Vero:

Los aceites esenciales de *T. caracasana* y *T. heterocarpa* fueron tóxicos para las células Vero con valores de CC_{50} de 25,73 y 43,03 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

DISCUSIÓN

Los aceites esenciales obtenidos de plantas colombianas del género *Tagetes* mostraron una variedad en su composición química, actividad contra *T. cruzi* y toxicidad moderada o nula en células de mamífero.

La composición química de los aceites esenciales evaluados reveló diferencias de acuerdo con la especie. Las principales variaciones en la composición se

presentaron entre las cuatro especies, mientras que interespecie las diferencias se relacionaron con la concentración y no con el tipo de componentes. Sin embargo, otros estudios han reportado variaciones intra-específicas que permiten agrupar los aceites de una misma especie de *Tagetes* en subtipos¹¹. Gil *et al* (2000) establecieron la existencia de tres quimiotipos de aceites esenciales de *T. minuta*. El Quimiotipo 1: relacionado con Z- β -ocimeno, dihidrotagetona, Z-tagetona, E- y Z-tagetenonas y limoneno; Quimiotipo 2: con dihidrotagetona y Quimiotipo 3: con α -fenandreno y E- β -cimeno. Las variaciones químicas intraespecíficas en aceites esenciales han sido establecidas en más de 400 especies y familias y pueden estar relacionadas con las marcadas diferencias en la actividad biológica de los aceites esenciales de la misma especie²³. Por otra parte, estudios han reportado componentes característicos del aceite esencial de *T. lucida* como el linalool, estragol (45%) y metil-eugenol¹¹; similares a los encontrados en el aceites esencial de la especie estudiada en el presente trabajo.

Diversas especies de *Tagetes* han mostrado actividad biológica *in vitro*. Extractos de *T. terniflora*, *T. minuta* y su flavonoide, quercetagetina, han mostrado actividad contra bacterias como *Escherichia. coli*, *Stafilococcus aureus*, *S. epidermidis* y *P. aureginosa*^{18,24}. Extractos de *T. patula* han mostrado actividad antifúngica, antibacterial y nematocida como resultado de la acumulación de tiofenos fototóxicos²⁵⁻²⁷. Aceites esenciales obtenidos de *T. minuta* y *T. erecta* poseen actividad frente a larvas y adultos de *Anopheles stephensi*¹¹. Extractos de *T. lucida* han mostrado actividad contra *S. aureus*, *Candida albicans*. Este mismo extracto fue evaluado frente a epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, sin embargo, no presentó actividad ($CI_{50} > 1$ mg/ml)^{28,29}.

En el presente estudio, se demostró por primera vez la capacidad que tienen los aceites esenciales obtenidos de *T. heterocarpha*, *T. caracasana* y *T. zipaquirensis* *T.* de inhibir el *T. cruzi*. La actividad de los compuestos mayoritarios de estos aceites en las formas parasitarias está siendo evaluada actualmente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COLCIENCIAS por la financiación de este trabajo a través de el Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM (Contrato No 432-2004) y a la Universidad Industrial de Santander.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de interés con los datos descritos en este artículo.

REFERENCIAS

1. Coura JR., Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104 suppl 1: 31-40.
2. Ghul Felipe. Chagas diseases in Andean countries. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007,102 (suppl 1):29-37.
3. Coura J:R. Present situation and new strategies of chagas disease chemotherapy –a proposal. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104(4): 549-54.
4. Urbina J. Specific of chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. Acta Trop. 2009, en prensa.
5. Osorio E, Arango G, Jiménez N, Alzate F, Ruíz G, Gutiérrez D. *et al*. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of colombian Annonaceae. J Ethnopharmacol. 2007;111(3): 630-35
6. Ndjakou Lenta B, Vonthron-Senecheau C, Fongang Soh R, Tantangmo F, Ngouela S. *In vitro* antiprotozoal activities and cytotoxicity of som selected Cameroonian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2006;111(1): 8-11.
7. Santoro Y, Cardoso M, Guimaraes L, Mendoca L, Soares M. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oil of *Achilleum millefolium*, *Syzygium aromaticum*, *Ocimum basillicum* on epimastigotes and trypomastigotes. Exp Parasitol. 2007;116:283-290.
8. Santoro Y, Cardoso M, Guimaraes S, Salgado A, Menna-Barreto R, Soares M. Effect of oregano (*Origanum vulgare L.*) and thyme (*Thymus vulgaris*) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (protozoa: Kinetoplastida) Growth and ultrastructure. Parasitol Res. 2007;100:783-790.
9. Kiuchi F, Itano Y, Uchiyama N, Honda G, Tsubouchi A, Nakajima-Shimada J. Monoterpene Hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. J.Nat.Prod. 2002; 65: 509-12
10. De Souza V, Da Sila R, Pereira A, Royo V, Saravia J, Montanheiro M, et al. Trypanocidal activity of (-)-Cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Bioorg Med Chem. 2005, 15:303-7

11. Vasudevan P, Kashyap S y Sharma. *Tagetes*: a multipurpose plant. *Bioresour Technol.* 1997; 62: 29-35.
12. De las Heras B, Slowing K, Benedi J, Carretero E, Ortega T, Toledo C, et al. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *J. Ethnopharmacol.* 1998; 61: 161-166
13. Abad M.J, Bernejo P, Palomino S.S, Chiriboga X, Carrasco, L. Antiviral activity of some South American medicinal plants. *Phytother. Res.* 1999 13: 142-146
14. Lorenzo D, Loayza I, Dellacassa E. Composition of the essential oil of *Tagetes maxima* Kuntze from Bolivia. *Fragr Flavour. J.* 2002;17: 115-118.
15. Gil A, Ghersa C.M, Leicach S. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochem System Ecol.* 2000;28: 261-274.
16. Singh S, Sharma P, Vats L. Light dependent toxicity of the extract of plant *Tagetes erecta* and α -terthienyl toward larvae of mosquito *Culex tritaeniorhynchus*. *Toxicol. Environm. Chem* 1987;16(1): 81-88.
17. Mares D, Tosia B, Poli F, Andreotti E, Romagnoli C. Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiol Res.* 2004;159: 295-304.
18. Tereschuk, M.L, Riera, M.V, Castro G.R, y Abdala, L.R. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J. Ethnopharmacol.* 1997;56: 227-232
19. Parejo I, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acylated quercetagein glycosides with antioxidant activity from *Tagetes máxima*. *Phytochemistry.* 2005;66: 2356-2362.
20. Luna KP, Jaramillo CL, Gutierrez R, Esteban L, Angulo VM. Aislamiento de *T. cruzi* en pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas por medio de hemocultivo y xenocultivo. *Biomédica.* 2003; 23:119.
21. Luna KP, Jaramillo CL, Hernández G, Gutiérrez R, Vallejo GA, Angulo VM. ITS-RFLP-and RAPD-based genetic variability of *Trypanosoma cruzi* I, human and vector strains in Santander(Colombia). *Parasitol Res.* 2009; 105: 519-528.
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983; 65: 55-63.
23. Nemeth E.Z, Hethelyi E, Bernah J. Comparison studies on *Tanacetum vulgare* L. chemotypes. *J. Herbs Spices Med. Plants* 1994;2: 85-92.
24. Tereschuk M.L, Baigor M.D, Abdala L.R. Antibacterial activity of *Tagetes terniflora*. *Fitoterapia* 2003;74: 404-406.
25. Hudson J.B, Towers G.H.N., Therapeutic potential of plant photosensitizers. *Pharmacol. Therapeut.* 1991;49: 181-222.
26. Romagnoli C, Mares D, Fasulo M.P, Bruni A. Antifungal effects of α -terthienyl from *Tagetes patula* on five dermatophytes. *Phytother. Res.* 1994;8: 332-336.
27. Mares D, Tosi B, Romagnoli C, Poli F. Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts. *Pharm Biol.* 2002;40: 400-404.
28. Caceres A, López B, Gonzalez S, Berger I, Tada I, Maki J. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J Ethnopharmacol.* 1998;62: 195-202.
29. Muelas-Serrano S, Nogal J.J, Martínez-Díaz R.A., Escario J.A, Martínez-Fernandez A.R, Gómez-Barrio A. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J Ethnopharmacol.* 2000;71: 101-107