



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES
CARRERA DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

TEMA:

“Evaluación toxicológica de extractos de *Tagetes zypaquirensis*
sobre el modelo de pez cebra (*Danio rerio*)”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de ingeniería en
Biotecnología

Línea de investigación: Salud y bienestar integral

AUTOR:

Wilter Aarón Sánchez Mora

DIRECTOR:

Ing. Andrea Jazmin Chilingua Quispe MSc.

Ibarra – Ecuador 2026



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1206596478		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Sánchez Mora Wilter Aarón		
DIRECCIÓN:	El Olivo, Ibarra		
EMAIL:	wasanchezm@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:		TELÉFONO MÓVIL:	0968603477

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Evaluación toxicológica de extractos de <i>Tagetes zypaquiensis</i> sobre el modelo de pez cebra (<i>Danio rerio</i>).
AUTOR :	Wilter Aarón Sánchez Mora
FECHA:	04/03/2026
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniería en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Andrea Jazmín Chilibingua Q. MSc./Blga. Sania Ortega MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de esta y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 4 días del mes de marzo de 2026.

EL AUTOR:

Wilter Aarón Sánchez Mora

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Ibarra, 04 de marzo de 2026

Ing. Andrea Jazmín Chilibuina Q. Msc.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

Ing. Andrea Jazmín Chilibuina Q. Msc.

C.C.: 1720064193

APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular “EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE EXTRACTOS DE *Tagetes zypaquirensis* SOBRE EL MODELO DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*)” elaborado por Wilter Aarón Sánchez Mora, previo a la obtención del título del Ingeniero en Biotecnología, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:

Ing. Andrea Jazmin Chilibingua Q. MSc.

C.C.:1720064193

Blga. Sania Ortega MSc.

C.C.:1002631677

PRESENTACIÓN

Yo, SÁNCHEZ MORA WILTER AARÓN, con el número de identidad C.C: 1206596478 en calidad de autor de la tesis titulada “EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE EXTRACTOS DE *Tagetes zypaquirensis* SOBRE EL MODELO DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*)”, me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, el motor principal de mi vida. A mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional y por creer en mí incluso en los momentos de duda. De manera especial, a mis sobrinos y mi pequeña hermana, cuya alegría y presencia son una motivación constante y quienes ocupan un lugar fundamental en mi corazón; este logro también les pertenece.

A la Ing. Andrea Chiliquina e Ing. Carla Sandoval, mi más profundo agradecimiento por su invaluable guía, paciencia y profesionalismo durante este proceso de titulación. Sus conocimientos y orientaciones fueron los pilares fundamentales para la culminación exitosa de este trabajo experimental, de igual forma a todos los docentes y mentores que, a lo largo de cada etapa de mi carrera, compartieron su sabiduría y me formaron no solo como profesional, sino como persona.

A quién fue mi pareja. Gracias por acompañarme en esas largas noches de desvelo, por tu ayuda incansable para terminar cada detalle y, sobre todo, por no permitir que me rindiera cuando el camino se tornaba difícil. Tu apoyo fue el impulso necesario para llegar a la meta.

A mis amigos: Joel Andrade, Mateo Correa, Andrés Aguilar, Mabel Veliz, Kimberly Martinez y Nayeli Chuquin. Gracias por enseñarme el valor del equilibrio, por demostrarme que entre libros y laboratorios también hay espacio para la risa y el disfrute, y por recordarme siempre que se puede ser responsable sin dejar de vivir momentos inolvidables. Los llevaré siempre conmigo.

Y a una amiga muy especial, Evelyn Ramos. Siempre estuviste ahí, aun cuando todo se complicaba, por no dejarme solo te agradezco con todo lo que puedo ser.

Este trabajo, todo es por ustedes... Gracias por ser parte de mi camino.

RESUMEN EJECUTIVO

La presente investigación, evaluó el perfil toxicológico de los extractos vegetales de *Tagetes zypaquirensis* utilizando el modelo animal de pez cebra (*Danio rerio*) como plataforma de ensayo biotecnológico. La investigación se fundamentó en la creciente necesidad de validar la seguridad de compuestos bioactivos de la flora andina antes de su potencial aplicación farmacológica. Para ello, se obtuvo el aceite esencial (AE) mediante hidrodestilación con trampa de Clevenger y el extracto etanólico (EE) a través de maceración fría y liofilización, estandarizando además un protocolo de emulsificación con Tween 20 que garantizó la estabilidad de los compuestos lipofílicos del AE en el medio acuoso, se utilizó DMSO como vehículo para el EE.

Los bioensayos, realizados bajo la normativa OCDE 236, revelaron una toxicidad diferencial crítica. El aceite esencial exhibió una letalidad extrema con una Concentración Letal Media (CL50) y de Malformaciones (CE50) inferiores al 0.0001%. Por su parte, el extracto etanólico mostró una toxicidad moderada dosis-dependiente, con una DT50 de 49.91 mg/L en el desarrollo embrionario y una CL50 de 43.93 mg/L en especímenes juveniles.

Durante el análisis morfológico, se identificó y documentaron efectos teratogénicos severos provocados por la exposición temprana a los diferentes extractos, incluyendo edemas pericárdicos y del saco vitelino, torsión de la cola, arritmias cardíacas y mal formación de estructuras y cola. Estos hallazgos demuestran que los extractos de *T. zypaquirensis* ejercen un impacto significativo sobre la viabilidad y el desarrollo temprano de vertebrados, proporcionando una base científica esencial para la regulación de dosis y el manejo seguro de esta especie en futuras aplicaciones terapéuticas.

Palabras clave: Aceite esencial, extracto etanólico, *Tagetes zypaquirensis*, Teratogénico, toxicidad, CL50, CT50

ABSTRACT

The present study evaluated the toxicological profile of plant extracts from *Tagetes zypaquirensis* using the zebrafish (*Danio rerio*) animal model as a biotechnological assay platform. This research was driven by the increasing need to validate the safety of bioactive compounds from Andean flora prior to potential pharmacological applications. To this end, the essential oil (EO) was obtained via hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus, while the ethanolic extract (EE) was produced through cold maceration and lyophilization. Furthermore, an emulsification protocol using Tween 20 was standardized, ensuring the stability of the lipophilic compounds of the EO in the aqueous medium, whereas DMSO was utilized as the vehicle for the EE.

The bioassays, conducted in accordance with OECD Guideline 236, revealed critical differential toxicity. The essential oil exhibited extreme lethality, with a Median Lethal Concentration (LC50) and a Median Effective Concentration for malformations (EC50) below 0.0001%. Conversely, the ethanolic extract showed moderate dose-dependent toxicity, with a DT50 of 49.91 mg/L during embryonic development and an LC50 of 43.93 mg/L in juvenile specimens.

Morphological analysis identified and documented severe teratogenic effects resulting from early exposure to the different extracts, including pericardial and yolk sac edemas, tail flexure, cardiac arrhythmias, and malformations of various structures and the tail. These findings demonstrate that *T. zypaquirensis* extracts exert a significant impact on the viability and early development of vertebrates, providing an essential scientific basis for dose regulation and the safe management of this species in future therapeutic applications.

Keywords: Essential oil, ethanolic extract, *Tagetes zypaquirensis*, teratogenic, toxicity, LC50, TC50.

Índice de contenido

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	1
1.1.1. Aplicaciones de <i>D. rerio</i> en ensayos biomédicos	2
1.1.2. Aplicación de <i>Tagetes zypaquirensis</i> en investigaciones de farmacológicas.....	3
1.2. PROBLEMA.....	4
1.3. JUSTIFICACIÓN	5
1.4. OBJETIVOS	8
1.4.1. GENERAL:.....	8
1.4.2. ESPECIFICOS	8
1.4.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	8
CAPITULO II	9
MARCO TEORICO	9
2.1. El género <i>Tagetes</i>	9
2.1.1. Clasificación y clave taxonómica de <i>Tagetes. Zypaquirensis</i>	9
2.2. Metabolitos secundarios.....	12
2.2.1. Terpenos	12
2.3. Bioactividad del género <i>Tagetes</i>	14
2.4. Pruebas de toxicidad en modelos animales	15
2.5. La OCDE como organismo regulatorio para la experimentación animal	16
2.6. Marco legal.....	17
CAPITULO III	20
MARCO METODOLÓGICO	20
3.1 Enfoque	20
3.2. Tipo de investigación	20
3.3. Diseño de investigación	20
3.4. Obtención de materia vegetal.....	21
3.5. Extracción del aceite esencial de <i>T. zypaquirensis</i> por hidrodestilación.....	21
3.6. Maceración etanólica de <i>T. zypaquirensis</i>	21
3.7. Elección del emulsificante	22
3.8. Preparación de las soluciones de estudio	22
3.8.1. Preparación de los tratamientos	23
3.9 . EJECUCIÓN DEL PRIMER OBJETIVO	24

3.9.1. Mantenimiento de peces cebra y producción de huevos fertilizados	24
3.9.2. Ensayo de toxicidad en embriones de <i>D. rerio</i>	25
3.9.3. Validación del Test.....	26
3.9.4 Evaluación del desarrollo embrionario.....	27
3.10. EJECUCIÓN DEL SEGUNDO OBJETIVO	28
3.10.1. Ensayo de toxicidad por exposición	28
3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
3.11.1. Primer objetivo.....	29
3.11.2. Segundo objetivo	29
3.12. EJECUCIÓN DEL TERCER OBJETIVO.....	29
CAPITULO IV	30
RESULTADOS	30
4.1. Adecuación de peceras	30
4.2. Elección del emulsificante	31
4.3. Validez del test.....	32
4.4. Pruebas de teratogenicidad - aceite esencial <i>T. zypaquirensis</i>	33
4.5. Pruebas de teratogenicidad – Extracto etanólico (EE) <i>T. zypaquirensis</i>	38
4.6. Pruebas de toxicidad aguda	39
4.7. Concentración Letal Media (CL50)	42
CAPITULO V.....	45
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
5.1. Conclusiones	45
5.2. Recomendaciones.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	47
ANEXOS.....	59

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>T. zypaquirensis</i>	9
Tabla 2. Grupo de compuestos del aceite esencial de <i>T. zypaquirensis</i>	11
Tabla 3. Composición química del aceite esencial de <i>T. zypaquirensis</i>	11
Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos del agua.....	24
Tabla 5. Parámetros de letalidad/Subletalidad en embriones de <i>D. rerio</i>	27
Tabla 6. Parámetros de letalidad/Subletalidad en especímenes juveniles <i>D. rerio</i>	28
Tabla 7. Condiciones fisicoquímicas del agua en el mantenimiento de <i>D. rerio</i>	30
Tabla 8. Criterios de validez para ensayos de toxicidad sobre <i>D. rerio</i>	33
Tabla 9. Porcentaje de letalidad: Aceite esencial.	33
Tabla 10. Efectos de teratogenicidad del aceite esencial de <i>t. zypaquirensis</i>	36
Tabla 11. Porcentaje de letalidad del extracto etanólico.	38
Tabla 12. LC50 de los extractos a 96 hpf de prueba.....	42

índice de figuras

Figura 1. Identificación de <i>Tagetes Zypaquirensis</i>	10
Figura 2. E- tagetona: (5E)-2,6-dimetil-octa-5,7-dien-4-ona.....	13
Figura 3. Preparación de los tratamientos mediante disoluciones a partir de un Stock.....	23
Figura 4. Esquema del diseño experimental en embriones.....	26
Figura 5. Ensayos de emulsión. A). Solución Stock usando DMSO, B). Solución Stock usando Tween 20.....	32
Figura 6. Efectos teratogénicos observados en <i>D. rerio</i>	41

Índice de gráficas

Gráfica 1 Relación Dosis-Respuesta en la teratogenicidad	38
Gráfica 2. Relación dosis-respuesta de letalidad en alevines de <i>D. rerio</i>	39
Gráfica 3. Relación dosis-respuesta de toxicidad en alevines de <i>D. rerio</i>	40
Gráfica 4. CL50 extracto etanólico de <i>T. zypaquirensis</i> : embriones	43
Gráfica 5. CL50 para el extracto etanólico de <i>T. zypaquirensis</i> : Alevines	43
Gráfica 6. CT50 para el extracto etanólico de <i>T. zypaquirensis</i> : Alevines	43

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

El reconocimiento de *Danio rerio* (pez cebra) como modelo animal se formalizó a finales de la década de 1960. Su empleo inicial se destacó en estudios pioneros dirigidos a la identificación de fenotipos recesivos derivados de genomas maternos (Haffter et al., 1996). Más tarde, durante la década de 1990, *D. rerio* alcanzó una notable popularidad, especialmente en investigaciones de genética del desarrollo. Estas investigaciones fueron cruciales al determinar la utilidad y viabilidad del pez cebra como modelo animal de vertebrados, identificando mutaciones específicas que impactan su proceso de embriogénesis (Driever et al., 1996; Haffter et al., 1996). A pesar de la extensa aplicación y los estudios genéticos previos, la secuenciación completa del genoma del pez cebra comenzó más tarde, en el año 2001, en el Instituto Wellcome Trust Sanger. Este esfuerzo ha permitido la caracterización de un genoma que comprende más de 26,152 genes codificadores de proteínas (Collins et al., 2012; Howe et al., 2013).

Para el año 2009, el proyecto EnsembleCompara GeneTrees desarrolló un sistema computacional para la predicción ortóloga en vertebrados. Mediante la aplicación del algoritmo BLAST y la generación de los árboles genéticos de Ensembl, este sistema reveló que al menos el 71.4% de los genes codificadores de proteínas en humanos poseen un gen ortólogo en el modelo animal *D. rerio*. Esta proporción se eleva significativamente hasta un 82% cuando se consideran exclusivamente los genes relacionados con enfermedades humanas, subrayando de manera enfática la relevancia del pez cebra como modelo para ensayos biomédicos, genéticos y biotecnológicos (Howe et al., 2013; Vilella et al., 2009). Bajo este contexto, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), en colaboración con el Consejo de la Unión Europea, estableció un conjunto de normativas que regulan el uso de la especie como

modelo de investigación. Estas directrices especifican los requisitos necesarios para validar los ensayos aplicados sobre *D. rerio*. La implementación de esta nueva regulación, junto con el conocimiento exhaustivo de su genoma, ha catalizado un aumento exponencial en el número de investigaciones, superando actualmente los 50,000 resultados indexados en repositorios clave como el NCBI (National Center for Biotechnology Information) y The Zebrafish Information Network (ZFIN).

En el ámbito nacional, la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) fue pionera en el establecimiento de un bioterio dedicado a la investigación con pez cebra en 2019, conocido como Bioterio para la Investigación en Peces Cebra (BIPC-PUCE). Este proyecto fue uno de los ganadores del concurso INÉDITA 2018-2023, organizado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (Senescyt) y el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo [PNUD] (Senecyt & PNUD, 2018). El BIPC-PUCE inició operaciones con un total de nueve cepas de *D. rerio*, facilitando el desarrollo de investigaciones en áreas críticas como la toxicología y la teratogénesis de compuestos vegetales bioactivos y contaminantes derivados de la industria minera, además de ensayos enfocados en la regeneración y proliferación celular. Posteriormente, la implementación de *D. rerio* como modelo animal de investigación ha sido adoptada por otras instituciones académicas relevantes, incluyendo la Universidad de Cuenca y la Universidad Central del Ecuador. En estas instituciones se ha investigado el efecto teratogénico de extractos alcohólicos derivados de especies vegetales como *Ruta graveolens* (Ruda), *Phyllanthus anisolobus* (Barbasco), *Lantana camara* (Lantana) y *Mimosa pudica* (Mimosa), evaluando su impacto sobre el desarrollo embrionario del pez cebra (Peralta et al., 2022).

1.1.1. Aplicaciones de *D. rerio* en ensayos biomédicos

La relevancia del pez cebra (*D. rerio*) en la investigación biomédica quedó establecida cuantitativamente en 2012, al ser objeto de estudio en aproximadamente 2,500 artículos

científicos. La utilidad de este modelo abarca una amplia gama de ensayos para la detección de enfermedades genéticas y estudios de ecotoxicidad, tales como los realizados por Sanchez-Olivares et al., (2021), donde se expusieron embriones e individuos adultos a concentraciones de arsénico inferiores a 0.05 mg L^{-1} para determinar la Concentración Letal Media (CL50) y analizar los efectos de este contaminante, prevalente en ambientes acuáticos, sobre su desarrollo. De igual modo, se ha investigado el efecto teratogénico de diversos pesticidas utilizados en actividades agrícolas, con el objetivo de establecer concentraciones letales e identificar alternativas de control (Cassar et al., 2020; Gonçalves et al., 2020; Hussain et al., 2020).

Además, en este contexto, *D. rerio* no ha sido utilizado únicamente para la evaluación de contaminantes ambientales, sino para el estudio toxicológico y farmacológico de extractos vegetales con potencial terapéutico. Estas investigaciones han determinado tanto la bioactividad como la CL50 de los componentes presentes en extractos de especies como *Ruta graveolens* (ruda), *Phyllanthus anisolobus* (barbasco), *Allophylus edulis* (chal-chal), *Matricaria recutita* (manzanilla) y *Cornus capitata* (cornejo del Himalaya), entre otras (Adeyemi et al., 2015; Modarresi Chahardehi et al., 2020; Tewari et al., 2025), abriendo paso al estudio de bioactividad y posible toxicidad de otras especies vegetales, tales como *T. zypaquirensis* y su posible aplicación farmacológica.

1.1.2. Aplicación de *Tagetes zypaquirensis* en investigaciones de farmacológicas

Álvarez et al., (2015), Castillo & Panamá, (2023) y Tapia, (2012) en sus estudios sobre la evaluación de la bioactividad de *T. zypaquirensis* demostraron su potencial como agente nematicida sobre nematodos *Meloidogyne spp* y antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus* (Bsa.P+) -(ATCC 6538), *Escherichia coli* (*E.coli*WBLEE)-(ATCC 9637), *Pseudomonas aeruginosa* (PAE)-(ATCC 27853), *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231 respectivamente.

Actualmente, existe una limitación en la información disponible respecto a otros

estudios toxicológicos o de bioactividad específicos que involucren a *T. zypaquirensis*. Sin embargo, la investigación con otras especies del género *Tagetes* ha revelado un significativo potencial bioactivo, que incluye efectos antimicrobianos, antimicóticos, antiinflamatorios, antioxidantes, nematicida y, en algunos casos, un posible efecto antitumoral (Kannan et al., 2024; Siddiqa et al., 2025; Taype-Landeo et al., 2021). Esta evidencia indirecta sugiere un campo prometedor para la exploración de *T. zypaquirensis*, permitiendo caracterizar tanto los efectos embriotóxicos, teratogénicos y citotóxicos en modelos complejos como *D. rerio* y su posterior aplicación en la industria farmacéutica, aportando evidencia científica respecto a la seguridad y potencial farmacológico del extracto.

1.2. PROBLEMA

El desarrollo de la industria química, alimentaria y farmacéutica depende significativamente del suministro de compuestos bioactivos derivados de extractos o aceites esenciales vegetales. Estos productos naturales son cruciales en la búsqueda de soluciones a desafíos sanitarios globales, como la emergencia de la resistencia antimicrobiana y la necesidad de nuevas farmacoterapias. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 40 y el 90% de la población mundial, sobre todo sus estados miembros, recurren a la medicina tradicional basada en plantas para la atención primaria de salud, lo cual evidencia su relevancia terapéutica (Organización de las Naciones Unidas, 2025). No obstante, esta popularidad global plantea una preocupación crítica en salud pública: el uso empírico, indiscriminado o no regulado de extractos vegetales y el desconocimiento de los potenciales efectos a largo plazo, la toxicidad crónica y las interacciones farmacológicas con compuestos sintéticos (Organización Mundial de la Salud, 2013, 2025; Oyeboode et al., 2016).

A pesar de los avances en la investigación de productos naturales, muchas de las evaluaciones toxicológicas y farmacológicas de estos compuestos se realizan en modelos *in vitro*, los cuales, si bien ofrecen datos preliminares valiosos, son insuficientes para predecir

con precisión la respuesta de un organismo complejo. Las respuestas fisiológicas, metabólicas e inmunológicas en un entorno celular aislado no siempre reflejan la realidad de un sistema biológico completo, como el de los seres humanos. Por ello, se vuelve indispensable el uso de modelos animales bien caracterizados, que permitan observar posibles alteraciones morfológicas, celulares, moleculares o bioquímicas en un entorno *in vivo*, proporcionando una base de evidencia científica sólida para validar o descartar el uso seguro de compuestos bioactivos vegetales.

Por otro lado, el empleo de modelos animales en la investigación científica plantea sus propios desafíos, tanto éticos como logísticos. Las preocupaciones sobre el bienestar animal, el sufrimiento innecesario y la obligación moral de minimizar el daño han llevado a un debate constante en la comunidad científica, lo que subraya la necesidad de encontrar un equilibrio entre la búsqueda de avances científicos y el respeto hacia el bienestar animal (Organización Mundial Sanidad animal, 2023).

1.3. JUSTIFICACIÓN

Tagetes zypaquirensis, una planta de la familia Asteraceae nativa de regiones andinas de Sudamérica, ha sido objeto de numerosos estudios que han revelado sus significativas propiedades medicinales. Sus extractos contienen compuestos bioactivos como flavonoides y terpenoides, conocidos por su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana (Álvarez et al., 2015; Barrera et al., 2009; Salehi et al., 2018a; Taype-Landeo et al., 2021). El potencial antioxidante es crucial para mitigar el estrés oxidativo asociado a diversas patologías, mientras que las propiedades antiinflamatorias ofrecen una vía para el tratamiento de enfermedades crónicas. En el ámbito biomédico, los extractos del género *Tagetes* han demostrado un efecto antimicrobiano frente a múltiples patógenos y un prometedor potencial agente anticancerígeno al inducir la apoptosis selectiva en células tumorales sin afectar la viabilidad celular normal (Salehi et al., 2018a). Este perfil fitoquímico

posiciona a la planta como un candidato valioso para el desarrollo de nuevos antibióticos naturales y terapias alternativas a las ya existentes. Sin embargo, la aplicación clínica segura y efectiva de estos extractos requiere la realización de estudios exhaustivos de toxicidad y farmacocinética (Singh et al., 2024).

La evaluación de la toxicidad de principios activos, tanto de fitofármacos como de compuestos de la industria química general, constituye un paso obligatorio en el desarrollo de nuevos medicamentos. La validación de estos compuestos exige el uso de modelos animales vertebrados para determinar los efectos adversos de su administración (Linares Márquez & Jiménez Capriles, 2023).

Una de las estrategias para la evaluación toxicológica de estos compuestos es el uso de modelos animales para determinar los efectos adversos de su administración. Bajo este contexto, el pez cebra se destaca como una opción altamente viable debido a la alta relación ortóloga entre la información genética que comparte con los seres humanos, lo que permite extrapolar los resultados obtenidos en el modelo animal hacia individuos mucho más complejos (Crouzier et al., 2021; Teame et al., 2019).

En este contexto, el pez cebra se destaca como un modelo preclínico altamente eficiente, teniendo en cuenta los siguientes factores clave:

1. **Homología Genética:** La alta relación ortóloga entre el genoma de *D. rerio* y el humano permite una extrapolación rigurosa de los resultados obtenidos en el modelo a sistemas biológicos más complejos (Crouzier et al., 2021).
2. **Alineación Ética y Logística:** Su tamaño reducido, elevada fecundidad, facilidad de manejo y rápido desarrollo ofrecen una alternativa más económica y eficiente en comparación con modelos murinos, logrando una estricta adhesión a los principios de Reemplazo, Reducción y Refinamiento (3R) en la investigación animal (da Silva et al., 2023; Lammer et al., 2009)

3. **Transparencia *In Vivo*:** La transparencia de los embriones de *D. rerio* en etapas tempranas posibilita la observación directa y en tiempo real del progreso de los efectos tóxicos o los cambios inducidos por la exposición a compuestos activos, fármacos y contaminantes (Teame et al., 2019).
4. **Plataforma Teratogénica:** Su rápido desarrollo embrionario lo convierte en una plataforma ideal para evaluar la teratogénesis y predecir mecanismos de acción-respuesta, facilitando la predicción de efectos en grupos vulnerables como mujeres gestantes, recién nacidos y población infantil (Adeyemi et al., 2015).

En Ecuador, las investigaciones sobre extractos vegetales con potencial biomédico son de gran relevancia, dada la vasta biodiversidad local. La incorporación del modelo *D. rerio* en estas investigaciones es esencial para la determinación precisa de los efectos beneficiosos y tóxicos de los compuestos bioactivos (Teame et al., 2019). Instituciones como la Universidad de Cuenca han implementado activamente el uso del pez cebra en el estudio de plantas endémicas, promoviendo así la valoración de los recursos naturales del país y la apertura de nuevas vías para el desarrollo de nuevos posibles fármacos. En conclusión, la integración de *D. rerio* como modelo experimental para investigar la toxicidad de extractos derivados de *T. zypaquirensis*, representa un avance fundamental en la biomedicina ecuatoriana. Este enfoque no solo optimiza la comprensión de los efectos de los compuestos naturales bajo un marco ético riguroso, sino que también eleva la calidad y el impacto de la investigación en la región, contribuyendo al desarrollo de soluciones terapéuticas seguras basadas en la riqueza fitoquímica nacional

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. GENERAL:

- Evaluar los efectos toxicológicos de los extractos de *T. zypaquirensis* en dos etapas de desarrollo de *Danio rerio*.

1.4.2. ESPECIFICOS

- Establecer la dosis mínima tóxica y la DT50 del extracto de *T. zypaquirensis* sobre el desarrollo embrionario del modelo animal *D. rerio*
- Determinar la toxicidad aguda de los extractos de *T. zypaquirensis* sobre ejemplares juveniles del pez cebra.
- Estandarizar un protocolo para ensayos de toxicidad aguda en ejemplares del modelo animal *D. rerio*

1.4.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuál es la concentración máxima tolerada de los extractos vegetales de *T. zypaquirensis* sobre el modelo animal *Danio rerio* y qué no producen efectos negativos sobre su desarrollo?
- ¿Qué efectos toxicológicos presentan los extractos vegetales de *T. zypaquirensis* sobre el desarrollo embrionario y viabilidad de *Danio rerio*?

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. El género *Tagetes*

El género *Tagetes*, perteneciente a la familia Asteraceae, es originaria de América del Sur y Centroamérica y comprende aproximadamente 56 especies. En condiciones naturales, las plantas de este género crecen en climas templados-tropicales con temperaturas que oscilan desde los 14 °C a los 28.6 °C, así como en ambientes que propicien de un suelo fértil con un pH ligeramente alcalino (Salehi et al., 2018a) adicionalmente, las plantas del género *Tagetes* han sido utilizadas en la medicina popular debido a sus propiedades medicinales. Diversos estudios han mostrado su potencial como agente antimicrobiano, nematocida, antiinflamatorio, antioxidante, neuroprotector y antiartrítico, estas bioactividades se encuentran atribuidas por la presencia de diferentes metabolitos secundarios: flavonoides, cumarinas y terpenos (Ibrahim et al., 2018; Riaz et al., 2020a).

2.1.1. Clasificación y clave taxonómica de *Tagetes. Zypaquirensis*

La taxonomía es una rama de la ciencia que se encarga de clasificar a los seres vivos en diferentes categorías jerárquicas y tiene como objetivo la organización de la diversidad biológica existente: organismos y microorganismos (Moore et al., 2010). La tabla 1 detalla la jerarquía taxonómica de la planta de estudio.

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de T. zypaquirensis

Jerarquía taxonómica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales

Familia	Asteraceae
Género	<i>Tagetes</i>
Especie	<i>Tagetes zypaquirensis</i>

La clave taxonómica para la identificación y recolección de *T. zypaquirensis* (Figura 1) es: arbustos de hasta 80 cm de altura y olor agradable, tallos delgados con múltiples ramificaciones que terminan en flores amarillas con 8 pétalos, semillas negras similares a las de un comino y hojas con bordes irregulares (Castillo & Panamá, 2023).

Figura 1.

Identificación de Tagetes Zypaquirensis



2.1.2. Caracterización química del Aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis*

La caracterización química consiste en identificar y cuantificar los componentes químicos (Metabolitos secundarios) presentes en los aceites esenciales con el fin de conocer su biocompatibilidad con otros compuestos y su potencial bioactivo (Dima & Dima, 2015), lo cual, representa un punto crítico para el desarrollo de pruebas de toxicidad en modelos animales. Por ello, es necesario conocer todos los componentes del AE con el fin de poder profundizar en los resultados del ensayo y atribuirlos a los mismo. La Tabla 2 describe los

compuestos representativos del AE extraído, siendo los más representativos los monoterpenos oxigenados con un 96.4% (Castillo y Panamá, 2023).

Tabla 2.

Grupo de compuestos del aceite esencial de T. zypaquirensis

Grupo de compuestos		Abundancia relativa (%)	±	SD (%)
Hidrocarburos monoterpénicos	mh	1.30	±	0.04
Monoterpenos oxigenados	om	94.60	±	0.31
Hidrocarburos sesquiterpénicos	sh	0.60	±	0.09
Sesquiterpenos oxigenados	os	0.50	±	0.03
Otros derivados no terpénicos	nt	0.40	±	0.00
Identificación total (%)		97.30	±	0.23

Nota: mh: (hidrocarburos monoterpénicos), om: (monoterpenos oxigenados), sh: (hidrocarburos sesquiterpénicos), nt: (compuestos no terpénicos)

A su vez, Castillo y Panamá (2023), en su estudio de caracterización por método de cromatografía de gases establecen una lista más detallada de los compuestos presentes en el AE de *T. zypaquirensis*, mismos que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.

Composición química del aceite esencial de T. zypaquirensis

Compuestos	l.r.i.	Clase	Abundancia relativa (%)	±	SD (%)
(E)-tagetenona	1240	om	44.5	±	0.04
(Z)-tagetenona	1231	om	16.9	±	0.10
(Z)-tagetona	1153	om	16.8	±	0.22
Dihidrotagetona	1051	om	11.4	±	0.18
verbenona	1210	om	2.0	±	0.20

(Z)- β -ocimeno	1036	mh	1.3	\pm	0.04
isopiperitenona	1271	om	1.1	\pm	0.02
(E)-tagetona	1144	om	1.1	\pm	0.01
biciclogermacreno	1496	sh	0.6	\pm	0.09
α -terpineol	1191	om	0.4	\pm	0.01
Ácido 2-butenoico, 2-metil-,2-metil-2- propenil éster, (E)- globulol	1115	nt	0.4	\pm	0.00
1583	os	0.3	\pm	0.03	
4-Hidroxi- β - ciclocitral	1431	om	0.2	\pm	0.02
espatulenol	1577	os	0.1	\pm	0.01
(Z)-miróxido	1132	om	0.1	\pm	0.01
1,8-cineol	1031	om	0.1	\pm	0.00

Nota: I.r.i: (índice de retención lineal), Clase: (Grupo de compuesto), SD: (Error estándar).

2.2. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son sustancias que, aunque no son fundamentales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, tienen funciones importantes en la defensa contra patógenos, en la interacción con otros organismos y en la adaptación a diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, no son esenciales para la supervivencia de la misma, ni está involucrada con sus mecanismos metabólicos primarios (Tholl, 2015).

En el caso de *T. zypaquirensis*, se han identificado en varios estudios a los flavonoides y terpenos como los metabolitos clave que contribuyen a sus actividades biológicas.

2.2.1. Terpenos

Los terpenos son compuestos orgánicos formados por unidades de isoprenos (hidrocarburos con 5 átomos de carbono). Estos metabolitos poseen una amplia gama de

bioactividades entre los que se incluyen como agentes antimicrobianos, neuroprotectores y antiartríticos (Lopez et al., 2012)

2.2.1.1. Monoterpenos oxigenados

Entre los terpenos, los monoterpenos son el grupo más pequeño representados por una sola unidad de isopreno (5 átomos de Carbono), volviéndolo un compuesto altamente volátil (Tholl, 2015). El grupo de los monoterpenos comprende varios subgrupos como los acíclicos, los mono, bi y tricíclicos, así como los hidrocarburos monoterpénicos oxigenados

Los monoterpenos oxigenados son aquellos monoterpenos que poseen en su estructura química un átomo de oxígeno, como el caso del linalol, mentol, el geraniol y la tagetona o tagetenona.

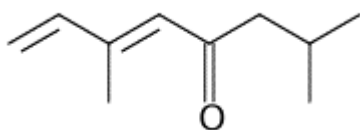
2.2.1.1.1 E- tagetenona

La E- tagetona, perteneciente al grupo de cetonas monoterpenos acíclicos (monoterpeno oxigenado- Figura 2) es un componente principal del aceite esencial en especies vegetales del género *Tagetes*, como se ha reportado en varios estudios de tamizaje fitoquímico realizado en diferentes especies (Riaz et al., 2020b; Salehi et al., 2018a; Torres-Martínez et al., 2022)

La presencia de este metabolito, sobre todo en aceites esenciales de flores y hojas de estas especies, es muy importante para llevar a cabo estudios de toxicidad por su efecto biológico en el control de algunas plagas del género *Coleoptera* y *Tenebrionidae*, así como de algunas enfermedades inflamatorias, neurodegenerativas e hipertensión ((Riaz et al., 2020b; Stefanazzi et al., 2006; Zanovello et al., 2021; Zavala-Ocampo et al., 2022).

Figura 2.

E-tagetona: (5*E*)-2,6-dimetil-octa-5,7-dien-4-ona



2.2.2. Flavonoides

Estos compuestos son reconocidos por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Los flavonoides contrarrestan los radicales libres, salvaguardando las células del daño causado por la oxidación. También regulan las vías de señalización celular relacionadas con la inflamación, disminuyendo la generación de mediadores inflamatorios (Wang et al., 2023).

2.3. Bioactividad del género Tagetes

La bioactividad de un compuesto natural se refiere a su capacidad para interactuar con organismos vivos y producir un efecto biológico (Stefanazzi et al., 2006). Por lo tanto, puede aplicarse a diferentes áreas del conocimiento como la química, medicina y farmacología.

2.3.1. Antimicrobiano

Es la capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento de microorganismos procariontes como las bacterias (Torres-Martínez et al., 2022).

2.3.2. Nematicida

Tipo de pesticida o agente capaz de producir un efecto destructivo para la eliminación de parásitos nemátodos (Aynar et al., 2017).

2.3.3. Antioxidante

Es la capacidad de una sustancia para atrapar y neutralizar los radicales libres y prevenir el daño oxidativo en las células (Benítez-Estrada et al., 2020).

2.3.4. Antiinflamatoria

Es la capacidad de una sustancia para reducir la inflamación causada por la generación de algún tipo de daño celular o de los tejidos, bloqueando ciertos agentes o rutas que pueden generar inflamación (Estrada et al., 2011).

2.4. Pruebas de toxicidad en modelos animales

Los ensayos toxicológicos en peces son fundamentales para evaluar el impacto de contaminantes en los ecosistemas acuáticos. Estos estudios permiten determinar la toxicidad de diversas sustancias mediante la observación de efectos adversos en organismos acuáticos bajo condiciones controladas.

2.4.1. Tipos de Ensayos de toxicidad

Los ensayos de toxicidad se clasifican principalmente en agudos y crónicos:

- **Ensayos de toxicidad aguda:** Evalúan los efectos letales o subletales de una sustancia en un corto período, generalmente entre 24 y 96 horas. Estos ensayos determinan la concentración letal media (CL_{50}), que es la concentración de una sustancia que causa la muerte del 50% de los organismos expuestos.
- **Ensayos de toxicidad crónica:** Se enfocan en los efectos a largo plazo de exposiciones a bajas concentraciones de contaminantes, evaluando parámetros como crecimiento, reproducción y comportamiento.

2.4.2. Efectos de la Toxicidad Aguda en Peces

La exposición aguda a contaminantes puede provocar una variedad de efectos adversos en peces, dependiendo del tipo de sustancia y su concentración:

- **Metales pesados:** El cadmio puede causar deformaciones esqueléticas y daño renal en peces. El mercurio deteriora las branquias y causa pérdida de equilibrio, mientras que el plomo afecta el sistema hematológico y neurológico. El arsénico afecta parámetros hematológicos, bioquímicos e ionoregulatorios, con bioacumulación en hígado y riñón. (Sanchez-Olivares et al., 2021)
- **Pesticidas:** El fipronil, un insecticida, ha mostrado una CL_{50} de 0,08 mg/L en *Poecilia reticulata*, provocando hiperexcitación, letargia y nado errático. El glifosato, un

herbicida, presentó una CL_{50} de 3,14 mg/L en la misma especie, con alteraciones en el patrón de nado (Gonçalves et al., 2020; Hussain et al., 2020)

- Efluentes industriales: Estudios con *Gambusia affinis* expuestos a efluentes industriales mostraron una CL_{50} de aproximadamente 15 mg/L, indicando alta letalidad. (Gonçalves et al., 2020)

2.4.3. Importancia de los Ensayos Toxicológicos

Estos ensayos son esenciales para:

- Evaluar la calidad del agua y detectar la presencia de contaminantes.
- Establecer límites permisibles de sustancias tóxicas en cuerpos de agua.
- Desarrollar estrategias de mitigación y políticas ambientales para proteger la biodiversidad acuática.

La selección de especies bioindicadoras, como *Danio rerio*, *Poecilia reticulata* y *Gambusia affinis*, es crucial debido a su sensibilidad a contaminantes y facilidad de manejo en laboratorio.

2.5. La OCDE como organismo regulador para la experimentación animal

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) juega un papel crucial en la regulación de la experimentación animal a nivel internacional. La OCDE ha desarrollado una serie de directrices y principios que buscan armonizar las prácticas de investigación con animales entre sus países miembros, promoviendo así estándares altos de bienestar animal y calidad científica.

2.5.1. Guías de la OCDE

Las guías de la OCDE, tales como las contenidas en el Manual sobre el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, proporcionan directrices detalladas sobre:

- **Diseño experimental:** Cómo diseñar estudios que proporcionen datos fiables mientras se minimiza el uso de animales.

- **Cuidado y manejo de animales:** Procedimientos para el manejo adecuado de los animales de laboratorio para asegurar su bienestar.
- **Evaluación y mitigación del dolor:** Estrategias para evaluar y reducir el dolor y el sufrimiento de los animales durante los experimentos.

2.5.2. Cumplimiento de Normativas Internacionales

Las guías de la OCDE exigen que todos los países implementen políticas nacionales que reflejen las mejores prácticas internacionales. Esto incluye la creación de comités de ética en investigación, programas de capacitación para el personal involucrado y mecanismos de monitoreo para asegurar el cumplimiento de las normativas.

La formación de comités de ética en investigación es un pilar fundamental en la implementación de normativas internacionales. Estos comités están encargados de revisar y aprobar los protocolos de investigación, asegurando que se cumplan los estándares éticos y legales. Además, garantizan que los estudios se realicen de manera responsable y respetuosa con los sujetos de investigación, ya sean humanos o animales. La OCDE enfatiza la importancia de la transparencia y la rendición de cuentas en todas las etapas del proceso de investigación.

2.6. Marco legal

La investigación científica que emplea animales como modelos experimentales debe regirse por estrictas normativas legales y éticas para asegurar el bienestar animal y la validez científica de los estudios. En Ecuador, estas normativas están en consonancia con las directrices internacionales, incluyendo las establecidas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, también conocida como OIE), poniendo énfasis en las tres R: reemplazo, reducción y refinamiento, con el objetivo de minimizar el uso de animales y mejorar las condiciones de los experimentos (Organización Mundial Sanidad animal, 2023).

La experimentación *in vivo* en Ecuador está regulada por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (Agrocalidad), la cual, promueve la protección de la naturaleza y garantiza la integridad, mantenimiento y bienestar de los animales, supervisando y controlando las actividades de investigación, conforme a lo establecido en el artículo 71 de la Constitución de la República del Ecuador de 2008.

En el ámbito de las normas de producción orgánica, específicamente el artículo 9, se reconoce a los animales no humanos como sujetos de derechos que los protegen contra todo tipo de maltrato y explotación, así como a una muerte digna, instantánea e indolora, por lo cual, toda acción innecesaria que atente contra este derecho será sancionada con base en el artículo 249 del Código Orgánico Integral Penal (COIP, 2021)

“Cualquier infracción cometida sobre los derechos animales serán sancionados con una pena preventiva de libertad de 2 a 12 meses”.

El artículo 244 del Reglamento General de la Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria establece que el uso de animales en actividades de investigación, educación o culturales debe seguir los lineamientos internacionales de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), según el capítulo 7.8 del Código Sanitario para Animales Terrestres. Estos lineamientos incluyen la aplicación de la regla de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento), el establecimiento de un marco de supervisión, la evaluación ética, la garantía de formación y competencia del personal, el origen de los animales y la atención veterinaria (Código Sanitario para Animales Terrestres, 2023; OMSA, 2023).

Asimismo, el artículo 247 del mismo reglamento exige que las instituciones y empresas que utilicen animales para estos fines formen un comité de ética conforme a las directrices de Agrocalidad. Este comité debe estar integrado por un equipo multidisciplinario que incluya científicos con experiencia en investigación animal, veterinarios y un miembro de la comunidad sin vinculación directa con la ciencia. Este equipo es responsable de revisar

detalladamente las propuestas de investigación, evaluando tanto el lugar donde se realizarán los estudios como el cumplimiento de los estándares éticos (Código Sanitario para Animales Terrestres, 2023)ás, de la revisión inicial de las propuestas, el comité de ética debe asegurar que el personal involucrado en la investigación esté adecuadamente capacitado en el manejo y cuidado de los animales. Esto garantiza que todos los procedimientos se realicen de manera ética y conforme a las normativas vigentes, protegiendo el bienestar de los animales y asegurando la integridad científica de los estudios.

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Enfoque

La presente investigación tiene un enfoque cuantitativo, ya que se buscó medir de forma objetiva y sistemática los efectos toxicológicos del extracto vegetal de *T. zypaquirensis* sobre el modelo animal *D. rerio*, a través de la cuantificación de variables biológicas como la tasa de supervivencia, frecuencia de malformaciones, movilidad, entre otras. Este enfoque permite el uso de herramientas estadísticas para el análisis de datos, su correcta validación y replicabilidad (Hernández, 2014).

3.2. Tipo de investigación

Este estudio es de nivel correlacional, que busca identificar las relaciones causales entre la exposición a distintos extractos vegetales y las respuestas fisiológicas y morfológicas del modelo animal *Danio rerio*.

Si bien en una primera instancia se requiere una fase exploratoria para determinar posibles principios activos con efectos tóxicos, y posteriormente una fase descriptiva para registrar y caracterizar sistemáticamente los efectos observados (malformaciones, letalidad o alteraciones en la conducta locomotora), el objetivo final de esta investigación es relacionar estos efectos según la concentración y tipo de extracto administrado. Por ello, el análisis de los resultados se orientará a establecer relaciones causa-efecto, apoyado en el control de variables, el diseño experimental riguroso y la aplicación de pruebas estadísticas.

3.3. Diseño de investigación

Para el cumplimiento de ambos objetivos se realizaron 2 diseños experimentales:

Objetivo 1.- Se utilizó un Diseño completamente aleatorizado (DCA) tomando en cuenta las concentraciones usadas en cada uno de los tratamientos, así como sus respectivos controles.

Objetivo 2.- Se utilizó un Diseño de Parcela Dividida (DPD), siendo el tipo de extracto la parcela principal y su concentración como la subparcela dentro del estudio.

La asignación de unidades experimentales se menciona en el análisis estadístico.

3.4. Obtención de materia vegetal

El muestreo de *Tagetes zypaquirensis* se realizó en la provincia de Imbabura, cantón Ibarra, parroquia Angochagua, sector Zuleta, coordenadas: -78.09445, 0.22135

3.4.1 Preparación de la muestra vegetal

Se utilizaron únicamente las hojas de la planta como fuente del aceite esencial y para el extracto etanólico (EE) de *T. zypaquirensis*. En ambos casos, se lavaron las muestras con agua corriente y secaron bajo sombra durante 28 horas a temperatura ambiente ($24\pm 1^\circ\text{C}$) hasta llegar a un máximo del 10% de humedad relativa. Finalmente, la materia vegetal se trituró y se pesó en un analizador de humedad marca Radwag, para determinar el correcto porcentaje de humedad de la materia vegetal después del secado (Casado, 2018).

3.5. Extracción del aceite esencial de *T. zypaquirensis* por hidrodestilación

La extracción del aceite esencial se llevó a cabo usando la técnica de hidrodestilado con la trampa de Clevenger y siguiendo el protocolo estandarizado JB01 en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Técnica del Norte (Anexo 1). Para su desarrollo se pesó 25 g de materia vegetal seca y previamente triturada, se colocó dentro del balón de destilación y se adicionó 500 mL de agua destilada a una temperatura de 96°C durante 2 horas.

Al final del proceso, el aceite esencial obtenido se almacenó en un frasco ámbar cubierto de papel aluminio a 4°C .

3.6. Maceración etanólica de *T. zypaquirensis*

Se pesó 100 g de hojas secas y trituradas y se humectaron con 500 mL de etanol al 96% dentro de un matraz, se selló herméticamente y maceró durante un período de 7 días en oscuridad

y a una temperatura de 25 ± 1 °C. Posteriormente, el extracto se filtró usando filtros Whatman de 22 μm y se concentró a sequedad utilizando un rotavapor, a 40°C, 300 rpm y 175 mbar, durante un periodo de 45 minutos (Alves-Pimenta et al., 2024; Roca et al., 2009).

Por último, el extracto fue liofilizado a - 40 °C durante un tiempo de 48 horas y transferido a un frasco de tapa rosca y se almacenó en un refrigerador a 4°C (Tapia, 2012).

3.7. Elección del emulsificante

Para realizar las pruebas de toxicidad es necesario que el AE de *T. zypaquirensis* se mezcle con el medio embrionario EA2 (medio acuoso); para lo cual se prepararon 5 microtubos donde cada uno contenía 100 μL de medio embrionario EA2, 100 μL del AE puro y 100 μL de una solución de DMSO (Dimetilsulfóxido) al 96%, 75%, 50%, 25% y 0.01% respectivamente. Las soluciones de DMSO se prepararon previamente diluyéndolo en agua destilada estéril.

Adicionalmente, se prepararon otros 5 microtubos que contenían los 100 μL del medio EA2 y 100 μL del AE puro, más 100 μL del tensioactivo Tween 20 a las mismas concentraciones utilizadas en el DMSO. Por otro lado, el extracto liofilizado de *T. zypaquirensis* se disolvió en 100 μL de DMSO al 0.01% disuelto en medio EA2.

Finalmente, todos los tubos se mezclaron en el vórtex en 4 ciclos de 60 segundos con un reposo de 10 segundos entre ciclos y se homogenizaron usando ultrasonificación durante 4 ciclos de 10 minutos con un reposo de 1 minuto entre ciclos, hasta obtener una emulsión visualmente homogénea.

3.8. Preparación de las soluciones de estudio

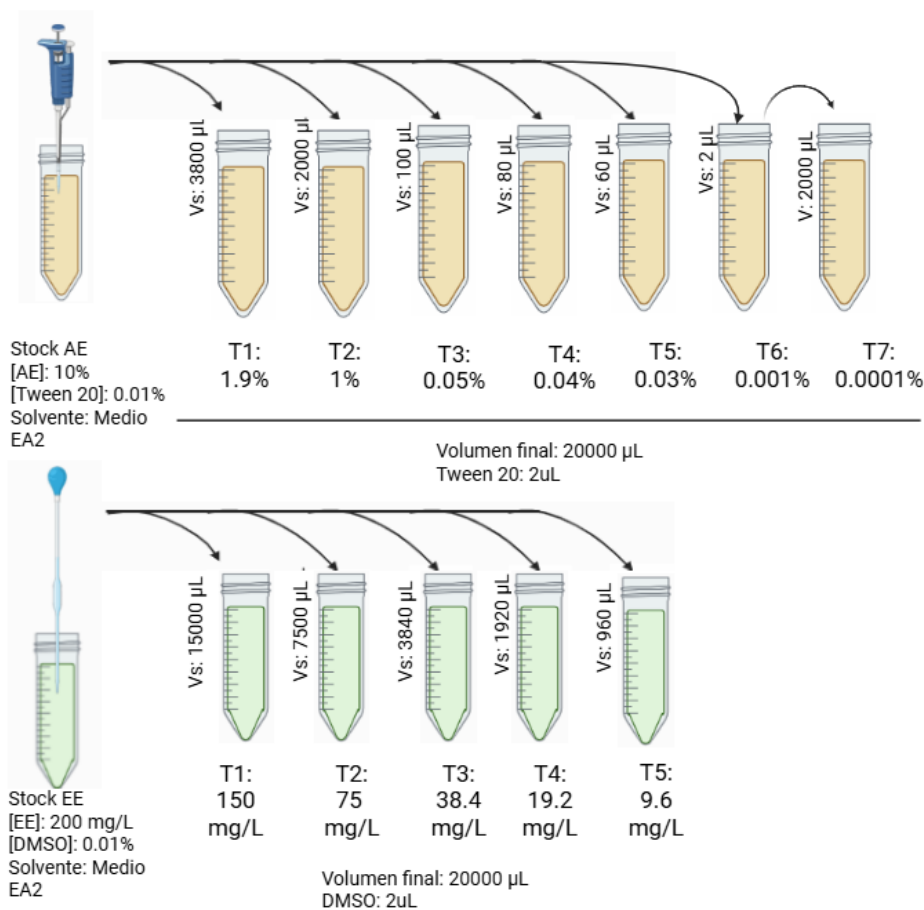
Las soluciones stock compuestas por aceite esencial o el extracto etanólico liofilizado de *T. zypaquirensis* se prepararon con base en los resultados de las pruebas de emulsificantes, siendo la primera una mezcla homogénea de AE [10%] + Medio embrionario EA2 + Tween 20 [0.01%] y la segunda el EE [200 mg/L] + Medio embrionario EA2 + DMSO [0.01%].

3.8.1. Preparación de los tratamientos

Partiendo de las soluciones stock [10% AE y 200 mg/L EE], se realizaron distintas diluciones (Figura 3), utilizando medio embrionario EA2 como solvente, hasta llegar a las concentraciones requeridas para el ensayo: 1.9%, 1%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.001% y 0.0001% del AE (Castillo & Panamá, 2023) y una concentración de 9.6, 19.2, 38.4, 75.0 y 150 mg/L e inferiores para el extracto etanólico (Herrera & Sandoval, 2019a). El porcentaje de Tween y DMSO se mantuvo a una concentración máxima de 0,01% en solución, disolviéndolo en medio el embrionario.

Figura 3.

Preparación de los tratamientos mediante disoluciones a partir de un Stock



3.9 . EJECUCIÓN DEL PRIMER OBJETIVO

3.9.1. Mantenimiento de peces cebra y producción de huevos fertilizados

Para obtener embriones viables, se empleó una población de peces adultos en fase reproductiva, criados en condiciones controladas de laboratorio (Tabla 4), libres de cualquier indicio de infección o enfermedad. Todos los especímenes fueron mantenidos en peceras con agua libre de cloro y una temperatura interna de 26 ± 1 °C. Todos los parámetros fisicoquímicos del agua en las peceras se monitorearon regularmente y se ajustaron según los estándares establecidos por la OCDE- DOC236: Ensayo de toxicidad aguda en embriones de pez cebra (FET), tal y como se mencionan en la Tabla 4 (Peralta et al., 2022).

Tabla 4.

Parámetros fisicoquímicos del agua de mantenimiento de Danio rerio.

Parámetros fisicoquímicos	Rango
Variables de control diaria	
pH	6.5-8.5
Conductividad	300-1000 μ S/cm
Oxígeno disuelto	6-6.5 mg/L
Temperatura	26 ± 1 °C
Variables de control semanal	
Amonio	< 0,02 mg/L
Nitrito	< 0,01 mg/L
Nitrato	< 50 mg/L
Dureza total	30-35 mg/L

Una vez identificados los peces adultos en su fase reproductiva (8-12 semanas de vida: presentan un incremento en su actividad e interacciones con otros peces en las horas de luz, y las hembras presentan un vientre más redondo y voluminoso), se separaron en peceras exclusivas para el desove, equipadas con una malla de poliestireno previamente desinfectada y provistos de un sistema de filtración e iluminación conforme al protocolo establecido en las

instalaciones: Filtración por esponjas activas y fotoperiodo de 14 horas luz-10 oscuridad. Se mantuvieron los parámetros fisicoquímicos descritos en la Tabla 4.

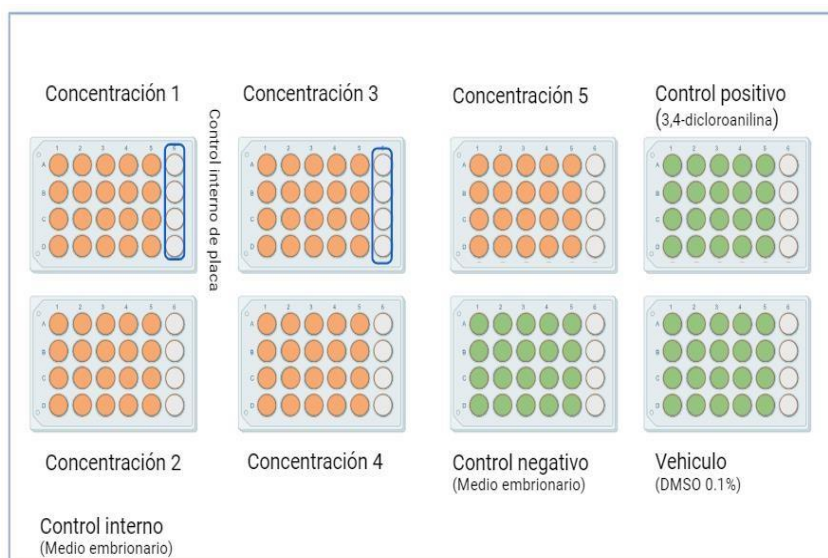
La recolección de los embriones se realizó luego de una hora después del desove, durante el inicio del período de iluminación. Posteriormente, se examinó la viabilidad de los embriones utilizando un estereomicroscopio [Olympus SZ61] y se eliminaron aquellos que no estaban fecundados o no eran viables (desarrollo anormal, corion roto, presencia de coagulación), se desinfectaron tal y como se describe en el Anexo 2, y finalmente, se colocaron en cajas Petri estériles junto con 25mL medio embrionario EA2 a 27 ± 1 °C durante un máximo de 2 horas.

3.9.2. Ensayo de toxicidad en embriones de *D. rerio*

El ensayo se realizó utilizando embriones fecundados, previamente desinfectados con una solución de hidróxido de sodio a 40ppm y azul de metileno 1%, en una etapa previa a la blastulación a las 2 horas post fecundación (hpf). Para ello, con ayuda de una pipeta Pasteur, se tomaron uno a uno los embriones y se colocó un embrión por cada pocillo, en placas de 24 pocillos, previamente acondicionadas durante 24 horas con cada una de las concentraciones, mismo medio que fue sustituido con 1mL de cada tratamiento antes de comenzar el ensayo. La distribución del ensayo se realizó tomando 14 embriones por cada tratamiento. Además, de los controles positivo, negativo, el control de solvente y un control interno de placa (Figura 4).

Figura 4.

Esquema del diseño experimental en embriones



Como control positivo se utilizó el reactivo 3,4-dicloroanilina a una concentración de 40 mg/L, medio embrionario EA2 como control negativo y una solución de DMSO 0.01% como control de solvente según lo establecido por la OCDE.

Finalmente, todos los embriones se observaron bajo el estereomicroscopio y microscopio invertido a las 24, 48, 72 y 96 horas después de aplicado el respectivo tratamiento.

3.9.3. Validación del Test

La OCDE determina los siguientes criterios de validación para ensayos de toxicidad en embriones:

- La tasa global de fecundación de todos los huevos recogidos deberá ser mayor o igual que el 70% en el lote sometido a ensayo,
- La temperatura del agua debe mantenerse a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ en los recipientes de ensayo durante toda su duración,
- La tasa global de supervivencia de los embriones en el control negativo (agua de dilución) y, si procede, el disolvente deberá ser mayor o igual que el 90% hasta el final del período de exposición de 96 horas,

- La exposición al control positivo (3,4-dicloroanilina para el pez cebra) deberá dar como resultado una mortalidad mínima del 30% al final del período de exposición de 96 horas,
- La tasa de eclosión en el control negativo y del solvente deberá ser mayor o igual que el 80% al final del período de exposición de 96 horas,
- Al final del período de exposición de 96 horas, la concentración de oxígeno disuelto en el testigo negativo y a la concentración de ensayo máxima deberá ser mayor o igual que el 80% de la saturación.

3.9.4 Evaluación del desarrollo embrionario

Las principales observaciones de letalidad/toxicidad luego de cumplido el tiempo de tratamiento se incluyen en la Tabla 5 para embriones y en la Tabla 6 para individuos juveniles.

Tabla 5.

Parámetros de letalidad/subletalidad en embriones de D. rerio

Criterios de evaluación de letalidad	Tiempo de exposición			
	24 h	48h	72 h	96 h
Coagulación	x	x	x	x
No desprendimiento de la cola		x	x	x
No formación de somitas		x	x	x
Ausencia de latido cardiaco		x	x	x
Retraso o falta de eclosión				x
Muerte		x	x	x
Criterios subletales de valoración de desarrollo				
Formación de somitas	x			
Desarrollo normal de ojos	x	x	x	x
Movimientos espontáneos	x	x	x	x
formación de edemas				
Criterios de valoración de teratogénicidad				

Malformación de colas	x	x	x	x
Malformación de columna	x	x		x
Deformación de yema	x	x	x	x
Retraso general del crecimiento	x	x	x	x

Las unidades se tomaron como número de embriones afectados por cada efecto estudiado en la Tabla 5 y se expresarán en unidades de porcentaje (Ecuación 1).

$$\left[\frac{\text{Embriones afectados}}{\text{Embriones totales del tratamiento}} * 100 \right]$$

Ecuación 1. *Porcentaje de embriones afectados/enfermos*

3.10. EJECUCIÓN DEL SEGUNDO OBJETIVO

3.10.1. Ensayo de toxicidad por exposición

Para la exposición de los peces cebra se asignaron un total de 8n peces en etapa juvenil (n: número de tratamientos, incluyendo los controles), con 1 mes de edad y se colocaron en placas de 24 pocillos. Para ello, se partió de las soluciones stock, disueltas directamente en el agua de las peceras de mantenimiento hasta alcanzar la concentración requerida. El tiempo de exposición fue de 96h, se mantuvieron los parámetros fisicoquímicos expuestos en la Tabla 4.

Tabla 6.

Parámetros de letalidad/subletalidad en especímenes juveniles *D. rerio*

Criterios de evaluación de letalidad	Tiempo de exposición			
	24 h	48h	72 h	96 h
No movimiento del opérculo	x	x	x	x
Muerte	x			x
Criterios subletales de valoración de desarrollo (Neurodegenerativo)				
Nado deficiente	x			
Ataxia	x	x	x	x
Nado invertido	x	x	x	x
Cabezazos	x			

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.11.1. Primer objetivo

Tras las 96 hpf de exposición, se contaron los embriones vivos, muertos y malformados totales y se realizó un análisis de regresión no lineal PROBIT para calcular la concentración toxica media (CT50) y la concentración efectiva de malformaciones (CE50) con un valor de confianza del 95% ($p < 0,05$). Finalmente se calculó el índice teratogénico (TI) utilizando la relación CL50/CE50 (Cardoso, 2022). Por otro lado, los datos sobre las alteraciones del desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos se analizaron mediante la prueba de Fisher con una significancia $p < 0.05$.

3.11.2. Segundo objetivo

Para el segundo objetivo se siguió un Diseño Completamente al Azar y se realizó un ANOVA factorial (AxB), siendo (A) el tipo de extracto, y (B) los tratamientos o dosis empleados, en consecuencia, se registraron los tiempos de exposición (24h, 48h, 72h, 96h) y la concentración del extracto suministrada sobre la mortalidad de los embriones y especímenes juveniles de *D. rerio* mediante un análisis de regresión no lineal Probit.

3.12. EJECUCIÓN DEL TERCER OBJETIVO

La estandarización del protocolo para la aplicación del modelo animal *D. rerio* en ensayos de toxicidad, ecotoxicidad y teratogenicidad, se realizó tomando en cuenta los resultados obtenidos en el objetivo 2.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Adecuación de peceras

Las condiciones fisicoquímicas del agua en las peceras se mantuvieron constantes como se muestran en la Tabla 8, la temperatura promedio registrada fue de 25.85 °C, con una desviación estándar de ± 0.366 , manteniéndose dentro del rango requerido de 26 ± 1 °C. El valor medio del oxígeno disuelto fue de 6.48 mg/L, cumpliendo con el criterio de saturación mínima del 80%, tal como exige el apartado 9(f) del documento 236 de la OCDE. Asimismo, los valores de pH se situaron en un promedio de 7.80, dentro del intervalo permitido de 6.5 a 8.5, sin cambios mayores a 1.5 unidades durante el ensayo. Finalmente, la conductividad presentó un promedio de 439.25 $\mu\text{S/cm}$, lo cual es adecuado para mantener la estabilidad iónica del medio de exposición. Estos resultados (Tabla 7) confirman que la calidad del agua durante las 96 horas del ensayo fue apropiada y cumple con los requisitos exigidos por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico, junto a la Unión Europea.

Tabla 7.

Condiciones fisicoquímicas del agua en el mantenimiento de D. rerio

Parámetros fisicoquímicos del agua				
Días de los ensayos	pH	Conductividad	OD	Temperatura
		$\mu\text{S/cm}$	mg/L	°C
1	8,43	446	6,6	26
2	7,82	434	6,8	26
3	7,68	418	6,7	26
4	7,89	419	6,7	25
5	7,90	428	6,7	26
1	7,13	438	6,3	26
2	7,4	440	7,3	26
3	7,16	453	6,5	25

4	8,2	466	6,4	26
5	7,6	434	6,3	26
1	7,7	431	6,5	26
2	7,7	436	6,4	26
3	7,8	435	6,4	25
4	8,62	446	6	26
5	8,77	455	6	26
1	7,61	452	6,4	26
2	8,57	450	6,5	26
3	7,2	440	6,4	26
4	7,36	431	6,4	26
5	7,47	433	6,3	26
Promedio	7,80	439,25	6,48	25,85

4.2. Elección del emulsificante

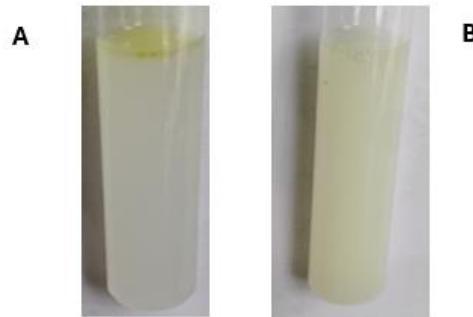
Los ensayos de emulsión realizados con el aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis* evidenciaron diferencias notables en la estabilidad según el emulsionante utilizado. Para el DMSO, aunque inicialmente se logró una aparente mezcla con el medio embrionario, al cabo de 5 minutos se observó una clara separación de fases (Figura 4a) indicando inestabilidad de la emulsión. Por el contrario, la formulación empleando Tween 20 como agente tensioactivo permitió obtener una emulsión estable, sin separación visible de fases durante el periodo de observación de 24h (Figura 4b), Este resultado mostró una mayor eficiencia del Tween 20 para vehicular el aceite esencial de *T. zypaquierensis* en medios acuosos, tal y como lo sugiere Álvarez et al., (2015) en su ensayo sobre la evaluación nematocida de este tipo de extracto. Sin embargo, este resultado en la elección del emulsificante contrasta con lo reportado por Fernández et al., (2023a) & Khan et al., (2023), donde se utilizó DMSO como agente emulsificante en aceites esenciales de especies como *T. minuta* y *T. multiflora*, obteniendo la estabilidad deseada del tratamiento.

Estas diferencias respecto al emulsionante seleccionado podrían atribuirse tanto a las

variaciones de la composición fitoquímica de los diferentes aceites esenciales, las concentraciones que se usaron e incluso las condiciones experimentales bajo las cuales se llevaron a cabo los ensayos.

Figura 5.

Ensayos de emulsión. A). Solución Stock usando DMSO, B). Solución Stock usando Tween 20



4.3. Validez del test

Tras el proceso de desove se obtuvieron un total de 500 embriones, con una tasa de fertilización del 93,33 %, valor que supera el mínimo establecido por la directriz OCDE–236 (> 70 %). Este resultado garantizó la disponibilidad de una cohorte adecuada y viable para la realización de los ensayos de toxicidad aguda en el modelo animal.

La sensibilidad del modelo se confirmó utilizando un total de 42 embriones, divididos en 3 repeticiones por cada control utilizado (Tabla 8), donde se obtuvo una tasa de mortalidad promedio del 100% en el control positivo (C+), evaluado con 3,4-dicloroanilina, excediendo ampliamente el valor mínimo de 30%. Asimismo, la tasa de supervivencia promedio en el control con solvente y el control negativo fue del 91.67%, superando el valor mínimo exigido del 80%, lo que asegura un correcto manejo de la técnica, selección y manipulación de los embriones objeto de estudio. Finalmente, la concentración promedio de oxígeno disuelto hasta el final del ensayo en cada tratamiento fue de 6.42mg/L o un 89.2% aproximadamente, lo que garantizó las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo embrionario del pez.

Tabla 8.*Criterios de validez para ensayos de toxicidad sobre D. rerio*

Parámetro de validación	Criterio de aceptación	Promedio
	[%]	[%]
Tasa de fertilización	≥ 70	93,33
Tasa de supervivencia [C-]	≥ 90	91,67
Tasa de mortalidad [C+]	> 30	100
Tasa de supervivencia [solvente]	≥ 80	91,67
Oxígeno Disuelto	≥ 80	89.2

El cumplimiento de todos los parámetros de control (Tabla 8), aseguran la robustez, sensibilidad y validez científica de los datos obtenidos en la evaluación toxicológica del extracto vegetal.

4.4. Pruebas de teratogenicidad - aceite esencial *T. zypaquirensis*

Los resultados de las pruebas de teratogenicidad evaluados en embriones a las 96 hpf se resumen en la Tabla 9. Sin embargo, como el aceite de *T. zypaquirensis* mostró un alto nivel de toxicidad que desencadena en la muerte del embrión se consideró únicamente el valor de letalidad.

Tabla 9.*Porcentaje de letalidad: Aceite esencial.*

Concentración (%)	Letalidad 1 (%)	Letalidad 2 (%)	Promedio de letalidad (%)
C+	100	100	100
C-	5	0	2.5
1.9	100	100	100
1	100	100	100
0.5	100	100	100

0.4	100	100	100
0.3	100	100	100
0.001	100	100	100
0.0001	90	85	87.5

Nota: letalidad 1 y letalidad 2 hacen referencia al promedio de letalidad de cada repetición del ensayo*

Los embriones de pez cebra fueron expuestos durante 96 horas a distintas concentraciones del aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis* (0.001% a 1.9%) para evaluar su efecto letal. En concentraciones de 1.9% o superiores, se observó una letalidad del 100% en ambas réplicas, indicando una fuerte toxicidad del extracto a partir de este umbral. Incluso en concentraciones relativamente bajas como 0.001%, 0.03%, 0.04% y 0.05%, la letalidad fue del 100% en todos los casos.

La exposición a las concentraciones más elevadas (> 0.001%) generó mortalidad inducida por la coagulación total del embrión desde las 2 primeras horas de exposición, lo que indica un fuerte efecto embriotóxico, asociado posiblemente a metabolitos secundarios capaces de dañar la membrana coriónica del embrión, tal y como se muestra en la Tabla 10. De igual manera, la disminución progresiva de la letalidad a concentraciones cercanas al 0.0001% permite evaluar el umbral de toxicidad del extracto sobre el desarrollo del modelo animal, registrándose una tasa de letalidad del 90% y 85% en las réplicas 1 y 2 respectivamente. Esto sugiere una clara relación dosis-respuesta, donde a medida que disminuye la concentración del aceite esencial, también disminuye su efecto letal sobre los embriones.

Aunque no existen suficientes evidencias bibliográficas del uso de *T. zypaquirensis* sobre *D. rerio*, se han reportado ensayos de toxicidad aguda llevados a cabo en otros modelos animales como en nemátodos del género *Meloidogyne spp*, donde el AE de *T. zypaquirensis* a una concentración de 0.8 µg/mL, presentó una alta acción nematocida (Álvarez et al., 2015).

Estos resultados se soportan en el estudio del perfil fitoquímico del AE de *T.*

zypaquirensis y otras especies del género *Tagetes*, así como en las características fisiológicas del modelo animal utilizado. Desde el punto de vista fisicoquímico, los compuestos mayoritarios identificados en los aceites esenciales de diversas especies de *Tagetes*, según lo reportado por Álvarez et al., (2015); Salehi et al., (2018b) & Castillo y Panamá (2023), son (E)-Tagetona, (Z)-Tagetona, (Z)-tagetona, (E)-tagetona, Trans- Tagetona, Verbenona y 4-etil-4-metil-1-hexeno y presentan características estructurales que favorecen su permeabilidad a través de membranas biológicas, como un bajo peso molecular (126~152 g/mol) y una naturaleza lipofílica, derivada por su esqueleto hidrocarbonado con un único grupo carbonilo polar que además de facilitar la difusión pasiva a través de las membranas celulares, puede incrementar la reactividad de la molécula al interactuar con proteínas y lípidos asociados a la membrana que cubre al embrión y generando como resultado un fuerte efecto embriotóxico por desestabilización de la membrana o inducción de estrés oxidativo (Boussery et al., 2008; Chemtob, 2004; Mittal, 2017; Singh et al., 2024).

Tabla 10.

Efectos de letalidad del aceite esencial de T. zypaquirensis

**Dosis /Tiempo
(horas)**

24

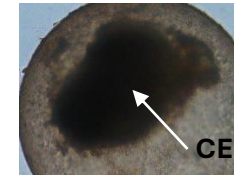
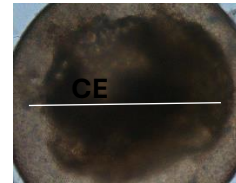
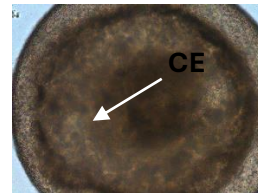
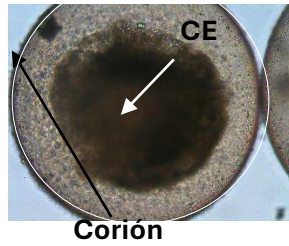
48

72

96

Observación

C+



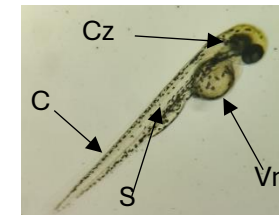
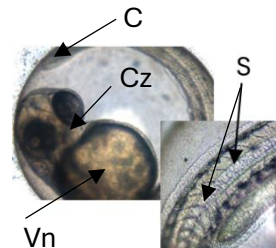
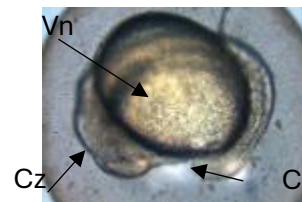
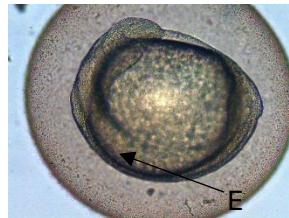
-Se observó la coagulación total del núcleo embrionario (CE) a las 2 horas post-fecundación (phf).

-El corión se mantiene íntegro y estable

-Desarrollo normal del espécimen.

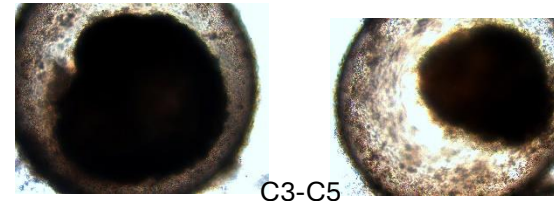
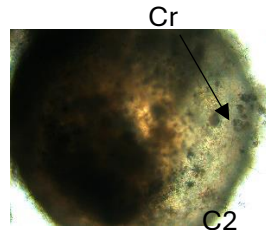
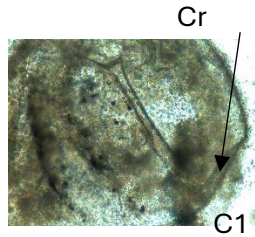
24 hpf: Periodo de segmentación y formación de estructuras físicas.

C-

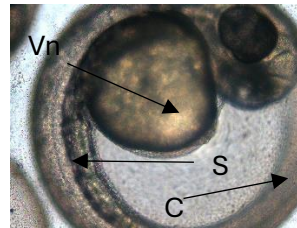
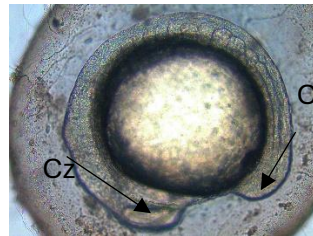
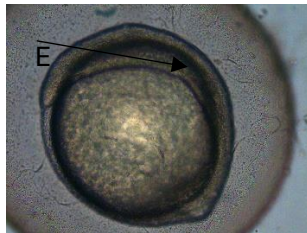


48 hpf: Periodo faríngeo-formación de cola (C), cabeza (Cz), somitas (S) y vejiga natatoria (Vn), presencia de latido cardíaco.

1.9%- 0.001%



0.0001%



72 hpf: Fase previa a la eclosión- Separación de cola y conteo de hasta 72 somitas.

96 hpf: Eclosión

-Se observó la coagulación total del embrión entre las primeras 12 hpf

-Las concentraciones mayores al 1% destruyeron el corión (Cr), regando el contenido intracelular al medio.

-Existe un pequeño retraso en el proceso de desarrollo embrionario de *D. rerio*

-Un 80% de los embriones coagularon entre las primeras 48 hpf.

4.5. Pruebas de teratogenicidad – Extracto etanólico (EE) *T. zypaquirensis*

La evaluación de la teratogenicidad del extracto etanólico de *T. zypaquirensis* reportada a las 96 horas en embriones de pez cebra (*D. rerio*) reveló una fuerte actividad embriotóxica dependiente de la concentración, tal y como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11.

Porcentaje de letalidad del extracto etanólico.

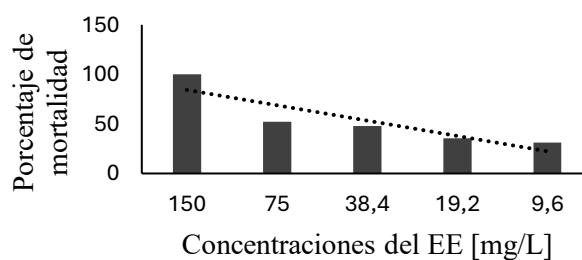
Tratamiento [mg/L]	Tasa de mortalidad [%]
(C+): 0,4	100
T1: 150	100
T2: 75	52,38
T3: 38.4	47,62
T4: 19.2	35,71
T5: 9.6	30,95
Vh: 0.01	28,57
C- : 0	2,38

*Los resultados mostrados en la tabla representan el promedio de 3 repeticiones utilizando un total de 42 embriones.

El tratamiento 1 [150 mg/L] indujo una letalidad del 100% lo que establece un umbral de toxicidad aguda significativo para el extracto, observándose una relación dosis-respuesta donde, conforme se reduce concentración del EE el porcentaje de mortalidad disminuye (Gráfica 1).

Gráfica 1.

Relación Dosis-Respuesta en la teratogenicidad



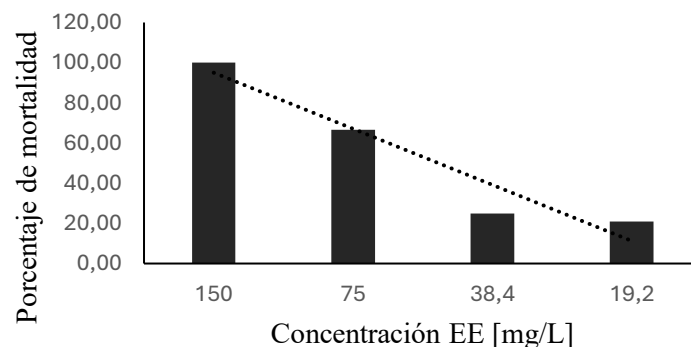
Los tratamientos 2, 3, 4 y 5 [75 mg/L, 38.4 mg/L, 19.2 mg/L y 9.6 mg/L] mostraron una disminución en los porcentajes de mortalidad de 52.38%, 47.61%, 35.71% y 30.95% respectivamente. Cabe mencionar que la muerte embrionaria se dio mayormente por la coagulación de la yema entre las 24 y 48h de exposición, es decir pasada la fase de blastulación, al inicio de la etapa de segmentación y gastrulación. Sin embargo, los embriones expuestos a las dosis de 38.4 - 75 mg/L que no coagularon, presentaron un retraso general en su proceso de desarrollo.

4.6. Pruebas de toxicidad aguda

Los resultados para las pruebas de toxicidad aguda usando el extracto etanólico de *T. zypaquirensis* mostraron efectos similares a los realizados sobre embriones, sin embargo, debido a la letalidad del extracto se tomarán en cuenta ambos valores tal y como se observa en la Gráfica 2 y 3.

Gráfica 2.

Relación dosis-respuesta de letalidad en alevines de D. rerio.



Como se puede observar en la Gráfica 2, existe una disminución en la mortalidad de los alevines conforme la dosis de tratamiento disminuye, siendo que a concentraciones de 75 mg/L, 38.4 mg/L y 19.2 mg/L los porcentajes de mortalidad disminuyeron en 66.66%, 25% y 20.83% respectivamente. Sin embargo, se presentó un valor atípico con respecto a la dosis más baja del tratamiento [9.6 mg/L], el cual se omitió debido a que se obtuvo un porcentaje de mortalidad

igual al 54.16%, este resultado pudo deberse a diversos factores como en la elaboración de los extractos e inclusive en la manipulación de los alevines al momento del traspaso de sus peceras a las cajas multipocillos donde se llevo a cabo el ensayo.

Además de lo expuesto anteriormente, el extracto etanólico administrado a los alevines, presentó efectos de toxicidad aguda observada a concentraciones de 75, 38.4 y 19.2 mg/L (Gráfica 3). Se observó torción a nivel de la columna- escoliosis en el 37.5 % de los especímenes expuestos a 75 mg/L, seguido de un 29.16% para 38.4 mg/L y un 8.33% para 19.2 mg/L, arritmia cardiaca (88-100 lpm) en un 25%, 12.5% y 4.1% respectivamente, malformación de la cola, edemas pericárdicos en el 6%, 8.33% y 0% respectivamente y edemas de vejiga natatoria en un 13 %, 0% y 4.16% respectivamente (Anexo 5). Dichos efectos (Figura 6) se mostraron desde las 24 horas de exposición a los tratamientos y se comprobaron a partir de las 48 de exposición.

Gráfica 3.

Relación dosis-respuesta de toxicidad en alevines de D. rerio

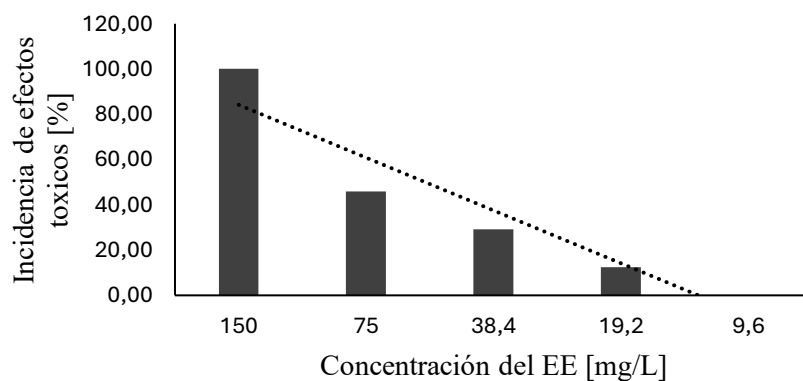
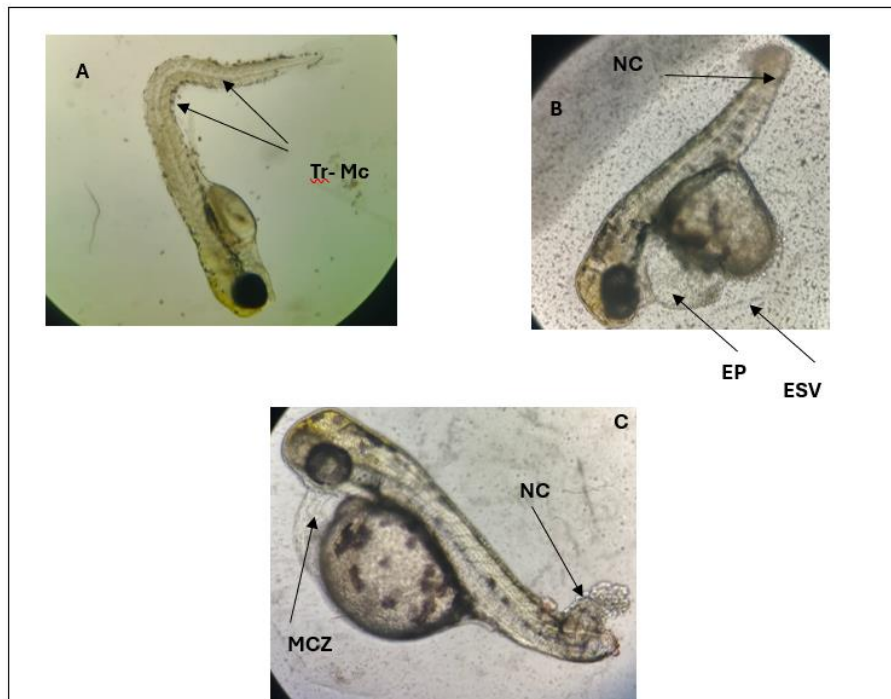


Figura 6.

Efectos teratogénicos observados en D. rerio



Tr-MC: Torción/ Malformación de la cola, **NC:** No formación de la cola, **ESV:** Edema del saco vitelino, **EP:** Edema pericárdico, **MCZ:** Malformación del corazón (Posible causa de la arritmia cardiaca).

Estos resultados contrastan con los reportados por Chaniad et al., (2021), donde evaluaron extractos etanólicos de *Tagetes erecta* en modelos murinos ICR, reportando que la dosis letal fue superior a 2000 mg/kg de peso corporal, siendo esta la mayor concentración ensayada, sin observarse mortalidad. Así mismo, presentó que dosis de 50 mg/mL \approx 50 g/L no generaban mortalidad en especímenes adultos de *Artemia salina* mientras que dosis mucho menores [< 150 mg/L] del extracto etanólico de *T. zypaquirensis* si generaron mortalidad tanto en embriones como especímenes juveniles de *D. rerio*. De igual forma, Cuellar, (2023) reportó que dosis de hasta 500 μ g/mL \approx 500 mg/L del extracto de *T. erecta*, aunque evidenciaron citotoxicidad en células de cáncer de pulmón, no presentó efectos tóxicos en ratones C57BL/6 infectados con estas células cancerosas y mucho menos mortalidad, contrastando con la alta sensibilidad observada en *D. rerio* y el efecto que tiene sobre su desarrollo. Por el contrario,

Iannacone et al., (2017) reportaron que extractos de *T. minuta* si presentaron letalidad sobre huevos de *Chrysoperla asoralis* y *Orius insidiosus* en concentraciones de 12,5 mg/mL a 200 mg/mL, mientras que muestra letalidad en individuos adultos a concentraciones superiores a 100 mg/mL, siendo aún dosis muy altas en comparación a las utilizadas en estos ensayos.

De acuerdo con la literatura científica consultada sobre el tamizaje fitoquímico en otras plantas del género *Tagetes*, se determinó la presencia de diferentes metabolitos secundarios flavonoides como ácido gálico, benzoico, cumárico y ferúlico; flavonoles y flavononas como la quercetina 3-O.arabinósido y el kaempferol 3,7- O diglucósido; así como algunas cumarinas que pueden conferirle al extracto su efecto toxicológico (Barrera et al., 2009; Camacho et al., 2019; Roca et al., 2009; Siddiqa et al., 2025). Dichos metabolitos funcionan como antioxidantes naturales que, en principio pueden proteger las células del daño oxidativo, sin embargo metabolitos como la quercetina y el kaempferol pueden inducir un efecto pro-oxidativo a altas concentraciones (Sobhy et al., 2023).

4.7. Concentración Letal Media (CL50)

El análisis PROBIT para el cálculo de la concentración letal media (CL50) dio como resultados los valores de la Tabla 12 y se presentan en las Gráficas 4, 5 y 6. Los datos del mismo se encuentran en los anexos 2, 3 y 4.

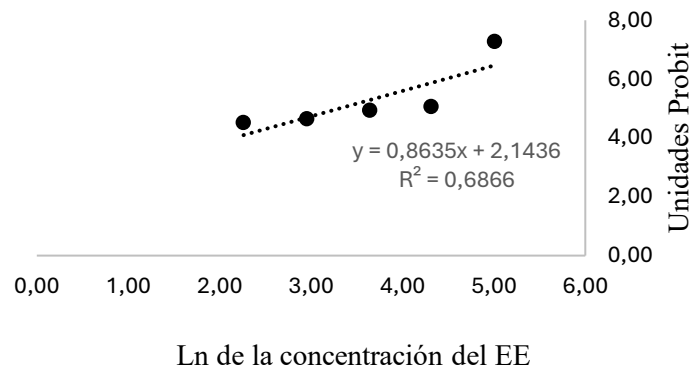
Tabla 12.

LC50 de los extractos a 96 hpf de prueba

Extracto	Aceite esencial: Embriones	Extracto etanólico: Embriones	Extracto etanólico: Alevines
LC50 [mg/L]	≤ 0.001%	27.32	43.93
TC50 [mg/L]			49.91
R²		1.000	0.981

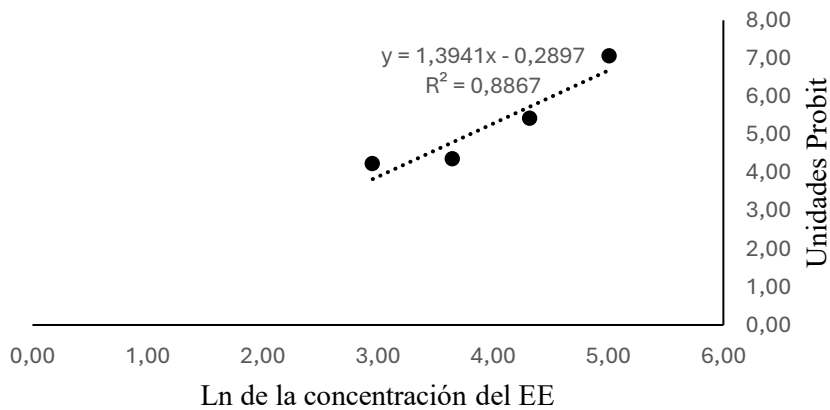
Gráfica 4.

CL50 extracto etanólico de T. zypaquirensis: embriones



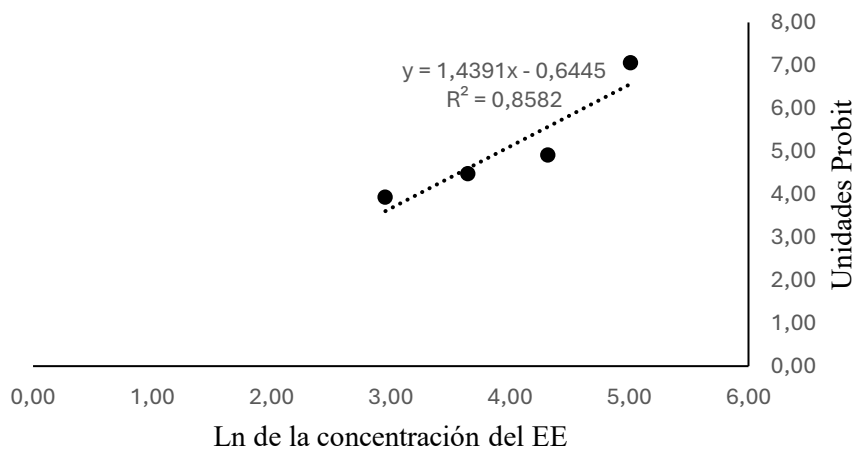
Gráfica 5.

CL50 para el extracto etanólico de T. zypaquirensis: Alevines



Gráfica 6.

CT50 para el extracto etanólico de T. zypaquirensis: Alevines



Con base en la Tabla 12 y los gráficos 4,5 y 6, se evidencia que el CL50 para el extracto etanólico en alevines [43.93 mg/L] es casi el doble en comparación con el CL50 para embriones [27.32 mg/mL] y un CT50 de 49.91 mg/L, dado que los embriones son más propensos a sufrir daños o alteraciones durante su desarrollo, así como durante su manipulación. Para el aceite esencial se reportan valores inferiores al 0.0001%, lo que resulta extremadamente tóxico para los embriones.

Siendo así, el valor de CL50 del extracto etanólico de *T. zypaquirensis* observado en este estudio, resultó ser mucho menor a los reportados, según (Escobar et al., 2009; Shirazi et al., 2014), al CL50 75 ± 5 y 70 ± 4 y $194,34 \mu\text{g/mL}$ para las líneas celulares KB, HepG2 y Vero respectivamente, de igual forma al CL50= $17,28 \mu\text{g/mL}$ para el tratamiento de *Aedes aegypti* reportado por Sartor et al., (2025), y una CL50 $21.35 \mu\text{g/mL}$ y $149 \mu\text{g/mL}$ para epismastigotes y amastigotes intracelulares respectivamente; los cuales, si bien no son vertebrados, permiten tener un punto de referencia desde el cual pueden partir otros ensayos utilizando concentraciones similiares. Por otro lado, el valor del CL50 para el aceite esencial de *T. zypaquirensis* se encuentra muy cercano a lo reportado por (Fernández et al., 2023b) en su investigación usando el aceite esencial de *T. multiflora* sobre *Artemia salina*, siendo una CL50 igual a 0.00144%, misma que presenta una composición fitoquímica muy similar a *T. zypaquirensis*.

Finalmente, los valores de CL50 encontrados para el extracto etanólico (27.32 y 43.93 mg/L), se consideran menores a los reportados por Vidal et al., (2009), quién evaluó el efecto toxicológico del extracto etanólico de *T. patula* sobre larvas y pupas de *A. aegypti* L, siendo su CL50= 0.07 mg/mL y 0.0891 mg/mL y a lo reportado por (Herrera & Sandoval, 2019b) , quién utilizo los extractos etanólicos de *T. minuta* y *T. erecta* sobre *Meloidogyne* spp, teniendo un CL50 de 0.00177 mg/mL y 0.00173 mg/mL.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Los valores de fertilización (>90%), supervivencia (>90% en C-), mortalidad eficaz en C+ (100%) y condiciones fisicoquímicas del agua demuestran que los resultados son confiables y científicamente válidos.
- Dada la alta tasa de letalidad generada por concentraciones muy bajas del aceite esencial [$< 0.0001\%$] no es posible determinar la DT50 del mismo, por lo cual se tomará como DT50 y DL50 valores inferiores al 0.0001%. para el caso del aceite esencial y una DT50 49.91 mg/L para el extracto etanólico de *T. zypaquirensis* sobre el modelo animal *D. rerio*.
- El extracto etanólico de *T. zypaquirensis* posee una elevada toxicidad aguda en especímenes juveniles de *D. rerio*, generando efectos como arritmias cardiacas, malformaciones de la cola y corazón, así como la presencia de edemas a nivel de la vejiga natatoria y pericardio a las 96 horas de exposición a los tratamientos aquí expuestos.
- Los protocolos para ensayos de toxicidad aguda se determinaron con base en la metoología y los resultados obtenidos a lo largo del ensayo y se espera que puedan optimizar el flujo de trabajo, manejo del modelo animal y control de cada uno de los requerimientos necesarios para la validación de los ensayos.

5.2. Recomendaciones

- De ser posible se recomienda aislar los componentes mayoritarios del aceite esencial y el extracto etanólico y evaluar su efecto toxicológico de forma individual, de igual forma se recomienda probar diferentes métodos de exposición de estos compuestos sobre el modelo animal.

- Se recomienda repetir los ensayos que dieron como resultado valores atípicos, para corroborar la información que se obtuvo durante los primeros ensayos, manteniendo un control estricto sobre las variables de incubación y sobre todo en la preparación de cada uno de los tratamientos.
- Se recomienda evaluar otros solventes como medio para la dilución del Aceite esencial o en su defecto algunas mezclas que mejoren el proceso de emulsión de los aceites esenciales con el solvente a utilizar.

BIBLIOGRAFIA

- Adeyemi, J. A., Da Cunha Martins, A., & Barbosa, F. (2015). Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 172–173, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.04.001>
- Álvarez, D., Botina, J., Ortiz, A., & Botina, L. (2015). Evaluación nematocida del aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis* en el manejo del nematodo *Meloidogyne* spp. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(1).
- Alves-Pimenta, S., Colaço, B., Oliveira, P. A., & Venâncio, C. (2024). *Development Features on the Selection of Animal Models for Teratogenic Testing* (pp. 67–104). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3625-1_3
- Aynar, S., Diaz, J., Alvarado, G., Velázquez Israel, Pelaez, A., & Tejeda, M. (2017). ACTIVIDAD NEMATICIDA DE EXTRACTOS BOTÁNICOS CONTRA *Meloidogyne incognita* (KOFOID Y WHITE) EN OKRA (*Hibiscus esculentus* L. MOENCH) . *Revista de Ciencias Iológicas y de La Salud*, 20(1).
- Barrera, L., Hung, B., Botta, A., Hernandez, E., González, M., & Aguilar, B. (2009). CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE *Tagetes erecta* Lin. *Revista Cubana de Química*, 21(2), 10–15. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543717002>
- Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., & Quintero-Gutiérrez, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y

espectrofotométricos (FRAP). *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>

Boussery, K., Belpaire, F. M., & Van de Voorde, J. (2008). Physiological Aspects Determining the Pharmacokinetic Properties of Drugs. In *The Practice of Medicinal Chemistry* (pp. 539–559). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00023-7>

Camacho, C., Pérez, Y., Valdivia, A., Ramírez, H., & Gómez, L. (2019). Phytochemical screening studies of bioactive compounds of *Tagetes erecta*. *Revista Cubana de Química*, 31(1).

Cardoso, J. (2022). *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO FACULTAD DE QUÍMICA* [Universidad Autónoma del Estado de México]. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/137982>

Casado, I. (2018). *Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor*.

Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R. T., Van Cruchten, S., & Zon, L. I. (2020). Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 33(1), 95–118. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00335>

Chaniad, P., Techarang, T., Phuwajaroanpong, A., Na-ek, P., Viriyavejakul, P., & Punsawad, C. (2021). In Vivo Antimalarial Activity and Toxicity Study of Extracts of *Tagetes erecta* L. and *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn. from the Asteraceae Family. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/1270902>

- Chemtob, S. (2004). Basic Pharmacologic Principles. In *Fetal and Neonatal Physiology* (pp. 179–190). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9654-6.50022-9>
- Código Sanitario para Animales Terrestres. (2023). UTILIZACIÓN DE ANIMALES EN LA INVESTIGACIÓN Y EDUCACIÓN. *Código Sanitario Para Los Animales Terrestres y Marinos*.
- COIP. (2021). *CÓDIGO ORGÁNICO INTEGRAL PENAL, COIP*. www.lexis.com.ec
- Collins, J. E., White, S., Searle, S. M. J., & Stemple, D. L. (2012). Incorporating RNA-seq data into the zebrafish Ensembl genebuild. *Genome Research*, 22(10), 2067–2078. <https://doi.org/10.1101/gr.137901.112>
- Crouzier, L., Richard, E., Sourbron, J., Lagae, L., Maurice, T., & Delprat, B. (2021). Use of Zebrafish Models to Boost Research in Rare Genetic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13356. <https://doi.org/10.3390/ijms222413356>
- Cuellar, A. (2023). *Evaluación del efecto citotóxico y antitumoral del extracto de Tagetes erecta L. en modelos experimentales de carcinoma pulmonar de Lewis in vitro e in vivo*. <http://ricaxcan.uaz.edu.mx/jspui/handle/20.500.11845/3963>
- da Silva, I. I., da Silva, N. P. C., Marrs, J. A., & Cadena, P. G. (2023). Essential Oils Produce Developmental Toxicity in Zebrafish Embryos and Cause Behavior Changes in Zebrafish Larvae. *Biomedicines*, 11(10), 2821. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102821>
- Dima, C., & Dima, S. (2015). Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 5, pp. 29–35). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.003>

- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C. F., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y. R., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., & Boggs, C. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, *123*(1), 37–46. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.37>
- Escobar, P., Herrera, L. V., Leal, S. M., Durán, C., & Stashenko, E. (2009). Chemical composition and anti-tripanosomal activity of essential oils from *Tagetes* (Asteraceae Fam.) grown in Colombia. *Revista de La Universidad Industrial de Santander*, *41*, 280–286.
- Estrada, H., González, K., & Medina, J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *10*(3), 182–217.
- Fernández, J. P. C., Lazo, V. A. de los A. L., & De Nieto, M. E. V. (2023a). Extracción, estudio físico químico y actividad biológica del aceite esencial de la *Tagetes multiflora* (Chiqchipa). *South Florida Journal of Development*, *4*(8), 3150–3160. <https://doi.org/10.46932/sfjdv4n8-016>
- Fernández, J. P. C., Lazo, V. A. de los A. L., & De Nieto, M. E. V. (2023b). Extracción, estudio físico químico y actividad biológica del aceite esencial de la *Tagetes multiflora* (Chiqchipa). *South Florida Journal of Development*, *4*(8), 3150–3160. <https://doi.org/10.46932/sfjdv4n8-016>
- Gonçalves, Í. F. S., Souza, T. M., Vieira, L. R., Marchi, F. C., Nascimento, A. P., & Farias, D. F. (2020). Toxicity testing of pesticides in zebrafish—a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*(10), 10185–10204. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07902-5>

Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., J. M. van Eeden, F., Jiang, Y.-J., Heisenberg, C.-P., Kelsh, R. N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., & Nüsslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, *123*(1), 1–36. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.1>

Herrera, W., & Sandoval, M. (2019a). *TOXICIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PLANTAS DE CAMPO Y CALLOS IN VITRO DE Tagetes minuta Y Tagetes erecta SOBRE Meloidogyne spp. EN Solanum lycopersicum L., LAMBAYEQUE 2019*.

Herrera, W., & Sandoval, M. (2019b). *Toxicidad del extracto etanólico de plantas de campo y callos In Vitro de Tagetes Minuta y Tagetes Erecta sobre Meloidogyne spp. en Solanum Lycopersicum L., Lambayeque 2019* [Universidad nacional “Pedro Ruiz Gallo”]. <https://hdl.handle.net/20.500.12893/5897>

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>

Hussain, A., Audira, G., Malhotra, N., Uapipatanakul, B., Chen, J.-R., Lai, Y.-H., Huang, J.-C., Chen, K. H.-C., Lai, H.-T., & Hsiao, C.-D. (2020). Multiple Screening of Pesticides Toxicity in Zebrafish and Daphnia Based on Locomotor Activity Alterations. *Biomolecules*, *10*(9), 1224. <https://doi.org/10.3390/biom10091224>

- Iannacone, J., Alvariño, L., Guabloche, A., Ventura, K., La Torre, M., Carhuapoma, M., & Castañeda, L. (2017). Acute and chronic toxic effect of *tagetes minuta* “black mint” (Asteraceae) and carbaril on six important entomophages in biological Control. *The Biologist*, *15*(1), 85–97. <https://scispace.com/pdf/efecto-toxico-agudo-y-cronico-de-tagetes-minuta-huacatay-49n8s7ge5g.pdf>
- Ibrahim, S. R. M., Abdallah, H. M., El-Halawany, A. M., Esmat, A., & Mohamed, G. A. (2018). Thiotagetin B and tagetannins A and B, new acetylenic thiophene and digalloyl glucose derivatives from *Tagetes minuta* and evaluation of their in vitro antioxidative and anti-inflammatory activity. *Fitoterapia*, *125*, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.12.024>
- Kannan, K., Raju, P., Keerthy, B. N., Rajagopal, A., & Sabat, S. (2024). Biopesticide effect on crops for the bioactive components extracted from *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*. *Discover Agriculture*, *2*(1). <https://doi.org/10.1007/s44279-024-00045-y>
- Khan, P., Waheed, A., Azeem, M., Parveen, A., Yameen, M. A., Iqbal, J., Ali, M., Wang, S., Qayyum, S., Noor, A., & Naqvi, T. A. (2023). Essential Oil from *Tagetes minuta* Has Antiquorum Sensing and Antibiofilm Potential against *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1. *ACS Omega*, *8*(39), 35866–35873. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03507>
- Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., & Braunbeck, Th. (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *149*(2), 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>

- Linares Márquez, P., & Jiménez Capriles, M. A. (2023). Análisis bioético en la utilización de animales en la industria farmacéutica. *Apuntes de Bioética*, 6(2), 113–131. <https://doi.org/10.35383/apuntes.v6i2.974>
- Lopez, N., Aleixandre Amaya, & Miguel, M. (2012). Artículo de Revisión Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud Beneficial health properties of iridoids terpenes. In *Nutr. clín. diet. hosp* (Vol. 32, Number 3).
- Meloni, D. A., Lescano, J. A., Arraiza, M. P., & Beltrán, R. E. (2019). Yield, chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha spicata* (Lamiaceae) in Santiago del Estero, Argentina. *UNED Research Journal*, 11(3), 327–333. <https://doi.org/10.22458/urj.v11i3.2624>
- Mittal, B. (2017). Pharmacokinetics and Preformulation. In *How to Develop Robust Solid Oral Dosage Forms from Conception to Post-Approval* (pp. 17–37). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804731-6.00002-9>
- Modarresi Chahardehi, A., Arsad, H., & Lim, V. (2020). Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants*, 9(10), 1345. <https://doi.org/10.3390/plants9101345>
- Moore, E. R. B., Mihaylova, S. A., Vandamme, P., Krichevsky, M. I., & Dijkshoorn, L. (2010). Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Research in Microbiology*, 161(6), 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.007>
- OMSA. (2023). *Utilización de animales en la investigación y educación*.
- Organización de las Naciones Unidas. (2025). *La medicina tradicional es ahora una realidad mundial*. <https://news.un.org/es/story/2025/12/1540894>

- Organización Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*.
- Organización Mundial de la Salud. (2025). *Global traditional medicine strategy 2025-2034*. <https://iris.who.int/>.
- Organización Mundial Sanidad animal. (2023). *Utilización de animales en la investigación y educación*.
- Oyebode, O., Kandala, N.-B., Chilton, P. J., & Lilford, R. J. (2016). Use of traditional medicine in middle-income countries: a WHO-SAGE study. *Health Policy and Planning, 31*(8), 984–991. <https://doi.org/10.1093/heapol/czw022>
- Peralta, E., Bravo, E., & Peñaherrera, E. (2022). *Optimización del modelo de pez cebrá (Danio rerio) para toxicidad de extractos vegetales*.
- Riaz, M., Ahmad, R., Rahman, N. U., Khan, Z., Dou, D., Sechel, G., & Manea, R. (2020a). Traditional uses, Phyto-chemistry and pharmacological activities of *Tagetes Patula* L. *Journal of Ethnopharmacology, 255*, 112718. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112718>
- Riaz, M., Ahmad, R., Rahman, N. U., Khan, Z., Dou, D., Sechel, G., & Manea, R. (2020b). Traditional uses, Phyto-chemistry and pharmacological activities of *Tagetes Patula* L. *Journal of Ethnopharmacology, 255*, 112718. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112718>
- Roca, L. B., Guzmán, B. H., Botta Gómez, A. M., Sosa, E. H., González Pérez, M., & Navarro, B. A. (2009). *CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE Tagetes erecta Lin: XXI*.

- Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Leal, A. L. A. B., Coutinho, H. D. M., Vitalini, S., Kręgiel, D., Antolak, H., Sharifi-Rad, M., Silva, N. C. C., Yousaf, Z., Martorell, M., Iriti, M., Carradori, S., & Sharifi-Rad, J. (2018a). Tagetes spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules*, 23(11), 2847. <https://doi.org/10.3390/molecules23112847>
- Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Leal, A. L. A. B., Coutinho, H. D. M., Vitalini, S., Kręgiel, D., Antolak, H., Sharifi-Rad, M., Silva, N. C. C., Yousaf, Z., Martorell, M., Iriti, M., Carradori, S., & Sharifi-Rad, J. (2018b). Tagetes spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules*, 23(11), 2847. <https://doi.org/10.3390/molecules23112847>
- Sanchez-Olivares, M. A., Gaytán-Oyarzun, J. C., Pérez-Cruz, M. E., & Prieto-Garcia, F. (2021). Embryotoxic, teratogenic and genotoxic effect in zebrafish(Danio rerio)by exposure to arsenic. *Hidrobiologica*, 31(3), 221–230. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2021v31n3/Sanchez>
- Sartor, E. de B., Schorr, R. R., Betim, F. C. M., Anjos, C. A. dos, Oliveira, C. F. de, Dalarmi, L., Montrucchio, D. P., Dias, J. de F. G., Miguel, O. G., & Miguel, M. D. (2025). Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of Tagetes minuta Linnaeus from the southern Brazilian highlands. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902025e24072>
- Senecyt & PNUD. (2018). *PROYECTOS INEDITA-PNUD 2018-2023*.
- Shirazi, M. T., Gholami, H., Kavooosi, G., Rowshan, V., & Tafsiry, A. (2014). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of Tagetes minuta

- and is *Oscipicum basilicum* essential oils. *Food Science & Nutrition*, 2(2), 146–155. <https://doi.org/10.1002/fsn3.85>
- Siddiq, A., Khaliq, A., Sultan, M. T., Chugthai, M. F. J., Ahsan, S., Khalid, W., & Suleria, H. (2025). Characterization of Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activities of Tagetes Flowers With Varying Treatments Using LC-ESI-QToF-MS/MS. *Food Science & Nutrition*, 13(10). <https://doi.org/10.1002/fsn3.71047>
- Singh, D., Kumar, D., Shankar, S., & Shankar, V. (2024). *Environmental Toxicology and Occupational Health Hazards*.
- Sobhy, R., Khalifa, I., Rahaman, A., Zeng, X.-A., Nawaz, A., & Walayat, N. (2023). Quercetin: The Biological Effects, Chemical Steadiness, Metabolism, and Delivery Systems. In *Handbook of Dietary Flavonoids* (pp. 1–33). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94753-8_12-1
- Stefanazzi, N., Gutierrez, M. M., Stadler, T., Bonini, N. A., Ferrero, A. A., Leal, R., Gral San Martín, P. M., & A Bonini, I.-M.-A. N. (2006). Actividad biológica del aceite esencial de Tagetes terniflora Kunth (Asteraceae) en Tribolium castaneum Herbst (Insecta, Coleoptera, Tenebrionidae). In *Bol. San. Veg. Plagas* (Vol. 32).
- Tapia, J. (2012). “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO Y SUBEXTRACTOS CLOROFÓRMICO Y ETÉREO DE *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*.”
- Taype-Landeo, O., Ruiz-Rodriguez, A., Aguirre-Huayhua, L., & Ore-Areche, F. (2021). Compuestos bioactivos, perfil antioxidante y actividad antimicrobiana del aceite esencial de Tagetes erecta y Tagetes patula. *Revista Científica Dominio de Las Ciencias*, 7(5). <https://doi.org/https://doi.org/10.23857/dc.v7i5.2260>

- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., & Zhou, Z. (2019). The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers*, *9*(3), 68–77. <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
- Tewari, I., Ram, V., Singh, S., & F Singh, M. (2025). Toxicity and fertility studies of *Cornus capitata* Well. fruit extract in the Zebrafish Model. *Iranian Journal of Toxicology*, *19*(4), 189–196. <https://doi.org/10.32592/IJT.19.4.189>
- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *148*, 63–106. https://doi.org/10.1007/10_2014_295
- Torres-Martínez, R., Moreno-León, A., García-Rodríguez, Y. M., Hernández-Delgado, T., Delgado-Lamas, G., & Espinosa-García, F. J. (2022). *Tagetes lucida* Cav. essential oil and the mixture of its main compounds are antibacterial and modulate antibiotic resistance in multi-resistant pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, *75*(2), 210–223. <https://doi.org/10.1111/lam.13721>
- Vidal, J., Carbajal, A., Sisniegas, M., & Bobadilla, M. (2009). Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* y *Tagetes patula* sobre *Aedes Aegypti*. In *Rev. peru. biol* (Vol. 15, Number 2). <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm> *Rev. peru. biol* 15
- Vilella, A. J., Severin, J., Ureta-Vidal, A., Heng, L., Durbin, R., & Birney, E. (2009). EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Research*, *19*(2), 327–335. <https://doi.org/10.1101/gr.073585.107>
- Wang, D., Chen, J., Pu, L., Yu, L., Xiong, F., Sun, L., Yu, Q., Cao, X., Chen, Y., Peng, F., & Peng, C. (2023). Galangin: A food-derived flavonoid with therapeutic potential

against a wide spectrum of diseases. *Phytotherapy Research*, 37(12), 5700–5723.

<https://doi.org/10.1002/ptr.8013>

Zanovello, M., Bolda Mariano, L. N., Cechinel-Zanchett, C. C., Boeing, T., Tazinaffo, G.

C., Mota da Silva, L., Silva, D. B., Gasparotto Junior, A., & de Souza, P. (2021).

Tagetes erecta L. flowers, a medicinal plant traditionally used to promote diuresis, induced diuretic and natriuretic effects in normotensive and hypertensive rats.

Journal of Ethnopharmacology, 279, 114393.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114393>

Zavala-Ocampo, L. M., Aguirre-Hernández, E., López-Camacho, P. Y., Cárdenas-

Vázquez, R., Dorazco-González, A., & Basurto-Islas, G. (2022).

Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity properties of *Petiveria*

alliacea L. *Journal of Ethnopharmacology*, 292, 115239.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115239>

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo estandarizado JB01: Extracción de AE de *T. zypaquirensis*.

1. Armar el equipo de extracción de AE por hidrodestilación (Figura 14) y cubrir la trampa dean stark con papel aluminio.

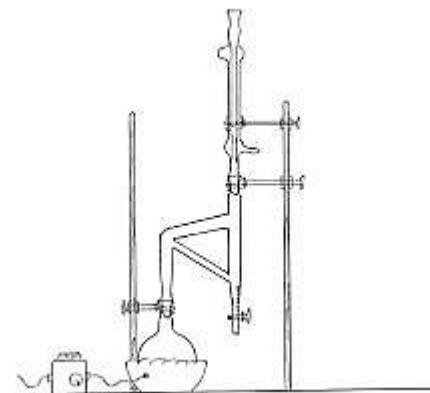


Figura 14. Equipo de extracción de AE.

2. Colocar en el balón de destilación 25g de materia vegetal seca previamente cortada en trozos pequeños y añadir aproximadamente 500mL de agua destilada.
3. Establecer las condiciones de operación (temperatura 250°C). En un lapso de 30 min empieza el punto de ebullición a partir del cual inicia el proceso de condensación y se precipita el AE.
4. La duración de todo el proceso es de 2h en la cual se forman dos fases inmiscibles, la acuosa y la del AE que son depositadas en la trampa dean stark. Abrir cuidadosamente la trampa y retirar la fase acuosa.
5. Transcurrido las 2h, recolectar minuciosamente en un tubo de microcentrífuga o en un tubo de ensayo el aceite esencial que se encuentra en la trampa.
6. Trasvasar el aceite esencial del tubo de microcentrífuga a un frasco ambar (si es necesario, utilizar micropipeta) y cubrir con papel aluminio.
7. Etiquetar la muestra (Código de la muestra, fecha y nombres) y almacenar el frasco ambar en la refrigeradora a 4°C para su posterior uso.

Repetir este proceso las veces que sean necesarias (Meloni et al., 2019).

Anexo 2. Análisis Probit- Cálculo del la CL50 del extracto etanólico en embriones

Concentración [mg/L]	Repeticiones del experimento						Total espécimen es	Total sujeto s muert os	Proporci ón de ajuste	Porcenta je de mortalid ad	Ln de la concentraci ón	z value	z value corregido
	1		2		3								
	n 1	m 1	n 2	m 2	n 3	m 3							
0,4	1 4	14 4	1 4	14 4	1 4	14 4	42	42	0,988	100,000	-0,916	#¡NUM!	7,269
150	1 4	14 4	1 4	14 4	1 4	14 4	42	42	0,988	100,00	5,011	#¡NUM!	7,269
75	1 4	8 4	1 4	6 4	1 4	8 4	42	22	0,523	52,381	4,317	5,0597 17	5,058
38,4	1 4	6 4	1 4	6 4	1 4	8 4	42	20	0,477	47,619	3,648	4,9402 83	4,942
19,2	1 4	5 4	1 4	5 4	1 4	5 4	42	15	0,360	35,714	2,955	4,6338 94	4,643
9,6	1 4	5 4	1 4	4 4	1 4	4 4	42	13	0,314	30,952	2,262	4,5027 99	4,515
0,01	1 4	6 4	1 4	3 4	1 4	3 4	42	12	0,291	28,571	-4,605	4,4340 51	4,449
0	1 4	1 4	1 4	0 4	1 4	0 4	42	1	0,035	2,381	#¡NUM!	3,0192 48	0,000

CL50 27.32 mg/L

Anexo 3. Análisis probit- Cálculo de la CL50 del extracto etanólico en juveniles

Concentración [mg/L]	Repeticiones del experimento						Total espécimene s	Total sujetos muerto s	Proporció n de ajuste	Porcentaj e de mortalida d	Ln de la concentració n	z value	z value corregid o
	1		2		3								
	n1	m1	n2	m2	n3	m3							
0,4	8	8	8	8	8	8	24	24	0,980	100,000	-0,916	#¡NUM!	7,054
150	8	8	8	8	8	8	24	24	0,980	100,00	5,011	#¡NUM!	7,054
75	8	5	8	5	8	6	24	16	0,660	66,667	4,317	5,43072	5,412
38,4	8	2	8	1	8	2	24	6	0,260	25,000	3,648	4,32551	4,357
19,2	8	2	8	2	8	2	24	5	0,220	20,833	2,955	4,18778	4,228
9,6	8	5	8	4	8	4	24	13	0,540	54,167	2,262	5,10463	5,100
0,01	8	0	8	0	8	1	24	1	0,060	4,167	-4,605	3,26833	3,445
0	8	0	8	0	8	0	24	0	0,020	0,000		#¡NUM!	2,946

CL50 43.93 mg/L

Anexo 4. Análisis Probit CT50 del extracto etanólico en juveniles

Concentración [mg/L]	Repeticiones del experimento						Total espécimen es	Total sujeto s muert os	Proporci ón de ajuste	Porcenta je de mortalid ad	Ln de la concentraci ón	z value	z value corregido
	1		2		3								
	n	m	n	m	n	m							
0,4	8	8	8	8	8	8	24	24	0,980	100,000	-0,916	#¡NUM!	7,054
150	8	8	8	8	8	8	24	24	0,980	100,00	5,011	#¡NUM!	7,054
75	8	4	8	4	8	3	24	11	0,460	45,833	4,317	4,8953 67	4,900
38,4	8	2	8	2	8	3	24	7	0,300	29,167	3,648	4,4514 78	4,476
19,2	8	2	8	1	8	0	24	3	0,140	12,500	2,955	3,8496 51	3,920
9,6	8	0	8	0	8	0	24	0	0,020	0,000	2,262	#¡NUM!	2,946
0,01	8	0	8	0	8	1	24	1	0,060	4,167	-4,605	3,2683 36	3,445
0	8	0	8	0	8	0	24	0	0,020	0,000	#¡NUM!	#¡NUM!	2,946

CT50 **49.91 mg/L**

Anexo 5. Frecuencia de malformaciones

Concentración EE	Observación	Total especímenes	# afectados	% Afectados
75 mg/L	Aritmia cardiaca	24	6	25,00
	Edema natatorio	24	3	12,50
	Escoleosis/ malformación columna	24	9	37,50
	Ataxia	23	-	-
	Edema pericartico	24	-	-
38.4 mg/L	Aritmia cardiaca	24	3	12,50
	Edema natatorio	24		0,00
	Escoleosis/ malformación columna	24	7	29,17
	Edema pericartico	24	2	8,33
	Ataxia	24	-	-
19.2 mg/L	Aritmia cardiaca	24	1	4,17
	Edema natatorio	24	1	4,17
	Escoleosis/ malformación columna	24	2	8,33
	Edema pericartico	24	-	-
	Ataxia	24	-	-