



División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Informe final

Evaluaciones preliminares de seguridad y eficacia de tres extractos de *Tagetes micrantha*.

Proyecto genérico correspondiente: Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

Alumna: Zaira Yolotzin Domínguez Velázquez

Matrícula: 2153060507

Asesores:

Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa

M. en C.Q. Olivia Soria Arteché

Lugar de realización:

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos, Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicios (UIDIS), Laboratorio de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas y UPEAL Bioterio.

Fecha de inicio: 15 de noviembre 2018

Fecha de término: 15 de mayo 2019

Índice

I.-Resumen	4
II.-Introducción.....	5
II.1.-Antecedentes	5
II.1.1.-Plantas medicinales	5
II.1.2.-El género <i>Tagetes</i>	5
II.1.3.-Generalidades de <i>T. micrantha</i>	6
II.1.4.-Taxonomía	7
II.1.5.-Usos tradicionales.....	7
II.1.6.-Efectos Biológicos.....	8
II.1.7.-Fitoquímica.....	8
II.2.1.-Generalidades del Dolor.....	9
II.2.2.-Clasificación del dolor	9
II.2.3.-Nociceptores	10
II.2.4.-Proceso neuronal de la señal del dolor	11
II.2.5.-Transducción.....	11
II.2.6.-Transmisión.....	11
II.2.7.-Modulación.....	12
II.3.1.-Generalidades de la Inflamación.....	12
II.3.2.-Tipos de inflamación	13
II.4.1.-Toxicidad aguda.....	15
III.-Planteamiento del problema.....	15
IV.-Objetivos	15
IV.1.-Objetivo general.....	15
IV.2.-Objetivos específicos	15
V.-Materiales y métodos	16
VI.-Resultados y Análisis de resultados.....	18
VII.-Conclusiones	21
VIII.-Recomendaciones	21
IX.-Referencias.....	22

Agradecimientos institucionales

A mi alma mater la Universidad Autónoma Metropolitana por formarme en conocimientos, valores y actitudes.

Al laboratorio de síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas, a mis asesores la M. en C. Q. Olivia Soria Arteché y el Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa por brindarme el espacio para realizar mi proyecto de servicio social, por el conocimiento adquirido, por su apoyo y paciencia.

Al Dr. Sol Cristians Niizawa por las facilidades otorgadas en la colecta de *Tagetes micrantha*, la parte principal de este proyecto.

A la M. en C. Beatriz González Hidalgo, del herbario. Por la identificación del material vegetal.

Dedicatorias

A mi pequeña familia: mi madre Tita Velazquez, mi padre Abraham Dominguez, mi hermano Abraham Dominguez Velazquez, y a Clara por estar siempre en buenas malas y peores. Gracias, por tanto.

A los Velazquez Rodríguez, pero en especial a mi abuela Lucinda y a mi tía Marielena por apoyarme en todo y siempre darme ánimos.

A mis amigos de la Universidad, con los que compartí tanto: Ivonne, Andrea, Esteban, Breni, Zafiro, Citlali y a mi amiga desde siempre, Claudia.

Por último y no menos importante a mi número 15.

Hoy por hoy, estoy en donde estoy y soy lo que soy por ustedes.

I. Resumen

En el presente documento, se detalla la información generada por la evaluación toxicológica y farmacológica preliminar *in vivo*, realizada a un extracto preparado a partir de las partes aéreas de la especie medicinal *Tagetes micrantha*, también conocida popularmente como anisillo. Esta planta es altamente apreciada en varios lugares de nuestro país para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales e inflamatorios.

Con las partes aéreas secas y molidas del anisillo, se prepararon tres extractos, uno acuoso (infusión, TMA) y dos orgánicos [(MeOH 100%, TMM) y (DCM-MeOH 1:1, TMDM)], estos dos últimos por maceración exhaustiva. Estos extractos se emplearon para realizar, en primera instancia, la evaluación de su potencial toxicidad aguda mediante el protocolo de la OCDE 423 *in vivo*.

En el caso particular de TMA y después de evaluar su efecto tóxico agudo, se seleccionó para la búsqueda preliminar de evidencia sobre los potenciales efectos analgésico y antiinflamatorio *in vivo*. Lo anterior, se decidió empleando los siguientes criterios: nula toxicidad, es la forma tradicional de preparación y consumo más importante por la población, así como un alto rendimiento en la obtención del extracto ($\approx 60\%$). Para esto, se emplearon las pruebas del edema auricular agudo inducido con un éster de forbol y de los estiramientos abdominales inducidos con ácido acético al 0.6%.

Después de la preparación de los extractos, se obtuvieron los siguientes rendimientos, TMDM: 4.06, TMM: 3.04 y TMA: 60.90%.

En la evaluación de la toxicidad aguda, la administración de una dosis única de 2 g/Kg de peso no provocó la muerte de ningún animal. Por tanto, y de acuerdo con los criterios de la guía de la OCDE 423, los extractos evaluados no son tóxicos en estas condiciones. Con estos resultados, se escogió al extracto TMA para evaluar sus potenciales efectos antiinflamatorios y antinociceptivos.

En cuanto a la actividad antiinflamatoria, la aplicación de 1 mg/oreja del extracto TMA provocó la disminución del edema inducido por el TPA en un 59.54%. Por su parte, el fármaco de referencia, indometacina, presentó un porcentaje de inhibición de la inflamación del 87.35% a la misma dosis.

Para la evaluación del efecto antinociceptivo de TMA (250 y 500 mg/Kg, vía oral), en el modelo de estiramientos abdominales inducidos con ácido acético diluido (0.6%), el extracto presentó un porcentaje del 62.75% en la disminución de los estiramientos abdominales a la dosis de 250 mg/Kg, mientras que para la dosis de 500 mg/Kg de peso, el porcentaje fue de 56.28%. Por su parte, el fármaco de referencia (Ibuprofeno, 100 mg/Kg, vía oral) inhibió la respuesta nociceptiva en un 97.63%.

Los resultados obtenidos en este proyecto nos indican que, de manera preliminar, los extractos preparados de las partes aéreas del anisillo no son tóxicos en el modelo usado y, que el extracto TMA podría contener sustancias antiinflamatorias y analgésicas. Lo anterior constituye evidencia que sustenta parcialmente los usos

etnomédicos que se la da a *T. micrantha*. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar estos resultados.

II.- Introducción

En México, el uso de plantas medicinales con fines curativos es un hecho, pues las comunidades indígenas poseen un profundo conocimiento de su ambiente, saben los numerosos usos que les pueden dar a las plantas y estos conocimientos constituyen una base importante para la conservación de la biodiversidad global y su uso sustentable (Magaña, Gama, & Mariaca, 2010).

T. micrantha es una especie que se encuentra en diferentes zonas de México, es usada por distintas comunidades de varias maneras; una de ellas es como agente curativo para diferentes padecimientos, entre las que se encuentran dolor de estómago, diarrea, cólicos en niños, cólicos biliares (Arias, 2016), y es apreciada por sus propiedades antiinflamatorias. No obstante, se trata de una planta que no ha sido estudiada lo suficiente para asegurar que su consumo no cause ningún tipo de daño, por lo que representa una excelente oportunidad para realizar los estudios necesarios y obtener información acerca de su seguridad y eficacia.

Como ya se mencionó, el anisillo es utilizado por sus potenciales propiedades analgésicas y/o antiinflamatorias, aunque aún no existe un reporte en donde estos efectos sean evaluados. En este informe, se reporta los resultados de la evaluación preliminar de la toxicidad aguda, efectos antinociceptivo y antiinflamatorio, de tres extractos preparados a partir de las partes aéreas de *T. micrantha*.

II.1.- Antecedentes

II.1.1.-Plantas medicinales

La práctica de la medicina herbolaria se basa en el uso terapéutico de las plantas medicinales como sustitutas de las medicinas alopáticas o en combinación. Además, las experiencias ancestrales acumuladas en el tiempo, su accesibilidad y sus bajos costos, convierten a la medicina herbolaria en la alternativa principal de salud para muchos, lo que ha permitido que estas prácticas se mantengan hasta la actualidad (Gallegos, 2016).

De las plantas se usan sus extractos en diversas formas de preparación para mejorar el estado de salud. El objetivo de esta investigación está en el estudio preliminar de los efectos tóxicos, analgésicos y antiinflamatorios de la planta *T. micrantha*, la cual se presume que posee estas actividades biológicas.

II.1.2.- El género *Tagetes*

Este género cuenta con aproximadamente 50 a 55 especies ampliamente distribuidas en el mundo. Dentro de este, 24 especies se encuentran en mayor parte dentro del territorio nacional (Montes, 2011), considerado posiblemente como el centro de origen y diversidad del género (García et al., 2011).

El género fue utilizado por los pobladores mesoamericanos de diferentes maneras, destacan los usos ceremoniales y medicinales, aunque se registran otros como atenuante o comestible (Serrato, 2009). Actualmente, varias de sus especies se emplean como recurso terapéutico herbolario o como plantas ceremoniales y de ornato, entre otros (García et al., 2011).

El género *Tagetes* pertenece a la tribu Tageteae de la familia botánica Asteraceae o Compositae, la cual está formada por tribus, géneros y especies poco estudiadas. Esta familia botánica quizá sea la segunda más numerosa y distribuida en el mundo.

El género se distingue morfológicamente por lo siguiente: Plantas herbáceas anuales y también perennes, algunas parecen arbustos; tallos comúnmente erectos con hasta 220 cm de altura y puede alcanzar 3 cm de diámetro, en algunas especies las hojas son simples ovado-acuminadas o lineares, pero la mayoría tiene hojas pinnadas o pinatífidas con folíolos enteros, lineares o dentados color amarillo, anaranjado y blancas que son poco frecuente (Serrato, 2014).

II.1.3.- Generalidades de *T. micrantha*

T. micrantha también conocida como anisillo, anís, anís de campo, anisito, anisito rojo, entre otros nombres; es una especie originaria del sureste de los Estados Unidos de Norte América y México, habita frecuentemente en zonas de clima templado (Arias, 2016). En todas las regiones de México se encuentran especies de *Tagetes*, aunque no todas las especies se distribuyen en las mismas regiones ni en los mismos estados.



Figura 1 y 2. Fotografías de *Tagetes micrantha* obtenidas en el Jardín Botánico de la UNAM Niizawa, S. (2018).

Se distribuye en toda la república mexicana, mayoritariamente en los siguientes estados: Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango y Zacatecas en la zona norte. Pasando a la zona centro y sur la podemos encontrar en: San Luis Potosí, Aguas Calientes, Guanajuato, Nayarit, Jalisco, Colima, Veracruz, Puebla, Tlaxcala, Estado de México, CDMX, Querétaro y Morelos (Serrato, 2009).



Figura 3. Mapa de distribución de *Tagetes micrantha*. Obtenido de Tropicos.org. Missouri Botanical Garden <http://www.tropicos.org/Name/2711172>.

II.1.4.- Taxonomía

- Reino Plantae
- Subfilo Angiospermae
- Clase Magnoliopsida
- Orden Asterales
- Familia Asteraceae
- Subfamilia Asteroideae
- Tribu Tageteae
- Género *Tagetes*
- *Tagetes micrantha*

II.1.5.- Usos tradicionales

T. micrantha se considera una planta caliente ya que suele “atemperar” el estómago (García *et al.*, 2011), es por ello que en numerosos estados de la república su uso medicinal incluye el tratamiento de diversas dolencias digestivas, sean cólicos, cólicos de niños (cólico del recién nacido), cólicos biliares y dolores estomacales (bilis y dolor de estómago), por lo general se ingiere el cocimiento de la planta completa o de las ramas.

En Michoacán, además, se ocupa para aliviar dolor de cabeza, dolor de corazón, y de garganta; recomiendan masticarla con un poco de sal (Arias, 2016). Así como para la traspurga, se utiliza contra el torzón y la diarrea, para esta última se bebe el cocimiento de las ramas con azúcar, después de cenar o en ayunas.

Se recomienda para tratar el espanto o susto, enfermedad que se origina a raíz de una impresión fuerte y repentina, en los niños les puede venir cuando los castigan; el tratamiento consiste en tomar el cocimiento de la planta, puede aplicarse también en forma de baños, o sahumero (Argueta, 1994).

También se emplean para dar sabor a los atoles, color y aroma a los elotes y chayotes hervidos por su olor a anís y sabor dulce, usos que se registran desde épocas prehispánicas (García *et al.*, 2011).

II.1.5.- Efectos Biológicos

Varias de las especies de *Tagetes* son utilizadas como aceites esenciales (García *et al.*, 2011). Estos aceites son un recurso importante con un gran potencial en la agricultura orgánica debido al efecto que presentan de inhibir *in vitro* a *Dikeya dadantii* y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, lo cual podría utilizarse en el biocontrol de bacterias fitopatógenas en la agricultura (Rincón, Quiñones, Qui, & Serrato, 2012).

T. micrantha está relacionada con las enfermedades gastrointestinales, resultados que concuerdan con lo reportado por Aguilar contreras y colaboradores (2005), quienes mencionan que algunas especies de este género se utilizan actualmente para el tratamiento de diarrea y disentería (García *et al.*, 2011).

II.1.6.- Fitoquímica

Las especies del género *Tagetes* poseen una amplia diversidad de metabolitos secundarios, los cuales son importantes para su supervivencia y reproducción. Entre los compuestos químicos que se han identificado del género *Tagetes* se encuentran derivados fenólicos del tiofeno y del benzofurano, terpenos, esteroides, alcaloides, flavonoides, cumarinas, y carotenoides (Contreras, 2018).

La información de *T. micrantha* respecto a su fitoquímica es escasa, pero dentro del género, se han estudiado a varias de ellas. En la tabla 1 se encuentran los compuestos obtenidos de algunas de las especies del género *Tagetes*.

Los extractos de algunas especies de *Tagetes*, tales como *T. patula*, *T. pusila*, *T. minuta*, *T. lucida* y *T. máxima* han presentado efectos nematocida, insectocida, antifúngico, antibacteriano, antiinflamatorio y antioxidante. Estas actividades biológicas han sido relacionadas con la presencia de piretrina, flavonoides, tienoles y terpenoides (Escobar *et al.*, 2009).

T. erecta ha sido reconocido como nematocida y larvicida, además, los extractos de sus semillas tienen actividad antimicrobiana efectiva (Bye, 1986).

Los extractos de la planta entera de *T. minuta* muestran cualidades antitumorales y los ensayos de su aceite esencial revelaron que tiene actividad tranquilizante, hipotensor, broncodilatador, espasmolítico y antiinflamatorio (Bye, 1986).

Estudios farmacológicos de patuletina, que es un derivado de *T. patula*, indican que reduce la permeabilidad capilar y tiene efectos antiespasmódicos e hipotensores (Bye, 1986).

Los compuestos químicos anetol y alilanol, del grupo fenilpropanoides, constituyen la mayor parte del aceite esencial de *Tagetes filifolia*, el anetol produce diferentes efectos biológicos como repelente, insectocida, fungicida, nematocida y bactericida (Serrato *et al.*, 2008).

Tabla 1. Compuestos obtenidos de extractos y aceites esenciales de tres especies de *Tagetes*

Especie	Cetonas	Terpenoides	flavonoides	otros
<i>T. lucida</i>	Tagetona Carvona Deshidrotagetona	Ocimeno β -sitoesterol Ocimenona Pinoeno Canfeno Limoneno Felandreno	Flavonoides no identificados	Un alcaloide no identificado Alcoholes Ésteres
<i>T. minuta</i>	Tagetona Carvona Deshidrotagetona	Ocimeno Ocimenona Pinoeno Canfeno Limoneno Felandreno	Patuletina Quercetina Quercetagetina Isoramnetina	Alcoholes Ésteres
<i>T. filifolia</i>	Carvona	Pinoeno Canfeno Mirceno δ -careno Terpineno <i>p</i> -cimeno Cineol <i>trans</i> - β - Ocimeno γ -terpineno β -terpineol Citronelal Alilanisol	Flavonoides no identificados	4-anisaldehído Estragol Pulegona Anetol Isosafrol Acetato de metilo Metileugenol Farneseno Ledol Espatuleno Cadinol Linalool

II.2.1.- Generalidades del Dolor

Es difícil poder definir el dolor, pero el concepto más acertado es el siguiente:

“Experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a una lesión tisular presente o potencial, o que se describe en términos de dicha lesión”.

Es un mecanismo que sirve para proteger al organismo, de tal forma que el individuo reacciona eliminando o alejándose del estímulo doloroso. El dolor, por tanto, no se define exclusivamente como una percepción nociceptiva, sino que constituye una experiencia subjetiva integrada por un conjunto de pensamientos sensaciones y conductas (Muriel, 2001).

El dolor tiene una alta prevalencia y un gran impacto individual, familiar, laboral, social y económico. Es, en general, la causa principal de atención médica y, por tanto, de ausentismo laboral, incapacidad y pensión por invalidez.

II.2.2.- Clasificación del dolor

La clasificación del dolor la podemos hacer atendiendo a su duración, patogenia, localización, curso, intensidad, factores pronósticos de control del dolor y, finalmente, según la farmacología (Puebla, 2005). Dentro de este documento solo destacaremos la basada en la duración y en la patogenia.

De acuerdo con su duración.

Se clasifica en agudo y crónico o bien rápido y lento. El dolor agudo surge inmediatamente después de que se recibe el estímulo doloroso o lesión tisular (0.1 segundos), no se siente en tejidos profundos del organismo y existe una correlación importante entre la intensidad del dolor y la patología desencadenante, su evolución natural es disminuir progresivamente hasta desaparecer, una vez que se produce la curación de la lesión subyacente (Idáñez, 2012).

Por su parte, el dolor crónico surge después de un segundo de haber recibido la lesión tisular y va creciendo gradualmente a lo largo de varios segundos y hasta minutos, genera un dolor insoportable y prolongado. Se presenta en la piel, tejidos y órganos profundos (Guyton y Hall, 2007). Otras características del dolor crónico además del factor tiempo, son que en ocasiones las posibilidades para identificar la patología causal suelen ser baja e insuficiente para explicar la presencia y/o la intensidad del dolor, y responden pobremente a los tratamientos habituales (Idáñez, 2012).

De acuerdo con su patogenia.

El dolor clasificado según su patogenia tiene tres divisiones:

- Neuropático

Es producido por estímulo directo del sistema nervioso central (SNC) o por lesión de vías nerviosas periféricas. Se describe como punzante, quemante (Puebla, 2005). En esta clase de dolor se presenta una sensación de descarga eléctrica o de quemadura, está asociado a signos sensoriales como la alodinia (estímulos que normalmente no son dolorosos) o hiperalgesia (aumento de la sensibilidad en receptores de dolor), (Gómez & Tortorici, 2009).

- Psicógeno

El dolor psicógeno es aquél en el que predomina la dimensión afectiva emocional sin causa orgánica que lo justifique (Tarrío, 2004).

- Nociceptivo

El dolor nociceptivo se caracteriza principalmente por la activación directa de las terminaciones libres de fibras sensoriales especializadas presentes en tejidos periféricos que actúan como receptores del dolor, denominados nociceptores. (Guerrero, 2007). Este tipo de dolor es el más frecuente y se divide en somático y visceral.

II.2.3.- Nociceptores

Las terminaciones nerviosas libres que responden específicamente a los estímulos que dañan los tejidos son receptores llamados nociceptores (Viera, 2017). Su principal función es diferenciar los estímulos inocuos de los lesivos, de modo que ignoran los de baja intensidad y codifican el estímulo lesivo dentro de un rango de intensidades transmitiéndolo al SNC (Romera, Perena, & Perena, 2000).

Tipos de nociceptores

Nociceptores cutáneos: Presentan un alto umbral de estimulación, sólo se activan ante estímulos intensos y no tienen actividad en ausencia de estímulo nocivo. Existen de 4 tipos:

- Nociceptores A- δ situados en la dermis y epidermis. Son fibras mielínicas con velocidades de conducción alta y sólo responden a estímulos mecánicos.
- Nociceptores C amielínicos, con velocidades de conducción lenta. Se sitúan en la dermis y responden a estímulos de tipo mecánico, químico y térmico.
- Nociceptores músculo-articulares: En el músculo, los nociceptores A- δ responden a contracciones mantenidas del músculo, y los de tipo C, responden a la presión, calor, e isquemia muscular. En las articulaciones, también existen estos dos tipos de nociceptores y se sitúan en la cápsula articular, ligamentos, periostio y grasa, pero no en el cartílago.
- Nociceptores viscerales: La mayor parte son fibras amielínicas. Existen de dos tipos: los de alto umbral, que sólo responden a estímulos nocivos intensos, y los inespecíficos que pueden responder a estímulos inocuos o nocivos (Ferrandiz, 2011).

II.2.4.- Proceso neuronal de la señal del dolor

La nocicepción es un proceso de percepción de estímulos nocivos, que comprende cuatro fases y se encuentran sujetos a modulaciones farmacológicas: la transducción, transmisión, modulación y percepción.

II.2.5.- Transducción

Es el proceso por el cual el estímulo nociceptivo es convertido en señal eléctrica en los nociceptores. Estos responden a diferentes noxas, térmicas, mecánicas o químicas; pero no responden a estímulos no nociceptivos. La liberación periférica de neurotransmisores permite el clásico axón-reflejo, el cual origina cambios periféricos que son reconocidos como indicadores de dolor: enrojecimiento, hinchazón, tersura (Zerraga, 2007).

La transducción se activa en cuanto los nociceptores captan y transforman el estímulo nocivo en señales eléctricas, posteriormente durante la transmisión, estas señales se propagan a lo largo de las fibras nociceptivas hasta la médula espinal (Coderre *et al.*, 1993; Guevara-López, 2008).

II.2.6.- Transmisión

Es el segundo estadio del proceso de la señal nociceptiva. La información de la periferia es transmitida a la médula espinal, luego al tálamo y finalmente a la corteza cerebral. La información es transmitida, a través de dos neuronas nociceptivas aferentes primarias:

- Fibras C o nociceptores polimodales C; que son no mielinizadas, representan el 80% de todos los nociceptores periféricos transmiten información nociceptiva mecánica, térmica y química.
- Fibras A delta; son fibras mielinizadas delgadas, conducen a 2. 20 m/segundo; responden a estímulos mecánicos de alta intensidad, por lo cual son llamadas mecanos receptores de umbral alto; algunas de estas fibras responden a estímulos térmicos.

Los nociceptores aferentes transmiten la señal de la periferia a través de la liberación de neurotransmisores específicos que están asociados con el dolor: glutamato y sustancia P. El glutamato es el neurotransmisor más importante que interacciona con los receptores de aminoácidos excitatorios: *N*-metil **D**-aspartato (NMDA) y no NMDA. La sustancia P, interactúa con los receptores dobles de la proteína G. Las fibras nerviosas aferentes primarias en la asta dorsal espinal hacen sinapsis con la neurona de segundo orden. Dichas fibras viajan en el tracto de Lissauer el cual está localizado en la sustancia gris de la asta dorsal espinal; la misma está dividida anatómicamente en 6 capas o láminas (lámina I, II, III, IV, V, VI), cada una de las cuales recibe tipos específicos de fibras aferentes nerviosas (Zegarra, 2007).

II.2.7.- Modulación

La asta dorsal de la médula espinal permite el primer nivel de integración en el SNC y su modulación por las interneuronas espinales, dirige la información a través de las vías ascendentes y, finalmente, permite la elaboración de respuestas reflejas, tanto vegetativas como motoras (Romera *et al.*, 2000).

Representa los cambios que ocurren en el sistema nervioso en respuesta a un estímulo nociceptivo, el mismo permite que la señal nociceptiva recibida en la asta dorsal de la medula espinal sea selectivamente inhibida, de manera que la señal a los centros superiores es modificada (Zegarra, 2007) siendo el resultado final de la percepción o proceso neuronal del dolor.

II.3.1.- Generalidades de la Inflamación

El daño a los tejidos corporales activa una respuesta defensiva denominada inflamación (Tortora, 2007).

El proceso inflamatorio es una respuesta diseñada específicamente para eliminar cualquier estímulo nocivo tanto endógeno (ej. productos del sistema inmune) como exógeno (sustancias químicas, bacterias y virus), es desencadenada por diversos factores como son infecciones o lesiones físicas (Clark y Johnson, 1995; Burke *et al.*, 2007). Se caracteriza por cinco signos clínicos: rubor, calor, dolor, tumor (edema) e impotencia funcional (González & González, 2019).

1) Calor: o aumento local de la temperatura secundario a la vasodilatación, y aumento de consumo local de oxígeno.

2) Rubor: producido por el incremento del flujo sanguíneo en la zona afectada.

3) Dolor: provocado por distensión de los tejidos y liberación de prostaglandinas como mediadores químicos.

4) Edema: resultante del aumento de la permeabilidad capilar y consiguiente sufusión de líquido en el tejido intersticial.

A estos signos Rudolf Virchow, médico alemán, les sumó un quinto signo clínico, *functio laesa*, que es la pérdida de funcionalidad, resultante de la limitación a la que conduce la conjugación de los cuatro signos mencionados (Villalba, 2014).

Estas manifestaciones cardinales son causadas por la acumulación de leucocitos, proteínas plasmáticas y derivados de la sangre hacia sitios de los tejidos extravasculares donde existe una infección o lesión (González & González, 2019). Forma parte de la primera línea de defensa del sistema inmune, se presenta inmediatamente cuando el organismo detecta la presencia de algún agente extraño o una lesión tisular (Madigan *et al.*, 2009).

Si existe una agresión de cualquier etiología, se desencadena un proceso inflamatorio mediado por factores humorales y celulares, que intentan limitar y reparar la lesión producida.

II.3.2.- Tipos de inflamación

La clasificación de la inflamación se realiza tomando en cuenta el tiempo de duración, carácter del exudado, etiología, características morfológicas y localización (Villalba, 2014). Por su duración pueden ser agudas o crónicas.

Aguda

La inflamación aguda constituye una respuesta natural, de carácter protector, que pretende librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias que esta provoca (León *et al.*, 2015). Se caracteriza por ser una respuesta rápida, con una duración que oscila entre minutos, horas y pocos días. Se caracteriza por la exudación de líquido, proteínas plasmáticas (edema) y la migración de leucocitos generalmente de neutrófilos al lugar de la lesión.

El primer evento que se genera durante la inflamación aguda es la dilatación de los vasos sanguíneos provocando un aumento del flujo sanguíneo en el foco de la lesión, este suceso ocasiona un cambio visible de color en el tejido. Posteriormente, existe el aumento de la permeabilidad vascular. La alteración de la permeabilidad constituye la característica principal que provoca el exudado antes mencionado (León *et al.*, 2015). El aumento de la permeabilidad vascular se genera por varios mecanismos, que pueden producirse simultáneamente:

- Formación de aberturas entre las células endoteliales de las vénulas
- Reorganización del citoesqueleto (retracción endotelial)
- Aumento de la transcitosis
- Lesión endotelial directa, con necrosis y desprendimiento de las células endoteliales

- Lesión endotelial mediada por leucocitos

El siguiente evento que se presenta durante el proceso de inflamación es la expresión de las selectinas P y E sobre las células endoteliales, las cuales atraen a los leucocitos, principalmente a los neutrófilos, permitiendo su adhesión a las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos (Prescott *et al.*, 2004).

Una de las funciones características e importantes de la inflamación, es el aporte de leucocitos a la zona de la lesión. Los leucocitos fagocitan a los patógenos, destruyen a las bacterias y a los microorganismos, y degradan el tejido necrótico, pero también pueden prolongar la lesión tisular al liberar enzimas, mediadores químicos y especies reactivas del oxígeno (León *et al.*, 2015).

La siguiente parte de este proceso es la transmigración, se produce fundamentalmente a través de las uniones intercelulares, estando implicadas ciertas moléculas de adhesión presentes en las uniones de las células endoteliales; una de ellas se denomina PCAM-1 (familia de los genes codificadores de inmunoglobulinas). Esta respuesta termina una vez que se elimina al agente infeccioso. Si la respuesta inflamatoria falla, este proceso persiste convirtiéndose en una etapa crónica (Ahmed, 2011).

Crónica

La inflamación crónica, que tiene lugar mientras existe muchas infecciones persistentes, se caracteriza por la presencia de un número anormalmente grande de linfocitos dentro del tejido. Generalmente también están presentes macrófagos en gran número, como lo están los basófilos en algunos tipos de inflamación crónica. Los términos inflamación aguda e inflamación crónica no son mutuamente excluyentes. (Stanier, Ingraham, Wheelis, & Painter, 1992).

El término crónico alude a una respuesta inflamatoria persistente por más de algunos días o semanas. Una inflamación aguda puede transformarse en crónica (Muñoz, 2013).

La respuesta inflamatoria crónica se ha clasificado en varias clases (Reyes *et al.*, 2006):

- Inflamación crónica fibrosa: Predomina la infiltración de fibroblastos los cuales producen abundante tejido conectivo o proteínas de la matriz extracelular.
- Inflamación crónica serosa: Se caracteriza por que en el área de la lesión se acumula un exudado claro que parece suero.
- Inflamación crónica supurada: Consiste en la formación de pus en una cavidad recién formada.
- Inflamación crónica granulomatosa: Se caracteriza por que en el tejido afectado contiene múltiples estructuras pequeñas, en forma de granos, conocidos como granulomas.

La respuesta inflamatoria crónica se subdivide en dos partes: una es la respuesta celular y la otra es la granulación del tejido (Muñoz, 2013). La inflamación crónica se

presenta cuando la inflamación aguda no ha logrado mitigar el estímulo nocivo o cuando la misma respuesta inflamatoria se autoperpetúa (Chávez, Elizondo, Gutiérrez, & León, 2011).

II.4.1.- Toxicidad aguda

El uso de fitomedicamentos constituye una nueva categoría terapéutica. La existencia de plantas con un elevado potencial terapéutico constituye una alternativa farmacológica de marcado interés en el tratamiento de muchas enfermedades, de ahí la importancia de realizar estudios preclínicos con el propósito de detectar posibles efectos tóxicos post administración. Dentro de la batería de ensayos de primera línea se encuentran los estudios de toxicidad a dosis única imprescindibles en la estimación del potencial tóxico de una sustancia, referido como el estudio cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas (Bermúdez *et al.*, 2007).

III.- Planteamiento del problema

Tagetes micrantha no ha sido lo suficientemente estudiada (Cortes, Lara & Aoki, 2004); a pesar de esto, es usada ampliamente por diferentes grupos rurales en nuestro país. Además, es una de las especies enlistadas en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, debido a su relevancia en su uso terapéutico y existe la necesidad de estudios químicos, toxicológicos, farmacológicos, entre otros. Por lo anterior, se plantea en este proyecto de Servicio Social, evaluar de manera preliminar la toxicidad aguda, así como sus potenciales efectos analgésicos y antiinflamatorios, de tres extractos de la planta.

IV.- Objetivos

IV.1.- Objetivo general:

Evaluar de manera preliminar, los efectos tóxicos agudos, antinociceptivos y antiinflamatorios *in vivo*, de tres extractos preparados de las partes aéreas de la especie *Tagetes micrantha*.

IV.2.- Objetivos específicos:

- Preparar tres extractos (uno acuoso y dos orgánicos), de las partes aéreas de *T. micrantha*.
- Evaluar la toxicidad aguda de los extractos, empleando el protocolo de la OCDE (423) en ratones.
- Evaluar la actividad antinociceptiva de uno de los extractos en el modelo de estiramientos abdominales inducidos con ácido acético diluido.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de uno de los extractos en el modelo del edema auricular agudo inducido con un éster de forbol.

V.- Materiales y Métodos

Obtención del material vegetal y preparación de los extractos.

Para la preparación de los extractos se utilizaron las partes aéreas, limpias y secas previamente, de la especie *T. micrantha*. El material vegetal se obtuvo de la Reserva Ecológica del Jardín Botánico de la UNAM, colectada por el Dr. Sol Cristians Niizawa. La identificación la realizó la M. en C. Beatriz González Hidalgo, responsable del Herbario de la UAM-Xochimilco.

Los extractos orgánicos se prepararon de acuerdo con la tabla 2. De manera breve, se pesaron 50 g del material vegetal y se agregaron en un recipiente de vidrio de 1L. En este mismo se agregaron los disolventes mencionados en la tabla 2, dejando reposar durante tres días. Posteriormente, se filtraron y se concentraron con ayuda de un rotavapor. El disolvente recuperado se usó para extraer nuevamente el material vegetal. Este proceso se repitió tres veces para cada disolvente.

Para el caso del extracto acuoso, la infusión se preparó pesando 50 g del material vegetal, vertiendo 750 mL de agua recientemente hervida. Posteriormente, se dejó reposar por 30 minutos, se filtró y se sometió a un proceso de liofilización.

Tabla 2. Claves, cantidades de disolventes y material vegetal para la preparación de los extractos de *T. micrantha*.

Clave del extracto	Volumen de disolvente (mL)	Peso de material vegetal <i>T. micrantha</i> (g)
Agua (TMA)	750	50
Metanol (TMM)	500	50
Diclorometano-Metanol 1:1(TMDM)	500	50

Para cada uno de los extractos se obtuvo el rendimiento, el cual fue calculado con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto seco obtenido (g)}}{\text{Peso del material vegetal inicial (g)}} \times 100$$

Evaluaciones biológicas

En los experimentos se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1 con un intervalo de peso entre 20-30 g obtenidos del UPEAL-bioterio de la UAM Xochimilco. Se mantuvieron en condiciones estándar (ciclos de 12 horas luz/obscuridad) con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el cuidado y manipulación de animales de experimentación. También se observaron con detenimiento la aplicación de reglas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Evaluación de la toxicidad aguda *in vivo*.

Esta prueba se realizó de acuerdo con la guía de la OCDE 423.

Se utilizaron tres ratones CD-1 entre 25 y 30 gramos de peso corporal, que se dejaron en ayuno durante ocho horas con libre acceso a agua. Previo al experimento, se observó el comportamiento de los ratones durante treinta minutos para establecer el comportamiento estándar de los ratones. Posteriormente, se les administró los distintos extractos de *T. micrantha* por vía oral, la dosis utilizada fue de 2 g/kg de peso. En cuanto al grupo control, se utilizaron tres ratones de entre 25 y 30 gramos de peso corporal, a los cuales se les administró solamente solución salina (10 ml/kg de peso) por vía oral.

Después de realizar el procedimiento mencionado, se evaluó el comportamiento de los ratones durante ocho horas posteriores a la administración de los tratamientos. Pasado este tiempo, se observó la conducta de los animales durante 14 días, anotando cualquier comportamiento fuera de lo normal y registrando la variación de peso corporal.

Evaluación de la actividad antiinflamatoria en la prueba del edema auricular agudo en oreja de ratón.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria del TMA empleando la prueba del edema auricular agudo inducido con TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol) en ratón. Para ello, se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1, los cuales fueron distribuidos en tres grupos de tratamientos de tres ratones cada grupo [TMA (1 mg/oreja), indometacina (1 mg/oreja) y vehículo (SSI)]. Previo a la administración de los tratamientos, los animales fueron anestesiados con una solución de pentobarbital sódico comercial (dilución 1:10 en SSI); una vez anestesiados, se les aplicó de manera tópica en la oreja derecha 20 µL de TMA disueltos en etanol al 70%. Para el grupo dos (indometacina) se aplicó el fármaco de referencia disuelto en 20 µL de acetona, mientras que para el tercer grupo (vehículo), el disolvente donde se solubilizó el extracto (etanol al 70%). Finalmente, y posterior a la aplicación de los tratamientos, a todas las orejas derechas se les aplicó TPA (2.5 µg/oreja disueltos en 20 µL de acetona). En todas las orejas izquierdas se administró el medio en el que fue disuelto el tratamiento (etanol al 70% o acetona).

Después de cuatro horas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se tomaron biopsias de tejido auricular de 7 mm de ambas orejas con ayuda de un sacabocados. Más adelante, se calculó el porcentaje de inhibición del edema con la fórmula siguiente.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{peso de la oreja derecha TPA} - \text{peso de la oreja derecha tratamiento}}{\text{peso de la oreja derecha TPA}} \times 100$$

Evaluación de la actividad antinociceptiva en la prueba de los estiramientos abdominales en ratón.

Se evaluó la actividad antinociceptiva del TMA empleando la prueba de los estiramientos abdominales inducidos con ácido acético (0.7%) en ratón. Para ello, se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1, los cuales fueron distribuidos en tres grupos de tratamientos de tres ratones cada grupo [TMA (250 y 500 mg/Kg), ibuprofeno (100 mg/Kg) y vehículo (Tween + SSI)]. Los ratones fueron administrados vía oral con los tratamientos 60 minutos previos a la inducción de los estiramientos-contracciones abdominales. Una vez transcurrido el tiempo de absorción, se administró por vía intraperitoneal una solución diluida de ácido acético al 0.7% a cada ratón. Inmediatamente, los animales se colocaron en una caja de plástico transparente y se contaron el número de estiramientos y contracciones en periodos de 5 minutos hasta completar 30 minutos.

La nocicepción se manifiesta por estiramientos abdominales (en algunas ocasiones se pueden observar contracciones); por lo tanto, el experimentador registra el número de estiramientos de las patas traseras y flexión del cuerpo hacia atrás.

VI.- Resultados y Análisis de resultados

Preparación de los extractos.

Los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado; se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal (Carrión & García, 2010). Los extractos realizados, fueron preparados con la finalidad de probar con cuál de los disolventes se obtenía un mejor rendimiento y una mayor cantidad de metabolitos, tratando de abarcar distintas polaridades.

Se calculó el rendimiento del proceso de extracción con cada uno de los disolventes el de TMA fue el más alto con un valor de 60.90%, seguido de TMDM con 4.06%, TMD con 3.56% y TMM 3.04%.

Toxicidad aguda

Como se mencionó en el apartado de metodología para evaluar la toxicidad aguda, se utilizó la guía de la OCDE 423 para tal propósito. Este tipo de evaluaciones debe ser de los primeros procedimientos que un producto destinado al consumo humano debe ser objeto. De igual manera, dado que se pretende evaluar efectos farmacológicos en animales de laboratorio, es importante también realizar este ensayo para averiguar si existe algún tipo de efecto tóxico por la administración de los extractos de *T. micrantha*. Los resultados obtenidos indicaron que no hubo ningún deceso de los animales durante las dos semanas de evaluación (Tabla 5), sin embargo, se notaron algunos efectos sobre algunos animales. El ratón número 3 de grupo administrado

con TMDM presentó un crecimiento anormal de la cabeza al cuarto día del tratamiento. Debido a esto, fue sacrificado al día 5, pues se notó que también disminuyó su movilidad.

Otro de los ratones que tuvo que ser sacrificado por una situación similar fue el ratón número 3 al cual se le administró solución salina, por lo tanto, se cree que esto dos animales podrían haber presentado algún problema no relacionado con la administración de los extractos, pues en este último caso, no debió de tener ningún tipo de alteración ya que se le administró solo solución salina.

Fuera de estas dos situaciones los demás animales no tuvieron ningún comportamiento anormal, por lo tanto, en esta dosis podemos ver que no existen signos de toxicidad.

Tabla 3. Toxicidad aguda a una sola dosis de cuatro extractos de T. micrantha

Tratamiento	Animales por grupo	Animales muertos
TMA	3	0
TMM	3	0
TMDM	3	0
TMD	3	0

Actividad antiinflamatoria

Una vez evaluada la actividad tóxica aguda, se procedió a evaluar la actividad antiinflamatoria empleando el modelo del edema auricular agudo inducido con TPA en ratón. En esta evaluación sólo se utilizó el extracto acuoso (TMA), ya que fue el de mejor rendimiento en la extracción y es la forma tradicional en la que se usa la planta. Como fármaco de referencia se usó indometacina.

Los resultados obtenidos mostraron que la administración de una dosis de 1 mg/oreja del TMA provocó un porcentaje de inhibición del edema en un 61%, mientras que el fármaco de referencia mostró un porcentaje de inhibición de 87.56%. Lo anterior nos indica que el extracto acuoso muestra un potencial antiinflamatorio bueno. De manera adicional, en este experimento es importante destacar que el tratamiento se aplica de manera tópica, por tanto, los compuestos deben ser permeable a la piel, esto nos permite suponer que el extracto podría ser utilizado en una presentación tópica y que los compuestos responsables de esta actividad deben tener naturaleza lipofílica.

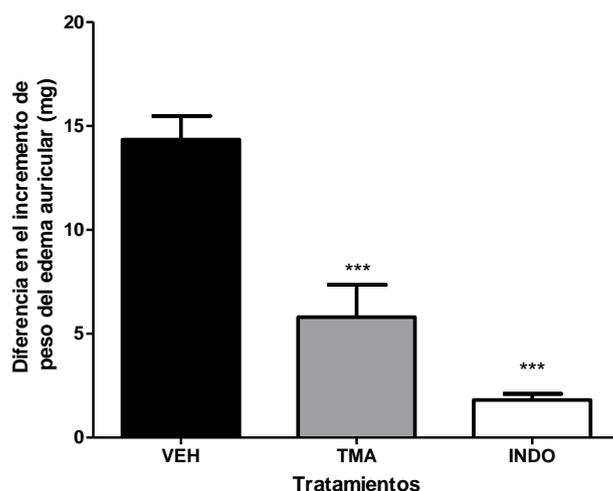


Figura 4. Efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de *T. micrantha* (1 mg/oreja) en el modelo de edema auricular agudo inducido con TPA en ratón. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=8$ ratones. *** Diferencia estadísticamente significativa con el VEH ($P<0.001$).

Actividad antinociceptiva

Los resultados que se obtuvieron para la actividad antinociceptiva en la prueba de estiramientos abdominales en ratón están condensados en la figura 5. En ella, podemos ver que el fármaco ibuprofeno disminuyó el número de estiramientos abdominales de manera notoria, en comparación con el grupo de animales al que se le administró solución salina o vehículo (promedio de estiramientos del 90.71).

El extracto evaluado fue TMA de igual manera que para la actividad antiinflamatoria, y se utilizaron dos dosis como se describió en el apartado metodología. Podemos observar que para la primera dosis de 250 mg/kg, se obtuvo un porcentaje de inhibición en los estiramientos del 62.75% y para la segunda dosis de 500 mg/Kg una inhibición de 56.28%; el aumento de la dosis al doble no indicó necesariamente que los estiramientos decrecieran en comparación con la dosis de 250 mg/kg de peso.

El modelo de estiramiento abdominal nos ayuda a obtener como resultado el comportamiento de alguna sustancia respecto al dolor provocado por el ácido acético. De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, algunas de las especies de *Tagetes* (*minuta*, *terniflora*, *multiflora*, *laxa*, *campanulata*) presentan efecto analgésico o como lo reportan Rondina y sus colaboradores (2008) son antiespasmódicas, y ayudan a aliviar el dolor de estómago. Esto podría explicar el efecto observado para TMA y debe ser corroborado mediante la experimentación adecuada para la actividad antiespasmódica.

De acuerdo con la investigación realizada por Gutiérrez Gaitén y sus coparticipes (2018), en donde estudiaron a *T. lucida*, esta contiene taninos y flavonoides, los cuales poseen propiedades analgésicas, entre otras. Esto nos ayuda a inferir, desde un enfoque quimiotaxonómico, que probablemente *T. micrantha* contenga algunos metabolitos secundarios que como en el caso de *T. lucida* le confieren ese efecto biológico.

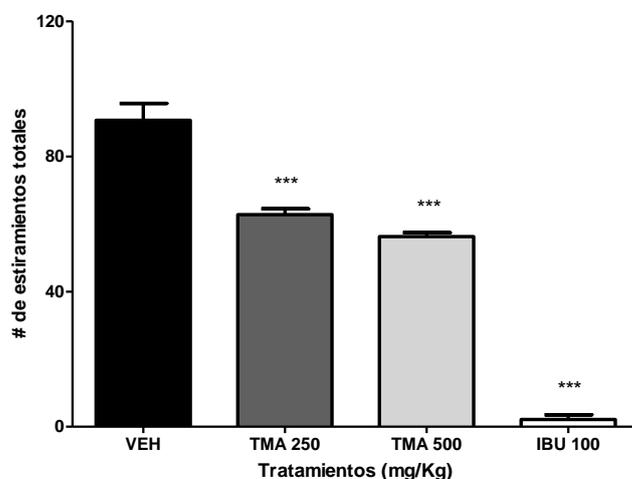


Figura 5. Efecto antinociceptivo del extracto TMA (250 y 500 mg/kg) en el modelo de estiramiento abdominal inducido con ácido acético. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=8$ ratones. * Diferencia estadísticamente significativa con el VEH ($P<0.001$).

VII.- Conclusiones

Conforme lo obtenido a la evaluación de *T. micrantha*, se puede concluir que los tres extractos preparados no presentaron efectos tóxicos agudos después de su administración en ratones por vía oral.

En cuanto a las actividades biológicas estudiadas, TMA disminuyó de manera significativa el edema auricular producido por el TPA, comparado con un fármaco de referencia. Para la evaluación del efecto antinociceptivo, se observó un efecto moderado y no dependiente de la dosis.

Los resultados aquí reportados son evidencia parcial que sustenta el uso que las personas le dan al anisillo con fines medicinales.

VIII.- Recomendaciones

Debido a los resultados obtenidos en este proyecto es viable dar a conocer las perspectivas de este.

Realizar el aislamiento, análisis, y purificación de *Tagetes micrantha*.

Evaluar a los extractos y compuestos para identificar cuáles son activos y confieren los efectos analgésicos y antiinflamatorios.

IX.- Referencias

- Aguilar Contreras, A; Tapia Pérez, M; & Osuna Torres, L. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Barcelona. Editorial: Universidad de Barcelona. pág. 173.
- Ahmed Afsar, U. (2011). An Overview of inflammation: mechanism and consequences. Australia. Centro de Enfermedades Inflamatorias. Biol. 6, pág. 274-281.
- Anisillo *Tagetes micrantha*, Naturalista recuperado el 04 de agosto de 2019, de: <https://www.naturalista.mx/taxa/154007-Tagetes-micrantha>.
- Arias Chalico, L. (2016). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Ciudad de México. UnADM. pág. 24.
- Cortés Arroyo, A.R.; Lara Chacón, B., & Aoki Maki, K. (2004). Screening and Selection of Plants by Positive Pharmacologic Effect on Jejenum Muscular Contractility, Pharmaceutical Biology, volumen 42, No.1, pág. 24-29.
- Bermúdez Toledo, D.; Monteagudo Jiménez, E.; Boffill Cárdenas, M.; Díaz Costa, L.; Roca Simeón, A; Betancourt Morgado, E., & Silveira Prado, E. (2007). Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. España. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, volumen 8, No.3, pág.1-7.
- Bye Robert, A. (1986). Medicinal plants of the Sierra Madre comparative study of Tarahumara and mexican market plants. Ciudad de México. Economic Botany 40, volumen 1, pág. 103-124.
- Carrión Jara, Ana Victoria, & García Gómez, Cándida Rafaela. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica (tesis doctoral). Cuenca Ecuador. Facultad de ciencias químicas escuela de bioquímica y farmacia, recuperado de: <https://www.coursehero.com/file/50725284/tq1005pdf/>.
- Casanova Egon, R. (2006). Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Chile. Revista médica de Chile, volumen 134, No. 9 pág. 1200-1202.
- Chávez Gonzáles, A.; Elizondo Argueta, S.; Gutiérrez Reyes, G., & León Pedroza J. (2011). Implicaciones fisiopatológicas entre inflamación crónica y el desarrollo de diabetes y obesidad. Ciudad de México. Cirugía y cirujanos, volumen 79, No. 2 pág. 209-216.
- Clarck, W.G., & Johnson, A. (1997). Farmacología Médica. 13ª edición, Editorial Mosby. España. 156-158.
- Coderre Terence, J.; Kats, J; Vaccarino A., & Melzack R. (1993). Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. Ovid revista electrónica. Recuperado de: <https://insights.ovid.com/article/00006396-199303000-00002>.
- Contreras Bailón, A. (2018). Análisis Fitoquímico, actividad insecticida y antifúngica de extractos de *Tagetes lucida* y *Tagetes patula* (tesis). Morelos pág.49, recuperado de:

<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/24501/PTesis%202018%20Araceli%20Contreras%20Bail%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

- De Feo Vincenzo; Della Porta, G; Soria Urrunaga, E; Soria Urrunaga, R & Senatore, F. (1998). Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. Italia pág.145-147.
- Escobar, P; Herrera, L; Leal, S; Durán, C; & Stashenko, E. (2009). Composición química y actividad antitripanosomal de aceites esenciales obtenidos de *Tagetes* (Fam. Asteraceae), recolectados en Colombia. Colombia. Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP), Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander. pág-281-286.
- Gallegos Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. Anales de la Facultad de Medicina, volumen 77, No.4, pág. 327-332.
- García, A. S., & Guzmán Mendoza, R. (2016). Conocimiento tradicional asociado al uso de plantas medicinales en migrantes mazahuas de una comunidad indígena de San José del Rincón, Estado de México. Huellas de la Migración. Universidad de Guanajuato, Volumen 1, No. 1, pág. 195-220.
- García Sánchez, F.; López Villafranco, M.; Aguilar, S., & Aguilar Contreras, A. (2011). Etnobotánica y morfo-anatomía comparada de tres especies de *Tagetes* que se utilizan en Nicolás Romero, Estado de México. Botanical Sciences, volumen 90, No. 3, pág. 221-232.
- Gómez Barrios, J. V. & Tortorici, V. (2009). Mecanismos del dolor neuropático: del laboratorio a la clínica. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. Venezuela, volumen 28, No. 1, pág. 2-11.
- González Costa, M., & González, Alexander Ariel Padrón. (2019). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. Revista Habanera de Ciencias Médicas, volumen 18, No. 1, pág.30-44, recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1729-519X2019000100030.
- Guerrero, J. A. (2007). Compuestos antihiperlipémicos y antinociceptivos de la especie *Hintonia standleyana* Bullock (Rubiaceae). Una contribución a la determinación de los parámetros de inocuidad, calidad y eficacia de la droga cruda (Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias; UNAM, Posgrado en Ciencias Químicas), recuperado de: <https://quimica.unam.mx/ensenanza/posgrados-de-la-facultad-de-quimica/maestria-y-doctorado-en-ciencias-quimicas/>.
- Gutiérrez Gaitén, Y.; Scull Lizama, R.; García Simón, G., & Montes Álvarez, A. (2018). Evaluación farmacognóstica, fitoquímica y biológica de un extracto hidroalcohólico de *Tagetes lucida* Cavanilles. Cuba. Revista Cubana De Plantas Medicinales, Volumen 23, No. 2.
- Guyton A. C., & Hall John, E. (2007). Compendio de fisiología médica. Décimo primera edición. Elsevier Saunders. España.
- Idáñez Mesas Ángela. (2012). Dolor Agudo y Crónico. Clasificación del Dolor. Historia clínica en las Unidades de Dolor, Hospital Universitario Vall d'Hebrón. Área de Traumatología, Barcelona, España. pág. 1-22.

- León Regal, M.; Alvarado Borges, A.; de Armas García, J.; Miranda Alvarado, L.; Varens Cedeño, J., & Cuesta del Sol, J. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares: cifras alarmantes. Cuba. Revista Finlay, volumen 5, No. 1, pág. 47-62.
- Ferrandiz Mach, Marta. (2011). Fisiopatología del dolor. Barcelona. Hospital de la Santa Creu. Pág.1-14.
- Madigan Michael, T.; Martinko Jhon, M.; Kelly Bender, S.; Daniel Buclely, H., & David Stahl, A. (2009). Principios esenciales de inmunología. Brock, Biología de los Microorganismos. 12ª edición. Pearson education. España Madrid. Pág. 935-963
- Magaña Alejandro, M. A.; Gama Campillo, L. M., & Mariaca Méndez, R. (2010). El uso de las plantas medicinales en las comunidades Maya-Chontales de Nacajuca, Tabasco, México. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Polibotánica, No. 29, pág. 213-262.
- Montes Belmont, R.; Flores Moctezuma, H.; Castrejon Ayala, F.; Barajas Pérez, J. S., & Serrato Cruz, M. A. (2011). Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. Xalapa, México. Revista Mexicana de Micología. Volumen 34 Pág. 83-88.
- Morán Chorro, I.; Martínez de Irujo, J. B.; Marruecos Sant, L. & Nogué Xarau, S. (2011). Toxicología clínica. Difusión Jurídica y Temas de Actualidad S. A.
- Argueta Villamar, A.; Cano Asseleih, L. M.; Rodarte, M., & Gallardo Vázquez, M. C. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. México, CDMX. Instituto nacional indigenista. 1 edición, pág.1786.
- Muñoz, Rivas Ricardo. (2013). Unidad 7 Patología pulpar 1a. Sección: Inflamación pulpar. Fes Iztacala, recuperado de: <https://www.iztacala.unam.mx/rrivas/patologiapulpar.html>.
- Prescott L. M., Harley J. P. y Klein D. A. (2004). Microbiología. Quinta edición. Mc GrawHill Interamericana.
- Puebla Díaz, F. (2005). Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S.: Dolor iatrogénico. Oncología. Barcelona. Volumen 28, No. 3, pág. 33-37.
- Reyes G. M. G.; Izquierdo S. T., & García T. F. (2006). Inflamación. Mecanismos bioquímicos e inmunológicos del daño tisular y bases farmacológicas de su tratamiento. México. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rincón Enríquez, G.; Quiñones Aguilar, E. E.; Qui Zapata, J. A., & Serrato Cruz, M. A. (2012). Efectividad biológica de extractos de *Tagetes spp* sobre bacterias fitopatógenas. SNICS-SINAREFI, CIATEJ, México. Pág 43.
- Romera, E; Perena, M.J.; Perena, M.F., & Rodrigo, M.D. (2000). Neurofisiología del dolor. Barcelona. 7: Supl. II, pág. 11-17.
- Rondina, R; Bandoni, A & Coussio, J. (2008). Especies medicinales argentinas con potencial actividad analgésica. Argentina. Volumen 24, pág.65.
- Serrato Cruz, M. A. (2014). El recurso genético cempoalxóchitl (*Tagetes spp.*) de México (Diagnóstico). Estado de México. Universidad Autónoma Chapingo, primera edición, pág.185.

- Serrato Cruz, M. A. (2009). Información documental sobre el taxa *Tagetes* para dimensionar su centro de origen y diversidad genética en México. Estado de México. Universidad Autónoma Chapingo, pág.7.
- Serrato Cruz, M. Á.; Díaz Cedillo, F., & Barajas Pérez, J. S. (2008). Composición del aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la región centro-sur de México. México. Agrocienza, volumen 42, No. 3, pág. 277-285.
- Stanier Y. R.; Ingraham L. J.; Wheelis L. M., & Painter R. Page. (1992). Microbiología. España. Editorial Reverté, segunda edición.
- Tarrío Blanco, E.; Almendro Espinosa, J. M.; Marcos Carreras, H., & Rodríguez López, J. M. (2004). Guía de buena práctica clínica en dolor y su tratamiento. OMC, pág. 13-16.
- Tortora, G. & Funke, B. & Case, C. (2007). Introducción a la microbiología (9a edición). Argentina. Editorial: Médica Panamericana. Núm. Pág. 959.
- Viera, Cecilia. (2017). Neurofisiología del dolor musculoesquelético. Nocicepción. Editorial ciencias médicas, primera edición, pp. 91-114.
- Villalba Herrera Ericka Wendie. (2014) INFLAMACION. La paz. Rev. Act. Clin. Med. volumen 43, pág. 2261-2265.
- Zegarra Piérola, Jaime Wilfredo. (2007). Bases fisiopatológicas del dolor. Acta Médica Peruana, 24(2), pp.35-38.