



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
**CAMPUS TUXTEPEC**

---

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Actividad Antioxidante y Anti-inflamatoria de  
Plantas Silvestres y un Cultivo *in vitro* de  
*Sambucus nigra* L.**

**T E S I S**

Para obtener el grado de

**Maestría en Biotecnología**

Presenta:

**David Gustavo Cruz Cruz**

Director de Tesis

**Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo**

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México.**

**2018**



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2017/MB/057
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 25 de Septiembre de 2017

**C. DAVID GUSTAVO CRUZ CRUZ**  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. Blanca E. Barrera Figueroa	UNPA	Presidente
Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	Vocal
Dra. Ariana A. Huerta Heredia	Cátedra CONACYT-UNPA	Secretario
Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín	UNPA	1er Suplente
Dr. Lemuel Pérez Picaso	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.



Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chi ji jú



**DR. MARIO VALERA ZARAGOZA**  
Jefe de la División de Estudios  
de Posgrado

**M. en C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA**  
Vice-rector Académico

Vo. Bo. **VICE-RECTORIA  
ACADEMICA**

C.c.p. Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo – Director de tesis.  
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo.

**CAMPUS TUXTEPEC**  
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

**CAMPUS LOMA BONITA**  
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/009
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

*San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 26 de febrero de 2018*

**L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL**  
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología de la C. David Gustavo Cruz Cruz, matrícula **14140006**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Actividad antioxidante y anti-inflamatoria de plantas silvestres y un cultivo *in vitro* de *Sambucus nigra* L**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí jí jú

**Dra. Sandra T. del Moral Ventura**

Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. David Gustavo Cruz Cruz  
C.c.p. Archivo

**CAMPUS TUXTEPEC**

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

**CAMPUS LOMA BONITA**

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230

## **DEDICATORIA**

*A MI COPAÑERA, A MIS HIJOS Y MIS PADRES*

## AGRADECIMIENTOS

*“No tenemos que derrumbar nuestros sueños, hay que derrumbar las barreras que nos impiden cumplirlos.”*

En este camino estoy agradecido con las personas que me han ayudado a seguir avanzando, a seguir creciendo, a no darme por vencido y seguir creyendo; cada uno me ha apoyado en varios sentidos, en una frase de apoyo, un artículo no encontrado, e incluso en lo monetario.

Gracias a mis papás que siempre están conmigo en todo momento brindándome un apoyo incondicional

A mi esposa e hijos que me aman y que están a mi lado apoyándome.

A mi asesor y familia que me motivaron a continuar con mis estudios y siempre apoyándome en todo momento.

A los profesores-investigadores que gracias a su apoyo disiparon las dudas que tenía.

Compañeros y amigos que siempre estuvieron conmigo a pesar del tiempo y distancia y que siempre conté con su amistad en todo momento y compartiendo su conocimiento sin dudarlo, muchas gracias a todos.

*“Las mejores cosas de la vida, no son las cosas ni los objetos que has comprado ni adquirido. Son los momentos vividos, las emociones sentidas, los recuerdos felices y las lecciones aprendidas.”*

## **RECONOCIMIENTO**

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec y de Laboratorio de Proteínas del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la asesoría del Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo y la asesoría de la M.C Alma Rosa Laredo.

La investigación fue realizada bajo el financiamiento del proyecto CB-CONACyT N° 18395 e INFRA 255514. Asimismo, se contó con la beca CONACyT con número de registro 483584 perteneciente al programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131.

## **PRODUCTOS**

Cruz, D.G., Sánchez-Méndez, L.I., Capataz-Tafur, J., Sanchez, P.M. Establecimiento de *cultivo in vitro* de *Sambucus nigra*. II Encuentro Nacional sobre Biotecnología UATx. 06 - 09 de Diciembre 2015. Tlaxcala, Tlax. México.

Cruz, D.G., Sánchez-Méndez, L.I., Herrera-Ruiz M.L. Capataz-Tafur, J., Sánchez-Ocampo, P.M. Anti-inflammatory activity of *Sambucus nigra* extracts from callus *in vitro* culture. SILAE. 11-15 de Septiembre de 2016. Modena – Italy.

# INDICE

INDICE DE FIGURAS .....	iii
INDICE DE CUADROS .....	iv
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1. GENERALIDADES.....	5
1.1 Sauco ( <i>Sambucus nigra</i> L.).....	5
1.2 Estudio fitoquímico en <i>Sambucus nigra</i> .....	6
1.3 Uso en la medicina tradicional.....	8
1.4 Actividad biológica de <i>Sambucus nigra</i> .....	8
1.5 Cultivo de células y tejidos vegetales (CCTV).....	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	10
4. HIPÓTESIS .....	11
5. OBJETIVO GENERAL .....	11
5.1 Objetivos Particulares .....	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
6.1 Material Biológico .....	12
6.2 Obtención de los extractos .....	13
6.3 Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> .....	13
6.4 Análisis fitoquímico y por TLC de los extractos de <i>S. nigra</i> .....	14
6.5 Actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema de ratón inducido con TPA en ratones CD1 .....	14

6.6	Cuantificación de compuestos fenólicos.....	15
6.6.1	Cuantificación de compuestos fenólicos totales.....	15
6.6.2	Cuantificación de flavonoides totales.....	16
6.7	Cuantificación de la actividad antioxidante con el método de DPPH .....	16
6.8	Cuantificación de la actividad antioxidante con el método del ABTS .....	17
6.9	Cuantificación de la actividad antioxidante con el método del Fosfomolibdeno .....	17
6.10	Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	18
6.11	Análisis estadístico.....	18
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
7.1	Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> .....	20
7.2	Análisis fitoquímico y por TLC de los extractos de <i>S. nigra</i> .....	23
7.3	Cuantificación de compuestos fenólicos.....	26
7.3.1	Cuantificación de compuestos fenólicos totales.....	26
7.3.2	Cuantificación de flavonoides totales.....	27
7.4	Actividad Anti-inflamatoria.....	28
7.5	Cuantificación de la actividad antioxidante con el método del DPPH .....	30
7.6	Cuantificación de la actividad antioxidante con el método del ABTS .....	32
7.7	Cuantificación de la actividad antioxidante con el método del Fosfomolibdeno .....	33
7.8	Análisis por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	34
8.	CONCLUSIÓN .....	38
9.	PERSPECTIVAS.....	40
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	41
11.	ANEXOS .....	49

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Sambucus nigra</i> L. ....	5
<b>Figura 2.</b> Compuestos activos de <i>S. nigra</i> L.....	7
<b>Figura 3.</b> Estrategia Experimental .....	12
<b>Figura 4.</b> Explantes mostrando contaminación a los 9 días de siembra .....	21
<b>Figura 5.</b> Explantes con formaciones callosas de <i>S. nigra</i> L., después de 9 días de su siembra. .....	21
<b>Figura 6.</b> Explantes oxidados de los tratamientos T <sub>3</sub> y T <sub>5</sub> .....	22
<b>Figura 7.</b> Cinética de crecimiento de callos inducidos a partir de yemas de <i>S. nigra</i> . ....	22
<b>Figura 8.</b> Perfil cromatográfico de los extractos silvestres e <i>in vitro</i> de <i>S. nigra</i> revelada con Vainillina. ....	24
<b>Figura 9.</b> Perfil cromatográfico de los extractos silvestres e <i>in vitro</i> de <i>S. nigra</i> revelada con reactivo de Liebermann-Burchard en luz UV/Vis de banda ancha (365 nm). ....	25
<b>Figura 10.</b> Cromatograma del extracto metanólico <i>in vitro</i> vs silvestre de <i>S. nigra</i> , a 280 nm. .....	35
<b>Figura 11.</b> Perfiles cromatográficos del HPLC del extracto de <i>S. nigra</i> metanólico <i>in vitro</i> ...	36

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Combinación de reguladores de crecimiento para <i>S. nigra</i> L. ....	14
<b>Cuadro 2.</b> Peso y Rendimientos de los extractos de <i>S. nigra</i> . ....	20
<b>Cuadro 3.</b> Respuesta de explantes de <i>S. nigra</i> L. ....	21
<b>Cuadro 4.</b> Fitoquímica de los extractos de <i>S. nigra</i> ....	23
<b>Cuadro 5.</b> Cuantificación de fenoles totales de extractos de <i>S. nigra</i> . ....	26
<b>Cuadro 6.</b> Cuantificación de flavonoides totales de extractos de <i>S. nigra</i> . ....	27
<b>Cuadro 7.</b> Actividad anti-inflamatoria de <i>S. nigra</i> L. ....	28
<b>Cuadro 8.</b> Cuantificación de la actividad antioxidante de los extractos de <i>S. nigra</i> con DPPH. .....	30
<b>Cuadro 9.</b> Porcentaje de Inhibición de los extractos de <i>S. nigra</i> con DPPH. ....	31
<b>Cuadro 10.</b> Cuantificación de la actividad antioxidante de los extractos de <i>S. nigra</i> con ABTS. ....	32
<b>Cuadro 11.</b> Porcentaje de inhibición de los extractos de <i>S. nigra</i> con ABTS. ....	33
<b>Cuadro 12.</b> Cuantificación de la actividad antioxidante de los extractos de <i>S. nigra</i> con Fosfomolibdeno. ....	34

## RESUMEN

El *Sambucus nigra* L. (Acanthaceae) conocida como Sauco, es una planta usada en la medicina tradicional mexicana, para tratar diferentes padecimientos como son: fiebres, afecciones respiratorias, trastornos digestivos, desparasitante, inflamaciones, entre otros. Esta planta biosintetiza compuestos como antocianinas, flavonoles, ácidos fenólicos y en cultivos *in vitro* se ha observado que acumula flavonoides y compuestos fenólicos como quercetina, apigenina y ácido caféico. Además, a *S. nigra* se le han evaluado algunas actividades biológicas como anti-inflamatoria, antioxidante, citotóxica, antibacteriana, antiviral, entre otras; y debido a su uso en la medicina tradicional se recolectada y comercializa indiscriminadamente, esto podría disminuir su población y eventualmente ponerla en peligro de extinción. El objetivo del presente trabajo fue establecer un cultivo *in vitro* para la obtención del material vegetal y comparar la actividad antioxidante y anti-inflamatoria de plantas silvestres e *in vitro* de *S. nigra*. Para ello, se indujo un cultivo *in vitro* de callos a partir de diferentes explantes en medio Murashige y Skoog (MS) con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal como IBA, BAP y 2,4-D. La cuantificación de la actividad antioxidante se realizó por los métodos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS (2,2-azino-bis [3, etilbenzotiazolina-6-sulfato]) y Fosfomolibdeno. La actividad anti-inflamatoria tópica se evaluó por el modelo de edema de oreja de ratón inducido por 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). El análisis químico de los extractos activos se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UHPLC). Los extractos *S. nigra*, mostraron capacidad antioxidante por tres métodos (para extractos metanólico de plantas silvestres y de acetato de etilo en callos *in vitro*, por DPPH con  $929.68 \pm 6.52$  y  $471.02 \pm 0.71$   $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto; ABTs con  $656.06 \pm 16.65$  y  $358.33 \pm 1.74$   $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto y Fosfomolibdeno con  $1975.56 \pm 2.78$  y  $3134.17 \pm 23.20$   $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto respectivamente). Por otro lado, los extractos de acetato de etilo de plantas silvestres y el extracto metanólico de callos *in vitro* mostraron actividad anti-inflamatoria con 88.5 y 93.5 % de inhibición respectivamente (dosis de 1.6 mg/oreja) alrededor de dos veces más que la dexametasona (fármaco de referencia) con 50 % de inhibición (dosis de 1 mg/oreja). Además, fueron dosis-dependientes con una  $\text{DE}_{50} = 1.098$  mg/oreja y  $\text{DE}_{50} = 0.88$  mg/oreja para el extracto de acetato de etilo silvestre y extracto

metanólico *in vitro* respectivamente. El análisis químico por TLC y UHPLC sugiere que en los extractos activos pueden estar presentes compuestos fenólicos como 4-hidroxibenzoico glucósido (275 nm), cianidin-3,5-*O*-diglucósido (280, 520 nm) y cianidin-3,5-*O*-sambubiosido (280, 520 nm).

## ABSTRACT

*Sambucus nigra* L. (Acanthaceae) is a plant used in Mexican traditional medicine, to treat different diseases such as: fever, respiratory diseases, digestive disorders, deworming, and inflammation, among others. This plant accumulates anthocyanin, flavonols and phenolic acids. The *in vitro* cultures of this plant have been observed to accumulate flavonoids and phenolic compounds such as quercetin, apigenin and caffeic acid. In addition, the anti-inflammatory, antioxidant, cytotoxic, antibacterial and antiviral activities has been evaluated of *S. nigra* extracts. Due to above mentioned, this plant is collected and marketed indiscriminately, this could decrease its population and eventually put it in danger of extinction. The objective of this work was to establish an *in vitro* culture and evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of *S. nigra* extracts as a source of plant material and biological active compounds. An *in vitro* callus culture was established by micropropagation techniques from explants with different combinations of phytohormones such as IBA, BAP and 2,4-D. Quantification of the antioxidant activity was performed by the methods of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2-azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfate]) and Phosphomolybdenum. The anti-inflammatory activity was evaluated in mouse ear edema model induced by 12-*O*-tetradecanoilphorbol-13-acetate (TPA). The biological activities of the extracts were always compared against a reference drug: dexamethasone as anti-inflammatory and Trolox as an antioxidant. Chemical analysis of the major compounds of the active extracts was performed by chromatographic methods such as Thin Layer Chromatography (TLC) and Chromatography (Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)). All extracts from wild plants and *in vitro* material showed high antioxidant capacity by three different methods (methanol extract from wild plants and *in vitro* callus extract with DPPH: 929.68  $\mu$ M Trolox/g extract and 471.02  $\mu$ M Trolox/g extract; ABTs with 656.06 $\pm$ 16.65 y 358.33 $\pm$ 1.74  $\mu$ M Trolox/g extract; Phosphomolybdenum with 1975.56 $\pm$ 2.78 and 3134.17 $\pm$ 23.20  $\mu$ M Trolox/g extract respectively). On the other hand, ethyl acetate extract from wild plants and methanol extract from *in vitro* callus showed anti-inflammatory activity with 88.5 and 93.5% of inflammation inhibition (dose 1.6 mg/ear) respectively, around the two times more than dexamethasone with 50% of inflammation inhibition (dose 1 mg/ear). In addition, were dose-dependent with ED<sub>50</sub>=1,095 mg/ear (ethyl acetate extract) and DE<sub>50</sub>=0.88

mg/ear (*in vitro* methanol extract). The chemical analysis by TLC and HPLC suggests that the phenolic compounds could be present in the active extracts such as 4-hydroxybenzoic glycoside (275 nm), cyanidin-3, 5-O-diglucoside (280, 520 nm) and cyanidin-3, 5-O-sambubioside (280, 520 nm).

## INTRODUCCIÓN

La supervivencia de los organismos está regulada por la respuesta del sistema inmune la cual requiere eliminar agentes extraños, tejidos dañados; entre otras funciones que están medidas por una respuesta protectora denominada inflamación, en este proceso intervienen muchos mecanismos, algunos mediados por moléculas de señalización, además de la activación de los factores de complemento. Los mediadores pertenecen a diferentes clases químicas, tales como aminas biógenas, proteínas y péptidos, especies reactivas de oxígeno, y lípidos. Estos mediadores inician, mantienen, agravan y modulan el curso de un gran número de enfermedades humanas. Ciertas enfermedades patológicas desencadenan procesos inflamatorios tales como artritis reumatoide, asma, enfermedades inflamatorias intestinales, cáncer, arteriosclerosis, tromboembolismo, enfermedad arterial coronaria, cerebral y periférica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad de Crohn, peritonitis, esclerosis múltiple, entre otras, debido a una respuesta pro-inflamatoria excesiva o deficiente. Existen dos grupos importantes de agentes anti-inflamatorios, los esteroideos (o glucocorticoides) y los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), los primeros son anti-inflamatorios muy potentes que pueden actuar sobre la inflamación por diversas rutas, mientras que los AINEs capaces de suprimir los signos y síntomas de la inflamación, algunos también ejercen acciones antipiréticas y analgésicas, son útiles en los trastornos en los cuales el dolor está relacionado con la intensidad del proceso anti-inflamatorio. Sin embargo, diversas investigaciones han demostrado efectos en ambos tipos de agentes anti-inflamatorios, por lo que se recurre al uso de compuestos presentes en plantas medicinales (Gómez *et al.*, 2011).

Las plantas medicinales se han empleado como terapia para tratar diferentes padecimientos como: afecciones respiratorias, trastornos digestivos, desparasitante, inflamación, entre otras, y han sido utilizadas desde la época precolombiana hasta la actualidad; una de ellas es el Sauco (*Sambucus nigra* L), la cual pertenece a la familia de las Acanthaceae, subfamilia Adoxaceae (Leitão *et al.*, 2014). Esta planta se ha utilizado para el tratamiento de afecciones de las vías respiratorias, como antifebrífugo y sudorífica, diurético, síntomas reumáticos, entre otros (Sidor & Gramza, 2014, Leitão *et al.*, 2014). En esta planta se ha reportado la presencia

flavonoles como rutina, isoquercetina, astragalina, encontrándose en toda la planta (Dawidowicz *et al.*, 2006), mientras que en las flores presenta antocianinas, flavonoles y ácidos fenólicos (Sidor & Gramza-Michalowska, 2014). Estudios realizados comprueban que dichos compuestos son eficaces en el tratamiento de enfermedades respiratorias (H1N1) y como antibacterial (Kinoshita *et al.*, 2012; Krawitz *et al.*, 2011), y como antioxidantes validados por diferentes métodos como: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), 2,2-azino-bis [3, etilbenzotiazolina-6-sulfato] (ABTS), N,N-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMPD), por mencionar algunos, Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP), el 5,5-dimetil-1-pirrolín-N-óxido (DMPO) y Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC) (Almajano 2009) y el Fosfomolibdeno (Prieto *et al.*, 1999). Además, en especies del género *Sambucus* se han reportado efectos tales como anti-inflamatorio, anti-*Helicobacter pylori*, antiviral, antibacterial, entre otros (Süntar *et al.*, 2010).

Sin embargo, debido al uso medicinal que tiene *S. nigra* se ha colectado y comercializado de forma indiscriminada por lo que para no afectar las poblaciones se ha optado por utilizar herramientas biotecnológicas para proveer de material vegetal de forma continua y de manera sustentable, una de ellas es el cultivo de células y tejidos vegetales (CCTV), basándose en el principio de la totipotencialidad que consiste en que cualquier célula viviente (vegetal) presenta una copia del material genético, de cualquier parte de la planta, teniendo el potencial para regenerarse, en condiciones adecuadas (Calva & Pérez, 2005; Negrón, 2004).

Por lo que en este trabajo se estableció un sistema de cultivo *in vitro* de *S. nigra*, y se comparó la actividad antioxidante y anti-inflamatoria de los extractos *in vitro versus* extractos silvestres, seguido de un análisis químico por TLC y HPLC.

## 1. GENERALIDADES

### 1.1 Sauco (*Sambucus nigra* L.)

*Sambucus nigra* L. (Fig. 1) es una planta leñosa que crece en México. En cuanto a su taxonomía pertenecía anteriormente a la familia de las Caprifoliaceae (Uncini & Tomei, 1999), posteriormente fue reclasificada en la familia de las Acanthaceae, sub-familia Adoxaceae (Leitão *et al.*, 2014), esto de acuerdo a clasificación filogenética de Grupo Filogenético de las Angiospermas (GFA y por sus siglas en inglés APG Angiosperm Phylogeny Group) (Missouri Botanical Garden, 1998). Su sinonimia botánica es *Sambucus mexicana* P., *Sambucus bipinnata* S., *Sambucus simpsonii* R. En la medicina tradicional es conocida como: Sauco, Alcanfor, Flor del Sauco, Sauce, Azumate, Sambuco, Sanabuco, entre otros; y es utilizada para tratar diversos padecimientos y dolencias como fiebre, afecciones respiratorias, trastornos digestivos, inflamación, herpes, como diurético, diaforético, entre otros. Es nativa de la mayor parte de Europa y Asia; crece en climas variados y alturas que van de 200 a 3000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (Sidor & Gramza-Michalowska, 2014, Uncini & Tomei, 1999, Uncini *et al.*, 2005, Veberic *et al.*, 2009).



**Figura 1.** *Sambucus nigra* L.

*Sambucus nigra* L. es un arbusto caducifolio que crece hasta 6 m de altura, está compuesta por hojas pinnadas de color verde oscuro; las inflorescencias en forma de corimbo multifloro, consisten en flores individuales que tienen cinco pétalos, con 5 estambres y cada uno con una

antera, son hermafroditas en grandes agrupaciones, y florece a principios de verano, de las que se obtienen frutos, son bayas pequeñas de color negro o púrpuro, con un diámetro de 3 a 6 mm, que maduran a finales del verano (Veberic *et al.*, 2009; Stránsky *et al.*, 2001; Lee & Finn, 2007).

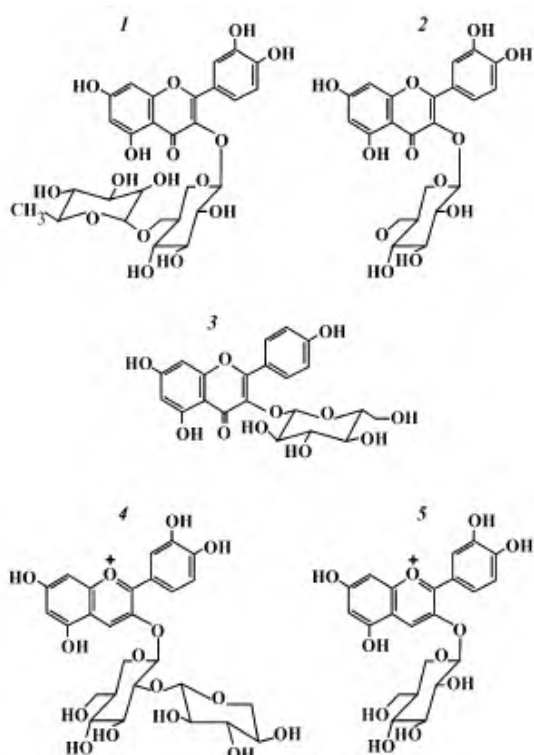
Es cultivada en países Europeos, como en Portugal, Italia, Austria, en Estados Unidos y Asia, con la finalidad de producción bayas, vinos y la obtención de extractos de flores por su sabor y olor característico, además, en bebidas, saborizantes en alimentos, suplemento alimenticio y preparaciones medicinales (Lee & Finn, 2007; Veberic *et al.*, 2009; Christensen *et al.*, 2008; Salvador *et al.*, 2015).

## **1.2 Estudio fitoquímico en *Sambucus nigra***

El nitrato potásico, los ácidos ursólico y oleanólico presentes en la parte aérea, le confieren propiedades diuréticas, antifebrífugo, sudoríficas, depurativas, porque con la sudoración se eliminan las toxinas de estas infecciones.

Se ha reportado que *S. nigra* acumula compuestos como antocianinas y otros polifenoles, flavonoles, ácidos fenólicos en fruto y flores, entre otros (Sidor & Gramza-Michalowska, 2014); Dawidowicz *et al.* (2006), reportaron que en hojas, frutos y flores se encuentran flavonoles, y antocianinas representativos en frutos (Fig. 2) presentando capacidad antioxidante, neutralizando la actividad del radical libre del DPPH e inhibiendo la reacción de co-oxidación del ácido linoleico y  $\beta$ -caroteno; adicionalmente presenta azúcares y ácidos orgánicos en frutos. Además de triterpenoides, ácidos grasos libres, esteroides y alcoholes alifáticos de cadena larga (Salvador *et al.*, 2015). Las bayas de *S. nigra* son ricas en ácidos fenólicos, antocianinas y glucósidos de flavonol que pueden incrementar la capacidad antioxidante del plasma en sangre y previenen la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad y agregación de plaquetas que están asociadas con enfermedades cardiovasculares (Kaack *et al.*, 2008). Por otro lado, Akhtar *et al.* (2015), realizaron un análisis fitoquímico y de propiedades antioxidantes a plantas medicinales, en la que extractos metanol/cloroformo de *S. nigra* presentan compuestos como terpenoides, taninos, alcaloides y quinonas, a los que se le atribuye la actividad antioxidante por los métodos de Poder Reductor, Capacidad Antioxidante

Total (método del fosfomolibdeno) y DPPH, teniendo un mayor contenido de compuestos fenólicos.



**Figura 2.** Compuestos activos de *S. nigra* L. (1.- Rutina; 2.- Isoquercitrina; 3.- Astragalina; 4.- Cianidin-3-sambubiosido; 5.- Cianidin-3-glucósido) (Dawidowicz *et al.*, 2006).

Por su gran contenido en glucósidos, flavonoides (rutina y quercetina) y ácidos orgánicos se utiliza como anti-inflamatorio, estimulante de las defensas del organismo y como antioxidante. Las flores y hojas secas contienen taninos, aceites esenciales y sobre todo rutina, beneficiosa sobre los capilares, son usadas como estimulante de la circulación. Los frutos frescos (desecados o en mermelada) son laxantes, ricos en vitaminas C (y en menor cantidad vitamina A), por lo que entran en la composición de fórmulas adelgazantes. Estos contienen pectina, compuestos flavónicos (rutina e isoquercitrina), pigmentos antocianósidos (crisantemina, sambucianina y sambucianina), taninos (0,3 %), azúcares reductores (5 %) y ácidos orgánicos (cítrico, málico, tartárico); los cuales son útiles como anti-inflamatorios en reumatismos.

### **1.3 Uso en la medicina tradicional**

*S. nigra* es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional con beneficios en el tratamiento de la fiebre (antipirético) y como expectorante. Las hojas son usadas para tratar inflamaciones, manchas, quemaduras, descamaciones en la piel (en baños de asiento), infecciones en oídos y conjuntivitis (lavados oculares con hojas y flores). El Líber (segunda corteza del tronco, después de rasparlo superficialmente) se ha usado desde la antigüedad contra edemas y ascitis. La corteza añejada también se ha utilizado como diurético, laxante y para inducir el vómito (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Francisco Hernández en su obra: La Historia de la Plantas de la Nueva España del S. XVI, indica su utilidad como antidiarreico, antiescabiático, contra la bilis y como catártico (Nicolás León, 1905). Además, Fray Francisco Ximénez (1651) menciona que “quita el dolor nacido de causa cálida, retiene el flujo de sangre de las narices, curan las fiebres que repiten por intervalos evacuando la causa del daño, quita los dolores nacidos del mal francés y sana los tortijones y dolores del vientre de las paridas”.

Por otro lado, Juan de Esteyneíffer relata a inicios del siglo XVIII que se usa para “el tullimiento, muelas picadas, campanilla caída, hidropesía, hinchazón de los testículos, obstrucción del vaso, mal de banda, pujos, flegmón, sabañones, sarna, tina, y caspa” (Juan Esteyneffer, 1712).

También se ha usado para tratar la enfermedad de Alzheimer, la diabetes, la epilepsia, la colitis ulcerosa, gastritis, el sarampión, las migrañas, las neuralgias; además como inmunoestimulante en el tratamiento del herpes, el cáncer y el VIH. Se ha aplicado externamente en quemaduras y psoriasis, además de actuar como demulcente, diaforético y desinfectante (el vinagre de los frutos del saúco) (Laffita & Castillo, 2011).

### **1.4 Actividad biológica de *Sambucus nigra***

En cuanto a la actividad biológica, se ha reportado que extractos etanólicos y acuosos de flores y frutos de *S. nigra* presenta actividad antioxidante (Garofulić *et al.*, 2012; Dawidowicz *et al.*, 2006); se realizaron pruebas de la actividad antioxidante en extractos de etanol y acuoso de planta silvestre de *S. nigra* por diferentes métodos como DPPH, Poder Antioxidante de

Reducción Férrica (FRAP) y Capacidad de absorción de radicales libres (ORAC), dichas actividades se pueden atribuir a la presencia de compuestos biológicamente activos como son: antocianinas, flavonoles y ácidos fenólicos en flores (Sidor & Gramza-Michalowska, 2014) y rutina, isoquercetrina y astragalina, encontrándose en la parte aérea (Dawidowicz *et al.*, 2006). Por otro lado, D'Abrosca *et al* (2001), reportaron la presencia de metabolitos fitoestimuladores (lignanós) y fitoinhibidores (cianogénicos) a partir del extractos metanólico de la parte aérea de *S. nigra*.

Flavonoides y ácidos fenólicos presentes en jugos de los frutos han mostrados actividad antibacterial y antifúngica, así como propiedades anti-inflamatorias, por lo que inhibe o previene el desarrollo de enfermedades infecciosas e inflamatorias (Kaack *et al.*, 2008). Los compuestos aislados como terpenos y compuestos relacionados obtenidos de un extracto de *Tripterygium wilfordii* pueden ser utilizados como agente antiartrítico y protector de cartílago de los huesos; otro compuesto bioactivo presente en *S. nigra* son los flavonoides, una mezcla extraída de flavonoides bioactivos de *Silybum marianum* presentan inhibición de la TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$  B, disminución NO y de moléculas proinflamatorias como la ciclooxigenasa y peroxinitrito (Gómez *et al.*, 2011).

Zakay-Rones *et al.*, (2004) demostraron que del extracto de flores de *S. nigra*, Sambucol® inhibió los virus de la influenza A y B, en grupos de pacientes adultos, donde le atribuyen a los flavonoides presentes en el extracto; además, Kinoshita *et al.* (2012), realizaron pruebas para determinar la actividad antiviral utilizando extractos acuosos de *S. nigra* de frutos ante el virus H1N1, teniendo como respuesta detener la replicación viral y estimular la respuesta del sistema inmune. Krawits *et al.* (2011) probaron la actividad antibacterial a partir de extractos acuosos de frutos, inhibiendo el crecimiento de *Haemophilus influenzae*. En estudios *in vivo* David *et al.* (2014), realizaron una síntesis verde para probar la actividad anti-inflamatoria de nanopartículas de plata (NPAg) usando extractos de frutas de *S. nigra*, a estas frutas (bayas) les realizaron una extracción de polifenoles mediante acetona-agua, posteriormente se agregaron NPAg, las cuales se probaron en un modelo de inflamación inducido por carragenina en pata de rata Wistar, en donde las NPAg disminuyeron la inflamación un 12.61% después de la inyección de la carragenina en comparación con el grupo control. Además, disminuyó el nivel de citoquinas en los tejidos y con un efecto protector a largo

plazo, las NPAG se utilizaron en lesiones cutáneas de la psoriasis vulgaris, teniendo un efecto anti-inflamatorio mejor que la hidrocortisona.

Con respecto a las especies del género *Sambucus*, se probaron extractos de etanol de *S. ebuluss* L. en la inhibición de la TNF- $\alpha$  inducida (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$ , molécula involucrada en el proceso de inflamación, que se asocia a condiciones inflamatorias crónicas), siendo el ácido ursólico el compuesto activo y responsable de la inhibición de la TNF $\alpha$  (Schwaiger *et al.*, 2011); por otro lado, Abdala *et al.*, (2014) utilizaron extractos acuosos de plantas de *Sambucus palmesis* L. bajo el modelo inflamación en cojinete plantar en ratas inducido con carragenina, obteniendo un efecto anti-inflamatorio y antinociceptivo (actividad analgésica), algunos autores sugieren que la presencia de compuestos como antocianinas, flavonoides, taninos y glucósidos cianogénicos son los responsables.

Sin embargo, debido al uso del *S. nigra* en la medicina tradicional y su colecta indiscriminada, es necesario utilizar sistemas biotecnológicos que ayuden a proveer material vegetal de manera continua y sustentable para la obtención de compuestos biológicamente activos, una de las técnicas más utilizadas es el cultivo de células y tejidos vegetales (CCTV).

### **1.5 Cultivo de células y tejidos vegetales (CCTV)**

El cultivo de células y tejidos vegetales son un conjunto de técnicas que se usan para hacer crecer células, tejidos y órganos vegetales *in vitro* en condiciones de asepsia, controlada y libres de organismos, con un medio que aporta los nutrientes necesario para su desarrollo, permitiendo la generación de plantas idénticas a la madre, además de tener un control de plagas y enfermedades, requiriendo un menor tiempo y espacio (Calva y Pérez, 2005). Además, es posible cultivar las partes áreas de las plantas (brotes), para la producción de metabolitos secundarios.

En los cultivos de brotes hay estabilidad genética y mayor capacidad de producción de metabolitos secundarios; estos compuestos pueden asociarse a su crecimiento (Bourgau *et al.*, 2001). López *et al.* (2009), reportaron la obtención de plántulas de las hierbas del cáncer como: *Castilleja tenuiflora* Benth. y *Cuphea equipetala* Cav. de las familias Orobanchaceae y

Litraceae respectivamente, y de estas determinaron la presencia de compuestos fenólicos como feniletanoides, alcaloides, flavonoides, por mencionar algunos, y que estos compuestos presentan actividad biológica como antioxidante y anti-inflamatorio (Waizel-Bucay *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2013).

Con respecto a cultivos *in vitro* de especies de *Sambucus*, Zhihong & Zhouqi (2008), realizaron cultivos de tejidos mediante segmentos de tallos de *S. williamsii*, demostraron que el medio adecuado es Murashige & Skoog (MS, 1962), y para germinación de brotes, con la combinación de ácido naftalenacético (NAA) 0.2 mg·L<sup>-1</sup> y benzilaminopurina (6-BA) 2.0 mg·L<sup>-1</sup>, con una inducción del 100 %, para la el medio de cultivo para multiplicación es: medio MS, y combinación de TDZ 0.03 mg·L<sup>-1</sup> and 6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> y después de 25 días, un coeficiente de multiplicación de 3.8. Charlebois & Brassard (2013), micropropagaron de brotes de *S. canadensis* en medio MS con 20 g L<sup>-1</sup> sacarosa, 8 g L<sup>-1</sup> agar, 1 mg L<sup>-1</sup> BAP, y 5 µg L<sup>-1</sup> NAA que dieron los mejores resultados. Los estudios acerca de la producción y cultivos *in vitro* de *S. nigra* son escasos, por lo que en este trabajo se propone la micropropagación *in vitro* para potencializar la producción de compuestos.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México cuenta con una gran diversidad en plantas medicinales, estas se han empleado para prevenir y contrarrestar diversos padecimientos, como tos, empacho, presión alta, fiebre, inflamaciones, entre otros. El Sauco (*Sambucus nigra* L.) una planta usada en la medicina tradicional en el estado de Oaxaca, se usa para tratar diferentes padecimientos como son afecciones respiratorias, trastornos digestivos, inflamación, herpes, entre otros (Shikov *et al.*, 2014; Uncini *et al.*, 2005); y se ha reportado que extractos de la planta (parte aérea) y frutos presentan actividad biológica como antiviral, antioxidante y antibacterial (Kinoshita *et al.*, 2012; Krawits *et al.*, 2011). En las plantas del género *Sambucus* (Abdala *et al.*, 2014; Schwaiger *et al.*, 2011); se han encontrado compuestos como antocianinas, flavonoles y ácidos fenólicos, a los cuales se les atribuye su actividad biológica (Sidor & Gramza-Michalowska, 2014). En la medicina tradicional ocupan las flores, frutos (temporales) y hoja, por lo que cortan gran parte de la planta sin darle utilidad a otras partes de la misma, lo que impide su reproducción y consecuentemente va disminuyendo su población. Además, las plantas del género *Sambucus*, son utilizadas como anti-inflamatorios y esto podría incrementar su uso, por lo que se busca solucionar el uso indiscriminado de los recursos naturales y asimismo la obtención de material vegetal homogéneo de manera sostenible sin alterar el ambiente.

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Sambucus nigra* (Sauco) es una planta usada en la medicina tradicional mexicana y en particular en el estado de Oaxaca, para tratar diferentes padecimientos como afecciones respiratorias, trastornos digestivos, inflamación, herpes, como diurético, diaforético, entre otros. Esta especie acumula compuestos del tipo (fenólicos, flavonoles, antocianinas, taninos) los cuales están asociados a diferentes actividades biológicas como son anti-inflamatorios, analgésicas, antivirales y antioxidantes, por lo que se ha propuesto como una alternativa para el tratamiento de diferentes enfermedades. Sin embargo, la evaluación de sus propiedades biológicas y su relación con el contenido de compuestos biológicamente permitirá validar su uso en la medicina tradicional. Además, debido a que es colectada y comercializada indiscriminadamente, esto podría disminuir su población y eventualmente ponerla en peligro de extinción. Por lo tanto, en este trabajo se propone utilizar la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales para obtener material biológico homogéneo de forma continua y libre de patógenos como una fuente de compuestos biológicamente activos.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los extractos obtenidos de plantas silvestres y de un cultivo de callos *in vitro* de *Sambucus nigra* L., presentarán actividad antioxidante y anti-inflamatoria.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad antioxidante y anti-inflamatoria de los extractos de plantas silvestres y de un cultivo de callos *in vitro* de *Sambucus nigra* L. y realizar un análisis químico de los extractos.

##### **5.1 Objetivos Particulares**

Establecer un cultivo *in vitro* de callos de *S. nigra* L.

Cuantificar la actividad antioxidante de los extractos de plantas silvestres y un cultivo *in vitro* de *Sambucus nigra* L. por los métodos del DPPH, ABTS y fosfomolibdeno.

Evaluar la actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema de oreja de ratón inducido por TPA de los extractos de plantas silvestres y de un cultivo *in vitro* de *S. nigra* L.

Realizar un análisis fitoquímico básico y por HPLC de los extractos activos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Se aplicó la siguiente estrategia experimental:

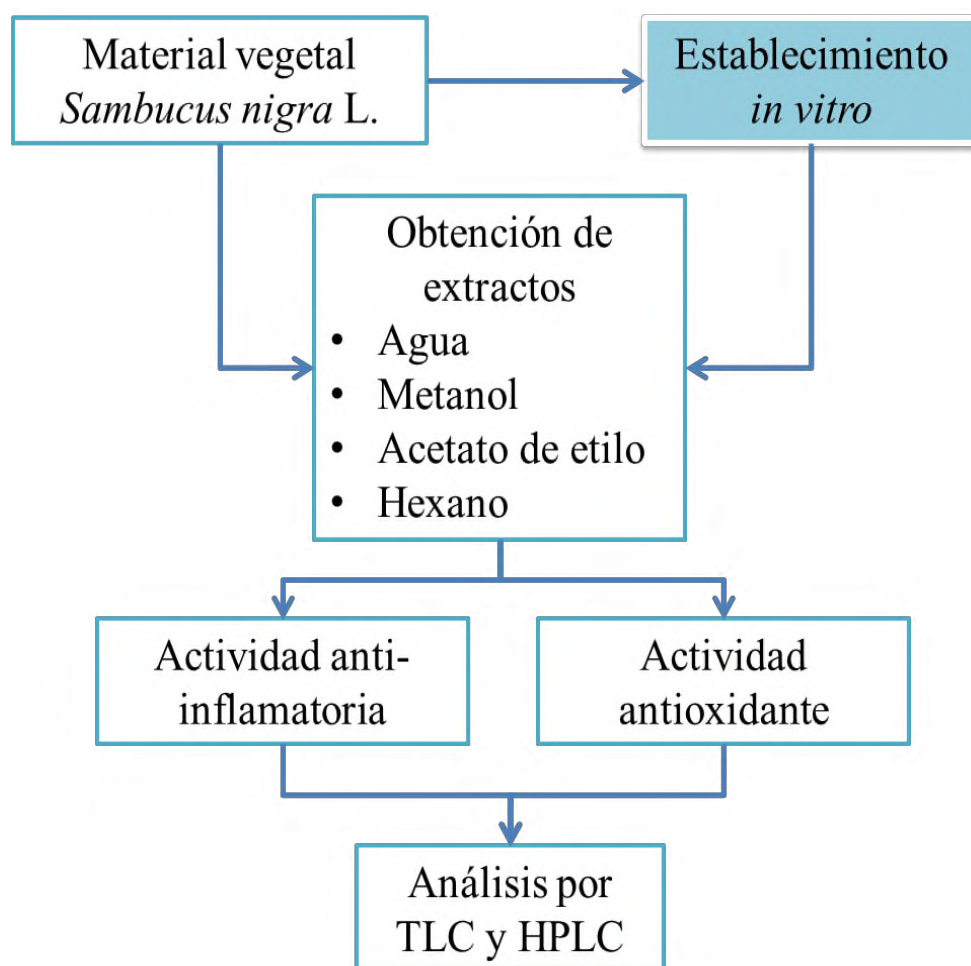


Figura 3. Estrategia Experimental

### 6.1 Material Biológico

La planta de *Sambucus nigra* L. que se utilizó para la realización de este trabajo, se recolectó en la Col. Obrera de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, ubicación latitud 18° 01' N, longitud 96° 10', a 57 msnm. Para el cultivo *in vitro* se tomaron muestras de partes aéreas (flores, hojas, yemas y nodos) como fuente de explante.

## 6.2 Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos se utilizó la parte aérea (hojas y tallo) de la planta silvestre (s) y de un cultivo *in vitro* (i), se dejaron secar a temperatura ambiente, posteriormente se realizó una extracción por gradiente de polaridad con hexano (EH), acetato de etilo (EAe), metanol (EM) y agua (EA); la mezcla se dejó reposar por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró y se concentró en un rotavapor a una presión reducida, en un baño de agua a 40°C con una rotación de 50 rpm.

Los extractos obtenidos se depositaron en viales y se dejaron secar a temperatura ambiente en una campana de extracción; posterior a su secado, se pesaron y se determinaron los rendimientos (%) de los extractos.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{PES}{PM} (100)$$

Donde:

*PES*= Peso del extracto seco

*PM*= Peso de la muestra

## 6.3 Establecimiento de cultivos *in vitro*

Para la inducción del cultivo *in vitro* de *S. nigra* se tomaron muestras de partes aéreas (flores, hojas, yemas y nodos) como fuente de explante. Posteriormente, se realizó una desinfección, que consistió en un lavado con agua estéril y desinfectante comercial (plata coloidal al 0.38%) por 10 min; seguido con etanol al 70 % por 1 min y lavado con agua estéril; después se dejó en hipoclorito de sodio al 2 % por 15 min, el cual fue retirado mediante un lavado con agua estéril. Finalmente, se sembró de 3 a 5 explantes en frascos Gerber con 20 ml de medio de cultivo MS (4.4 g/l) suplementado con sacarosa (20 g/l), reguladores de crecimiento ANA, BAP, IBA y 2,4-D, a diferentes concentraciones (Cuadro 1) y Phytigel (2 g/l). El pH se ajustó a 5.8. Los cultivos se incubaron a 25 °C con un periodo de 16/8 h luz/oscuridad.

**Cuadro 1.** Combinación de reguladores de crecimiento para *S. nigra* L.

Tratamiento	ANA	BAP	IBA	2.4-D
	mg/l			
T1	-	-	-	-
T2	0.5	2.0	-	-
T3	0.2	1.0	-	-
T4	-	1.0	0.5	-
T5	-	-	0.4	0.5

ANA (ácido 1-naftalenacético); BAP (6-bencilaminopurina); IBA (ácido indolbutírico) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético).

#### 6.4 Análisis fitoquímico y por TLC de los extractos de *S. nigra*

Para el análisis fitoquímico de los extractos de *S. nigra*, los extractos se disolvieron en etanol-agua (1:1), utilizando el método descrito por Patil & Deshmukh (2016), para la detección de taninos, flavonoides, cumarinas, glicósidos, terpenoides, esteroides y proteínas.

Para la TLC en los extractos, se tomaron alícuotas de 3  $\mu$ L de cada uno de los extractos y se colocaron en la parte inferior de una placa cromatográfica de sílica gel Merck F<sub>254</sub>, y se preparó la fase móvil con hexano y acetato de etilo (70:30).

Posteriormente se introdujo las placas en la fase móvil, y se dejó correr hasta que la fase móvil llegara a 0.5 cm antes del final de la misma; después se dejó secar, se aplicó el revelador de vainillina y se calienta a 110°C de 5-10 min y posteriormente se observaron las coloraciones, a otra placa se le aplicó el reactivo de Liebermann-Burchard, se calentó a 100°C de 5-10 min y se observaron en luz UV de 365 nm.

#### 6.5 Actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema de ratón inducido con TPA en ratones CD1

La actividad anti-inflamatoria se realizó con el método descrito por Payá, *et al.*, (1993). Que consistió en: 6 grupos de 9 ratones de la cepa ICR-CD1, de los cuales 2 grupos fueron para el control ((+) Dexametasona, (-) TPA) y 4 con TPA con los extractos, se utilizaron ratones de ambos sexos con pesos entre 28 y 30 g. Los ratones se mantuvieron a temperatura de 24 $\pm$ 3 °C, 70 $\pm$ 5 % de humedad con un ciclo de 12 h luz/oscuridad y alimento/agua *ad libitum*.

La inflamación en el animal se produjo por 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). El TPA (2.5 µg) se disolvió primero en acetona (20 µL), posteriormente se aplicó sobre la parte superficial externa e interna del lado derecho causando un edema, 15 minutos después, se aplicó el tratamiento (extracto) a cada uno de los individuos a una dosis de 1,6 mg/. El control positivo (Dexametasona) se administró a 1 mg/oreja. Todos los tratamientos se disolvieron en acetona y se aplicaron por vía tópica en el oído posterior a la administración de TPA. Después de cuatro horas de la administración del extracto, los animales se sacrificaron en una cámara de cloroformo. Se tomaron secciones circulares de 6 mm de diámetro del pabellón auricular de las orejas tratadas y no tratadas. Finalmente se pesaron para determinar la disminución de la inflamación. El porcentaje de inhibición se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = [\Delta p \text{ control} - \Delta p \text{ tratamiento}] \times 100$$

Donde:

$\Delta p$ :  $pt-pst$ ;  $pt$  es el peso de la sección de las orejas tratadas;  $pst$  es el peso de la sección de las orejas no tratadas.

## **6.6 Cuantificación de compuestos fenólicos**

### 6.6.1 Cuantificación de compuestos fenólicos totales

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales se realizó por el método descrito por Arthur, *et al.* (2011), con modificaciones por Cruz-Cruz (2013), éste método está basado en la reducción del ácido fosfomolibdico hasta óxidos azules de molibdeno con estados de oxidación inferiores a 7<sup>+</sup>.

Se prepararon los reactivos de Folin-Ciocalteu diluido en agua desionizada en una relación 1:10 y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 3 %.

Para la cuantificación de los extractos se utilizó 40 µL de la muestra, se le adicionó 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu diluido. Se dejó reaccionar por 6 min; después se adicionaron 100 µL

de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y se dejó reposar por 25 min, y se leyó en el lector de microplacas con el filtro de 750 nm.

Los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de ácido gálico ( $\mu\text{g}$  EAG)/g de peso seco.

#### 6.6.2 Cuantificación de flavonoides totales

Se realizó la cuantificación de los flavonoides totales utilizando la técnica descrita por Enayat & Banecjee (2009), con modificaciones de Cruz-Cruz (2013).

Se partió de 40  $\mu\text{L}$  de cada uno de los extractos como volumen máximo de muestra, y se adicionó 40  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, inmediatamente se agregaron 10.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  al 5 %, y se dejó reposar por 5 min. Transcurrido el tiempo se le adicionó 10.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 10 % y se homogenizó, se dejó reposar por 6 min. Posteriormente, se adicionaron 70  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1M y se llevó a un volumen final de 240  $\mu\text{L}$  con agua desionizada, se dejaron reposar por 10 min y se leyeron con el filtro de 490 nm.

Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina (mg EQ)/g de peso seco.

#### 6.7 Cuantificación de la actividad antioxidante con el método de DPPH

La cuantificación de la actividad antioxidante con DPPH se realizó con el método descrito por Gutiérrez *et al.*, (2008) con modificaciones de Cruz-Cruz (2013), el método se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH por los antioxidantes que se encuentren en la muestra.

Se preparó el DPPH 150  $\mu\text{M}$  para la cuantificación de la actividad antioxidante en los extractos, se tomaron 40  $\mu\text{L}$  de volumen total y se le adicionó 200  $\mu\text{L}$  de la solución de DPPH 150  $\mu\text{M}$ , se dejó reposar por 6 min en oscuridad y se leyó con el filtro de 520 nm en el lector de microplacas.

Los resultados se expresaron en  $\mu\text{Mol}$  de Trolox/g de peso seco; así mismo se calculó el porcentaje de Inhibición (% I).

El Porcentaje de Inhibición se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% I = \frac{A - A1}{A} \times 100$$

Donde:

% I = Porcentaje de inhibición

A = Absorbancia inicial (Mezcla de reacción)

A1 = Absorbancia de la muestra

## **6.8 Cuantificación de la actividad antioxidante con el método del ABTS**

La cuantificación de la actividad antioxidante se realizó con el método del ABTS descrito por Li, *et al.*, (2008) con modificaciones de Cruz-Cruz (2013). La solución de ABTS 7 mM se preparó en persulfato de potasio 2.45 mM, se incubó por 16 h para la formación del radical ABTS+. Transcurrido el tiempo, la solución se diluyó con MeOH hasta obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.05$  a 750 nm en el lector de microplacas.

Para la cuantificación de los extractos, se usaron 40  $\mu\text{L}$  de volumen máximo de muestra y 200  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción, y se leyó con el filtro de 750 nm.

Los resultados se expresaron en  $\mu\text{Mol}$  de Trolox/g de peso seco y se calculó el Porcentaje de Inhibición (% I).

## **6.9 Cuantificación de la actividad antioxidante con el método del Fosfomolibdeno**

La cuantificación de la actividad antioxidante con Fosfomolibdeno se realizó mediante el método descrito por Prieto, *et al.*, (1999), con modificaciones de Cruz-Cruz (2013). Este método se basa en la reducción de Mo VI a Mo V por los compuestos antioxidantes y la

formación de molibdeno verde a una absorbancia de 695 nm, y detecta antioxidantes como ácido ascórbico, algunos fenoles y carotenoides.

En esta técnica, se inició con la preparación de la mezcla de reacción con fosfato de sodio 28 mM y molibdato de amonio 4 mM, en ácido sulfúrico 0.6 M en agua desionizada.

Para cuantificar los extractos, se tomaron 40  $\mu$ L de volumen máximo de muestra y 200  $\mu$ L de mezcla de reacción (el volumen multiplicado por 5, debido a que si se usaban 240  $\mu$ L se evaporarían al ser calentado), y se leyó con el filtro de 655 nm en el lector de microplacas.

Los resultados se expresaron en  $\mu$ Mol de Trolox/g de peso seco.

#### **6.10 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

El análisis por HPLC se llevó a cabo por el método descrito por Proestos *et al.* (2005), donde se utilizó el cromatógrafo con detector de arreglo de diodos. La fase móvil consistió de: agua con 1% ácido acético glacial (disolvente A), agua con 6% ácido acético glacial (disolvente B), y agua/acetonitrilo (65:30, v/v) con 5% ácido acético glacial (solvente C). El gradiente que se utilizó es el siguiente, A 100 %, 0 – 10 min; B 100 %, 10 – 30 min; B 90 %/C 10 %, 30 – 50 min; B 80 %/C 20 %, 50 – 60 min; B 70 %/C 30 %, 60 – 70 min; C 100 %, 70 – 105 min; A 100 % 105 – 110 min. El flujo de 0.5 mL/min, con un volumen de inyección de 20  $\mu$ L. La longitud de onda de monitoreo es de 280 nm.

#### **6.11 Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA de una vía con una post prueba de Tukey, con un nivel de significancia  $p < 0.05$ , con el programa estadístico miniTab 16. Los resultados se presentaron con valor medio  $\pm$  SD.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el experimento se usaron 274.5 g de material vegetal de *S. nigra* L. en peso seco. Obteniendo el peso de los extractos y su rendimiento en el cuadro siguiente:

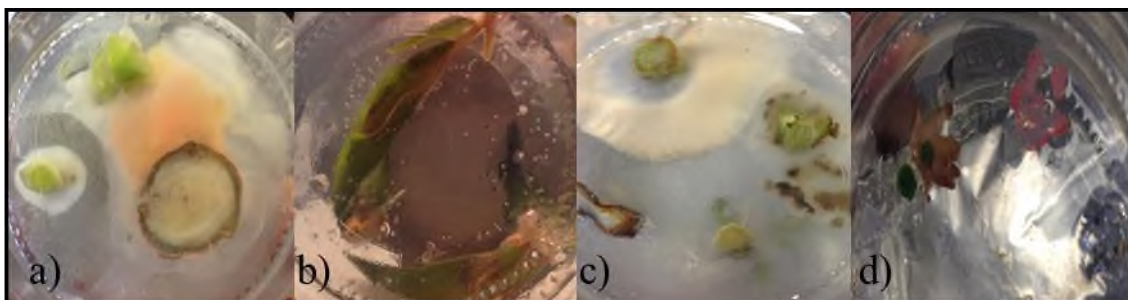
**Cuadro 2.** Peso y Rendimientos de los extractos de *S. nigra*.

<b>Extracto</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b>EHs</b>	8.5359	3.1
<b>EAes</b>	7.2849	2.7
<b>EMs</b>	10.6085	3.9
<b>EAs</b>	18.7082	6.8
<b>EH<i>i</i></b>	0.0162	1.0
<b>EAe<i>i</i></b>	0.0600	3.6
<b>EM<i>i</i></b>	0.4029	24.3
<b>EAI<i>i</i></b>	0.0641	3.9

E (Extracto); H, hexano; Ae, acetato de etilo; M, metanol; A, acuoso; s, silvestre; *i*, *in vitro*.

### 7.1 Establecimiento de cultivos *in vitro*

En el establecimiento de los cultivos *in vitro* de *S. nigra* L., después de nueve días en cultivo todos los explantes de presentaron contaminación en todos los tratamientos (Fig. 4), se observó crecimiento de hongos y levaduras, principalmente. Por lo que se aumentó el tiempo exposición para la desinfección de los explantes con hipoclorito de sodio hasta 20 min, además de plata coloidal al 0.34 % por 5 min. Los explantes que presentaron porcentaje de contaminación fueron tratados con cefotaxime (50 mg/l), hasta eliminar microorganismos. Se cambió de phytigel a agar para disminuir la hiperhidratación que presentaron algunos explantes, siguiendo los métodos utilizados para *S. canadensis* por ser del mismo grupo taxonómico descrito por Charlebois & Brassard (2013).



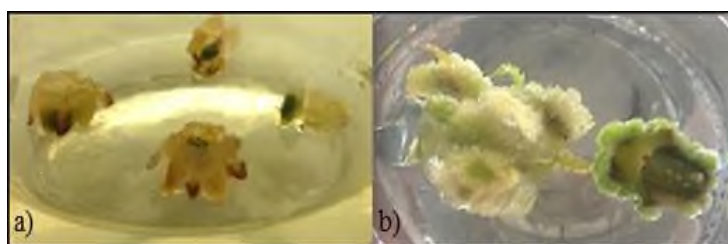
**Figura 4.** Explantes mostrando contaminación a los 9 días de siembra. a. Explantes nodales en el tratamiento T<sub>1</sub> (sin reguladores). b. Explantes de hojas en el tratamiento T<sub>2</sub> (ANA: BAP 0.5:2.0 mg/l). c. Explantes nodales en el tratamiento T<sub>3</sub> (ANA: BAP, 0.2:1.0 mg/l). d. Explantes florales en el tratamiento T<sub>4</sub> (BAP: IBA, 1.0:0.5 mg/l).

Después de solucionar la contaminación, los explantes de las partes aéreas de *S. nigra* (nodos y flores) generaron callos y brotes como se muestra en el Cuadro 3, los explantes florales presentaron un crecimiento celular excesivo, translúcido, catalogándose como callo de tipo friable en los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>4</sub> (Fig. 5a), con un porcentaje de inducción del 25 y 20% respectivamente. Mientras que en los tratamientos T<sub>3</sub> y T<sub>5</sub> presentaron oxidación (Fig. 6).

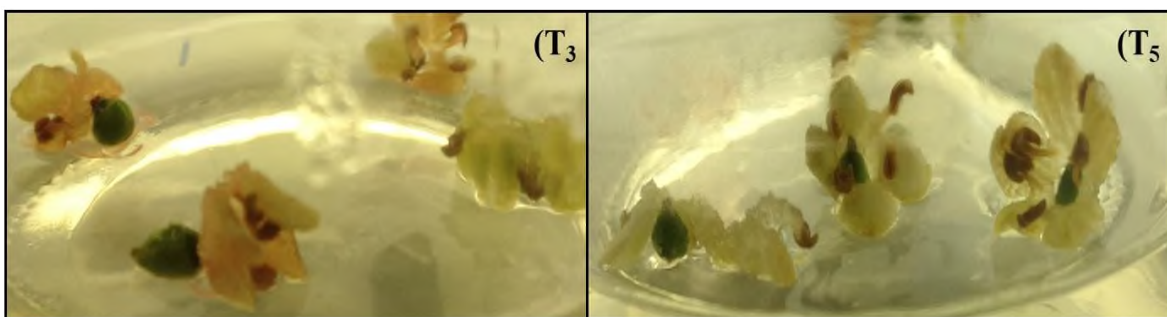
**Cuadro 3.** Respuesta de explantes de *S. nigra* L.

Tratamiento	Flores	Hoja	Yemas	Nodos
T <sub>1</sub>	-	-	-	
T <sub>2</sub>	25 <sup>+</sup>	-	-	
T <sub>3</sub>	-	-	-	
T <sub>4</sub>	20 <sup>+</sup>	-	-	
T <sub>5</sub>	-	15	35	15 <sup>+</sup> , 35 <sup>*</sup>

Frecuencia de crecimiento (%) de un lote de 20 explantes *in vitro* por tratamiento a los 9 días de su siembra. <sup>+</sup> Callo; <sup>\*</sup> Brote.

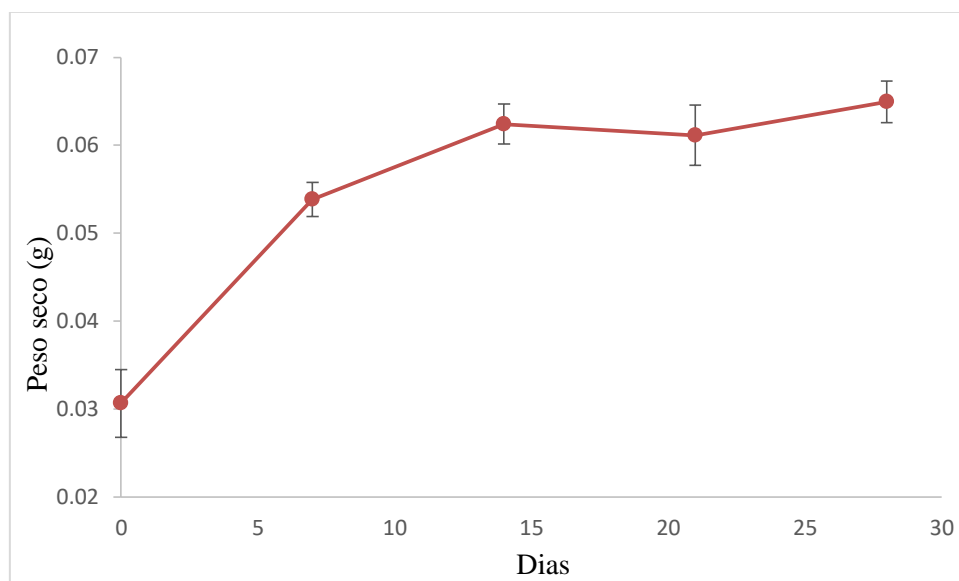


**Figura 5.** Explantes con formaciones callosas de *S. nigra* L., después de 9 días de su siembra. a) callo proveniente de explante de flores; b) callo obtenidos a partir de nodos.



**Figura 6.** Explantes oxidados de los tratamientos T<sub>3</sub> y T<sub>5</sub>.

Los explantes nodales generaron callos embriogénicos de color verde (Fig. 5b) y de brotes, con un 35% y 15 % de inducción respectivamente. En el tratamiento T<sub>5</sub> a partir de los callos y brotes generados a partir de yemas axilares, se realizó la resiembra en frascos con medio de cultivo nuevo, para continuar con las líneas celulares; la velocidad específica de crecimiento de los callos fue  $0.0508 \text{ d}^{-1}$  con un tiempo de duplicación de 13.64 d, como se muestra en la fig. 7, además que no hubo una diferencia significativa en el crecimiento de los callos, siendo un crecimiento celular muy lento, en referencia con otros del género de *Sambucus* que obtuvieron micropropagación y una alta sobrevivencia de los explantes, es el caso de *S. canadensis* (Charlebois & Brassard, 2013).



**Figura 7.** Cinética de crecimiento de callos inducidos a partir de yemas de *S. nigra*. Medios MS con IBA y 2,4-D (0.4 y 0.5 mg/l respectivamente).

Charlebois & Brassard (2013), trabajaron con *S. canadensis* donde obtuvieron mayor eficiencia tanto en desinfestación como en la obtención de brotes, comparado con lo obtenido en este trabajo, en cambio la respuesta que se obtuvo en la formación de callo (friables y embriogénicos), no se presenta en los trabajos de Charlebois & Brassard y de Zhihong & Zhouqi (2008), donde también hubo formación e inducción de brotes, estos se mantuvieron y se sembraron para mantener la línea celular.

## 7.2 Análisis fitoquímico y por TLC de los extractos de *S. nigra*

El análisis fitoquímico de los extractos de *S. nigra* silvestre y de callos (Cuadro 4), mostró que los extractos silvestres presentan un mayor grupo de compuestos en comparación con los extractos *in vitro*, el extracto silvestre EM presentó la mayoría de los compuestos, mientras que el extracto EH sólo dio positivo en flavonoides; se observó en mismo comportamiento en los extractos *in vitro*, donde el extracto EH dio positivo en flavonoides y el EM presentó un grupo mayor de compuestos.

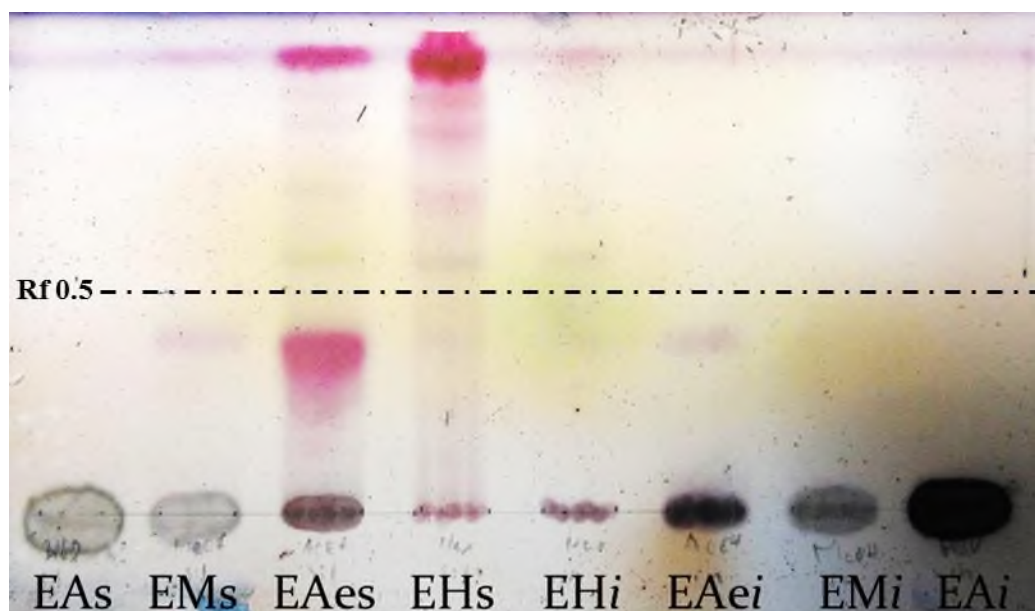
**Cuadro 4.** Fitoquímica de los extractos de *S. nigra*

Compuestos	Silvestre				<i>In vitro</i>			
	EH	EAe	EM	EA	EH	EAe	EM	EA
Taninos	-	+	+	+	-	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+	+
Cumarinas	-	-	+	+	-	+	+	+
Glicósidos	-	+	+	-	-	-	-	-
Terpenoides	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteroides	-	+	+	-	-	-	+	-
Proteínas	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Presencia de compuesto; -: ausencia de compuesto.

Estudios anteriores muestran la presencia de estos mismos compuestos, Akhtar *et al.* (2015) donde realizaron un estudio fitoquímico a plantas medicinales en Paquistán, en la que extractos de metanol-cloroformo de *S. nigra* mostraron acumulación de compuestos como terpenoides, taninos, quinonas y alcaloides, la acumulación de estos compuestos son similares a los que se obtuvieron en este trabajo, estos pueden variar debido a su sitio geográfico, y a las condiciones climáticas.

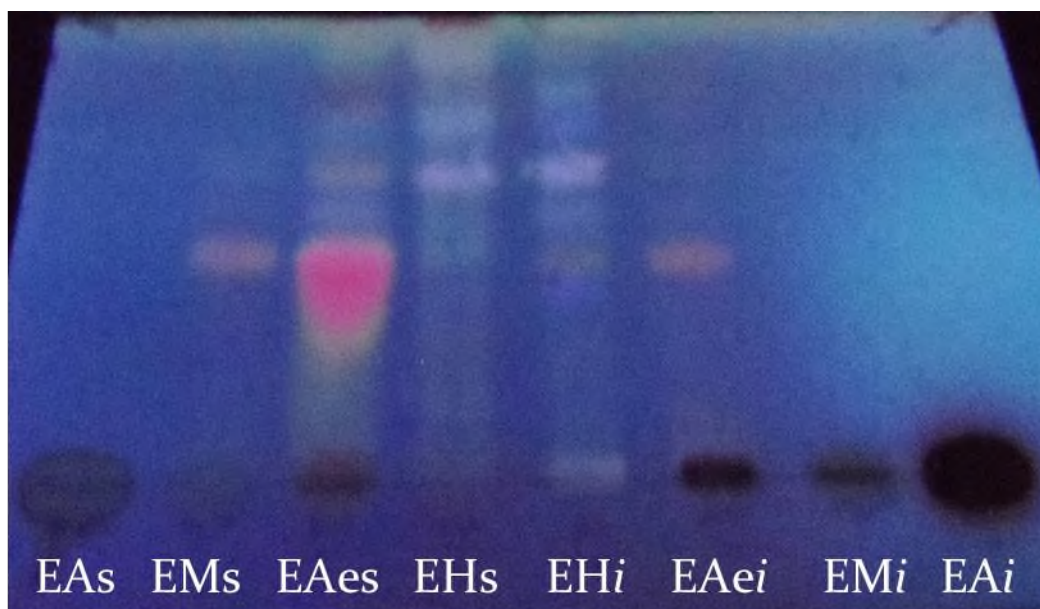
Además se realizó la detección de los grupos de compuestos por TLC por sus siglas en inglés, con ayuda de reveladores (Vainillina y Liebermann-Burchard) y luz UV/Vis de banda corta y ancha. En la figura 8, la placa cromatográfica se reveló con Vainillina, se observó que en donde hubo un mayor contenido de compuestos fue en los extractos EH y EAe silvestre e *in vitro*, esto se debe a la fase móvil que se utilizó, debido a que arrastró los compuestos poco y medianamente polar, y en el extracto EM sólo se observó una banda con Rf de 0.38 que comparte con los extractos EH y EAe en ambos sistemas silvestres e *in vitro*, mientras que el extracto EA no se separó del punto de aplicación; las bandas de los extractos EH, EAe, y EM, presentaron coloraciones amarillos, café, violeta, coloraciones representativas de los flavonoides glicosilados, también se observan coloraciones azules y rojo-violeta de los terpenos, estudios anteriores demostraron que *S. nigra* acumula estos compuestos en flores Sidor & Gramza-Michalowska (2014), este trabajo demostró que la parte aérea de *S. nigra* presenta compuestos similares. Akhtar *et al.* (2015) muestran resultados similares, como se observa en la fitoquímica anterior (cuadro 4).



**Figura 8.** Perfil cromatográfico de los extractos silvestres e *in vitro* de *S. nigra* revelada con Vainillina. Sistema de elución de hexano-acetato de etilo (70:30).

Cuando la placa se reveló con el reactivo de Liebermann-Burchard (Fig. 9), algunas de las bandas de los extractos no se separaron y se encuentran agrupadas, puede deberse a que presentan una polaridad similar y por ende los compuestos se encuentran unidos o traslapados, por otro lado, debido a la fase móvil que se utilizó los compuestos poco y medianamente

polares fueron separados, siendo los extractos EH y EAe silvestres e *in vitro* los que presentaron una mayor cantidad de bandas y por la coloración que presentaron se identifican grupos de compuestos como cucurbitacinas que dan una coloración rojo-violeta y azul, terpenos con coloración gris y flavonoides amarillo-café, el extracto EM silvestres e *in vitro* presento una banda similar a la de los extractos EH y EAe, mientras que los extractos silvestre e *in vitro* EA no se separaron del punto de aplicación, debido a que los compuestos son muy polares.



**Figura 9.** Perfil cromatográfico de los extractos silvestres e *in vitro* de *S. nigra* revelada con reactivo de Liebermann-Burchard en luz UV/Vis de banda ancha (365 nm). Sistema de elución de Hexano-Acetato de etilo (70:30).

Trabajos anteriores demuestran el contenido de compuestos similares a los que se obtuvieron en este trabajo, sin embargo, Dawidowicz *et al.* (2006), Veberic *et al.* (2009), Sidor & Gramza-Michalowska (2014), Kaack *et al.* (2008), Hleba *et al.* (2014), han encontrado dichos compuestos en flores y frutos en una mayor concentración, Dawidowicz *et al.*, (2006), Akhtar *et al.* (2015), mostraron que en la parte aérea también dichos compuestos. Especies de *Sambucus* presentan una similitud en los compuestos que acumulan, como *S. ebulus*, *S. wightiana*, *S. williamsii*, de los cuales contienen principalmente, flavonoides como quercetina, ácidos orgánicos, esteroides, triterpenos, iridoides, polifenoles y ácido ursólico entre otros (Süntar *et al.*, 2010; Abdala *et al.*, 2014).

### 7.3 Cuantificación de compuestos fenólicos

#### 7.3.1 Cuantificación de compuestos fenólicos totales

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales de los extractos de *S. nigra* silvestre e *in vitro*, se realizó la curva patrón con ácido gálico [0-90 µg/ml] en el lector de microplacas con el filtro de 750 nm. Donde se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9957. Los contenidos de los fenoles totales de los extractos de *S. nigra* silvestres e *in vitro* se muestran en el siguiente cuadro.

**Cuadro 5.** Cuantificación de fenoles totales de extractos de *S. nigra*.

Extracto	mg EAG/g de extracto	
	Silvestre	<i>In vitro</i>
<b>EH</b>	0.449±0.050 <sup>de</sup>	0.501±0.060 <sup>de</sup>
<b>E Ae</b>	0.751±0.021 <sup>c</sup>	0.665±0.017 <sup>cd</sup>
<b>EM</b>	1.316±0.046 <sup>a</sup>	1.016±0.016 <sup>b</sup>
<b>EA</b>	0.674±0.088 <sup>cd</sup>	0.326±0.008 <sup>e</sup>

Evaluación de las medias ±SD.  $n=3$ ; Prueba de ANOVA por Tukey con  $<p=0.05$ , letras diferentes indican que hay diferencias significativas. EH: Extracto hexánico; EAe: Extracto de acetato de etilo; EM: Extracto metanólico; EA: Extracto acuoso.

Se observó que el extracto que presento un mayor contenido de compuestos fenólicos fue el EMs y EMi (1.316 y 1.016 mg EAG/g de extracto respectivamente), mientras que el extracto EHs y EAi (0.449 y 0.326 mg EAG/g de extracto) fueron los que presentaron un menor contenido de fenoles, esto puede deberse a la polaridad de los compuestos. Podemos mencionar que todos los extractos de *S. nigra* silvestres e *in vitro* presentan un contenido de compuestos fenólicos

Hleba *et al.* (2014) reportaron el contenido ácidos fenólicos en extractos metanólicos de flores de plantas de *S. nigra* silvestre colectadas en Eslovaquia, acumulando 1123.3 mg de ácidos fenólicos/g de extracto, teniendo un contenido menor que el extracto EMs reportado en este trabajo, y mayor que el extracto EMi. Los compuestos fenólicos se han reconocido por su actividad antioxidante y que se relaciona con reducir los riesgos de muchas enfermedades crónicas, tales como el cáncer o enfermedades coronarias (Li *et al.*, 2012).

### 7.3.2 Cuantificación de flavonoides totales

Para la cuantificación de los flavonoides totales de los extractos de *S. nigra*, se generó la curva patrón de quercetina [0-100 mg/l] en el lector de microplacas con el filtro de 490 nm. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9952. Los contenidos de flavonoides totales de los extractos de *S. nigra* silvestre e *in vitro* se muestran a continuación:

**Cuadro 6.** Cuantificación de flavonoides totales de extractos de *S. nigra*.

Extracto	µg EQ/g de extracto	
	Silvestre	<i>In vitro</i>
<b>EH</b>	1.26±0.13 <sup>f</sup>	0.54±0.10 <sup>f</sup>
<b>E Ae</b>	5565.08±88.38 <sup>a</sup>	1850.79±88.38 <sup>c</sup>
<b>EM</b>	3326.98±83.99 <sup>b</sup>	1057.14±137.46 <sup>d</sup>
<b>EA</b>	882.54±57.23 <sup>d</sup>	422.22±42.00 <sup>e</sup>

Evaluación de las medias ±SD.  $n=3$ ; Prueba de ANOVA por Tukey con  $p<0.05$ , letras diferentes indican que hay diferencias significativas. EH: Extracto hexánico; EAe: Extracto de acetato de etilo; EM: Extracto metanólico; EA: Extracto acuoso.

Los extractos que presentaron mayor contenido de flavonoides fueron el extracto EAes y EAei (5565.08 y 1850.79 µg EQ/g de extracto, respectivamente) seguidos de los extractos EMs y EMi (3326.98 y 1057.14 µg EQ/g de extracto), mientras que los extractos EHs y EHi fueron los que presentaron menor contenido de flavonoides, se observó un comportamiento similar en el contenido de flavonoides en los extractos silvestres con los extractos *in vitro* aunque en menor concentración.

Hleba *et al.* (2014) reportaron un menor contenido de flavonoides en extractos metanólicos de flores de *S. nigra* con 876.8 µg Q/g de extracto, siendo el extracto de acetato de etilo silvestre 3 veces mayor que el *in vitro*, el segundo mayor contenido de flavonoides se observó en metanólicos silvestres, siguiendo la misma tendencia el extracto metanólico *in vitro* con una concentración 3 veces menos que la silvestre. Es importante resaltar que, el comportamiento del contenido de fenoles es diferente al contenido de flavonoides, observando que los extractos de *S. nigra* silvestre acumulan una mayor concentración de flavonoides que los *in vitro*. Por otro lado, los flavonoides presentan propiedades antioxidantes, y contribuyen en la reducción de enfermedades cardiovasculares, además de presentar una potencial sinergia con los fenoles

y algunos flavonoides que entran en este grupo son isoflavonas, flavononas, flavonas metiladas y flavonoles, por su poca polaridad (Andersen y Markham, 2006).

#### 7.4 Actividad Anti-inflamatoria

La actividad anti-inflamatoria inició con la aplicación del TPA en las orejas de los ratones (grupo control negativo) con  $10.13 \pm 0.61$  mg de edema, mientras que el control positivo fué  $5.44 \pm 1.45$  mg, inhibiendo el 46.3 % del edema producido por el TPA. Cuando se aplicaron los tratamientos (extractos silvestres e *in vitro* de *S. nigra*) se observó que todos los extractos presentaron actividad anti-inflamatoria. Sin embargo, los extractos EHs, y EMI, en dosis de 1.6 mg/oreja inhibieron el edema formado por el TPA significativamente ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control positivo (dexametasona), seguido del extracto EHs en el caso de los extractos silvestres, mientras que los extractos *in vitro* EHi, EAei y EAi mostraron una menor inhibición de la inflamación en comparación con el control positivo (dexametasona).

**Cuadro 7.** Actividad anti-inflamatoria de *S. nigra* L.

Tratamiento	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	% Inhibición
TPA	2.5µg	10.13±0.61	-
Dexametasona	1	5.44±1.45 <sup>bc</sup>	46.3
EHS	1.6	6.13±0.71 <sup>bcd</sup>	39.5
EAs	1.6	1.16±0.20 <sup>a</sup>	<b>88.5</b>
EMs	1.6	4.34±0.58 <sup>ab</sup>	57.1
EAs	1.6	5.26±1.06 <sup>bc</sup>	48.0
EHi	1.6	7.84±1.33 <sup>bcd</sup>	22.6
EAei	1.6	6.66±0.56 <sup>bcd</sup>	34.2
EMi	1.6	0.66±0.22 <sup>a</sup>	<b>93.5</b>
EAi	1.6	9.06±0.72 <sup>cd</sup>	10.5

Evaluación de las medias  $\pm$ SD.  $n=5$ ; Prueba de ANOVA por Tukey con  $<p=0.05$ , letras diferentes indican que hay diferencias significativas; s: silvestre; i: *in vitro*; EH: Extracto hexánico; EA: Extracto de acetato de etilo; EM: Extracto metanólico; EAc: Extracto acuoso.

En estudios anteriores se ha comprobado la actividad anti-inflamatoria en frutos, debido a su acumulan de polifenoles (David *et al.*, 2014). Por otra parte, los estudios de actividad

biológica de la parte aérea de *S. nigra* son escasos, mas sin embargo, Abdala *et al.* (2014), menciona que especies de *Sambucus* han presentado actividad anti-inflamatoria, antinociceptiva, citotóxica, antioxidante, entre otras; demostrando que *S. palmensis* presenta actividad anti-inflamatoria bajo el modelo edema en pata de ratón inducido con carragenina, disminuyendo la inflamación un 28.57 % al compararlo con ibuprofeno (control positivo) con un 47.44 % de inhibición. En otros estudios realizados por Schwaiger *et al.* (2011), observaron actividad anti-inflamatoria *in vitro* con extractos etanólicos de hojas de *S. ebuluss* inhibiendo la TNF $\alpha$  (molécula pro-inflamatoria) y Abdala *et al.* (2014) usando extractos acuosos de planta de *S. palmensis* observó actividad anti-inflamatoria en pata de rata inducida por carrageninas, además de tener una respuesta antinociceptiva. De esta manera, podemos mencionar que los extractos de *S. nigra* silvestres e *in vitro* presentan actividad anti-inflamatoria y que los compuestos responsables como: fenólicos, flavonoides y antocianinas en particular rutina, sambucina, sambucianina, quercetina, por mencionar algunos, están relacionados con el género *Sambucus*.

Al evaluar la dosis-respuesta de los extractos más activos de ambos sistemas, como es el caso de acetato de etilo de las plantas silvestres (EAes) y del extracto metanólico *in vitro* (EMi) con 88.5 y 93.5 % de inhibición de la inflamación respectivamente (cuadro 5). Se observó que, ambos extractos fueron dosis-dependientes con DE<sub>50</sub> = 1.09 mg/oreja para EAes y DE<sub>50</sub> = 0.88 mg/oreja para EMi (cuadro 6, anexo 1).

**Tabla 6.** Dosis respuesta del extractos EAes y EMs de *S. nigra*.

Tratamiento	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	% Inhibición
<b>EAes</b>	0.4	9.50±0.99	6.17
	0.8	8.08±0.46	20.20
	1.6	1.16±0.20	<b>88.54</b>
	3.2	8.12±0.74	19.80
<b>EMi</b>	0.4	8.08±0.83	20.20
	0.8	4.34±0.58	57.14
	1.6	0.66±0.22 <sup>a</sup>	<b>93.51</b>
	3.2	7.46±0.61	26.32

Evaluación de las medias  $\pm$ SD. n=5; s: silvestre; i: *in vitro*; EAe: Extracto de acetato de etilo; EM: Extracto metanólico.

Sin embargo, se observó que ambos extractos EAes y EMi perdieron su efectividad al aumentar las dosis de 1.6 mg/oreja a 3.2 mg/oreja para los 2 tipos de extracto, presentando una disminución del porcentaje de inhibición en el edema con 19.80% y 26.32% respectivamente, este comportamiento sugiere puede deberse a que, dentro de los extractos hay compuestos que pueden no favorecer o contrarrestar el efecto inhibitorio de la inflamación cuando se rebasa una concentración determinada y que pueden estar ejerciendo un efecto antagónico a los compuestos anti-inflamatorios como rutina, quercetina, sambucina, sambucianina entre otros.

### 7.5 Cuantificación de la actividad antioxidante con el método del DPPH

Los resultados obtenidos en la curva patrón de Trolox con DPPH 150  $\mu\text{M}$  utilizando el lector de microplacas, se obtuvo una curva patrón con un coeficiente de correlación de 0.9908, por lo que se procedió a la cuantificación de los extractos.

Los resultados de la actividad antioxidante con DPPH de los extractos de plantas y callos *S. nigra* se muestran en el siguiente cuadro.

**Cuadro 8.** Cuantificación de la actividad antioxidante de los extractos de *S. nigra* con DPPH.

Extracto	$\mu\text{M}$ de Trolox/g de extracto	
	Silvestre	<i>In vitro</i>
<b>EH</b>	222.26 $\pm$ 4.06 <sup>f</sup>	424.25 $\pm$ 3.76 <sup>d</sup>
<b>EAe</b>	436.61 $\pm$ 4.27 <sup>d</sup>	471.02 $\pm$ 0.71 <sup>c</sup>
<b>EM</b>	929.68 $\pm$ 6.52 <sup>a</sup>	435.00 $\pm$ 0.47 <sup>d</sup>
<b>EA</b>	602.58 $\pm$ 1.64 <sup>b</sup>	395.48 $\pm$ 3.05 <sup>e</sup>

Evaluación de las medias  $\pm$ SD.  $n=3$ ; Prueba de ANOVA por Tukey con  $<p=0.05$ , letras diferentes indican que hay diferencias significativas. EH: Extracto hexánico; EAe: Extracto de acetato de etilo; EM: Extracto metanólico; EA: Extracto acuoso.

En la actividad antioxidante por el método del DPPH, el extracto que presentó una mayor actividad fue el extracto EMs con 929.68  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto y el de menor actividad fue el extracto EHs con 222.26  $\mu\text{M}$  Trolox/g de extracto de los extractos silvestres, en los extractos *in vitro* el extracto EAei fue el que presentó mayor actividad y el de menor el EAi con 435.00 y 395.48  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto respectivamente, la capacidad antioxidante del extracto EAei puede deberse a compuestos que pertenecen al grupo de flavonoides

principalmente y además, pueden estar involucrados otro grupo de compuestos de menos polaridad los responsables en dicha actividad (Andersen y Markham, 2006). También se calculó el porcentaje de inhibición de los extractos de *S. nigra* como se muestra en el siguiente cuadro:

**Cuadro 9.** Porcentaje de Inhibición de los extractos de *S. nigra* con DPPH.

<b>Extracto</b>	Silvestre	<i>In vitro</i>
<b>EH</b>	33.4 <sup>f</sup>	42.4 <sup>d</sup>
<b>EAe</b>	43.6 <sup>cd</sup>	47.0 <sup>a</sup>
<b>EM</b>	46.4 <sup>ab</sup>	43.5 <sup>d</sup>
<b>EA</b>	45.1 <sup>bc</sup>	39.5 <sup>e</sup>

Evaluación de las medias  $\pm$ SD.  $n=3$ ; Prueba de ANOVA por Tukey con  $<p=0.05$ , letras diferentes indican que hay diferencias significativas. EH: Extracto hexánico; EAe: Extracto de acetato de etilo; EM: Extracto metanólico; EA: Extracto acuoso.

Se observó que el extracto EAei y el EMs fueron los que inhibieron el radical DPPH por encima de los demás extractos (47.0 y 46.4 % respectivamente), y el extracto EHs fue el que obtuvo una menor inhibición (33.4 %), esto puede deberse a que en esta forma de evaluación solo hay una variable de respuesta, que es la absorbancia del extracto, ya que el DPPH se mantiene constante comparados a los resultados que obtuvieron, Dawidowicz *et al.* (2006), en donde evaluaron la captación del radical libre de DPPH en extractos de hojas de *S. nigra* silvestre a 20°C, observando un 16.8%, la inhibición, cabe mencionar que, todos los extractos evaluados en este trabajo son al menos 2 veces más activos. Trabajos anteriores reportaron que la acumulación de compuestos antioxidantes se encuentran en las bayas y en flores (Nakajima *et al.*, 2004; Buřičová & Rėblová, 2008, Denev *et al.*, 2010; Garofulić *et al.*, 2012), sin embargo el presente trabajo se demostró que la parte aérea tiene la capacidad de proporcionar compuestos antioxidantes y que los cultivos *in vitro* son una opción en la obtención de metabolitos secundarios, ya que los extractos presentan compuestos fitoquímicos antioxidantes y que reducen el radical DPPH (Tsao & Deng, 2004).

## 7.6 Cuantificación de la actividad antioxidante con el método del ABTS

Los resultados obtenidos en la curva patrón de Trolox con ABTS utilizando el lector de microplacas, se obtuvo una curva patrón con un coeficiente de correlación de 0.9966, por lo que se procedió a la cuantificación de los extractos.

Los resultados de la actividad antioxidante con ABTS de los extractos de *S. nigra* silvestres e *in vitro* se muestran en el cuadro 9.

**Cuadro 10.** Cuantificación de la actividad antioxidante de los extractos de *S. nigra* con ABTS.

Extracto	$\mu\text{M}$ de Trolox/g de extracto	
	Silvestre	<i>In vitro</i>
<b>EH</b>	65.33 $\pm$ 6.79 <sup>f</sup>	287.76 $\pm$ 5.87 <sup>d</sup>
<b>E Ae</b>	316.47 $\pm$ 10.46 <sup>cd</sup>	358.33 $\pm$ 1.74 <sup>bc</sup>
<b>EM</b>	656.06 $\pm$ 16.65 <sup>a</sup>	304.51 $\pm$ 8.63 <sup>d</sup>
<b>EA</b>	378.89 $\pm$ 12.02 <sup>b</sup>	200.44 $\pm$ 6.42 <sup>e</sup>

Evaluación de las medias  $\pm$ SD.  $n=3$ ; Prueba de ANOVA por Tukey con  $<p=0.05$ , letras diferentes indican que hay diferencias significativas. EH: Extracto hexánico; EAe: Extracto de acetato de etilo; EM: Extracto metanólico; EA: Extracto acuoso.

La cuantificación de los extractos de *S. nigra* con ABTS, mostraron una similitud en el comportamiento de la actividad antioxidante acorde con el método del DPPH anteriormente descrito, en donde el EMs tiene una actividad mayor en relación con el resto de los extractos silvestres con 656.06  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto. El EHs fue el menor con 65.33  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto. En el caso de los extractos *in vitro* el extracto EAei presento el mayor contenido en la actividad antioxidante con 358.33  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto y el de menor contenido es el extracto EAi con 200.44  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto. Además, el extracto EH<sub>i</sub> fue mayor que el EA<sub>i</sub>, comprobando que todos los extractos presentaron compuestos antioxidantes que reducen el radical catiónico ABTS<sup>+</sup> a ABTS (Tsao & Deng, 2004).

Trabajos anteriores no han determinado la actividad antioxidante por el método del ABTS en parte aérea de *S. nigra*. Sin embargo, Moldovan *et al.* (2016), probaron NPAG usando extractos de frutos de *S. nigra* para sus potenciales aplicaciones en terapias de enfermedades causadas por inflamación y estrés oxidativo; determinando que las NPAG presentaron una

mayor capacidad antioxidante (177.09  $\mu\text{M}$  Trolox) comparado con el extracto acuoso de frutos de *S. nigra* (118.44  $\mu\text{M}$  de Trolox), mientras que Olejnik *et al.* (2016), usaron extractos de fruta de *S. nigra* como protector gastrointestinal contra el estrés oxidativo, teniendo la capacidad de reducción de  $\text{ABTS}^+$  de extracto no digerido de *S. nigra*, con 333.12  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de peso seco. Además, este radical también fue reducido (182.42  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de peso seco) cuando se incubó con el extracto en un ambiente simulando la digestión en el tracto digestivo. Finalmente, se calculó el porcentaje de inhibición de los extractos de *S. nigra* (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Porcentaje de inhibición de los extractos de *S. nigra* con  $\text{ABTS}^+$ .

Extracto	Silvestre	<i>In vitro</i>
<b>EH</b>	35.4 <sup>e</sup>	53.3 <sup>bc</sup>
<b>EAe</b>	56.6 <sup>abc</sup>	61.3 <sup>a</sup>
<b>EM</b>	57.9 <sup>ab</sup>	55.2 <sup>bc</sup>
<b>EA</b>	52.9 <sup>c</sup>	43.3 <sup>d</sup>

Evaluación de las medias  $\pm$ SD.  $n=3$ ; Prueba de ANOVA por Tukey con  $p < 0.05$ , letras diferentes indican que hay diferencias significativas. EH: Extracto hexánico; EAe: Extracto de acetato de etilo; EM: Extracto metanólico; EA: Extracto acuoso.

Los extractos que obtuvieron la mayor capacidad de inhibición de radical catiónico  $\text{ABTS}^+$  fueron el extracto EAe, EMs y EAes (61.3, 57.9 y 56.6 % I, respectivamente), mientras que el extracto EHs solo obtuvo un 35.4% de inhibición. Podemos decir que todos los extractos de *S. nigra* presentaron capacidad de Inhibición ante el radical catiónico  $\text{ABTS}^+$ , sin embargo no se encuentran antecedentes sobre el porcentaje de inhibición en extractos de *S. nigra* o en especies de *Sambucus*.

## 7.7 Cuantificación de la actividad antioxidante con el método del

### Fosfomolibdeno

Se realizó la curva patrón de Trolox con fosfomolibdeno en el lector de microplacas, donde se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9919, por lo que se prosiguió a la cuantificación de los extractos de *S. nigra*.

Posteriormente se cuantificaron los extractos de los extractos silvestres e *in vitro* de *S. nigra*, como se muestra en el cuadro 12.

**Cuadro 12.** Cuantificación de la actividad antioxidante de los extractos de *S. nigra* con Fosfomolibdeno.

Extracto	$\mu\text{M}$ de Trolox/g de extracto	
	Silvestre	<i>In vitro</i>
<b>EH</b>	6235.00 $\pm$ 38.19 <sup>a</sup>	2438.33 $\pm$ 4.17 <sup>d</sup>
<b>EAe</b>	4043.33 $\pm$ 8.33 <sup>b</sup>	3134.17 $\pm$ 23.20 <sup>c</sup>
<b>EM</b>	1975.56 $\pm$ 2.78 <sup>c</sup>	1542.50 $\pm$ 14.43 <sup>e</sup>
<b>EA</b>	1835.00 $\pm$ 8.67 <sup>f</sup>	802.29 $\pm$ 3.76 <sup>h</sup>

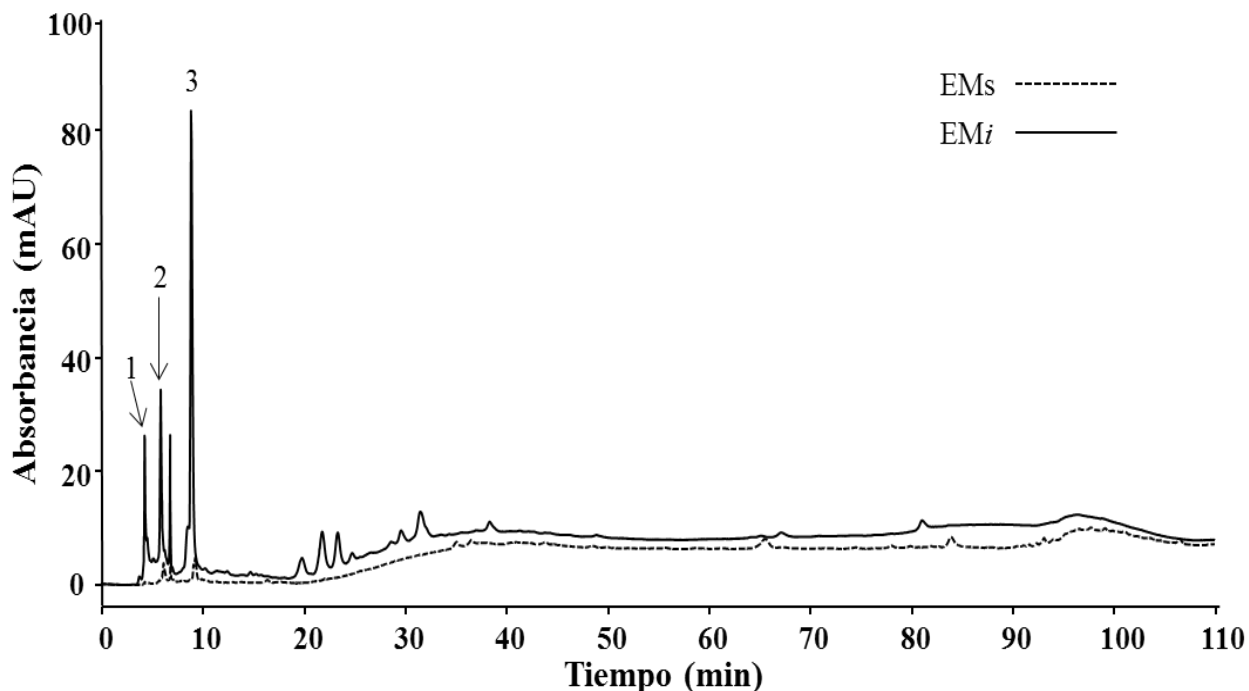
Evaluación de las medias  $\pm$ SD.  $n=3$ ; Prueba de ANOVA por Tukey con  $<p=0.05$ , letras diferentes indican que hay diferencias significativas. EH: Extracto hexánico; EAe: Extracto de acetato de etilo; EM: Extracto metanólico; EA: Extracto acuoso.

El extracto que presentó mayor actividad antioxidante fue EHs con 6235.00  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto, esto puede deberse a compuestos de baja polaridad (no identificados) presentes en este extracto, seguido del extracto EAes, siendo el extracto EAs el que presenta menor contenido con 1835.00  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto. Mientras que el extracto EAei presenta la mayor actividad con 3134.17  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto, seguido del extracto EHi con 2438.33  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto, siendo el extracto EAi el extracto que presenta un menor contenido en comparación con los otros extractos con 802.29  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto. Este método por su utilidad es una buena alternativa para la evaluación de capacidad antioxidante total, además de ser usado en extractos liposolubles en hojas de plantas, y otros compuestos a los que se les atribuye la capacidad antioxidante lipídica total, incluyen carotenoides, flavonoides y derivados de ácido cinámico (Prieto *et al.*, 1999).

### 7.8 Análisis por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

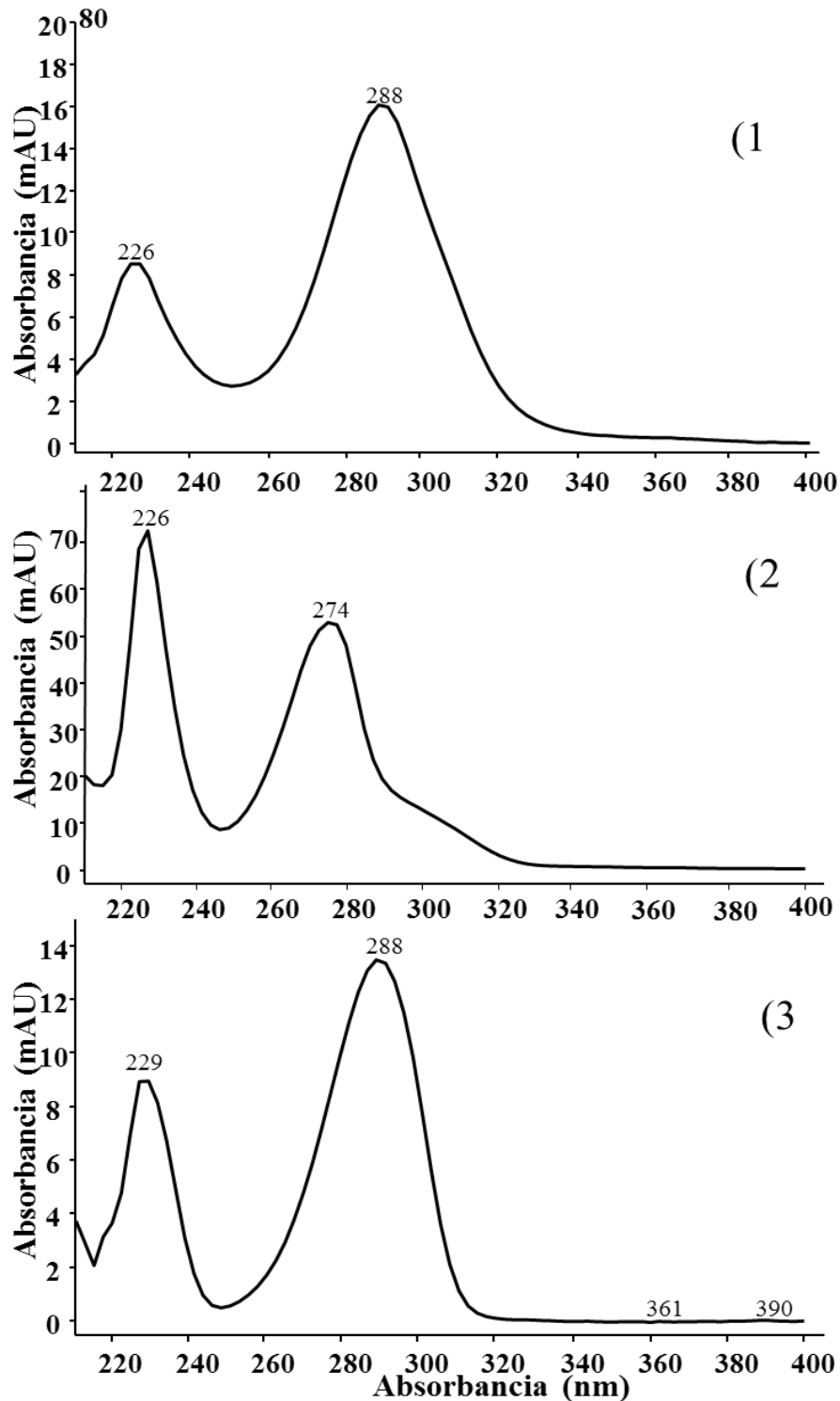
Para el análisis de los extractos de *S. nigra* se realizó bajo las condiciones propuestas por Proestos *et al.* (2005), que para seleccionar el extracto a analizar, se optó por el de mayor actividad anti-inflamatoria de los extractos *in vitro*, siendo el que obtuvo una diferencia estadística significativa el EMi (Fig. 10), y comparándolo con el EMs. De acuerdo a los

resultados se observó que en el cromatograma del EMI en los primeros 10 min se presentan cuatro picos principales de compuestos.



**Figura 10.** Cromatograma del extracto metanólico *in vitro* vs silvestre de *S. nigra*, a 280 nm.

Al comparar los cromatogramas de ambos extractos se observó, que se obtiene una diferencia en los compuestos que integran a cada extracto, el EMs no presenta los primeros picos de absorción como se muestra en el EMI (figura 10), los extracto no presentan una similitud en sus cromatogramas. Los picos que se observaron en los primeros 10 minutos de tiempo del EMI, se les extrajo el espectro de absorción con la intención de comparar con literatura para ver su posible similitud con compuestos que acumula el género *Sambucus* en particular, los espectros analizados solo fueron de 3 picos (Fig. 11) ya que a un pico no se les determino debido a que no presentaba definido su espectro de absorción.



**Figura 11.** Perfiles cromatográficos del HPLC del extracto de *S. nigra* metanólico *in vitro*. 1) pico de absorción a los 4.314 min; 2) pico de absorción a los 5.914 min; 3) pico de absorción a los 8.909 min.

Se sugiere que dichos compuestos presentes en el EMI posiblemente puedan ser los biológicamente activos o los que proporcionen en este caso la actividad anti-inflamatoria,

debido a no se presentan en el EMs. En un estudio realizado por Olejnik *et al.*, (2016) usaron extractos de fruta de *S. nigra* como protector gastrointestinal contra el estrés oxidativo, del cual identificaron compuestos fenólicos como: el 4-hidroxibenzoico glucósido (espectro de absorción 275 nm), muy cercano al del extracto EMI. Además, de compuestos que se encuentran en el rango de absorbancia de las que se obtuvieron en este trabajo, como cianidin-3,5-*O*-diglucósido (280, 520 nm), cianidin-3,5-*O*-sambubiosido (280, 520 nm), entre otros. Se sugiere seguir con el análisis químico de estos compuestos para identificarlos y determinar si son biológicamente activos.

## 8. CONCLUSIÓN

Se estableció el cultivo *in vitro* de explantes de *S. nigra* L., presentando crecimiento celular, identificando como callos embriogénicos cuando se utilizaron nodos en el T<sub>5</sub>, en cuanto a los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>4</sub>, se observó la formación de callos friables a partir de flores; los explantes podrán ser una fuente de material biológico en la obtención de compuestos biológicamente activos. Debido a la escasa información sobre el establecimiento de cultivos *in vitro* de *S. nigra*, con el presente protocolo se pretende la obtención de callos embriogénicos.

Los extractos de *S. nigra in vitro*, de acuerdo a la fitoquímica realizada presentan compuestos como, taninos, flavonoides, cumarinas y esteroides, al igual en extractos silvestre de *S. nigra*, identificándolos por medio de una cromatografía en capa fina y con la ayuda del reactivo de Liebermann-Burchard se observaron grupos de compuestos como cucurbitacinas, terpenos, flavonoides, flavonoides glicosilados, y terpenos, cuando se reveló con vainillina, esto se observó en extractos silvestres e *in vitro* de *S. nigra*.

Se demostró la actividad de los extractos silvestres de *S. nigra* como anti-inflamatorios, en donde el EAes y el EMs presentaron mayor actividad 88.5 y 57.1 % de inhibición del edema inducido con TPA, en comparación con los extractos y del fármaco comercial. En el caso de los extractos *in vitro* el extracto EMi presentó el 93.5 % de inhibición, los demás extractos presentaron efecto por debajo del fármaco comercial (46.3 %), sin embargo presentan débil actividad anti-inflamatoria.

En cuanto al contenido de compuesto fenólicos los extractos metanólico silvestres e *in vitro* presentaron el mayor contenido con 1.316 y 1.016 mg EAG/g de extracto, el contenido mayor en flavonoides fueron los extractos, silvestre e *in vitro* de acetato de etilo con 5565.08 y 1850.79 µg EQ/g de extracto, se han reconocido por su actividad antioxidante y que se relaciona con reducir los riesgos de muchas enfermedades crónico-degenerativas y cardiovasculares, tales como el cáncer o enfermedades coronarias.

Para la actividad antioxidante se comprobó que los extractos de *S. nigra* presentan actividad antioxidante, capaces de inhibir los radicales libres como el DPPH y el ABTS, se observó que

el extracto EMs fue el obtuvo un mayor contenido por estos métodos con 929.68 y 656.06  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto. Con el fosfomolibdeno el EHs fue le mayor con 6235.00  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto, para los extractos *in vitro* los extractos EAei presentaron un mayor contenido por los tres métodos, con 471.02, 358.33 y 3134.17  $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extracto, DPPH, ABTS y Fosfomolibdeno respectivamente.

En cuanto al análisis de los extractos por cromatografía líquida de alta resolución, se observaron cuatro compuestos en el EMi con diferentes tiempos de retención, siendo similares en los espectros de absorción, lo que nos quiere decir que pertenecen al mismo grupo de compuestos y son acumulados en la parte aérea y en frutos y flores.

## 9. PERSPECTIVAS

Obtener nuevas líneas de callos embriogénicos y obtener brotes, utilizando combinaciones de reguladores, y probando nuevos tipos de explante para la obtención de biomasa.

Realizar un fraccionamiento de los extractos más activos (EAes y EMI) y determinar los compuestos responsables de la actividad anti-inflamatoria y además comprobar si presentan actividad antioxidante.

Separar los extractos por cromatografía líquida de alta resolución, utilizando estándares para su identificación, y proponer una nueva metodología para disminuir el tiempo de corrida de las muestras, y la identificación de los compuestos activos presentes en los extractos *in vitro*.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Abdala S., Dévora S., Martín-Herrera D., Pérez-Paz P. (2014). Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Sambucus palmensis* link, an endemic Canary Island species. *Journal of Ethnopharmacology*. 155, 626-632.

Akhtar N., Haq I. y Mirza B. (2015). Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian Journal of Chemistry*. Article in press.

Almajano, María (2009). “Determinación de la actividad antioxidante de las bayas de Goji”. Consorci Escola Industrial de Barcelona. 321, 1-12.

Andersen Ø & Markham K. (2006). *FLAVONOIDS: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Edit. Tayloy & Francis Group. Pag. 10-12, 331.

Arthur H, Joubert E, De Beer D, Malherbe C. y Corli R. (2011). Phenylethanoid glycosides as major antioxidants in *Lippia multiflora* herbal infusion and their stability steam pasteurization of plant material. *Food Chemistry*. 127, 581-588.

Barros L., Cabrita L., Boas M., Carvalho A. y Ferreira I. (2011). Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chemistry*. 127, 1600-1608.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. Página web en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php> (consultada en abril 2017).

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S y Gontier E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161, 839-851.

Buřičová L. & Réblová Z. (2008). Czech Medicinal Plants as Possible Sources of Antioxidants. *Czech J. Food Sci.* 26 (2), 132-138.

Calva G. & Pérez J. (2005) Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*. 6 (11), 2-16.

Charlebois D. & Brassard N. (2013). Micropropagation of common Elder (*Sambucus canadensis* L.) with emphasis on disinfection of explants. *Agroforestry in action- The First International Symposium on Elderberry*. Columbia, Missouri, USA - June 9-14.

Christensen L., Kaack K. y Fretté X. (2008). Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acids. *Eur Food Res Technol*. 227, 293-305.

Cruz-Cruz, D. G. (2013). “Desarrollo de métodos colorimétricos en un lector de microplacas para evaluar la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en las hierbas del cáncer”. Tesis de licenciatura.

D'Abrosca B., DellaGreca M., Fiorentino A., Monaco P., Previtiera L., Simonet A. y Zarrelli A. (2001). Potential allelochemicals from *Sambucus nigra*. *Phytochemistry* 58, 1073–1081.

David L., Moldovan B., Vulcu A., Olenic L., Perde-Schrepler M., Fischer-Fodor E., Florea A., Crisan M., Chiorean I., Clichici S. y Filip G. (2014). Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 122, 767-777.

Dawidowicz A., Wianowska D. y Baraniak B. (2006). The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technology*. 39, 308-315.

Denev P., Ciz M., Ambrozova G., Lojek A., Yanakieva I. y Kratchanova M. (2010). Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry*. 123, 1055-1061.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. y N. Vidal. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 97, 654-660.

Enayat S. y S. Banerjee. (2009). Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp. *Food Chemistry*. 116, 23-28.

Esteyneffer Juan. (1712). Florilegio Medicinal de Todas las Enfermedades. Ed. En México por los herederos de Juan Joseph Guillena Carrafeof. Empedradillo, México.

Hernández Francisco. (1790). La Historia de la Plantas de la Nueva España del S. XVI. Opera, cum edita, tum inedita, ad autographi fidem et integratatem expressa (3 vols.) Madrid: Typographia Ibarrae Heredum.

Garofulić I., Kovačević K., Galić I., Dragović-Uzelac V. y Savić Z. (2012). The Influence of Processing on Physico-chemical Parameters, Phenolics, Antioxidant Activity and Sensory Attributes of Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Fruit Wine. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 7, 9-13.

Gómez H., González K. y Medina J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 10 (3), 182-217.

Gutiérrez D., Ortiz C., y A. Mendoza. (2008). “Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal”. Simposio de Metrología 2008. Santiago de Querétaro, México, 22 al 24 de Octubre.

Hleba L., Vuković N., Horská E., Petrová J., Sukdolak S. y Kačániová M. (2014). Phenolic profile and antimicrobial activities to selected microorganisms of some wild medical plant from Slovakia. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4 (4), 269-274.

Kaack K., Fretté X., Christense L., Landbo A. y Meyer A. (2008). Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of juice. *Eur Food Res Technol.* 226, 843-855.

Kinoshita E., Hayashi K., Katayama H., Hayashi T. y Obata A. (2012). Anti-Influenza Virus Effects of Elderberry Juice and Its Fractions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (9), 1638-1638.

Krawitz C., Mraheil M., Stein M., Imirzalioglu C., Domann E., Pleschka S. y Hain T. (2011). Inhibitory activity of a standardized elderberry liquid extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. *BMC Complementary & Alternative Medicine.* 11-16.

Kuete V, Tsafack A, Tsaffack M, Penlap V, Eota F, Ephraim A, Marion J y N Lall. (2008). Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of *Bersama engleriana* (Melianthaceae). *Journal of Ethnopharmacology.* 115, 494-501.

Laffita O. & Castillo A. (2011). Pharmaceutical-toxicological characterization of medicinal plant *Sambucus nigra* subsp. *canadensis* (L). R. Bolli. *Revista Cubana de Farmacia.* 45 (4), 586-596.

Lee J. & Finn C. (2007). Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 87, 2665-2675.

Leitão F., Guimarães S., Stern V., Machline I., Martinsa K. (2014). Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 24, 225-247.

León Nicolás. 1905. Cuatro libros de la Naturaleza y virtudes medicinales de las plantas y animales de la Nueva España. Morelia: Imprenta y litografía en la Escuela de Artes. México.

Li H., Deng Z., Wu T., Liu R., Loewen S. y Tsao R. (2012). Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food chemistry.* 130, 928-936.

López A., Medina V., Sepúlveda G., Salcedo G. y G. Trejo. (2009). “Estudio comparativo de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante de plantas silvestres y cultivadas de *Castilleja tenuiflora* Benth”. Memoria del 4th International workshop on comparative aspects of oxidative stress in biological system, II meeting of the free radical and oxidative stress branch of the Mexican Biochemical society. 31 marzo – 3 abril.

Missouri Botanical Garden (1998). An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 85 (4), 531-553.

Moldovan B., David L., Achim M., Clichici S. y Filip G. (2016). A green approach to phytomediated synthesis of silver nanoparticles using *Sambucus nigra* L. fruits extract and their antioxidant activity. *Journal of Molecular Liquids*. 221, 271-278.

Murashige T. & Skoog F. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15, 473–497.

Nakajima J., Tanaka I., Seo S., Yamazaki M., Saito K. (2004). LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2004 (5), 241-247.

Negrón, J. (2004). Cultivo de tejido vegetal “*in vitro*” de un segmento de la hoja de la planta *Kalanchoe peltata*. Biología 2013, Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Barranquitas.

Olejniak A., Olkowicz M., Kowalska K., Rychlik J., Dembczynski R., Myszka K., Juzwa W., Białas W. y Moyer M. (2016). Gastrointestinal digested *Sambucus nigra* L. fruit extract protects *in vitro* cultured human colon cells against oxidative stress. *Food Chemistry*. 197, 648-657.

Patil U. & Deshmukh O. (2016). Preliminary Phytochemical Screening of six Medicinal Plants used as Traditional Medicine. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 7 (1), 77-81.

Payá M., Ferrándiz M., Sanz M., Bustos G., Blasco R. y Rios J. (1993). Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the Mediterranean coast in mice. *Phytother. Res.* 7, 159–162.

Prieto P., Pineda M. y Aguilar M. (1999). Spectro photometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolibdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 49-56.

Proestos C, Chorianopoulos N., Nychas G. y Komaitis M. (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1190–1195.

Salvador A., Rocha S. y Silvestre A. (2015). Lipophilic phytochemicals from elderberries (*Sambucus nigra* L.): Influence of ripening, cultivar and season. *Industrial Crops and Products*. 71, 15-23.

Sánchez P., Villarreal M., Herrera-Ruiz M., Zamilpa A., Jiménez-Ferrer E. y Trejo-Tapia G. (2013). *In vitro* anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of extracts from wild growing and *in vitro* plants of *Castilleja tenuiflora* Benth. (Orobanchaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 150, 1032-1037.

Schwaiger S., Zeller I., Pölzelbauer P., Frotschnig S., Laufer G, Messner B., Pieri V., Stuppner H. y Bernhard D. (2011). Identification and pharmacological characterization of the anti-inflammatory principal of the leaves of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). *Journal of Ethnopharmacology*. 133, 704-709.

Shikov A., Pozharitskaya O., Makarov V., Wagner H., Verpoorte R. (2014). Heinrich M. Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *Journal of Ethnopharmacology*. 154, 481-536.

Sidor A. & Gramza-Michalowska A. (2014). Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. *Journal of Funtional Foods*. 18, 941-958.

Süntar I., Akkol E., Nuray F., Koca U., Keleş H. y Yesilada E. (2010) Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. *Journal of Ethnopharmacology*. 129, 106-114.

Stránský K., Valterová I. y Fiedler P. (2001). Nonsaponifiable lipid components of the pollen of elder (*Sambucus nigra* L.). *Journal of Chromatography A*. 936, 173-181.

Tsao R. & Deng Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*. 812, 85-99.

Uncini R. y Tomei P. (1999). Ethnopharmacobotanical studies of the Tuscan Archipelago. *Journal of Ethnopharmacology*. 65, 181-202.

Uncini R., Zaccaro L. y Tomei P. (2005). Antiviral activity *in vitro* of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 98, 323-327.

Veberic R., Jakopic J., Stampar F. y Schmitzer V. (2009). European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*. 114, 511-515.

Waizel-Bucay J., Martínez-Porcayo G., Villarreal-Ortega M., Alonso-Cortés D. y A. Pliego-Castañeda. (2003). Estudio preliminar etnobotánico, fitoquímico de la actividad citotóxica y antimicrobiana de *Cuphea aequipetala* Cav. (Litracea). *Polibotánica*. 15, 99-108.

Ximénez, Fray Francisco. (1615). Cuatro Libros de la Naturaleza y Virtudes de las Plantas, y Animales que Están Recevidos en el Uso de Medicina en la Nueva España. Ed. Casa de la Viuda de Diego López Dávalos. México.

Zacay-Rones Z., Thom E., Wollan T. y Wadstein J. (2004). Randomized Study of the Efficacy and Safety of Oral Elderberry Extract in the Treatment of Influenza A and B Virus Infections. *The Journal of International Medical Research*. 32, 132-140.

Zhihong L. & Zhouqi L. (2008). Tissue Culture of Stem Segment of *Sambucus williamsii*.  
*Journal of Northwest Forestry University*. 06.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1.

