



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPN**

**CAMPUS TUXTEPEC**

**“Actividad anti-ulcerogénica de extractos de *Sambucus nigra* en úlceras gástricas inducidas con Etanol e Indometacina en Ratón CD-1”**

**TESIS**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Biotecnología**

**PRESENTA:**

Miguel Arroniz García

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México 2020



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/375
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

*San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 4 de diciembre de 2019*

**M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA**  
VICE-RECTOR ACADÉMICO  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del **C. Miguel Arroniz García**, matrícula **16140001**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Actividad anti-ulcerogénica de extractos de *Sambucus nigra* en úlceras gástricas inducidas con etanol e indometacina en ratón CD-1**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

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



**Dr. Adolfo López Torres**

Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Miguel Arroniz García – Estudiante  
C.c.p. M.E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares  
C.c.p. Archivo



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2019/MBt/114
ASUNTO	Jurado de Examen de Grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 4 de diciembre de 2019

**C. MIGUEL ARRONIZ GARCÍA**  
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.

Dr. Oscar Núñez Gaona	UNPA	Presidente
Dr. Rubí Guadalupe Utrilla Coello	UNPA	Secretario
Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo	Cátedras CONACyT	Vocal
Dr. José Abad Zavaleta	UNPA	1er Suplente
Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo	UNPA	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

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



**Dr. Adolfo López Torres**  
Jefe de la División de Estudios  
de Posgrado

C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo

**M. en C. Héctor López Arjona**  
Vice-rector Académico  
Vo. Bo.



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 TUXTEPEC  
DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES CAMPUS TUXTEPEC  
Tel. 01(281)8729230

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo, por brindarme su apoyo y aportarme los conocimientos y sacar adelante mi proyecto tener paciencia y ayudarme en temas que se me dificultaban muchas gracias.

A la Dra. Jacqueline Capataz Tafur, ya que sus llamadas de atención me sirvieron para no quedarme con lo que se me decía si no siempre buscar mas allá y demostrarme a mi mismo y a los demás que si se puede y no hay que dejarse de nadie, mil gracias.

Al Bioterio de la Universidad del Papaloapan ya que en este fueron proporcionados todos los ratones CD-1 con los que se realizaron los experimentos, el cual está bajo la dirección del Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo fue quien autorizó el manejo y e uso de las instalaciones y de los ejemplares.

Al laboratorio de Cultivo de Células Vegetales, en este se realizaron todas las pruebas y análisis fitoquímicos, abasteciendo de material, reactivos y equipo para que este proyecto pudiese llevarse a cabo.

Y a los que quisieron verme tirado pero no lo lograron al contrario.

## DEDICATORIAS

A mi mamá Sara García Santos por siempre brindarme su apoyo incondicional y todas las mañanas darme un beso y salir despedirme a la puerta con una sonrisa sabiendo que su hijo va a buscar los estudios para salir adelante y conseguir mis metas.

A mi papá Tolentino Arroniz Cruz por siempre creer en mi y apoyarme en todo, quererme y darme siempre un aliento cuando se siente que ya no se puede y que mis objetivos y metas si se pueden.

A mis hermanos por el apoyo brindado en el transcurso de mi maestría.

A las personas que estuvieron ahí cuando me enferme y demostraron que si son familia y que ahí es donde se demuestra que a veces la sangre no es suficiente para ser familia mi tía Yolanda Oseguera Toscano.

## PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

Presentación oral:

Miguel Arroniz-García, Jaqueline Capataz-Tafur, Paul Mauricio Sánchez-Ocampo. Actividad anti-ulcerosa de extractos de *Sambucus nigra* en úlceras gástricas inducidas con etanol en ratón. Congreso Estatal de Biotecnología, Instituto Tecnológico de Oaxaca, 19-20 Abril del 2018, Oaxaca, México.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS .....	III
RESUMEN .....	XI
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	4
2.1.- <i>Sambucus nigra</i> .....	4
2.1.1.- Características de la especie. ....	4
2.1.2.- Usos del genero <i>Sambucus</i> en la medicina tradicional. ....	6
2.1.3.- Composición química y sustancias activas. ....	8
2.2.- Gastritis. ....	10
2.2.1.-Factores causantes.....	11
2.2.2.-Tipos de Gastritis. ....	12
2.2.2.1.- Gastritis aguda. ....	12
2.2.2.1.1.-Gastritis aguda erosiva hemorrágica: .....	13
2.2.2.1.2.-Gastritis flemosa: .....	14
2.2.2.2.- Gastritis crónica. ....	15
2.2.2.3.- Gastritis específica. ....	15
2.2.2.3.1.- Gastritis linfocítica .....	15
2.2.2.3.2.- Gastritis eosinofílica .....	15
2.2.2.3.3.- Gastritis granulomatosa .....	16
2.2.2.3.4.- Gastritis colagenosa .....	16
2.2.2.3.5. Gastritis por Anti-inflamatorios no esteroideos (AINES): .....	16
2.2.3.- Diagnostico. ....	17
• Manifestaciones clínicas:.....	17
• Hallazgos endoscópicos: .....	17
• Hallazgos histológicos:.....	17
• Exámenes de laboratorio:.....	18
2.2.4.- Tratamiento.....	18
2.2.4.1.- General. ....	18
2.2.4.2.- Especifico. ....	19
• Gastritis alcohólica: .....	19
• Gastritis por Estrés: .....	19
• Gastritis por hipertensión portal: .....	20

•	Gastritis por <i>H. pylori</i> .....	20
2.3.-	Uso del genero <i>Sambucus</i> en úlceras gástricas y procesos inflamatorios...	21
3.-	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4.-	JUSTIFICACIÓN. ....	24
5.-	HIPÓTESIS. ....	25
6.-	OBJETIVOS.....	25
Objetivo general:	.....	25
Objetivos específicos:	.....	25
7.-	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL. ....	26
8.-	METODOLOGÍA. ....	27
8.1.-	Material Biológico vegetal. ....	27
8.2.-	Obtención de los extractos.....	27
8.3.-	Análisis químico preliminar .....	28
8.3.1.-	Cromatografía en Capa Fina (TLC). ....	28
8.3-	Cromatografía en Columna.....	30
8.4.-	Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales.....	31
8.4.1. -	Cuantificación de compuestos fenólicos totales.....	31
8.4.2.-	Cuantificación de flavonoides totales. ....	32
8.5.-	Material Biológico (modelo murino).....	32
8.6.-	Inducción de úlceras gástricas mediante los modelos de Etanol absoluto e Indometacina.....	33
8.6.1.-	Evaluación de la actividad anti-ulcerogénica de extractos de <i>Sambucus nigra</i> en úlceras gástricas inducidas por etanol absoluto en ratones CD-1.....	33
8.6.2.-	Evaluación de la actividad anti-ulcerogénica de extractos de <i>Sambucus nigra</i> en úlceras gástricas inducidas por Indometacina en ratones CD-1. ....	35
8.7.-	Análisis de área dañada. ....	35
8.8.-	Análisis dosis - respuesta del extracto activo.....	36
8.9.-	Toxicidad. ....	36
8.10.-	Efecto sinérgico vía óxido nítrico.....	37
8.11.-	Análisis estadístico de datos. ....	37
9.-	RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	38
9.1.-	Análisis químico preliminar.....	38
9.1.1.-	Cromatografía en Capa Fina (TLC). ....	38

<b>9.1.2.- Cromatografía en columna (CC).</b>	<b>41</b>
<b>9.1.3.- Cuantificación de fenoles totales y flavonoides.</b>	<b>42</b>
<b>9.2.- Análisis del daño presentado en los estómagos.</b>	<b>44</b>
9.2.1.- Protección de los extractos ante el etanol.	44
9.1.2.- Análisis dosis-repuesta	46
<b>9.2.- Toxicidad.</b>	<b>47</b>
9.2.1.- Toxicidad a 30 mg/kg.	49
9.2.2.- Toxicidad a 40 mg/kg.	51
9.2.3.- Toxicidad a 53.5 mg/kg (DE <sub>50</sub> ).	52
9.2.3.- Toxicidad a 80 mg/kg.	55
<b>9.3.- Tratamiento con dosis de 30 mg/kg a 7 y 14 días.</b>	<b>56</b>
<b>9.4.-Mecanismo de acción vía óxido nítrico.</b>	<b>58</b>
9.1.2- Inducción de úlceras con Indometacina.	60
<b>10.-CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
<b>12.- REFERENCIAS.</b>	<b>64</b>
<b>13.- ANEXOS.</b>	<b>73</b>
13.1.-Curva de calibración para fenólicos.	73
13.2.- Curva de calibración para flavonoides.	73

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Árbol de <i>Sambucus nigra</i> .....	5
Figura 2.-Tracto Gastrointestinal (arriba) normal y (abajo) con lesión.....	11
Figura 3.- Anatomía del estómago .....	13
Figura 4.- Gastritis aguda erosiva hemorrágica.....	14
Figura 5.- Esquema sobre la actividad de los AINES.....	16
Figura 6.- Formulación del Omeprazol (a) y la Ranitidina (b) principales medicamentos en el tratamiento de la gastritis. ....	19
Figura 7.- Esquema experimental. ....	26
Figura 8.- A) Hojas de Saúco, B) Localización de la colecta. ....	27
Figura 9.- Esquema de la realización de la cromatografía en capa fina.....	29
Figura 10.- Esquema de la realización de cromatografía en columna.....	31
Figura 11.- Especificaciones en las que se encontraban los ratones CD-1 ( <i>Mus musculus</i> ).....	33
Figura 12.- Disección y apertura del estómago.....	34
Figura 13.- Análisis del área dañada por el software ImageJ.....	36
Figura 14.- Placas de cromatografía en el sistema de corrimiento Diclorometano:Metanol a diferentes concentraciones: a)75/25, b) 70/30 y c) 90/10 (v/v) reveladas con 4-hidroxi-benzaldehido,.....	38
Figura 15.- Placa de cromatografía corrida en el sistema Hexano:Ac. Etilo 75/25 (v/v) revelada con 4 hidroxi-benzaldehido. ....	39
Figura 16.-Placa de cromatografía corrida en el sistema Metanol:Ac. Etilo:Agua (100/13/10) (v/v/v).. ....	39
Figura 17.- Placa de cromatografía corrida en el sistema Cloroformo:Metanol:Agua (65:35:10) (v/v/v) en donde se observó la presencia de glucósidos y taninos reveladas con luz UV, a) 254 nm, b) 330 nm. ....	40
Figura 18.- Columna cromatográfica para el fraccionamiento del Extracto Activo.	41
Figura 19.- Placas en TLC con el sistema Cloroformo:metanol:agua (65:35:10). Reveladas con luz UV.....	42

Figura 20.- Daño del Etanol en los diferentes tratamientos con los extractos. A: EtOH,B: EtOH/Ex.Hex., C:EtOH/Ex.Ac.Et., D:EtOH/Ex.Met., E: EtOH/Ex.Aq.	45
Figura 21.- Efecto del extracto acuoso a diferentes dosis contra ulcers gástricas. Donde A: Control negativo (Etanol absoluto), Extracto acuoso (B: 20 mg/kg, C: 40 mg/kg, D: 80 mg/kg), E: Famotidina .....	46
Figura 22.-Evaluación de Dosis efectiva 50 ( $DE_{50}=53.50$ mg/kg).....	47
Figura 23.- Administración del extracto activo a diferentes concentraciones para monitorear la toxicidad. ....	48
Figura 24 Monitoreo de ratones 4 h después de administrar la dosis del extracto activo para toxicidad.....	49
Figura 25.- Protección del extracto activo en combinación con el DNI en ulcers provocadas por EtOH .....	59
Figura 26.- Daño generado por la Indometacina sobre la superficie estomacal....	60
Figura 27.- Estomago tratado con Etanol (A) y Estomago tratado con Indometacina (B).....	61
Figura 28.-Estomago con Indometacina (A) y Estomago tratado con extracto activo (B). ....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación Taxonómica de <i>Sambucus nigra</i> .....	5
Tabla 2.- Factores causantes de la gastritis.....	11
Tabla 3.- Clasificación de la gastritis.....	12
Tabla 4.- Pruebas de detección para <i>H. pylori</i> . (.....)	18
Tabla 5.- Sistemas de corrimiento y posibles metabolitos.....	29
Tabla 6.- Identificación de los grupos de metabolitos de acuerdo al rango del espectro UV/vis utilizado.....	30
Tabla 7.- Resultados de la cuantificación de fenólicos totales y flavonoides en los extractos.....	43
Tabla 8.- Efecto anti-ulceroso de los extractos de <i>Sambucus nigra</i> (Saúco) en el modelo de úlceras gástricas inducidas por etanol en ratón CD-1.....	45
Tabla 9.- Análisis dosis-dependiente a diferentes concentraciones del extracto activo que mostró toxicidad.....	47
Tabla 10.- Parámetros de toxicidad.....	49
Tabla 11.- Monitoreo de Toxicidad a concentración de 30 mg/kg.....	50
Tabla 12.- Monitoreo de Toxicidad a 40 mg/kg.....	51
Tabla 13.- Monitoreo de Toxicidad a 53.5 mg/kg (DE <sub>50</sub> ).....	53
Tabla 14.- Monitoreo de Toxicidad a 80 mg/kg.....	55
Tabla 15.- Estómagos sometidos al tratamiento con 30 mg/kg por 7 y 14 días. ...	58
Tabla 16.- Tratamiento a los 7 y 14 días con 30 mg/kg.....	58
Tabla 17.- Actividad del extracto activo en combinación con Dinitrato de Isosorbida.....	59
Tabla 18.- Resultados de úlceras con Indometacina.....	61

## RESUMEN

*Sambucus nigra* conocida comúnmente como Sauco es una planta silvestre que crece en riveras de ríos, arroyos, praderas y climas tropicales. Es utilizada en la medicina tradicional para tratar padecimientos como: inflamación estomacal, alivio de cólicos, desordenes gastrointestinales e inflamaciones. Además, acumula compuestos como fenólicos, flavonoides y taninos, los cuales pueden estar relacionados con sus propiedades medicinales. Debido a esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad anti-ulcerosa de extractos de *S. nigra* contra úlceras gástricas inducidas con etanol e indometacina en ratones de la cepa CD-1, seguido de un análisis químico preliminar. Para lograr esto, los extractos se analizaron por Cromatografía en Capa Fina, se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides. Se probó su capacidad antiulcerogénica a dosis de 80 mg/kg de peso y como fármaco de referencia a la famotidina. Posteriormente, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajeron los estómagos sabiéndose por la curvatura mayor y se cuantificó el daño generado con el software ImageJ, obteniendo un índice de ulceración y porcentaje de protección (%). Finalmente, se evaluó un posible mecanismo de acción usando dinitrato de isosorbida (DNI), como donador de óxido nítrico administrado junto con el extracto activo a dosis no efectivas. Los resultados mostraron que todos los extractos fueron activos superiores a famotidina (> 33.04%), siendo más activo el extracto acuoso con 60.73% de protección y con una dosis efectiva 50 de 53.5 mg/kg. Su posible mecanismo de acción puede estar mediada con el óxido nítrico por un efecto sinérgico, ya que presentó un 69% de protección. Sin embargo, se presentó toxicidad a dosis de 40 mg/kg de peso del extracto acuoso, pero cabe mencionar, que no se registró efecto nocivo a dosis 30mg/kg e inferiores. Posteriormente, se realizó la inducción de úlceras con indometacina fármaco perteneciente al grupo de anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's), observando que el extracto acuoso presentó la misma efectividad con 75.4% de protección a dosis de 30 mg/kg. El análisis químico indicó, que el efecto biológico de los extractos se relaciona directamente con el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto activo.

## ABSTRACT

*Sambucus nigra* commonly known as Elderberry is a wild plant that grows on the banks of rivers, streams, meadows and tropical weather in general. This plant is used in traditional medicine to treat gastrointestinal disorders, stomach inflammation, relief of colic and other conditions related to inflammatory processes. In addition, it accumulates compounds such as phenolics, flavonoids and tannins, which may be related to its medicinal properties. For this reason, the objective of this work was to evaluate the anti-ulcer activity of *S. nigra* extracts (hexane, ethyl acetate, methanol and water) against gastric ulcers induced with ethanol and Indomethacin in CD-1 mice, followed by a preliminary chemical analysis. To achieve this, the extracts were analyzed by TLC, column chromatography and quantification of phenolic compounds and flavonoids. Its anti-ulcer capacity of extracts was tested at dose of 80 mg / kg of weight, and famotidine as a reference drug. Subsequently, the mice were sacrificed by cervical dislocation, the stomachs were extracted and opened by the greater curvature, the damage generated with ethanol was analyzed and quantified with the ImageJ software, obtaining an ulceration index and subsequently the protection percent was calculated. Finally, a possible mechanism of action was evaluated using a nitric oxide donor Isosorbide dinitrate (DNI) administered together with the active extract at ineffective doses. The results showed that all the extracts were active higher than famotidine (> 33.04%), being more active the aqueous extract with 60.73% protection and with an effective dose 50 DE<sub>50</sub> = 53.5 mg / kg. Its possible mechanism of action can be mediated with Nitric Oxide, due to a synergistic effect with ineffective doses of DNI and aqueous extract with 69.04% protection. There was toxicity at a dose of 40 mg / kg of weight of the aqueous extract but at lower doses (30 mg / kg) they did not show toxicity. Subsequently, the induction of ulcers with indomethacin was performed a non-steroidal anti-inflammatory (NSAIDs) observing that the aqueous extract presented the same effectiveness with 75.4 % protection at a dose of 30 mg / kg. The chemical analysis indicated that the biological effect of the extracts is directly related to the content of phenolic compounds and flavonoids.

## 1.- INTRODUCCIÓN.

Desde tiempos prehispánicos el uso de hierbas con fines terapéuticos ha sido utilizado para aliviar diferentes enfermedades basándose principalmente en la farmacognosia la cual se fundamenta en el uso de los recursos naturales como alternativas terapéuticas enfocándose en el estudio de las propiedades físicas, químicas, bioquímicas, biológicas y farmacéuticas de los principios activos de origen natural, implicando la búsqueda en la terapia a partir de recursos naturales basándose en la interacción y la toxicidad que puedan causar las sustancias activas de las plantas, esta disciplina también ha sido llamada revolución verde. Por tal motivo, las plantas medicinales han encontrado nuevas alternativas en diferentes tratamientos por su actividad antioxidante, anti-inflamatoria, entre otras ya que su estructura compuesta fundamentalmente por glucósidos, flavonoides, ácidos orgánicos y taninos, presentes en la especie *Sambucus nigra* conocida comúnmente como Saúco han sido de gran relevancia, ya que estudios sobre esta planta han revelado su importancia en la actividad anti-inflamatoria y analgésica calmando los síntomas causados por úlceras estomacales sin causar efectos secundarios a otros sitios. La especie *Sambucus nigra* (Saúco), cuenta con dos subespecies *Sambucus peruviana* y *Sambucus mexicana* (Díaz, 2003), distribuidas en zonas templadas y subtropicales del mundo (Sanjinés *et al.*, 2006).

Por la variada composición química de *Sambucus nigra* proporciona numerosas propiedades terapéuticas (Sánchez *et al.*, 2010), por este motivo en muchas poblaciones es muy común que crezca cerca de los establos, parajes y viviendas campesinas, como siembra de traspatio y firmemente anclada en su uso tradicional se describe a esta planta como un “Botiquín Completo”, por sus incontables cualidades terapéuticas y prolácticas (Sánchez *et al.*, 2010). Este ejemplar según la bibliografía era utilizado desde la edad de piedra (Pahlow, 1985). En Gales existen reportes desde el siglo VI. (Tejero, 2012).

En Europa está documentado su uso desde el siglo XII en *The Physicians of the Myddavai* (los médicos del Myddavai), tratado que recoge los conocimientos

tradicionales sobre las curas y remedios que se preparaban a base de esta especie. En el siglo XVII era uno de los remedios para eliminar la flema, como diurético y purgante. En el siglo XVIII, el agua de *Sambucus nigra* se utilizaba como blanqueadora de la piel y para eliminar las pecas (Ody, 1993). En 1651 se publicó “Anatomía Sambuca”, tratado donde se recogen aproximadamente 70 enfermedades que pueden ser tratadas con remedios preparados a base de *Sambucus nigra*. En esta época en Inglaterra, era la especie que más se había desarrollado y estudiado en medicina (Tejero, 2012), poco utilizado en la actualidad (Ody, 1993).

En nuestro estudio se evaluó la actividad anti-ulcerosa que presenta *Sambucus nigra* probándola con úlceras gástricas generadas en ratón para simular un cuadro clínico de gastritis, ya que es un padecimiento que gran parte de la población suele presentar de forma cotidiana. Esta se genera por una lesión de la mucosa gástrica, que es la capa de células que reviste el estómago por dentro protegiéndolo de la acidez de los jugos gástricos. Aunque no es correcto, es frecuente que el término gastritis sea utilizado como sinónimo de dispepsia (dolor o molestias en el abdomen superior, así como síntomas de presión o plenitud relacionados muchas veces, aunque no necesariamente, con las comidas).

La gastritis puede ser producida por múltiples causas: alcohol, tabaco, alimentos, fármacos, antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), cirugías importantes o infecciones por la bacteria *Helicobacter pylori*(*H. pylori*). Desde finales del siglo XX se ha venido relacionando a *H. pylori* con la patología gástrica de una u otra forma. Es decir, la implicación de *H. pylori* en la úlcera gastroduodenal y como precursor de algún tipo de cáncer gástrico, pero también juega un papel importante como causa de gastritis. De hecho, cuando se ha estudiado su prevalencia, más de la mitad de la población presenta datos que confirman la presencia de esta bacteria en el estómago. Por lo tanto, no se trata de un proceso patológico homogéneo, sino uno heterogéneo clasificándose como un grupo de enfermedades de etiología y mecanismo patogénico multifactorial. Podría considerarse también como un grupo heterogéneo de alteraciones macroscópicas

y/o microscópicas de la mucosa que recubre interiormente el estómago (Fernández Travieso, 2014).

Para realizar el estudio fueron utilizados ratones de la cepa CD-1 ya que es la que presenta un organismo similar al del ser humano, los cuales se sometieron a modelos de ulceración de forma artificial con Etanol e Indometacina estos fueron tratados con extractos de *Sambucus nigra* para observar su capacidad anti-ulcerosa.

## **2.- ANTECEDENTES.**

### **2.1.- *Sambucus nigra*.**

Es una planta leñosa que crece en México, es un arbusto con características botánicas, composición química y sustancias activas, que ofrece las condiciones para ser aprovechado con fines de uso medicinal, alimenticio, ornamental, artesanal y como suplemento animal. Cuenta con dos subespecies *Sambucus peruviana* y *Sambucus mexicana* (Díaz, 2003), distribuidas en zonas templadas y subtropicales del mundo (Sanjinés *et al.*, 2006). Fue introducido por los españoles, quienes lo trajeron a América en el siglo XVI, se aclimato en muchas regiones incluso en las alturas andinas (Blanco *et al.*, 2005). Es un arbusto, que presenta características botánicas importantes para los sistemas agroforestales. Como sombrío a los cultivos, ornamental, cultural (planta mágica) (Botero, 2011), repelente e insecticida (Abella, 2000).

#### **2.1.1.- Características de la especie.**

En cuanto a su taxonomía pertenecía anteriormente a la familia Caprifoliácea (Uncini y Tomei, 1999), posteriormente fue reclasificada a la familia Acantácea, sub-familia Adoxácea (Leitão *et al.*, 2014), esto de acuerdo a clasificación filogenética de Grupo Filogenético de las Angiospermas GFA (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, Azúmate, Sambuco, Sanabuco, entre otros; y es utilizada para curar diversos padecimientos y dolencias como calenturas, 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 y Gramza-Michalowska, 2014)(Tabla 1).

**Tabla 1.-** Clasificación Taxonómica de *Sambucus nigra* Modificado de (Sidor y Gramsza-Michalowska 2014)

<b>Clasificación Taxonómica</b>	
<b>Reino:</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino:</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>División:</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase:</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase:</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Orden:</b>	<i>Dipsacales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Caprifoliácea</i>
<b>Género:</b>	<i>Sambucus</i>
<b>Especie:</b>	<i>S. nigra</i>

*Sambucus nigra* es un arbusto caducifolio que crece hasta 6 m de altura, está compuesta por hojas opuestas, pecioladas, pinnadas de color verde oscuro; las flores son pequeñas, blancas con 5 estambres y cada uno con una antera, son hermafroditas y pedunculadas, con filamentos delgados, el fruto es una drupa pequeña negra en forma de baya, con 3 o más nueces de endospermo carnosos (Fonnegra y Jiménez, 2006). Las raíces superficiales tienen brotes aéreos (Juárez 1996).(Fig. 1).



**Figura 1.-** Árbol de *Sambucus nigra* (Arroniz-García, 2018).

El nombre del genero *Sambucus* proviene del término sambuca, originario de un antiguo instrumento musical muy utilizado por los romanos y fabricado con la madera de esta especie. La especie *Sambucus nigra* conocida en el mundo popular como “Saúco americano, Saúco común o Sabuco” tiene propiedades medicinales como sedantes, analgésicas, antiespasmódicas, purgantes, antibacterianas, calmantes (Abella, 2010).

### **2.1.2.- Usos del genero *Sambucus* en la medicina tradicional.**

El género *Sambucus* ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional encontrando beneficios en el tratamiento contra la fiebre (antipirético) y expectorante en afecciones respiratorias (catarros y bronquitis). Las hojas tienen uso externo para tratar inflamaciones, quemaduras, manchas rojas y descamaciones en la piel (en baños de asiento), y para conjuntivitis (en compresas y lavados oculares de hojas y flores). Las hojas y flores son las partes que más se utilizan en la medicina tradicional, las propiedades para combatir la tos (antitusígenas), relajamiento de partes inflamadas y ligeramente laxantes que se deben a los mucilagos que presenta. (Paucar-Quispe, 2014).

En la medicina popular turca las hojas eran utilizadas externamente para tratar abscesos, heridas, edemas, eczemas, mordeduras de serpientes, resfriados, fiebres, hinchazones de tobillos e internamente para el tratamiento de hemorroides, purgante, diurético y para el tratamiento del dolor de estómago atribuyéndole una amplia gama de aplicaciones en el ámbito de curación, se le conoció con el sobrenombre de *hekimana* (médico de la madre) (Yesilada *et. al.*, 1993).

Las materias minerales presentes sobre todo el nitrato potásico y los ácidos ursólico y oleanólico, le confieren propiedades diuréticas, sudoríficas y depurativas, importante en estados febriles (de gripes, resfriados, faringitis y amigdalitis) y en enfermedades eruptivas infantiles (sarampión, rubéola, varicela y

escarlatina) porque con la sudoración se eliminan las toxinas de estas infecciones y desciende la fiebre. (Castillo *et. al.*, 2011)

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 flavonoides, entre estos destaca la rutina que es beneficiosa sobre los capilares y es usada como estimulante de la circulación, en afecciones cutáneas (forúnculos, eczemas, acné y otras dermatosis) se aplican compresas y lavados, a partir de la infusión de flores.

Los frutos frescos (desechados 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 isoquercetina), pigmentos antocianósidos (crisantemina, sambucianina y sambucianina), taninos, azúcares reductores y ácidos orgánicos (cítrico, málico, tartárico); los cuales son útiles como antiinflamatorios en reumatismos. El vinagre de los frutos de es desinfectante, dado su contenido de ácido málico. (Vivas *et. al.*, 2014). 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.

Se ha usado para tratar la enfermedad de Alzheimer, diabetes, epilepsia, colitis ulcerosa, gastritis, sarampión, migrañas, neuralgias; además como inmunoestimulante en el tratamiento de herpes, cáncer y VIH. Externamente se ha aplicado en quemaduras, psoriasis y herpes labial, además de actuar como demulcente (Yesilada *et. al.*,2014).

### 2.1.3.- Composición química y sustancias activas.

Entre los compuestos activos de *Sambucus nigra*, están:

- Aceites volátiles: en algunas literaturas se describen como la sangre u hormonas de la planta, se encuentran en plantas aromáticas a las que dan olor y otras características. La mayor parte de estos compuestos están constituidos por una mezcla de dos o más terpenos o una mezcla de *eleopteno* con *estearopteno* (el componente más volátil y el más estable respectivamente en una solución) (Cruz *et. al.*, 2011).
- Fitoesteroles: sustancias con estructura similar al colesterol, pero de origen vegetal. Por esta razón su consumo es beneficioso para el organismo humano, cumpliendo funciones importantes dentro del mismo, sirviendo como antioxidantes, anti-inflamatorios y anticancerígenos (Cruz *et. al.*, 2011).
- Mucílagos: polisacáridos con característica viscosa, que al entrar en contacto con el agua aumentan de volumen obteniendo una solución coloidal esta protege las membranas y mucosas de agentes químicos y mecánicos al igual que brinda saciedad quitando el hambre y tiende a desintoxicar el organismo (Ody, 1993).
- Taninos: son compuestos fenólicos hidrosolubles que suelen acumularse en la planta en las raíces, cortezas, frutos y hojas, aunque en menor proporción, son caracterizados por sus propiedades astringentes y anti-inflamatorias. Al ser capaces de secar y desinflamar la mucosa del tracto intestinal, resultan muy eficaces en tratamientos gástricos. La misma actividad astringente y la vasoconstricción que producen, ayudan a la coagulación de la sangre, acción antihemorrágica local (Font, 1990).

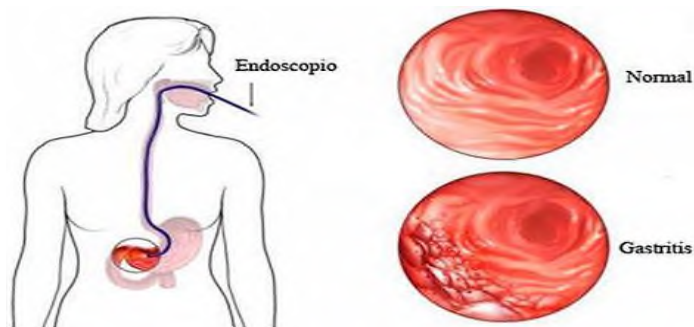
- Vitaminas A y C: la vitamina A es importante para la visión normal, el sistema inmunitario y la reproducción. Ayuda al buen funcionamiento del corazón, los pulmones, los riñones y otros órganos. Funciona como un antioxidante y acelera el proceso de curación de las heridas y fracturas óseas (Pahlow, 1985).
- Flavonoides: son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo de los daños producidos por sustancias o elementos oxidantes como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental y de sustancias nocivas presentes en los alimentos. Fueron descubiertos cuando en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina que regulaba la permeabilidad de las pequeñas arterias (Pahlow, 1985).
- Ácido vibúrnico: un compuesto que fomenta la sudoración ayudando en la desintoxicación de los tejidos corporales por su actividad astringente (Ody, 1993).
- Alcaloides: son compuestos fisiológicamente activos que contienen nitrógeno y son producidos por las plantas. Algunos alcaloides se emplean como anestésicos, antidepresivos o estimulantes, aunque muchos de ellos crean dependencia. Muchas plantas presentan estos compuestos en mayor proporción en la hoja (Pahlow 1985).

Los beneficios que proporciona la planta en la medicina tradicional son relacionados con la protección del aparato digestivo y atención a gastropatías principalmente en casos de inflamaciones y úlceras lo que comúnmente conocemos como gastritis.

## **2.2.- Gastritis.**

La gastritis suele denominarse como una inflamación del estómago que de forma seguida lleva a la formación de úlceras, dentro de esta denominación se incluyen todas aquellas enfermedades inflamatorias agudas o crónicas, focales o difusas que afectan al estómago. Por este motivo, no se trata de un proceso patológico homogéneo, siendo así, un grupo de enfermedades de etiología y mecanismo patogénico multifactorial. También puede considerarse como un grupo heterogéneo de alteraciones macroscópicas y/o microscópicas de la mucosa que recubre interiormente el estómago (Farreras-Rozman, 2013).

La gastritis es una enfermedad inflamatoria de la mucosa gástrica producida por factores exógenos y endógenos que produce síntomas dispépticos atribuibles a la enfermedad y cuya existencia se sospecha clínicamente, se observa endoscópicamente y que requiere confirmación histológica. La disciplina de esta enfermedad depende del tiempo en que la mucosa gástrica este expuesta a los factores causantes, jugando un papel importante la capacidad que presenta para soportar estos efectos deletéreos solo defendiéndose con las secreciones producidas de forma natural, produciendo así una barrera gástrica formada por componentes pre-epiteliales (mucosa y fosfolípidos) sub-epiteliales (flujo sanguíneo) y epiteliales (la restitución del tejido por células).El trastorno de uno o más de estos componentes defensivos por factores etiológicos de la gastritis originan la lesión de la mucosa permitiendo la acción del ácido, proteasas y ácidos biliares en mayor o menor grado y que pueden llegar hasta la lámina propia, sitio en el que producen lesión vascular (Fig. 2), estimulan las terminaciones nerviosas y activan la descarga de histamina y de otros mediadores(Valdivia Roldán, 2011).



**Figura 2.-**Tracto Gastrointestinal (arriba) normal y (abajo) con lesión.

Modificado de (Valdivia Roldan 2011)

### 2.2.1.-Factores causantes.

La gastritis suele tener varios factores que pueden dar su origen, observándose que en un solo paciente pueden intervenir varios detonantes tanto exógenos como endógenos, en donde el más común es la infección por *H. pylori* siendo una bacteria que se encuentra de forma normal en la flora bacteriana, sin embargo cuando esta tiende a incrementarse por ayuno prolongado y mala alimentación destaca entre los factores más significativos y suele causar lesiones, ya que activa diferentes mecanismos de defensa en el organismo que dañan la mucosa estomacal(Tabla 2) (León, 2008).

**Tabla 2.-**Factores causantes de la gastritis (Modificado de Valdivia Roldan, 2011).

<b>Factores Externos</b>	<b>Factores Internos</b>
1.- <i>H. pylori</i>	1.- Acido gástrico o pepsina
2.- Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)	2.- Bilis
3.- Irritantes gástricos	3.- Jugo pancreático
4.- Drogas	4.- Urea (Uremia)
5.- Alcohol	5.- Inmunes
6.- Tabaco	
7.- Cáusticos	
8.- Radiación	

### 2.2.2.-Tipos de Gastritis.

En los últimos años se han propuesto múltiples clasificaciones de la gastritis, recientemente, se ha implicado a *H. pylori* como el agente etiológico responsable de la gran mayoría de las enfermedades gástricas de origen inflamatorio. Luego de la combinación de varios criterios se clasifico a la gastritis en tres grandes grupos teniendo en cuenta los factores causantes, las gastritis más comunes son causadas por la ingesta de medicamentos (AINES), comidas irritantes y muy condimentadas, ayuno prolongado y enfermedades como la diabetes, por otra parte se pueden causar por la ingesta de alcohol y cáusticos, las gastritis más agresivas son causadas por enfermedades que afectan al sistema inmunitario entre la más común el VIH (Tabla 3) (Ramírez, 2008).

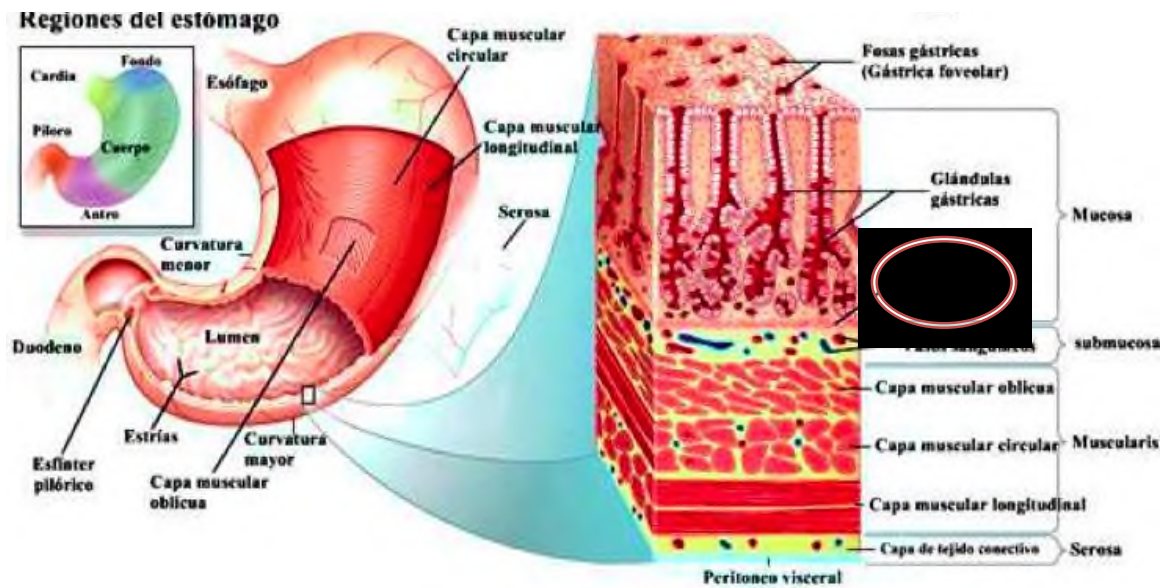
**Tabla 3.-** Clasificación de la gastritis.(Modificado de Abreu, García 2007).

<b>Grupo</b>	<b>Clasificación</b>
Gastritis aguda	Gastritis aguda erosiva hemorrágica
	Gastritis aguda flemonosa supurativa
Gastritis crónica	Gastritis crónica por <i>H. pylori</i>
	Gastritis crónica autoinmune
	Gastritis crónica hipertrófica
Gastritis especifica	Gastritis linfocítica
	Gastritis eosinofilica
	Gastritis granulomatosa
	Gastritis collagenosa

#### 2.2.2.1.- Gastritis aguda.

Es la forma más común que se presenta la gastritis, se caracteriza por inflamación de la mucosa acompañada por el desarrollo de múltiples erosiones en forma de llagas (Pérdida de sustancias solo en las capas más superficiales), las mismas que aparecen como lesiones hemorrágicas múltiples, bien definidas y de máximo

3 a 5mm de diámetro, pueden también aparecer como auténticas úlceras lo cual da lugar a hemorragias de mayor o menor intensidad. Microscópicamente las erosiones pueden mostrar necrosis en la mucosa que no sobrepase la *Muscularis mucosae* (primera capa de protección de mucosa gástrica) que ayuda a proteger el estómago por daños de los jugos gástricos, esta es segregada por las Cox1 y las Cox2 (Fig. 3) (Soriano *et. al.*, 2000).

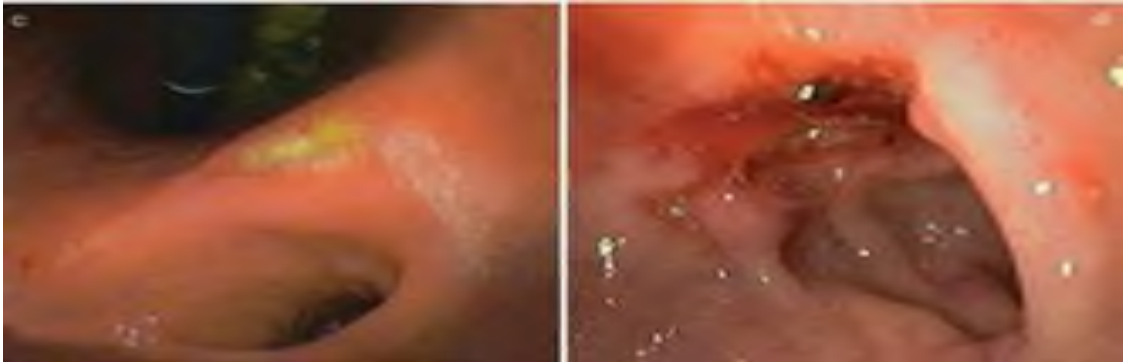


**Figura 3.-Anatomía del estómago**  
(Modificado de Enciclopedia británica, 2003)

#### 2.2.2.1.1.-Gastritis aguda erosiva hemorrágica:

Este tipo de gastritis se caracteriza por la presencia de necrosis en la mucosa superficial y la existencia de múltiples focos de hemorragia con un modesto o ausente infiltrado inflamatorio. Histológicamente se trata de una gastropatía con alteración vascular y lesión epitelial de diferentes grados, lo que determina el aspecto endoscópico. La gastritis hemorrágica aguda (Fig. 4) aparece asociada a circunstancias clínicas diferentes entre las cuales tenemos las siguientes (Soriano *et al.*, 2000).

- La ingesta de AINE's.
- Tratamientos radioterapéuticos.
- Lesión directa del epitelio gástrico por agentes tóxicos (alcohol, drogas, agentes químicos).
- Hipoxia, hipoperfusión de la mucosa o estrés grave.
- Agentes infecciosos.
- Reflujo biliar.



**Figura 4.-Gastritis aguda erosiva hemorrágica.**

(Modificada de Lanas y Saínez, 2014)

#### **2.2.2.1.2.-Gastritis flemosa:**

Es un proceso muy poco frecuente causado por bacterias piógenas, microscópicamente destaca un intenso infiltrado inflamatorio de carácter purulento, la formación de micro-abscesos y trombosis de vasos de la submucosa que puede originar necrosis de la pared.

Es producida también por la ingesta de alimentos contaminados, por bacterias o sus toxinas, bien sea como consecuencia del síndrome tóxico de la infección general o por la localización del germen. El diagnóstico se realiza mediante el análisis histopatológico y/o microbiológico de las muestras obtenidas por endoscopia (Valdivia Roldan 2011).

#### **2.2.2.2.- Gastritis crónica.**

Caracterizada por ser una inflamación de la mucosa gástrica que se presenta gradualmente, y que persiste durante un tiempo prolongado provocando lesiones de carácter irreversible. En el origen del trastorno pueden involucrarse diversos factores, como el consumo reiterado de sustancias o fármacos irritantes de la mucosa gástrica (alcohol, nicotina, AINES), bebidas muy frías o muy calientes, reflujo biliar desde el duodeno, trastornos autoinmunes o infecciones por bacterias como *H. pylori* y trastornos relacionados con la edad (Gámez *et al.*, 2008).

Se estima que el 50% de la población mundial presenta algún grado de inflamación gástrica debido a la infección de dicha bacteria, muchas de las personas infectadas no presentan síntomas. La asociación Española de gastroenterología establece dos grandes categorías de gastritis crónica en función de la presencia de atrofia, es decir daño de tejido (Miranda *et al.*, 2015).

#### **2.2.2.3.- Gastritis específica.**

El termino específico grupo incluye patologías de la mucosa gástrica cuya etiología cualidad específica que las distingue, no comparte las mismas características de grupos anteriores. Entre ellas tenemos (Angos, 2016).

##### **2.2.2.3.1.- Gastritis linfocítica**

Presenta un engrosamiento de los pliegues de la mucosa gástrica, modularidad, la característica microscópica fundamental es la presencia de un intenso infiltrado inflamatorio linfocítico y de células plasmáticas en la lámina propia y superficie epitelial del estómago (Boluda 2015).

##### **2.2.2.3.2.- Gastritis eosinofílica**

La característica histológica fundamental es una marcada infiltración de la mucosa y submucosa por eosinófilos con edema y congestión (Valdivia Roldan 2011).

### 2.2.2.3.3.- Gastritis granulomatosa

Las características microscópicas incluyen la inflamación crónica que afecta todo el grosor de la pared intestinal (transmural) con la presencia de granulomas no caseificantes y trayectos fistulosos. Esta puede ser asociada con la enfermedad de Crohn (Arce 2007).

### 2.2.2.3.4.- Gastritis colagenosa

Se caracteriza por la presencia de pliegues gástricos hipertróficos apreciando una escasa movilidad de la pared gástrica. Microscópicamente se caracteriza por la presencia de una banda gruesa de tejido colagenoso ubicado por debajo de la superficie epitelial de la mucosa gástrica con un infiltrado celular inflamatorio y capilares dilatados atrapados en la lámina propia (Salinas *et al.*, 2016).

### 2.2.2.3.5. Gastritis por Anti-inflamatorios no esteroideos (AINES):

Estos inhiben la actividad de las ciclooxygenasas que a su vez inactiva la actividad de las prostaglandinas encargadas de proteger la pared estomacal por la formación de mucosa (Fig. 5).

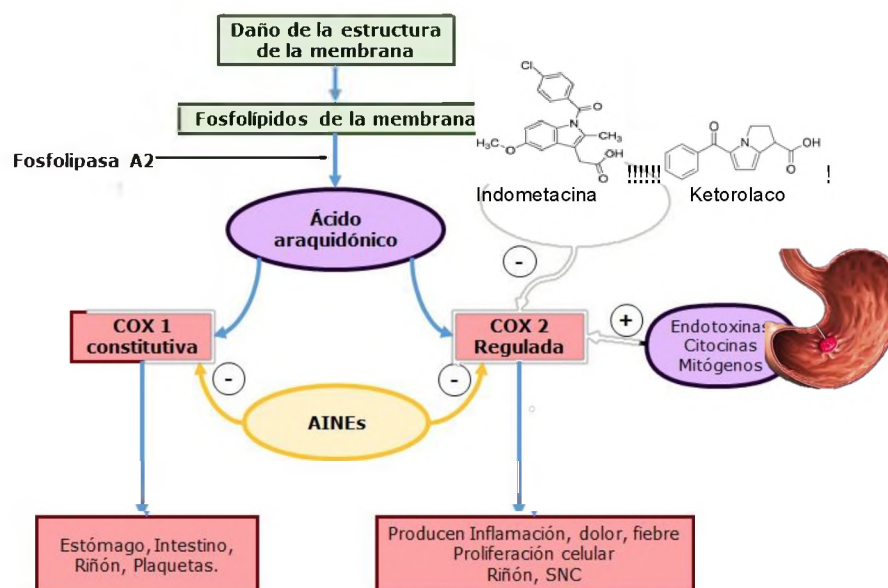


Figura 5.-Esquema sobre la actividad de los AINES.

(Modificado de Fernández Travieso 2014).

### 2.2.3.- Diagnostico.

Para el diagnóstico de gastritis no existe una buena correlación entre las manifestaciones clínicas, los hallazgos endoscópicos e histológicos, ya que es posible encontrar en ocasiones severas gastritis en individuos asintomáticos o mucosas gástricas normales en pacientes con síntomas acentuados atribuibles a gastritis (Fernández Travieso, 2014).

- **Manifestaciones clínicas:** las gastritis pueden ser totalmente asintomáticas y en caso de existir síntomas estos no son propios, sino atribuibles a ella, como es la presencia de ardor, dolor o molestias postprandiales en epigastrio, llenura precoz, vinagreras (agruras), náusea, distensión abdominal, síntomas que también pueden estar presentes en dispepsia no ulcerosa, úlceras o neoplasias gástricas o duodenales y aún en el colon irritable. Además pueden manifestarse con hemorragias crónicas o agudas que podrían llegar a ser masivas con vómitos con sangre (hematemesis) y la expulsión de heces negras y malolientes en ocasiones acompañadas con sangre (melena) (Sagaró, 2009).
- **Hallazgos endoscópicos:** los signos endoscópicos asociados a esta entidad incluyen edema (hinchazón), eritema (enrojecimiento), mucosa hemorrágica, punteados hemorrágicos, friabilidad, exudados, erosiones, nodularidad, pliegues hiperplásicos, presencia de signos de atrofia de la mucosa dada por visualización de vasos submucosos con aplanamiento o pérdida de los pliegues acompañados o no de placas blanquecinas que corresponden a áreas de metaplasma intestinal (Ríos et al., 2017).
- **Hallazgos histológicos:** no se debe abusar del diagnóstico de gastritis, por lo que se requiere realizar la biopsia para confirmación histológica, establecer la presencia o ausencia de *H. pylori* o de otras formas de gastritis específicas (Bejarano 2011).

- **Exámenes de laboratorio:** Las pruebas de laboratorio pueden usarse para determinar algunas causas de gastritis, como en el caso del *H. pylori* a través de métodos invasivos como la endoscopia y biopsias para el estudio histológico, realizar la técnica de la ureasa rápida, el cultivo y o el empleo de métodos no invasivos como la serológica para IgG, la detección de antígeno en las deposición, y la prueba del aliento del C13 o C14 espirado con sensibilidades / especificidades de o más de 90/90% a excepción de la serológica 80/90% y el cultivo 50/100% (Tabla 4) (Valdivia Roldan 2011).

**Tabla 4.-** Pruebas de detección para *H. pylori*.(Valdivia Roldan 2011)

Prueba	Sensib./especific.%	tipo	Características
Ureasa rápida	90/90	Invasivo	Barato y rápido.
Histología	90/90	Invasivo	Cara, lenta y específica.
Cultivo	50/100	Invasivo	Difícil y útil en resistencia.
Serología Ig G	80/80	No invasivo	No mide infección actual.
Prueba de aliento	90/90	No invasivo	Para control erradicación.
Antígeno deposición	90/90	No invasivo	Para control erradicación.

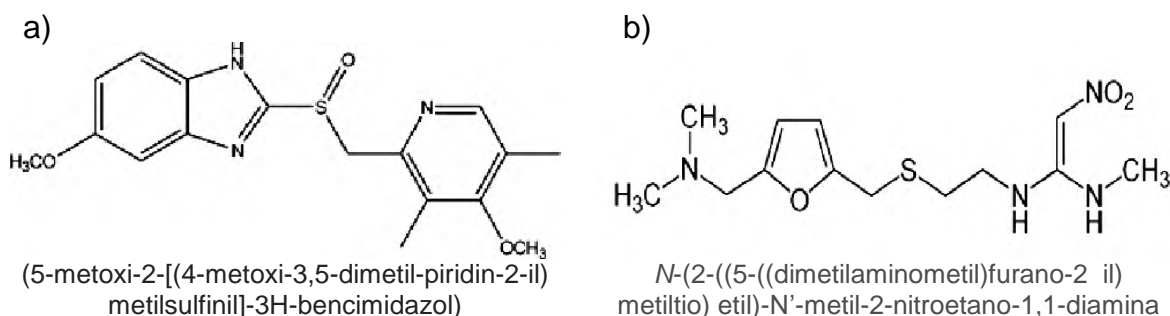
## 2.2.4.- Tratamiento

### 2.2.4.1.- General.

Se le indica al paciente llevar una dieta libre de alimentos irritantes de igual forma se le indican medidas terapéuticas que alivien los síntomas como sustancias activas que contrarresten la agresión de la barrera gástrica ya sea con antiácidos orales, cito-protectores de la mucosa gástrica (sucralfato, bismuto, misoprostol), antagonistas de receptores Histamina 2 (H2), inhibidores de la bomba de protones, a los que se puede añadir gastrocinéticos (metoclopramida, domperidona, cisaprida, mosaprida, cinitaprida) si existe evidencia de trastorno de motilidad gastroesofágica o gastroduodenal (Stephen *et. al.*, 2008).

### 2.2.4.2.- Especifico.

Los síntomas relacionados con la ingesta medicamentos (AINE's) se puede mejorar con el retiro, reducción o la administración de la medicación con alimentos, en aquellos pacientes en quienes persisten los síntomas se les debe someter a endoscopia diagnostica y estudio histológico para confirmar la etiología gástrica en especial si es causada por AINE's y en base a ello ser tratados sintomáticamente con el uso de sucralfato (1 gr 4 veces por día), antes de los alimentos y al acostarse, misoprostol un análogo de prostaglandina (200 mg 4 veces por día) y/o antagonistas de receptores H2 ranitidina (Fig. 6)(150 mg 2 veces por día) o inhibidores de la bomba de protones en una dosis diaria: omeprazol 20 mg, rabeprazol 20 mg, pantoprazol 40 mg(Fig. 6) (Fernández Travieso, 2014).



**Figura 6.-** Formulación del Omeprazol (a) y la Ranitidina (b) principales medicamentos en el tratamiento de la gastritis.

- **Gastritis alcohólica:** se prescriben antagonistas de receptores H2 utilizados desde 1976, su mecanismo de acción consiste en inhibir la secreción acida al bloquear los receptores H2 histamínicos, este grupo incluye cimetidina, ranitidina, famotidina, nizatidina y ebrotidina, se ha demostrado seguro y eficaz en la cicatrización de lesiones ulcerosas.
- **Gastritis por Estrés:** existe la profilaxis farmacológica para su prevención, con el uso endovenoso de antagonistas de receptores H2 o inhibidores de

la bomba de protones que tienen eficacia en inhibir la secreción gástrica mediante el bloqueo de la HK-ATPasa o la bomba de protones. Son también bases débiles, liposolubles que se absorben y llegan a la célula parietal. Son fármacos con pocas reacciones adversas, presentan habitualmente síntomas gastrointestinales y erupciones cutáneas que son normalmente transitorias y de intensidad moderada. Estos fármacos son inhibidores del sistema P450 al igual que los antihistamínicos H2. También es utilizado el sucralfato por vía oral, evidenciándose una franca reducción de la incidencia de sangrado digestivo hasta de un 50%. (Fernández-Travieso, 2014).

- **Gastritis por hipertensión portal:** está indicado el uso de propanolol o nadolol que reducen la incidencia de sangrado agudo recurrente por reducción de la hipertensión portal. En pacientes en quienes falla la terapia con propanolol se puede tener éxito usando procedimientos de descompresión portal (Fernández-Travieso, 2014).
- **Gastritis por *H. pylori*:** el tratamiento está dirigido a su erradicación, promoviendo la curación con disminución notoria en la recurrencia (Fernández-Travieso, 2014).
  - Omeprazol 40 mg diarios + claritromicina 500 mg
  - Omeprazol 40 mg diarios + claritromicina 500 mg + amoxicilina 1 g
  - Lansoprazol 30 mg + claritromicina 500 mg + amoxicilina 1 g
  - Lansoprazol 30 mg + amoxicilina 1 g
  - Esomeprazol 40 mg + claritromicina 500 mg + amoxicilina 1 g
  - Ranitidina citrato de bismuto 400 mg + claritromicina 500 mg, luego Ranitidina citrato de bismuto 400 mg.
  - Ranitidina citrato de bismuto + claritromicina 500 mg, luego Ranitidina citrato de bismuto 400 mg.
  - Subsalicilato de bismuto 525 mg + metronidazol 250 mg + Tetraciclina 500 mg + antagonistas H2.

La mayoría de los tratamientos mencionados anteriormente actúan en conjunto y en ocasiones no contrarrestan el padecimiento, por esta razón se recurre a lo natural, además de ser de fácil adquisición no trae reacciones adversas al organismo.

### **2.3.- Uso del genero *Sambucus* en úlceras gástricas y procesos inflamatorios.**

Se han estudiado remedios populares usados por los turcos que se afirmaban eficaces contra el dolor de estómago por su potencial anti-ulceroso mediante el uso de tisanas (té) realizadas con hojas (Yesilada *et al.*, 1993). También se estudió el efecto de los extractos acuosos y de metanol de hojas de *Sambucus ebulus* en el modelo de úlceras gástricas inducidas en rata por inmovilización e inmersión en agua (Método de ulceración por estrés). El extracto acuoso demostró una actividad anti-ulcerogénica dependiente de la dosis, dando como resultado inhibiciones de 42.3 a 71.3%, mientras que el extracto de metanol se encontró inactivo (Yesilada *et al.*, 1997).

Estudios realizados en Perú observaron que adicionando *Sambucus peruviana* en un 10% al yogurt natural este contaba con más actividad gastroprotectora ya que este posee propiedades laxantes, analgésicas, antioxidantes, diuréticas, antipiréticas y antisépticas. Es calmante, útil en el tratamiento de insomnios, migrañas, dolores de cabeza e inflamaciones dolorosas, siendo un plus en la formulación de yogurt desde un punto de vista nutricional inicial, favorece la digestión y protección al estómago aumentando y fortaleciendo su actividad gastroprotectora evitando la formación de úlceras y su fácil digestión por la elevada concentración de enzimas (Paucar, 2014).

Las hojas de *Sambucus ebulus*, son ampliamente utilizadas por los turcos en la medicina popular especialmente contra los trastornos inflamatorios. Las hojas frescas después de marchitarse sobre el fuego son aplicadas en forma de

infusiones o como cataplasmas de forma externa en el área dañada para curar quemaduras, edema, eczema, urticaria y abscesos. De esta forma recientemente fueron aislados dos iridoides (grupo de monoterpenos) que son sambulina A y sambulina B obtenidas de las hojas de *Sambucus ebulus*. Inhibiendo 52.82% y 72.88% respectivamente la producción de óxido nítrico, uno de los principales marcadores en procesos inflamatorios (Yesilada *et al.*, 2017).

En otros estudios se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto de metanol de rizoma de *Sambucus ebulus* probándolo en el modelo de edema de pata de rata obteniendo la inhibición de la inflamación en la fase temprana y fase tardía mostrando un 82.18% y 54.58% respectivamente debido a la concentración de taninos que presentaba el extracto (Ahmadiani *et al.*, 1998).

Por otra parte, aunque la información relacionada con la evaluación de extractos del género *Sambucus* contra úlceras gástricas inducidas en diferentes modelos en rata o ratón es escasa, en la literatura podemos encontrar que han evaluado plantas acumuladoras de monoterpenos (iridoides) como: aucubina y fenilpropanoides como verbascosido los cuales están presentes en extractos acuosos, acetato de etilo y metanol de *Castilleja tenuiflora* (Orobanchaceae), los cuales presentan un porcentaje de inhibición de úlceras causadas en rata de 81, 88 y 17% de inhibición (Sánchez-Ocampo *et al.*, 2013).

### 3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la actualidad el 80% de la población de los países en desarrollo recurre a la herbolaria tradicional para tratar sus necesidades primarias de salud. Además los fármacos utilizados para las enfermedades de hoy en día no se encuentran al alcance de todos los individuos o su ingesta suele ser muy agresiva al organismo debido a su dosis o a la falta de cultura de la medicación. Es por esto que algunas personas pueden desarrollar desórdenes gastrointestinales como por ejemplo daños a la mucosa del estómago, causando úlceras estomacales lo que comúnmente conocemos como gastritis. Esto nos ha llevado a buscar alternativas para tratar estos padecimientos basándonos en la medicina tradicional y utilizando a *Sambucus nigra* como una alternativa natural para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales utilizando infusiones, sin embargo, se desconoce si existe un efecto sinérgico dentro de la zona estomacal y de cómo ejercen el mecanismo de acción los componentes que lo integran.

#### 4.- JUSTIFICACIÓN.

*Sambucus nigra* es una planta usada en la medicina tradicional mexicana y en particular en la región de Papaloapan, para tratar diferentes padecimientos como afecciones respiratorias, trastornos digestivos, inflamación, herpes, como diurético, diaforético, entre otros. Esta especie acumula compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y taninos los cuales están asociados a diferentes actividades biológicas como son antiinflamatorias, antiulcerosas, antioxidantes, analgésicas y antivirales, 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 activos permitirá tener un acercamiento a su funcionamiento en la medicina tradicional con fundamentos biológicos. Siendo una de las nuevas alternativas en el tratamiento de estos padecimientos. En la región del Papaloapan es ampliamente conocido y usado en forma de tisanas para el alivio de dolores de estómago.

Por lo tanto, en este proyecto de investigación se plantea analizar el efecto antiulcerogénico y validar el uso tradicional de los extractos de *Sambucus nigra* y tener un primer acercamiento a los compuestos que poseen esta actividad.

## 5.- HIPÓTESIS.

Los extractos obtenidos de las hojas de *Sambucus nigra* presentarán actividad anti-ulcerosa en la inducción de úlceras gástricas en ratones CD-1.

## 6.- OBJETIVOS.

### Objetivo general:

- Evaluar la actividad anti-ulcerosa del extracto de hojas de *Sambucus nigra* e identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto activo.

### Objetivos específicos:

- Separar e identificar grupos de compuestos presentes en el extracto activo por TLC y CC.
- Evaluar la actividad anti-ulcerosa del extracto de hojas de *Sambucus nigra* en modelos de úlceras gástricas inducidas en ratón CD-1 con Etanol e Indometacina.
- Evaluar dosis respuesta del extracto activo de *Sambucus nigra*.
- Evaluar la toxicidad del extracto activo.
- Evaluar un posible mecanismo de acción vía óxido nítrico.

## 7.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

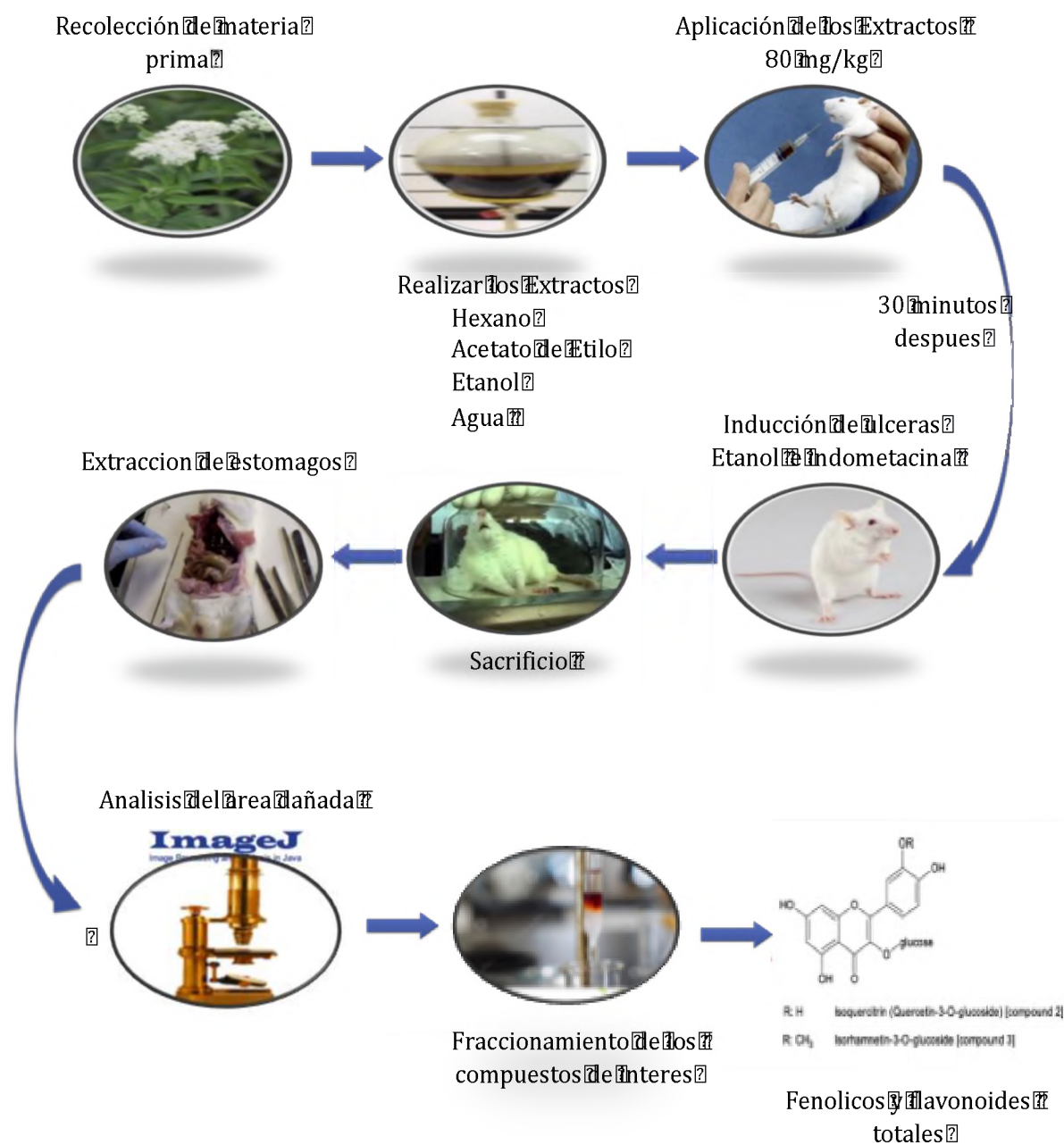


Figura 7.-Esquema experimental.

## 8.- METODOLOGÍA.

### 8.1.- Material Biológico vegetal.

Las hojas de *Sambucus nigra* (Fig. 8 A) se recolectaron en la región del Papaloapan en la Col. Obrera de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, en una ubicación de latitud 18° 01' N, longitud 96° 10', a 57 msnm (Fig. 8 B), que posteriormente se llevaron al laboratorio de la Universidad del Papaloapan.



**Figura 8.-**Recolección del material biológico A.) Hojas de Saúco, B) Localización de la colecta.

### 8.2.- Obtención de los extractos.

Las hojas de *Sambucus nigra* se dejaron secar a la sombra y temperatura ambiente, posteriormente estas fueron maceradas y pulverizadas. Se realizó una extracción con diferentes solventes por gradiente de polaridad (hexano (Ex. Hex.), acetato de etilo (Ex. Ac. Et.), metanol (Ex. Met.) y agua (Ex Aq.)) en relación 1/10; con un tiempo de extracción de 24 h. 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. Con tiempo de extracción de 24 h a agotamiento (Murillo y Méndez, 2003).

Los extractos obtenidos se depositaron en viales y se dejaron secar a temperatura ambiente en una campana de extracción.

### **8.3.- Análisis químico preliminar.**

Se realizó una identificación de los compuestos presentes en los extractos en donde se identificaron grupos de compuestos.

#### **8.3.1.- Cromatografía en Capa Fina (TLC).**

El análisis químico de los compuestos mayoritarios de los extractos se realizó por métodos cromatográficos como la cromatografía en capa fina o TLC para analizar cuales metabolitos están presentes en los extractos. Para este tipo de separaciones por ser plana, son aplicadas diferentes muestras generalmente a la fase estacionaria antes de ponerse en contacto con una fase móvil, que comienza a migrar a través de una placa en una dirección definida y constante llevada a cabo por capilaridad. El movimiento de la fase móvil a través de la fase estacionaria se conoce como la etapa de revelado. Después del desarrollo de la fase móvil se elimina por evaporación y la detección se realiza en la fase estacionaria. El registro de la respuesta del detector representada frente a la distancia de separación ( $R_f$ ). Las separaciones por cromatografía plana se producen en paralelo, esta situación tiene ventajas y desventajas: Las cromatografías planas son más flexibles pero no fácilmente automatizadas y la secuencia de pasos manuales de uso común hace que la validación del método más difícil ya que se basa en una metodología de prueba y error (Spangenberg *et. al.*, 2010).

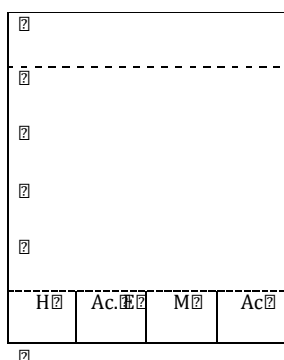
Para realizar este análisis los extractos de hexano, acetato de etilo, metanol y agua fueron disueltos en metanol 3 mg/mL posteriormente se tomó una alícuota de cada uno (1  $\mu$ L) y se colocó en la parte inferior de una placa para cromatografía, esta se introdujo en una cámara para cromatografía cargada previamente con el sistema de corrimiento (fase móvil) diclorometano: metanol, cloroformo:metanol, acetato de etilo: hexano, cloroformo:metanol: agua, cloroformo:metanol: acido

acético y metanol: agua a diferentes concentraciones en fase normal. Posteriormente se probó TLC en fase reversa para localizar con mayor facilidad los metabolitos de interés en el extracto activo (Acuoso) con diferentes sistemas de corrimiento elución en los cuales se ocuparon Acetonitrilo:Agua en diferente proporción V/V, de acuerdo a la polaridad de los metabolitos presentes en el extracto, que generalmente presentan alta polaridad, ya que se sospecha que se encuentran flavonoides, glucósidos y taninos. La fase móvil se dejó correr hasta 0.5 cm o hasta que llegara al final de la placa (Fig. 9) (Tabla 5).

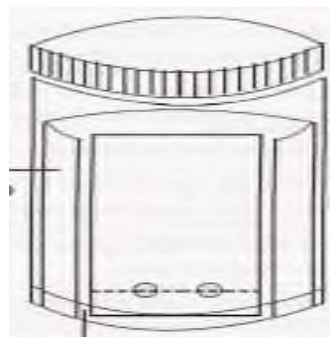
**Tabla 5.-**Sistemas de corrimiento y posibles metabolitos que se identifican (Modificado de Bladt *et al.*, 2009)

Solventes	Concentración	Metabolitos que se identifican
Cloroformo:Metanol:Ácido acético	(65:35:10)	Flavonoides, Alcaloides
Diclorometano:Metanol:Ácido acético	(60:30:10)	Alcaloides
Diclorometano:Metanol	(75:25,70:30,90:10)	Taninos
Acetato de etilo:Metanol:Agua	(100:13.5:10)	Flavonoides, Glicosidos
Cloroformo:Metanol:Agua	(65:35:10)	Glucósidos, Taninos

Placa para cromatografía



Cámara para cromatografía



Sistema de corrimiento: Diclorometano-Metanol,  
Acetato de Etilo- Hexano.

**Figura 9.-** Esquema de la realización de la cromatografía en capa fina (Arroniz García, 2018)

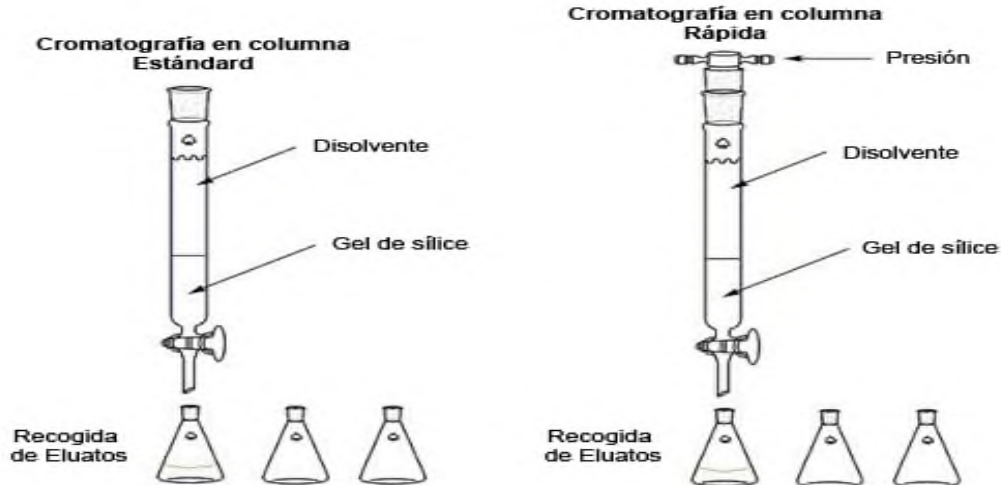
Posteriormente las placas fueron reveladas con 4-hidroxibenzaldehído y vainillina, y se llevaron a secar en una parrilla eléctrica por 3 minutos o hasta que apareciera la pigmentación (Tabla 6).

**Tabla 6.**-Identificación de los grupos de metabolitos de acuerdo al rango del espectro UV/vis utilizado (Modificado de Bladt *et. al.* 2009).

<b>Metabolitos</b>	<b>Coloración</b>	<b>Rango</b>
Flavonoides	Amarillos	254-336 nm
Glucósidos	Rojos Violetas Rosas	254-330 nm
Taninos	Cafés	254 nm
Alcaloides	Azul Verdes	254-336 nm

### 8.3- Cromatografía en Columna.

Es una técnica de purificación, puesto que permite aislar los compuestos de interés de una mezcla. La cromatografía en columna utiliza una columna de vidrio vertical que se llena con una fase estacionaria en la cual se ocupó gel de *Sílice 60 merk*. La muestra que se quiere separar se deposita en la parte superior de la columna. El resto de la columna se llena con el sistema de corrimiento (disolvente que constituye la fase móvil) que, por efecto de la gravedad, hace mover la muestra a través de la columna o se le puede aplicar presión para facilitar el proceso. Se establece un equilibrio entre el soluto adsorbido en la fase estacionaria y el sistema de corrimiento que fluye por la columna. Debido a que cada uno de los componentes de una mezcla establecerá interacciones diferentes con la fase estacionaria y la fase móvil, serán transportados a diferentes velocidades y se conseguirá su separación. Así, de manera similar a otros tipos de cromatografía, las diferencias en las velocidades de desplazamiento a través del medio sólido se corresponden con diferencias en los tiempos de elución por la parte inferior de la columna para cada uno de los componentes de la muestra original, que se recogerán en fracciones diferentes (Fig. 10).



**Figura 10.-** Esquema de la realización de cromatografía en columna.

#### **8.4.- Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales.**

##### **8.4.1. - Cuantificación de compuestos fenólicos totales**

La extracción de fenoles se llevó a cabo utilizando la metodología de (Silva *et al.*, 2012) con algunas modificaciones. Se utilizaron extractos de *Sambucus nigra* L, los cuales fueron suspendidos en 200 mL de agua destilada y colocados en un incubador por 30 min y 40 °C en oscuridad, posteriormente se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C. Por último el sobrenadante se liofilizó hasta peso constante.

Para la cuantificación de fenoles, fueron adicionados 2.5 µL de extracto (15 mg/mL) a 150 µL de agua desionizada más 10 µL de reactivo de Folin- Ciocalteu (Sigma Aldrich), la muestra se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubó a 37 °C por 15 min, después se añadió 30 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% (p/v) y se colocó en baño frío de hielo por 15 min. Como referencia para la curva de calibración se utilizó ácido gálico en concentraciones de 0 a 1000 µg/mL (Anexo 1). Las lecturas se llevaron a cabo a 750 nm y los resultados se

expresaron en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/g ES) (Chaovanalikit y Wrolstad, 2004).

#### **8.4.2.-Cuantificación de flavonoides totales.**



Se realizó la cuantificación de los flavonoides totales utilizando la técnica descrita por Enayat y Banecjee (2009).

De acuerdo a Enayat *et al.* 2009 para la cuantificación de flavonoides se tomaron 10.5 µL de extracto a una concentración de 15 mg/mL, al cual se adicionó 10.5 µL de NaNO<sub>2</sub> al 5%, posteriormente a esta muestra se añadieron 10.5 µL de AlCl<sub>3</sub> al 10% y se aforó a un volumen de 350 µL con agua desionizada para leer la absorbancia a 490 nm. Se utilizó quercetina a una concentración de 0 a 100 µg/mL para realizar la curva de calibración (Anexo 2). Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de quercetina por gramo de extracto seco (mg EQ/g PS).

#### **8.5.- Material Biológico (modelo murino)**

Para simular las úlceras gástricas humanas se utilizaron ratones CD-1 (Fig. 11) hembras y machos los cuales fueron proporcionados por el Bioterio de la Universidad del Papaloapan, esta especie es la que presenta características fisiológicas, secreción gástrica, similar a la de los seres humanos. Es de hacer notar que de la misma forma que sucede en humanos, la formación de úlceras está determinada por factores genéticos.

Los animales se mantuvieron en ayunas durante 24 h antes de iniciar la experimentación, dejándoles únicamente con agua *ad libitum* con las siguientes características.

<b>Bioterio</b>	
<b>UNPA</b>	
	
	
Peso promedio	30 – 35 g
Edad	5 – 6 semanas
Sexo	Hembras y Machos
Lugar de nacimiento	Bioterio de la Universidad del Papaloapan
Temperatura	25 27 °C
Luz	Fotoperiodo de Luz/Oscuridad 12-12 h

**Figura 11.-** Especificaciones en las que se encontraban los ratones CD-1 (*Mus musculus*).

### 8.6.- Inducción de úlceras gástricas mediante los modelos de Etanol absoluto e Indometacina

Las úlceras gástricas en los ratones se indujeron administrando etanol absoluto e indometacina, posteriormente se administraron los diferentes extractos de *Sambucus nigra* y se evaluó el efecto de protección posterior al sacrificio de los animales, con el propósito de cuantificar el daño presentado en la región estomacal, para esto los estómagos se diseccionaron y después se abrieron por la curvatura mayor, enseguida se retiró la materia residual, y se lavaron con agua destilada, el daño se evaluó por análisis de imagen con ayuda del software ImageJ.

#### 8.6.1.- Evaluación de la actividad anti-ulcerogénica de extractos de *Sambucus nigra* en úlceras gástricas inducidas por etanol absoluto en ratones CD-1.

Para realizar este experimento los ratones se mantuvieron en fotoperiodo de luz 12/12 h, con un peso aproximado de 30 gr, sometidos en ayuno 24 h antes de iniciar el experimento solo con agua *ad libitum*. Para realizar la experimentación se realizaron 6 lotes de 5 ratones separados en jaulas de acrílico transparente, con

esto se buscó tener un grupo control (+) al cual solo se le administro el fármaco de referencia famotidina (agente protector) a dosis de 20 mg/kg, un grupo control (-) tratado solo con etanol absoluto (agente ulcerante) a dosis de 1 mL/100 gr, y 4 grupos restantes que se les trato con el agente ulcerante más los extractos (hexano, acetato de etilo, metanol y agua a dosis de 80 mg/kg). Describiendo brevemente la técnica, primero se administró el extracto de forma intragástrica para que formen una protección previa (Robert *et. al.*, 1968). Posteriormente se administro el alcohol absoluto, ya que este agente genera un estrés oxidativo (OS) con la consiguiente liberación de radicales libres (FR), debido a una mala regulación en la bomba H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, lo cual a su vez provoca un daño por OS en la mucosa, y finalmente a la ruptura de la mucosa; se ha visto que entre un 10 a 40% de los estómagos de ratas y ratones, se cubren erosiones hemorrágicas y úlceras al ser examinados de 1 a 2 horas después de su administración. Después de la administración del etanol, se les dejo un reposo de 4 h, pasado este tiempo fueron sacrificados en una camara de cloroformo, posteriormente se diseccionaron los estómagos, estos se abrieron por la curvatura mayor y lavados con agua para retirar el residuo excedente que contenían, de forma seguida se secaron con gasas y extendidos sobre una superficie plana para analizar el área dañada, se fotografiaron sobre un fondo blanco (Altura de 20 cm) para ser sometidos a un análisis de imagen con el software ImageJ analizando de manera más objetiva el área dañada (Fig. 12).



**Figura 12.-** Disección y apertura del estómago.

### **8.6.2.- Evaluación de la actividad anti-ulcerogénica de extractos de *Sambucus nigra* en úlceras gástricas inducidas por Indometacina en ratones CD-1.**

Para este experimento se utilizó la técnica que propuso (Oyagi *et al.*, 2010) para inducir las lesiones hemorrágicas gástricas mediante administración intragástrica de Indometacina a dosis de 20 mg/kg. El extracto activo disuelto en CMC (solución de carboximetilcelulosa) al 0.5% disuelta en agua destilada el cual se administró una hora antes de la aplicación de la Indometacina en dosis orales con la ayuda de una cánula a diferentes concentraciones (10, 30 y 50.53 mg/kg). Doce horas después de la administración de Indometacina, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y seguidamente se extrajeron los estómagos, estos se abrieron a lo largo de la curvatura mayor. Las lesiones hemorrágicas se midieron utilizando el software de análisis de imagen ImageJ.

### **8.7.- Análisis de área dañada.**

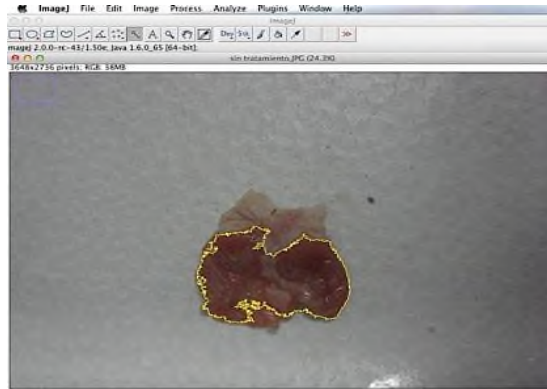
Después de la extracción de los estómagos se extendieron sobre una superficie plana, fueron fotografiados sobre un fondo blanco con una cámara Sony Cyber-Shot a una altura estándar, posteriormente se calculó el área dañada de forma digital mediante el software ImageJ (Fig. 13), calculando el índice de ulceración bajo la siguiente fórmula:

Formula 1.- Índice de Ulceración (IU):

$$IU = \frac{\text{Area Ulcerada (AU)}}{\text{Area Total (AT)}}$$

Y posteriormente se calculó el porcentaje de protección (% Protección):

$$\text{Formula 2.- \% Protección} = \left( \frac{(\text{IU Control}) - (\text{IU Pre-tratamiento})}{\text{IU Control}} \right) * 100$$



**Figura 13.-** Análisis del área dañada por el software ImageJ.

### **8.8.- Análisis dosis - respuesta del extracto activo.**

En este experimento evaluó a que concentración presentaba mayor eficacia el extracto activo, para esto se realizaron 5 lotes de 5 ratones, teniendo un control positivo, un control negativo y los siguientes grupos para el extracto activo a diferentes concentraciones ( 20, 40 y 80 mg/kg), el grupo control negativo (etanol absoluto) y el grupo control positivo (famotidina). Con esto se buscó determinar una  $DE_{50}$  y se verifico si esta dosis presentaba una actividad anti-ulcerogénica favorable.

### **8.9.- Toxicidad.**

Con este ensayo se buscó determinar la toxicidad que presenta el extracto activo a concentraciones específicas ya que *Sambucus nigra* contiene una toxina llamada *nigrina* encontrada principalmente en las hojas, esta producen RIP's (Proteínas Inactivadoras de Ribosomas) las cuales son toxinas de origen vegetal en su mayoría y en algunos casos de origen bacteriano, que provocan la inhibición irreversible de la biosíntesis de proteínas llevada a cabo por ribosomas de mamíferos, hongos, algunas plantas y bacterias (Girbes, 2004). Para esta prueba se organizaron lotes de 5 ratones a los cuales se les administró el extracto activo a diferentes dosis monitoreando los síntomas presentados en cada ejemplar en las horas siguientes a la administración del extracto.

### **8.10.- Efecto sinérgico vía óxido nítrico.**

La protección de úlceras se llevó a cabo con dosis no efectivas del extracto activo (5 mg/kg), combinando con un proveedor de óxido nítrico (Dinitrato de Isosorbida) a dosis no efectiva de 2.5 mg/kg, con esto se observó si presentaron efecto sinérgico cuando fueron combinados y aplicados de forma conjunta, ya que individualmente no presentaron ninguna actividad antiulcerogénica.

### **8.11.- Análisis estadístico de datos.**

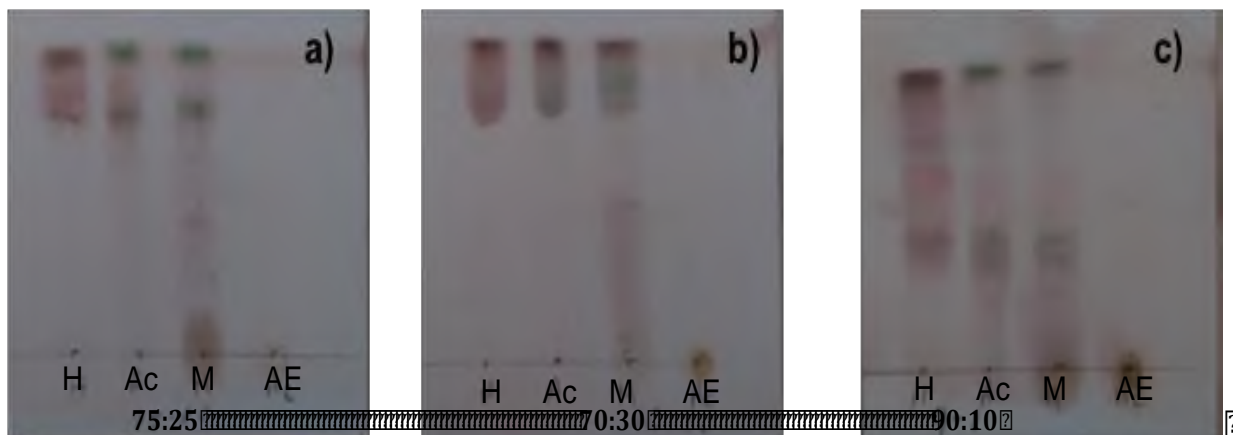
El análisis estadístico para la actividad antiulcerogénica fue realizado usando el programa estadístico Minitab 16. Los datos obtenidos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) de una vía con seguido de una post prueba de Dunnett con un nivel de significancia  $p < 0.05$ , los valores de  $IC_{50}$  fueron obtenidos por regresión lineal con un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.9678$ .

## 9.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

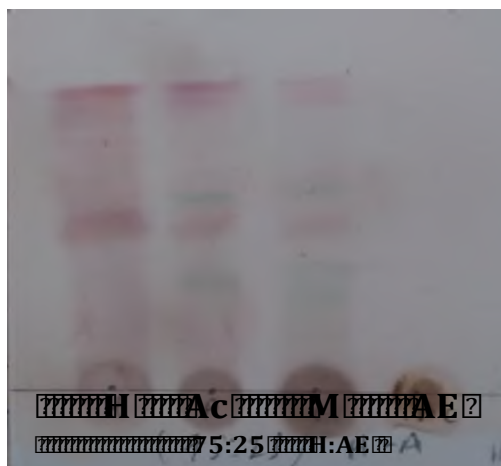
### 9.1.- Análisis químico preliminar.

#### 9.1.1.- Cromatografía en Capa Fina (TLC).

En la cromatografía en capa fina se realizaron varios ensayos utilizando placas de 5X5 cm para cromatografía en fase normal. Se probaron diferentes sistemas de corrimiento. Las primeras placas se corrieron con diclorometano:metanol (75/25, 70/30, 90/10, v/v) que posteriormente fueron reveladas con vainillina y 4-hidroxybenzaldehído (Fig. 14) en donde la coloración de las bandas indica la presencia de glucósidos (color guinda) y taninos (color café) (Tabla 6). En la otra prueba de corrimiento se utilizó un sistema hexano:acetato de etilo (75/25 v/v) (Fig. 15).



**Figura 14.-** Placas de cromatografía en el sistema de corrimiento Diclorometano:Metanol a diferentes concentraciones: a) 75/25, b) 70/30 y c) 90/10 (v/v) reveladas con 4-hidroxi-benzaldehído, la coloración mostrada en el bandeó refleja la presencia de glucósidos y taninos.

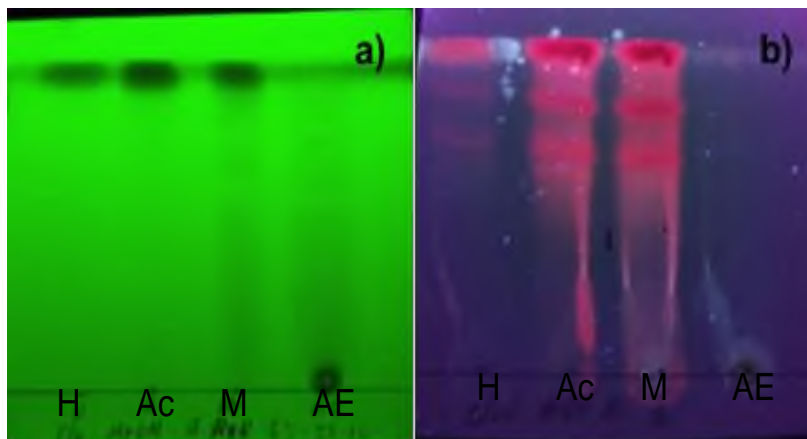


**Figura 15.-**Placa de cromatografía corrida en el sistema Hexano:Acetato de Etilo 75/25 (v/v) revelada con 4 hidroxibenzaldehído. Se presenta una coloración guinda indicando la presencia de glucósidos en el extracto de metanol y una ligera banda café en el extracto acuoso indicando la presencia de taninos .



**Figura 16.-**Placa de cromatografía corrida en el sistema Metanol:Acetato de Etilo:Agua (100/13/10) (v/v/v). En las placas corridas se observaron bandas de color marrón indicando la presencia de taninos y en la parte superior bandas verdes que se pueden considerar alcaloides revelado con 4-hidroxibenzaldehído.

Al correr los extractos de interés en un sistema cloroformo:metanol:agua (65/35/10 v/v/v) pueden apreciarse bandas de color guinda y de color café en la luz UV a diferente longitud de onda lo cual indica la presencia de glucósidos y taninos en fase normal respectivamente (Fig. 17). Después de hacer el corrimiento de las placas estas fueron reveladas con vainillina y 4-hidroxibenzaldehído donde fueron apreciados diferentes colores de acuerdo a los metabolitos presentes en el extracto, que por el color presentado se pudo hacer una inspección de los metabolitos de interés.



**Figura 17.**-Placa de cromatografía corrida en el sistema Cloroformo:Metanol:Agua (65:35:10) (v/v/v) en donde se observó la presencia de glucósidos y taninos reveladas con luz UV, a) 254 nm, b) 330 nm.

Con el revelado de las placas con vainillina y 4-Hidroxibenzaldehído se pudieron apreciar bandas con colores guindas, rosas y cafés, con esto se puede presumir la presencia de glucósidos y flavonoides, que debido a la presencia de estos compuestos, el extracto posiblemente puede estar presentando la actividad antiulcerante antes mencionada, que por su naturaleza polar poseen una gran

capacidad antioxidante, aunado a esto protegen la mucosa estomacal impidiendo que se genere daño por agente oxidantes (Yesilada *et al.*, 2014).

### 9.1.2.- Cromatografía en columna (CC).

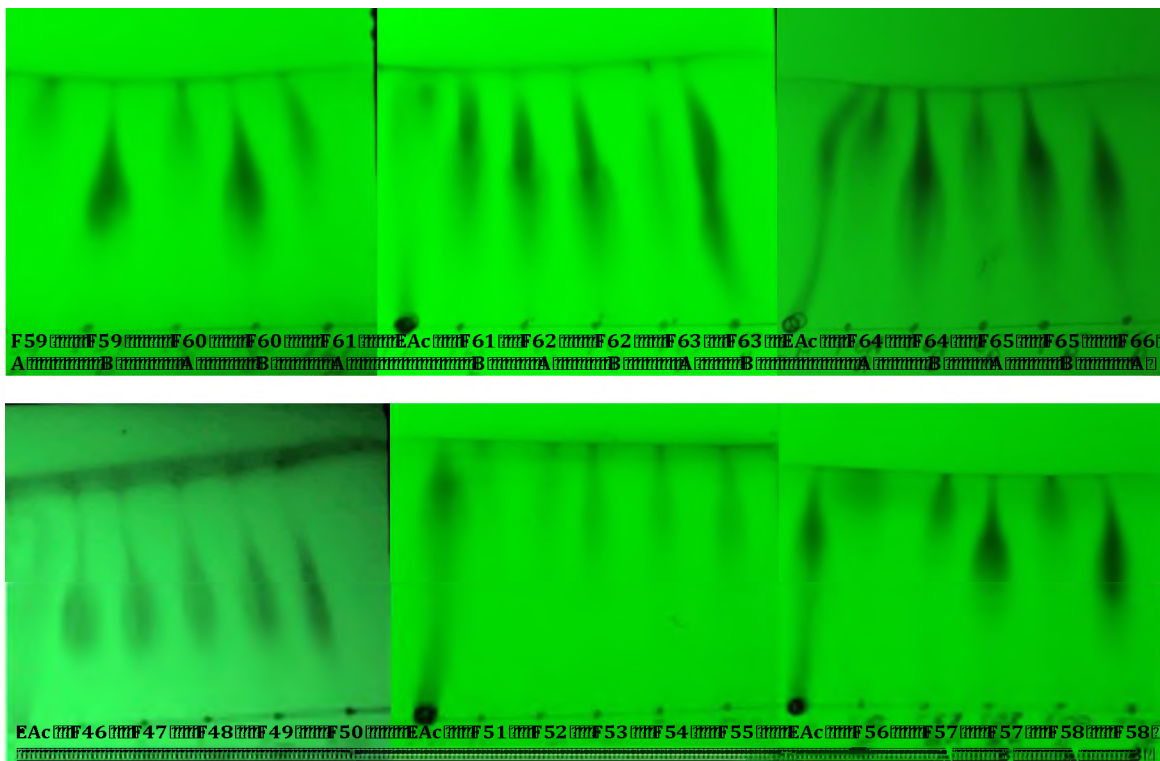
Con la TLC realizada de los extractos, se identificaron los grupos de compuestos como glucósidos y taninos en el extracto acuoso, que de acuerdo con su polaridad y el sistema de corrimiento utilizado (cloroformo:metanol:agua 65:35:10 V/V/V), se logró un mejor desplazamiento de los compuestos en el extracto activo. Esto dio la pauta para realizar un fraccionamiento por cromatografía en columna (Fig. 18), con el fin de analizar los compuestos presentes en el extracto activo, ya que la cromatografía en capa fina, nos indicó que el extracto activo (Extracto Acuoso) presentó los metabolitos con mayor relevancia para este estudio como los taninos glucósidos y flavonoides (rutina, quercetina) con actividad anti-ulcerosa probada (Yesilada *et al.*, 2014).



**Figura 18.-** Columna cromatográfica para el fraccionamiento del Extracto Activo.

Durante el fraccionamiento químico por cromatografía en columna las fracciones se recolectaron en viales de 8 mL hasta que finalizó el corrimiento. Se obtuvieron 86 fracciones en total y posteriormente cada fracción obtenida fue monitoreada por TLC y corrida por el mismo sistema cloroformo-metanol-agua(65:35:10 V/V/V)

posteriormente reveladas con luz UV (254 y 330 nm) y 4-hidroxi-benzaldehído (Fig. 19).



**Figura 19.-** Placas en TLC con el sistema Cloroformo:Metanol:Agua (65:35:10).  
Reveladas con luz UV.

### 9.1.3.- Cuantificación de fenoles totales y flavonoides.

En la cuantificación de fenoles totales y flavonoides, se observó que el de mayor acumulación para compuestos fenólicos fue el extracto acuoso, el cual fue 8.4 veces mayor que el metanólico, 5.8 veces más que Acetato de etilo y 12.3 veces más que hexano (Tabla 7). Referente a flavonoides, se observó que el extracto de Acetato de etilo y de hexano son similares en contenido con 67 y 64 mg Eq. de Quercetina/g de extracto, seguido del extracto metanólico el cual es 2.1 veces menos que el extracto de acetato de etilo y finalmente el acuoso con 1.1 veces menos que el Acetato etilo. En este último su contenido menor puede ser por la polaridad de los compuestos cuantificados, que son más afines por solventes de

mediana a baja polaridad como hexano y acetato de etilo. Además, podemos observar que el contenido de fenólicos totales se relaciona directamente con la mayor actividad anti-ulcerosa del extracto acuoso ya que esto puede ser debido a la acumulación de compuestos de alta polaridad como los ácidos fenólicos (gálico, caféico, clorogénico, cumárico, y ferúlico) principalmente, a los cuales presentan actividad antioxidante comprobada y pueden estar atrapando radicales libres (Bonaerense *et al.*, 2001) liberados por efecto del etanol el cual es el inductor de úlceras gástricas en nuestro modelo de estudio. Referente al contenido de flavonoides, la posible presencia de rutina y quercetina en los extractos, pueden estar ejerciendo un efecto positivo sobre la actividad evaluada (Yesilada *et al.*, 2014). Que de acuerdo con su polaridad, también pueden estar presentes tanto en el extracto acuoso como metanólico, de tal manera, que al administrar los tratamientos, estos pueden ejercer un efecto significativo al compararlos con el control (famotidina). Además, estos metabolitos muestran actividad antioxidante e inhiben el edema (inflamación) en un modelo de pata de ratón mostrando un gran potencial antiinflamatorio.

**Tabla 7.-**Resultados de la cuantificación de fenólicos totales y flavonoides en los extractos.

Extracto	Fenólicos	Flavonoides
	mg EAG/g de extracto <sup>2</sup>	µg EQ/g de extracto <sup>2</sup>
Hexano	16.22±2.40	64.26±0.64
Ac. Etilo	34.48±3.47	67.51±0.53
Metanol	23.79±1.22	31.58±0.82
Agua	200.34±0.21	59.89±0.49

Se puede observar que el contenido en los extractos probados el extracto acuoso contiene una mayor cantidad de fenólicos en el extracto acuoso se encuentra casi cuatro veces más que el contenido de flavonoides en el mismo extracto.

## 9.2 .- Análisis del daño presentado en los estómagos.

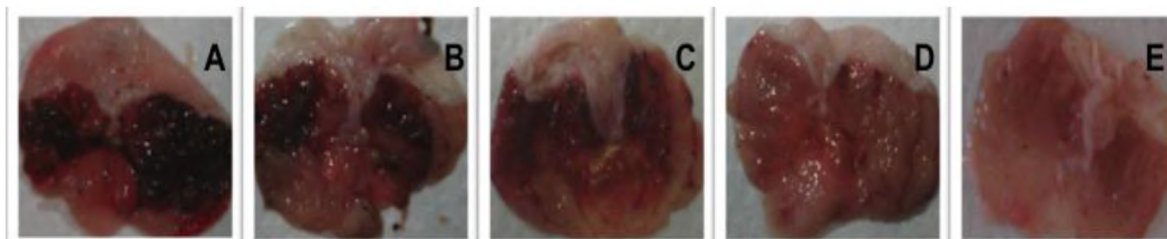
### 9.2.1.- Protección de los extractos ante el etanol.

Se observó, que todos los extractos presentaron actividad anti-ulcerante ya que obtuvieron mayor efectividad que el fármaco control (famotidina) sin embargo, el extracto acuoso fue el que obtuvo una mayor protección de las células estomacales, posiblemente está relacionada a la alta polaridad de los compuestos que arrastra el extracto acuoso. Observando que, los porcentajes de inhibición de la ulcera se presentaron en este tratamiento con un 60.75% siendo 1.7 veces más activo que el extracto de metanol con un 35.08% y 1.4 veces más eficiente que el extracto de acetato de etilo con 44.66%, por lo que presenta un efecto considerable en la protección estomacal inhibiendo la formación de las úlceras (Tabla 8, Figura 20). Esto, puede asociarse con el uso en la medicina tradicional que es la elaboración de té, que se utilizan para el alivio de diferentes padecimientos estomacales y tienen gran similitud con la formulación de este extracto. Cabe resaltar, que en estudios anteriores otros autores mencionan a otras especies del género *Sambucus* en los que se hace mención de *Sambucus mexicana* probando los extractos oralmente para aliviar el edema de pata de ratones albinos (Chajon-Flores, 1996) en el cual observaron una reducción en la inflamación. Por otro lado, se probaron extractos de *Sambucus ebulus* como un plus en la formulación del yogurt atribuyéndole propiedades laxantes y diuréticas (Yesilada *et al.*, 2017).

**Tabla 8.-** Efecto anti-ulceroso de los extractos de *Sambucus nigra* (Saúco) en el modelo de úlceras gástricas inducidas por etanol en ratón CD-1

Tratamiento	Dosis(mg/kg)	Índice de ulceración (IU)	% Protección
EtOH (-)		0.4668 ± 0.0343	
Ex. Hex.	80	0.2226 ± 0.0379**	48.99
Ex. Ac. Et.	80	0.1908 ± 0.0042**	44.66
Ex. Met	80	0.1623 ± 0.0433*	35.08
Ex. Aq	80	0.2760 ± 0.0341**	<b>60.73</b>
Famotidina (-)	20	0.1542 ± 0.0191 **	33.04

Los valores son la media ± el error estándar (n=5). ANOVA con una post prueba de Dunnett \*\*Estadísticamente significativo a  $p < 0.01$  en comparación con el control negativo (Etanol). EtOH=Etanol, Ex. Hex.= Extracto Hexano, Ex. Ac. Et. = Extracto Acetato de Etilo, Ex. Met.= Extracto Metanol, Ex. Aq. = Extracto acuoso.



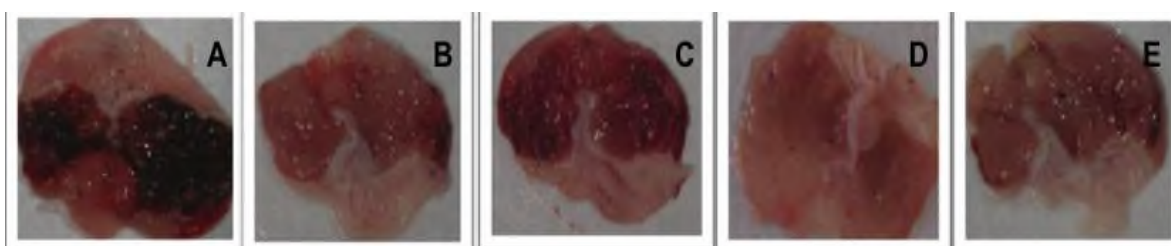
**Figura 20.-** Daño del Etanol en los diferentes tratamientos con los extractos. A: EtOH, B: EtOH/Ex.Hex., C: EtOH/Ex.Ac.Et., D: EtOH/Ex.Met., E: EtOH/Ex.Aq.

En la figura anterior se puede apreciar que la protección de los extractos fue consistente en porcentaje de inhibición de ulceración, aunque presentó mejor actividad el extracto acuoso (1.4 veces más en promedio), esto puede deberse, a la alta polaridad de los compuestos activos presentes en el extracto, como los compuestos fenólicos, flavonoides y glucósidos. En estudios anteriores, se ha

comparado la famotidina como fármaco anti-ulceroso de referencia inhibiendo solo el 32.8%. (Sánchez-Ocampo *et al.*, 2013).

### 9.1.2.- Análisis dosis-respuesta

Posteriormente se evaluó la dosis respuesta del extracto acuoso (Extracto activo). Para evaluar en qué concentración presenta una mejor actividad se hicieron concentraciones de 20, 40, y 80 mg/kg frente al mismo agente ulcerante Etanol absoluto, comparando con la famotidina que es nuestro fármaco de referencia a una dosis de 20 mg/ kg (Fig. 21).



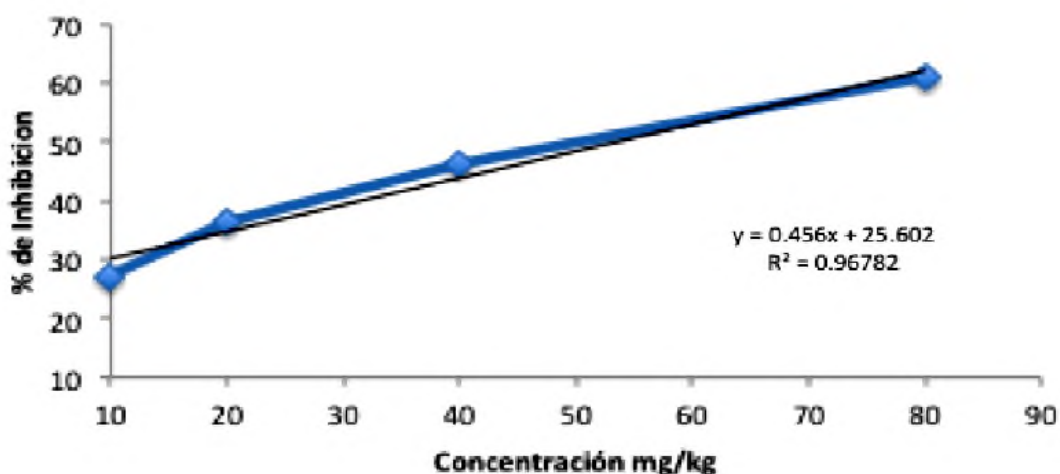
**Figura 21.-**Efecto del extracto acuoso a diferentes dosis contra ulcers gástricas. Donde A: Control negativo (Etanol absoluto), Extracto acuoso (B: 20 mg/kg, C: 40 mg/kg, D: 80 mg/kg), E: Famotidina

Observando que el porcentaje de protección del extracto fue 1.76 veces mayor que la famotidina con 59.82 y 33.85% de inhibición de ulceración respectivamente, y con base a los resultados obtenidos, se procedió a realizar el cálculo de la dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) la cual fue igual a 53.50 mg/kg (Fig. 22). Debido al manejo de las diferentes dosis y presencia de efectos o síntomas no deseados del extracto acuoso a dosis de 80 mg/kg se evaluó también la toxicidad a dosis de 10, 20, 40 y 80 mg/kg (Tabla 9).

**Tabla 9.-** Análisis dosis-dependiente a diferentes concentraciones del extracto activo que mostró toxicidad.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Índice de ulceración (IU)	% Protección
EtOH (-)		0.4668 ± 0.0398	
Ex. Ac.	20	0.1270 ± 0.0170 *** <sup>?</sup>	27.95
Ex. Ac.	40	0.1693 ± 0.0220 *** <sup>?</sup>	37.26
Ex. Ac.	80	0.2718 ± 0.0357 *** <sup>?</sup>	60.73
Famotidina (+)	20	0.1538 ± 0.0191 *** <sup>?</sup>	33.85

Los valores son la media ± el error estándar (n=5). ANOVA con una post prueba de Dunnett \*\*\*Estadísticamente significativo a  $p < 0.001$  en comparación con el control negativo (Etanol). EtOH=Etanol, Ex. Ac.20, 40, y 80 mg/kg y Famotidina (+) = control positivo.



**Figura 22.-**Evaluación de Dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>=53.50 mg/kg).

## 9.2.- Toxicidad.

Los resultados de inhibición de la ulceras alcanzaron las expectativas de protección que se tenían contempladas sobre el extracto activo (Acuoso), sin embargo se presentó efecto de toxicidad a concentraciones de 40 a 80 mg/kg cuando esta fue administrada de forma intragástrica, ya que los ejemplares presentaron el deceso 48 h después de su aplicación, esto nos llevo a revisar diversas literaturas y se encontró que *Sambucus nigra* contiene una colección de

proteínas inactivadoras de ribosomas, en particular *nigrinas* que parecen ser responsables de su toxicidad (Battelli *et al.*, 1997). Estas proteínas, Pertenecientes a las RIP's (Ribosome Inactivating Proteins) son toxinas de origen vegetal, estas se dividen en tipo RIP's de tipo 1 y de tipo 2, estas últimas poseen mayor toxicidad, entre este grupo entra la ricina, abrina, volkensina, viscumina y modeccina (Girbés *et al.*, 2004).

Las RIP's pueden atravesar las membranas celulares al reconocer y unirse a receptores de membrana plasmática y entrar en el citosol, la toxicidad de la ricina con dependencia de la vía de administración y considerada como arma de destrucción masiva en el ámbito celular. La mayor concentración de ricina se puede presentaren las hojas verdes de *Sambucus nigra*, siendo toxica a una concentración de 3 µg/kg de forma inyectada en cola de ratón provocando la muerte del animal en un plazo de 24 a 36 h, causando daños en las criptas del intestino y hemorragias (Juan, 2004). Esto nos llevó a realizar un experimento de toxicidad a concentraciones de 30, 53.5 y 80 mg/kg administrando por un lapso de 10 días. La prueba de toxicidad de *Sambucus nigra* se realizó con un lote de 10 ratones dividiéndolos en dos cajas de 5 ratones cada una para mantener un mejor control, probando las diferentes concentraciones por animal las cuales se administraron de forma intragástrica con la ayuda de una cánula (Fig. 23).



**Figura 23.-**Administración del extracto activo a diferentes concentraciones para monitorear la toxicidad.

Las dosis fueron administradas cada 24 h en un horario 11 a 12 h realizando el monitoreo del comportamiento de los animales presentes en cada caja, 4 h después de la administración de la dosis del extracto activo, por un lapso de 10 días, haciendo mención que se tomó como día uno el día después de la administración de la primera dosis aplicada (24 h después), los parámetros evaluados a continuación fueron concentrados y mostrados en el formato siguiente (Fig. 24, Tabla 10) para cada tabla.


- Somnolencia
- Mareo
- Diarrea
- Convulsiones
- Confusión
- Vomito
- Coloración de labios



**Figura 24** Monitoreo de ratones 4 h después de administrar la dosis del extracto activo para toxicidad.

**Tabla 10.-** Parámetros de toxicidad.

Dónde:

	Muerte de ejemplares
	Síntoma presentado

### 9.2.1.- Toxicidad a 30 mg/kg.

Para realizar esta prueba se seleccionó un lote con 10 ratones dividiéndolos en dos cajas para tener un mejor control a los cuales se les administro una dosis diaria de extracto con una concentración de 30 mg/kg, aplicando esta dosis cada

24 h en un horario de 11 a 12 h, 4 h posteriormente a la aplicación de la dosis se les monitoreo verificando si presentaban los parámetros anteriormente mencionados y se recolectaron en la siguiente la tabla (Tabla 11).

**Tabla 11.-** Monitoreo de Toxicidad a concentración de 30 mg/kg.

Toxicidad							
Días	Vomito	Mareo	Diarrea	Confusión	Somnolencia	Convulsión	Labios
1		✓		✓	✓		
2		✓			✓		
3					✓		
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

- 1º día: 4 h después de la aplicación de la muestra unos ratones presentaron destanteo ya que se pegaban a la pared de la caja en repetidas ocasiones, otros se quedaban dormidos sobre el aserrín y otros se tambaleaban al caminar.
- 2º día: se siguió el mismo procedimiento de administración de la muestra se monitoreo y se observó que los ratones solo presentaban dos comportamientos al quedarse dormidos y tambalearse cuando caminaban.
- 3º día: bajo el mismo procedimiento de aplicación y monitoreo se observó que los ratones presentaban sueño.
- 4º día: después de esta administración los ratones presentaron un comportamiento normal, presentando actividad cotidiana después de la administración de la dosis y manteniendo este comportamiento hasta finalizar el tratamiento de los 10 días en observación.

### 9.2.2.- Toxicidad a 40 mg/kg.

Dándole seguimiento al experimento de toxicidad se procedió a incrementar la concentración del extracto a 40 mg/kg siguiendo el mismo procedimiento en la separación y observación de los ratones, a esta concentración se presento la muerte de los ejemplares a partir del quinto día presentando somnolencia desde el primer día de la aplicación del extracto.

**Tabla 12.-** Monitoreo de Toxicidad a 40 mg/kg.

Toxicidad Caja 1							
Días	Vomito	Mareo	Diarrea	Confusión	Somnolencia	Convulsión	Labios
1					✓		
2				✓			
3				✓	✓		
4				✓			
5			✓		✓		
6				✓			
7				✓			
8							
9							
10							

Toxicidad Caja 2							
Días	Vomito	Mareo	Diarrea	Confusión	Somnolencia	Convulsión	Labios
1					✓		
2				✓	✓		
3				✓	✓		
4					✓		
5			✓	✓	✓		
6				✓			
7							
8							
9							
10							

- 1º día: a partir del primer día los animales presentaron somnolencia quedándose tirados en la caja durante un tiempo prolongado.

- 2º día: los animales dieron indicios de confusión tambaleándose por la caja y quedándose acorralados a la pared de la caja.
- 3º día: no se presentaron mejorías en el comportamiento de los ejemplares ya que presentaron las mismas características mencionadas anteriormente permaneciendo dormidos en un lapso prolongado.
- 4º día: Los animales presentaron diarrea y mostraron un comportamiento débil permaneciendo botados en el aserrín y con una respiración rápida.
- 5º día: se presentó la muerte de dos ejemplares, mientras que los restantes no presentaron mejorías.
- 6º día: se mostró la muerte de 1 ejemplar más, observando que el estado de los ratones sobrantes no mostraban mejoras.
- 7º día: se continuó con la muerte de más animales, con esto se decidió parar el experimento y sacrificar a los animales restantes para evitar errores en experimentos futuros.

### **9.2.3.- Toxicidad a 53.5 mg/kg (DE<sub>50</sub>).**

Al igual que en el experimento de toxicidad anterior se seleccionó un lote de 10 ratones dividiéndolos en dos cajas para tener un mejor control sobre ellos y mejor observación, a estos se les administro la misma dosis mencionada anteriormente con una concentración de 53.5 mg/kg (DE<sub>50</sub>) esta dosis se evaluó debido a que en el estudio de la dosis dependencia del extracto activo se presentó una reacción toxica a una concentración de 40 mg/kg sin embargo no se consideró toxica como tal, por esto se procedió a evaluar la toxicidad de la DE<sub>50</sub> administrada a cada ratón, esta fue suministrada en el mismo horario y monitoreada de la misma forma mencionada anteriormente los ratones presentaron el siguiente comportamiento (Tabla 13).

**Tabla 13.-** Monitoreo de Toxicidad a 53.5 mg/kg (DE<sub>50</sub>).

Toxicidad Caja 1							
Días	Vomito	Mareo	Diarrea	Confusión	Somnolencia	Convulsión	Labios
1					✓		
2				✓			
3			✓		✓		
4			✓	✓			
5			✓		✓		
6							
7							
8							
9							
10							
Toxicidad Caja 2							
Días	Vomito	Mareo	Diarrea	Confusión	Somnolencia	Convulsión	Labios
1			✓		✓		
2			✓		✓		
3				✓	✓		
4			✓		✓		
5			✓	✓			
6							
7							
8							
9							
10							

Caja 1:

- 1º día: los ratones presentaron somnolencia ya que estos se quedaban echados en el aserrín.
- 2º día: los ratones se comportaron de la manera antes mencionada solo que esta vez al caminar se encontraban entre si y a la vez se pegaban a las paredes de la caja.
- 3º día: los animales presentaron diarrea ya que al hacer presión en el la panza para administrar el extracto defecaron de forma semisólida, se apreció un comportamiento de tambaleo al caminar.

- 4º día: los ejemplares mostraron el mismo síntoma de diarrea al administrar el extracto mientras que mostraban un comportamiento de flojera, estaban todos echados en el aserrín sin ganas de pararse ya que no mostraron resistencia al ser atrapados para administrar el extracto.
- 5º día: se presentó la muerte de un animal mientras que ratones restantes siguieron presentando diarrea y somnolencia al estar echados.
- 6º día: se presentó la muerte de dos animales mientras que los animales restantes siguieron presentando los mismos síntomas.

Con esto se decidió parar el experimento ya que visualizo el resultado que se iba a tener, con la muerte de todos los ejemplares, los animales restantes fueron sacrificados ya que si se dejaban podían causar errores en experimentos futuros y a su vez observando sus órganos internos, no presentando ninguna alteración a simple vista.

#### Caja 2:

- 1º día: se presentó somnolencia en los animales y dos presentaron diarrea ya que al administrar el extracto se ejerció presión en el abdomen.
- 2º día: los animales presentaron la misma sintomatología mencionada anteriormente.
- 3º día: se presentó el deceso de un animal presentando sangrado por los oídos mientras que los demás animales presentaban confusión y somnolencia.
- 4º día: se observó que los animales mostraban somnolencia y diarrea.
- 5º día: se registró la muerte de dos animales, mientras que los animales restantes presentaban confusión y diarrea.

- 6º día: los animales siguieron presentando el mismo comportamiento, presentando los síntomas antes mencionados.

Con esto se decidió terminar con el experimento a esta dosis 53.5 mg/kg ya que se visualizó el desenlace de esta indagación, posteriormente los animales restantes fueron sacrificados ya que si se dejaban en resguardo en el Bioterio podrían interferir con experimentos futuros.

### 9.2.3.- Toxicidad a 80 mg/kg.

Para este experimento se seleccionó un lote de 7 ratones los cuales se mantuvieron en una caja y se les administro la dosis antes mencionada a una concentración de 80 mg/kg esta planeo ser administrada diariamente por un periodo de 10 días pero al 3º día dos ratones presentaron la muerte monitoreando después del primer día de la aplicación del extracto activo somnolencia, confusión y diarrea en el ejemplar, estos comportamientos se describen en la tabla siguiente

**Tabla 14.-** Monitoreo de Toxicidad a 80 mg/kg.

Toxicidad							
Días	Vomito	Mareo	Diarrea	Confusión	Somnolencia	Convulsión	Labios
1				✓	✓		
2					✓		
3			✓	✓	✓		
4			✓	✓	✓		
5				✓			
6							
7							
8							
9							
10							

- 1º día: después de la administración del extracto se administró la segunda dosis 4 h más tarde fueron monitoreados y se observó que los ratones presentaban somnolencia y otros presentaban confusión ya que se encontraban entre sí.

- 2º día: posteriormente de aplicar el extracto se monitorearon 4 h después y presentaban con somnolencia ya que hacían a caminar y se volvían a acurrucar y se quedaban dormidos.
- 3º día: al momento de aplicar el extracto y hacer presión en la panza los ratones defecaron presentando diarrea, posteriormente se monitorearon pasadas las cuatro horas y estos ejemplares presentaban el mismo parámetro de somnolencia al caminar poco, echarse y quedarse dormidos.
- 4º día: se encontraron dos ejemplares muertos de los que presentaban somnolencia los cuales se encontraban desangrando por los oídos, posteriormente se administraron los extractos y presentaron diarrea, a los ejemplares restantes se les siguió el mismo procedimiento de monitoreo, presentándose confusión en la mayoría de los animales restantes.
- 5º día: se encontraron dos ejemplares muertos a los cuales se les abrió y no mostraron ningún daño en el aparato digestivo. A los animales restantes se les administro la dosis correspondiente de extracto y se monitorearon en el mismo lapso de tiempo.

Después del día 5 se finalizó el experimento ya que se pronosticó que los animales restantes iban a morir, como se mencionó anteriormente los ejemplares fallecidos fueron abiertos y se examinó el tejido del sistema digestivo el cual no mostró daño aparente.

### **9.3.- Tratamiento con dosis de 30 mg/kg a 7 y 14 días.**

El resultado obtenido de las pruebas de toxicidad mostro que a una concentración de 30 mg/kg no se mostraba toxicidad alguna, esto dio la pauta a realizar experimento para simular el tratamiento que se administra cotidianamente con los fármacos convencionales de patente, para esto se seleccionaron 15 ratones a los


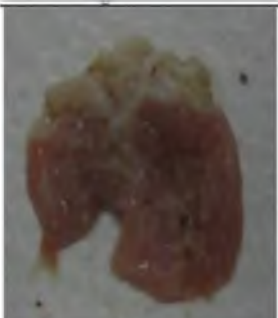

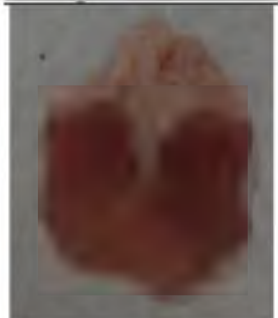
cuales se les indujo la ulceración por medio del etanol absoluto administrando una dosis de 200  $\mu$ L por animal. Estos animales se apartaron 5, de los cuales se quedaron con el etanol con el fin de que nos sirvan como control negativo a través del tiempo dejándolos solo con alimento y agua. Esto con la intención de compararlos al termino de los 7 y 14 días, observando cual fue la ventaja del tratamiento con la alimentación diaria. A los dos grupos restantes se administraron con el etanol, siguiendo el procedimiento media hora después se les administro el extracto a una dosis de 30 mg/kg durante 7 y 14 días respectivamente, el procedimiento se realizó inversamente a la vez anterior, ya que en esta ocasión primero se generó la ulcera y después se generó la protección, esto es con el fin de generar una simulación del tratamiento convencional que se genera con el Omeprazol, ranitidina y demás. Mientras que a los ratones que solo se mantuvieron con alimento (control negativo) se les suministro alimento necesario sin que les hiciera falta ningún día para evitar lesiones por ayuno prolongado.

Al termino de los 7 días se sacrificaron los ratones de la primera caja para evaluar el proceso de recuperación que se presentó en los estómagos por el extracto, a su vez durante el mismo experimento fueron sacrificados dos ratones de los que se encontraban solo con alimento para realizar una comparación de la reparación de la ulcera generada por el etanol y el tejido necrosado, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente para la extracción y análisis de los estómagos. Al termino de los 14 días, se realizó el análisis de las ulceras de los ratones de la caja faltante y se cuantificó el índice de ulceración (IU) y posteriormente el porcentaje de protección (porcentaje de inhibición de ulceración) haciendo una comparación entre los tratados con el extracto acuoso a 7 y 14 días con los controles (control negativo y positivo) (Tabla 13, Tabla 14).

Los animales que estuvieron sometidos al tratamiento, presentaron una recuperación favorable en los primeros 7 días, ya que al compararlos con el control negativo (solo agua y alimento durante 7 días después de inducir las ulceras con etanol absoluto) y control positivo (famotidina fármaco de referencia) en la primera semana fue 3.5 veces mejor que los tratados solo con agua y

alimento y 2.4 veces mejor que famotidina (79, 33 y 22.6% de protección respectivamente) (Tabla 15, 16). Cabe mencionar que, los animales no presentaron toxicidad ni aparecieron reacciones adversas secundarias en el ejemplar.

**Tabla 15.-** Estómagos sometidos al tratamiento con 30 mg/kg por 7 y 14 días.

Estomago control	Estomago con alimento	Estomago tratamiento 7 días	Estomago tratamiento 14 días
			
IU: 0.456	IU: 0.355	IU: 0.097	IU: 0.084
	% Protección: 22.59%	% Protección: 79.18%	% Protección: 82.06%

**Tabla 16.-** Tratamiento a los 7 y 14 días con 30 mg/kg.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Índice de ulceración (IU)	% Protección
Etanol	1 mL /100 gr	0.4544 ± 0.0343	
Alimento	Diario	0.3558 ± 0.0152*** <sup>¶</sup>	22.5950
7 días	30 mg diarios	0.0972 ± 0.0131*** <sup>¶</sup>	79.1805
14 días	30 mg diarios	0.0840 ± 0.0091*** <sup>¶</sup>	82.0634

Los valores son la media ± el error estándar (n=5). ANOVA con una post prueba de Dunnett\*\*\* Estadísticamente significativo a  $p < 0.001$  en comparación con el control negativo (Etanol), EtOH=Etanol, Alimento Diario (Alimento) y tratamiento más alimento a 7 y 14 días.

#### 9.4.-Mecanismo de acción vía óxido nítrico.

El resultado anteriormente expuesto dio la pauta para combinar una dosis no efectiva (5 mg/kg) del extracto activo más un vaso-relajador muscular como es Dinitrato de Isosorbida (DNI) que es un proveedor de óxido nítrico (ON) a dosis no efectivas de 2.5 mg/kg (Sanchez-Ocampo *et al.*, 2013). El experimento arrojó que

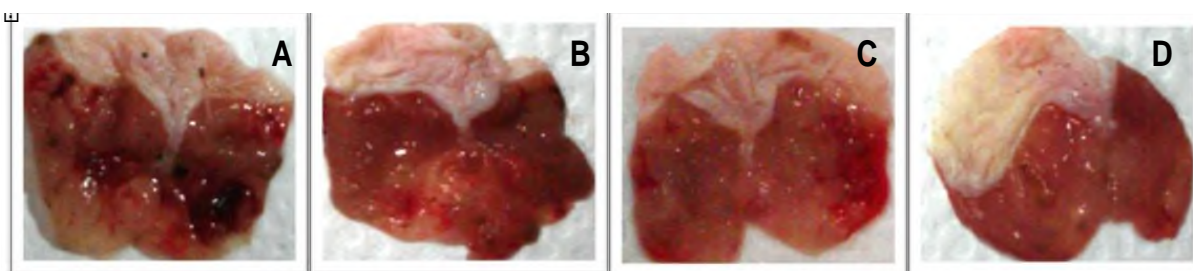
tanto el extracto como el DNI por si solos no presentaban ninguna actividad sin embargo cuando se combinaron, mostraron una inhibición de la ulcera de 69.04% (Tabla 17, Fig. 25) siendo 2 veces mayor protección que la que presenta la famotidina, esto nos lleva a sugerir que, el posible mecanismo de acción involucrado en la protección gástrica se relaciona con los metabolitos de alta polaridad presentes en *Sambucus nigra* y que está estrechamente relacionado con el ON, debido a la sinergia que se presenta con el extracto activo. Además, que en dosis no efectivas se potencializa la protección de las membranas impidiendo la formación de las especies reactivas de oxígeno (actividad anti-radical) ó antioxidante (Fernández-Travieso 2014).

**Tabla 17.-** Actividad del extracto activo en combinación con Dinitrato de Isosorbida.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Índice de ulceración (IU)	% Protección
EtOH	-----	0.4668 ± 0.0398	-----
Ex. Ac.	5	0.5088 ± 0.0336	NI
DNI	2.5	0.4557 ± 0.0186	NI
DNI+ Ex. Ac.	2.5 + 5	0.3135 ± 0.0084*** <sup>□</sup>	69.04

<sup>□</sup>

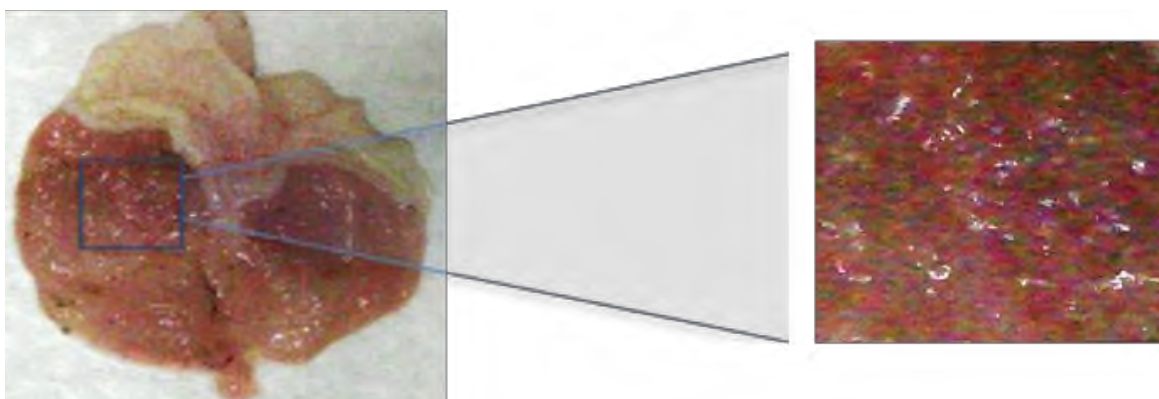
Los valores son la media ± el error estándar (n=5). ANOVA con una post prueba de Dunnett \*\*\* Estadísticamente significativo a  $p < 0.001$  en comparación con el control negativo (Etanol). Donde Ex. Ac. = Extracto acuoso, DNI= Dinitrato de Isosorbida, NI= No Inhibió.



**Figura 25.-** Protección del extracto activo en combinación con el DNI en ulceras provocadas por EtOH donde: A) EtOH, B) DNI+EtOH, C) Ex.Ac.+EtOH, D) DNI + Ex. Ac. + EtOH

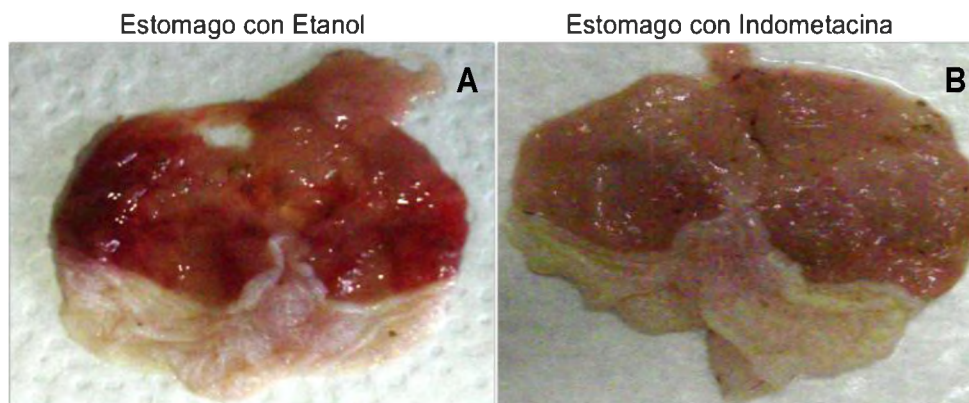
### 9.1.2- Inducción de úlceras con Indometacina.

Además del método de inducción de úlceras con etanol, también se realizó la prueba de inducción por Indometacina a 20 mg/kg validando el efecto antiulcerogénico del extracto, siendo este un AINE´s con una concentración que interrumpe la acción de las Cox 1 y Cox 2, ya que estas segregan las prostaglandinas encargadas de la producción de *mucus gástrico* en la pared estomacal, y la ausencia de esta mucosa gástrica causa pequeñas hemorragias y perforaciones (Fig. 26) (Valdivia Roldan, 2011). Por lo que se evaluó el extracto activo a una concentración de 30 mg/kg y 53.5 mg/kg( $DE_{50}$ ) mostrando interés por la dosis de 30 mg/kg ya que a esta concentración no presento toxicidad en los experimentos anteriores.



**Figura 26.-**Daño generado por la Indometacina sobre la superficie estomacal.

Se observó, que el área dañada causada por la Indometacina era pequeña en relación con el área total del estómago, que al compararlo con el daño que genera el etanol absoluto (Fig. 27), causó un daño inmediato necrosis en la mayoría del tejido estomacal por efecto del estrés oxidativo que genera. Sin embargo, el daño provocado por los AINES es lento, debido a que, primero se inhibe la actividad de las enzimas encargadas de la secreción de mucosa gástrica, y después provoca que los ácidos gástricos causen daños en la pared estomacal, ocasionando la aparición de pequeñas úlceras y perforaciones en forma de puntos rojos en la región estomacal.



**Figura 27.-**Estomago tratado con Etanol (A) y Estomago tratado con Indometacina (B).

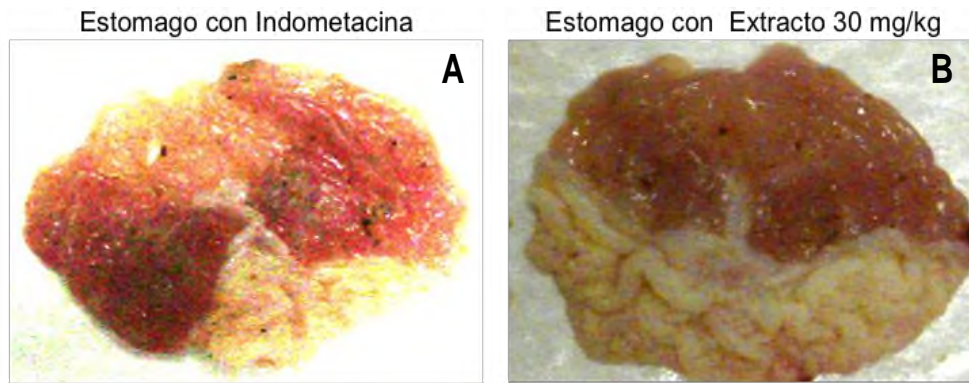
La protección que generó el extracto acuoso (activo) a concentración de 30 mg/kg fue de 75.40% siendo más representativa que la  $DE_{50}$  (53.5 mg/kg), ya que en esta se observó solo una protección de 58.23% la cual es 1.3 veces menos efectiva que la dosis de 30 mg/kg (Tabla 18). La protección es notoria en ambos casos ya que la región estomacal presentó daño menos severo en relación al etanol ( $IU_{indomet} = 0.09$ ) después de ser expuesta a la Indometacina por un periodo de 24 h. La protección que se observó por el extracto activo, fue muy evidente (75.4% de protección) (Fig. 28).

**Tabla 18.-** Resultados de úlceras con Indometacina.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Índice de ulceración (IU)	% Protección
Indometacina	20 mg/kg	$0.0915 \pm 0.0315^{\text{a}}$	
Ex. Ac	30 mg/kg	$0.0691 \pm 0.0105^{\text{b}***}$	75.40
Ex. Ac $DE_{50}$	53.5 mg/kg	$0.0533 \pm 0.0095^{****}$	58.23

Los valores son la media  $\pm$  el error estándar (n=5). ANOVA con una post prueba de Dunnett \*\*\* Estadísticamente significativo a  $p < 0.001$ , en comparación con el control negativo (Indometacina) Donde Ex. Ac. = Extracto Acuoso, Ex. Ac.  $DE_{50}$  = Extracto Acuoso Dosis Efectiva 50.

☒



**Figura 28.-**Estomago con Indometacina (A) y Estomago tratado con extracto activo (B).

Finalmente, es importante mencionar que ambos métodos son eficientes indicadores del daño ulceroso. Sin embargo, por el tiempo de exposición al agente ulcerante el método con etanol absoluto, suele ser una prueba tamiz rápida mostrando un panorama general de la proyección de los extractos como agentes protectores de úlceras gástricas. Además, existen otros métodos como inducción de úlceras por estrés (estrés por frío e inmovilización) e inducción de úlceras por ácido clorhídrico más Indometacina, que son igualmente válidos. Sin embargo, en ese mismo sentido son más tardados que el del etanol absoluto, pero se vuelven necesarios de realizar cuando se necesita validar el efecto anti-ulcerante de los extractos activos evaluados con la prueba tamiz de indicción de úlceras con etanol absoluto.

## 10.-CONCLUSIONES

Todos los extractos de *Sambucus nigra* (Saúco) mostraron efecto en la inhibición de las lesiones gástricas inducidas con etanol, en donde, el extracto acuoso fue el más activo a dosis de 80 mg/kg, y que en comparación con la famotidina (fármaco de referencia) mostró 1.76 veces mejor protección ante las úlceras.

El extracto acuoso (activo) fue dosis-dependiente con una dosis efectiva 50 (DE50) de 53.5 mg/kg. Sin embargo, este extracto presentó toxicidad.

Al combinar el extracto acuoso a dosis no efectivas con un donador de Óxido Nítrico, se potencializó el efecto del extracto activo, lo que sugiere que dicha actividad puede estar mediada por los niveles de ON.

Durante la evaluación de la dosis respuesta del extracto acuoso en el modelo de ratón, se presentó una toxicidad a concentración de 40 mg/kg o mayores, posiblemente por la presencia de nigrina una proteína tóxica para roedores encontrada en la especie *Sambucus nigra*. A dosis 30 mg/kg o menores concentraciones no presentaron efecto tóxico.

EL extracto acuso presentó hasta el 75.40% de inhibición de úlceras gástricas inducidas con Indometacina (AINE's) a dosis de 30 mg/kg. Posiblemente debido a, que los metabolitos que incluye se caracterizan por presentar actividad antioxidante y antiinflamatoria, como es el caso de los glucósidos, flavonoides y taninos.

Las placas de TLC realizadas del extracto activo, presentaron una coloración en donde se pudieron apreciar los metabolitos de interés, revelando bandas de coloración guinda y marrón relacionadas con la presencia de glucósidos, flavonoides y taninos a los que se le atribuye la actividad antiulcerante.

## 12.- REFERENCIAS.

Abella, I. (2000). La Magia de los Árboles, (tercera edición) Ed. RBA, España.

Abreu, L., & García, L. A. (2007). *Gastroenterología: endoscopia diagnóstica y terapéutica*. Ed. Médica Panamericana.

Ahmadiani, A., Fereidoni, M., Semnani, S., Kamalinejad, M., y Saremi, S. (1998). Efectos antinociceptivos y antiinflamatorios del extracto de rizoma de *Sambucus ebulus* en ratas. *Journal of Ethnopharmacology* , 61 (3), 229-235.

Al - Said, MS, Ageel, AM, Parmar, NS, y Tariq, M. (1986). Evaluación de la masilla, un medicamento bruto obtenido de *Pistacia lentiscus* para la actividad anti-úlceras gástrica y duodenal. *Journal of Ethnopharmacology* , 15 (3), 271 - 278.

Alzate F., Idárraga A., Díaz O. y Rodríguez W. (2013). Flora de los bosques montanos de Medellín. Programa Expedición Antioquia 2013, series Biodiversidad y Recursos Naturales. Alcaldía de Medellín, Universidad de Antioquia. 552 p.

Angós, R. (2016). Gastritis. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(2), 66-73. Arce, N. M. (2007). Enfermedad de Crohn gastroduodenal. *MA Gassull*, 4 p.

Arévalo D. (2013). Utilización de Tilo (*S. nigra* L.) como prebiótico natural en el engorde de pollos. Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Agropecuarias Escuela De Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Tesis Maestría.

Arias R. (2009). Experiencias sobre agroforestería para la producción animal en Guatemala. Página web: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frgagrofor1/arias22.htm> (Consultado en 2018).

Atehortúa, B. M. G., Galvis, M. M. B., & Quirama, J. F. R. (2015). Características, manejo, usos y beneficios del saúco (*Sambucus nigra* L.) con énfasis en su implementación en sistemas silvopastoriles del Trópico Alto. *Revista de*

*Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 155-168.

Balcanes A., Akülke, AZ, Bağatur, Y., Telci, D., Gören, AC, Kırmızıbekmez, H., y Yesilada, E. (2017). Sambulin A y B, iridoides no glicosídicos de *Sambucus ebulus*, ejercen una actividad anti-inflamatoria *in vitro* significativa en macrófagos RAW 264.7 inducidos por LPS mediante la inhibición de la fosforilación de MAPKs. *Journal of Ethnopharmacology*.206, 347-352.

Battelli, M.G.; Citores, L.; Buonamici, L.; Ferreras, J.M.; de Benito, F.M.; Stirpe, F.; Girbés, T. (1997). Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: a comparison with ricin. *Archives of Toxicology*, 71, 360-364.

Bladt, S., Wagner, H., & Zgainski, E. M. (2009). Plant drug analysis. *Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd ed. Berlin, Germany: Springer Dordrecht Heidelberg*.

Blanco G., Chamorro D., & Arreaza L. (2005). Predicción de la respuesta productiva en bovinos lecheros suplementados con ensilaje de *Sambucus peruviana*, *Acacia decurrens* y Avena sativa usando el modelo Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNPS) en Colombia. *Revista Corpoica*, 6(2), 86-90.

Boluda, E. R. (2015). Gastritis, úlcera y hemorragia digestiva. *Pediatría Integral*, 19(2), 83-91.

Bonaerense, A. F. (2001). Caracterización anatómico foliar y aspectos etnobotánicos de *Sambucus nigra* L. subsp peruviana (Kunth) R. Bolli (Caprifoliaceae). *Acta Fanti. Bonaerense*, 20(3), 173-179.

Botero H. (2011). Plantas Medicinales, pasado y presente. Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia – Corantioquia. Colombia, Medellín. 199 p.

Bremness L. (1993). Manual del Herborista. Guía Práctica para el Uso y Cultivo de Plantas Aromáticas y Culinarias. Madrid. Edición Española, Editorial Raíces, S.A. 285 p.

Cárdenas, C. A., Rocha, C. y Mora-Delado, J. R. (2011). Productividad y preferencia de forraje de vacas lecheras pastoreando un sistema silvopastoril intensivo de la zona alto Andina de Roncesvalles, Tolima. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 4, (1), 29-35.

Clapé-Laffita, O., & Alfonso-Castillo, A. (2011). Caracterización fármaco-toxicológica de la planta medicinal *Sambucus nigra* subsp. *canadensis* (L). R. Bolli. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(4), 586-596.

Cruz, A., Rodríguez, C. & Ortiz, C. (2011). Efecto insecticida in vitro del extracto etanólico de algunas plantas sobre la mosca adulta *Haematobia irritans*. *Revista Cubana de Planta Medicinales*, 16(3), 216-226.

Díaz, J. (2003). Informe Técnico. Caracterización del mercado Colombiano de plantas medicinales y aromáticas. Instituto Alexander Von Humboldt - El Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Bogotá D.C., Colombia.

Domínguez, J. C. M., Monroy, O. I., & Hernández, H. V. (2017). Caracterización fitoquímica de *Samanea Saman* Jacq Merr.(algarrobo). *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 5(1), 49-61.

Ferreras-Rozman. (2013). Enfermedades del aparato digestivo. Gastroenterología y hepatología. Decimosexta Edición. ISBN: 9788490225097, eBook ISBN: 9788490225103. Elsevier.

Fernández-Travieso, J. C. (2014). Incidencia actual de la gastritis: una breve revisión. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 45(1), 10-17.

Fonnegra, R. & Jiménez, S. (2006). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Medellín. Editorial Universidad de Antioquia. Segunda Edición. 347p.

Font, P. (1990). *Plantas Medicinales El Dioscórides Renovado*. Editorial Labor, S.A. Barcelona. 1033 p.

Galindo, W., Murgueitio, E., Giraldo, L., Marín, A., Berrio, L. & Uribe, F. (2003). *Manejo Sostenible de Los Sistemas Ganaderos Andinos*. Fundación CIPAV, Cali, Colombia. 213 p.

Gámez Escalona, M. M., Mulet Pérez, A. M., Miranda Moles, Z., & Mulet Gámez, A. M. (2008). Gastritis crónica antral por *Helicobacter pylori* en la infancia. *Revista Cubana de Pediatría*, 80(1), 65-78..

García, Jesús Pemán; Giménez, Jesús Cosculluela; López, Alfonso. Sambucus nigra L. JUAN, Tomás Girbés. 2004. Nigrina b: una proteína inactivadora de ribosomas no tóxica del saúco. Utilidad farmacéutica en la construcción de inmunotoxinas y conjugados para la terapia del cáncer. En *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 70 (1), 73-94.

Izquierdo, A. S., Cuffí, M. S., Frez, J. E., & Caserras, X. B. (2000) Gastritis y gastropatías. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 12(2): 66-73.

Jaramillo, B. (2011) Evaluación del crecimiento de terneras Holstein con la suplementación de dos niveles de Saúco (*S. nigra*) en pastoreo con kikuyo (p. *Clandestinum*). *Página web*: <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/terneras-holstein-t28996.htm> consultado en: Noviembre 2017.

Girbes, T. (2004). Nigrina b: una proteína inactivadora de ribosomas no tóxica del saúco. Utilidad farmacéutica en la construcción de inmunotoxinas y conjugados para la terapia del cáncer. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 70(1), 73-94.

Juárez, F. (2009). Aportes botánicos de salta - Ser. Herbario MCNS. Facultad de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Salta. 8, 1-22.

Lanas, Á., Fernández, Á., & Sáinz, R. (2012). Trastornos relacionados con la secreción gástrica ácida. *Montoro MA, García Pagán JC. Problemas Comunes en la Práctica Clínica-Gastroenterología y Hepatología*, 18, 271-280.

Lamshing Salinas, P., Casaubon García, P., & Goldbard Rochman, D. (2016). Gastritis colagenosa. Reporte de un caso pediátrico. *Anales Médicos de la Asociación Médica del Centro Médico ABC*, 61(4), 279-285.

Leon Barúa R. (2008). Génesis de la patología gastroduodenal asociada a infección por *Helicobacter pylori* y su modulación por factores geográficos y socioeconómicos. En Bussalleu A, Ramírez A, Tagle M Editores. Primera Edición Sección VIII: pag. 370 – 377.

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.

Liu Bejarano, H. (2011). Gastritis crónica atrófica: concordancia endoscópica, histológica, lesiones asociadas y aplicación de la cromoendoscopia virtual. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 31(2), 116-123.

Miranda Moles, Z., Mulet Pérez, A. M., Gámez Escalona, M. M., Escobar Bernal, A., Rodríguez Diéguez, M., & López Almaguer, G. (2015). Gastritis crónica antral por *Helicobacter pylori* en pacientes con y sin consumo de antiinflamatorios no esteroideos. *Correo Científico Médico de Holguin*. 19 (1), 63-75.

Missouri Botanical Garden (1998). An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 85 (4), 531-553.

Murakami, S., Takayama, F., Egashira, T., Imao, M. y Mori, A. (2012) Efecto protector de la preparación de papaya fermentada en la lesión gástrica aguda inducida por estrés. *Journal of Biophysical Chemistry*, 3 , 311 - 316.

Murillo, E., & Méndez, J. (2003). Guía metodológica para la investigación fitoquímica preliminar en plantas medicinales. *Universidad del Tolima, Ibagué*, 22 p.

Ody, P. (Miembro del National Institute of Medical Herbalist) (1993). The Herb Society Las Plantas Medicinales. Guía práctica con remedios útiles para los trastornos más comunes. Buenos Aires, Argentina. Javier Vergara Editor s.a. 191p.

Oyagi, A., Ogawa, K., Kakino, M., y Hara, H. (2010). Efectos protectores de un agente gastrointestinal que contiene ginseng rojo coreano en modelos de úlcera gástrica en ratones. *BMC medicina complementaria y alternativa*, 10 (1):45.

Pahlow, M. (1985). El gran libro de las plantas medicinales, Salud a través de las fuerzas curativas de la naturaleza. España. Editorial EVEREST S.A, Séptima Edición. 465 p.

Paucar Quispe, M. J. (2014). Influencia de la adición del sauco (*sambucus peruviana* L.) en las características fisicoquímicas y organolépticas del yogurt natural. Tesis, Universidad Nacional de Huancavelica. Facultad de Ciencias Agrarias.

Perú Acorde, 2000. Sauco "Estudio económico Productivo del Perú". Lima Perú. Lamina 81-A.

Ramírez Chávez, E., Lucas Valdez, L., Virgen Calleros, G., & Molina Torres, J. (2000). Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia*, 34(2), 207-215.

Ramírez-Ramos A, Sánchez-Sánchez R. *Helicobacter pylori*: epidemiología, microbiología, diagnóstico y tratamiento. En: Bussalleu A, Ramírez A, Tagle M Editores. Avances en gastroenterología y hepatología. Primera Edición 2008 pag 359 -369.

Reynel, C. & Marcelo, J. (2009). Árboles de los Ecosistemas Forestales Andinos, Manual de Identificación de Especies. Serie Investigación y Sistematización No 9. Programa Regional para la Gestión Social de los Ecosistemas Forestales Andinos ECOBONA-INTERCOOPERACIÓN. Perú, Lima.

Rimada, R. S., Gatti, W. O., Jeandupeux, R., & Cafferata, L. F. (2009). Isolation, characterization and quantification of artemisinin by NMR from Argentinean *Artemisia annua* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4), 275-281.

Rios, S. A., Prieto, O. P., Loyola, T. C., Rodríguez, M. E. A., & Reto, C. P. (2017). Dispepsia: Características clínicas, hallazgos endoscópicos e histológicos en pacientes atendidos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, Lima, Perú, durante el año 2010. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 33(1), 28-33.

Robert A, Nezamis RA, Lancaster JE, Hanchar AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. (1979). Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterol.*;77:433-443.

Rojas, K., Pachar, H. & Zambrano, B. (2011). Seguridad alimentaria y conocimientos locales. Las Mujeres y la Conservación de la agro biodiversidad en la Micro cuenca del Río Chimborazo. Corporación ECOPAR. Fundación Eco Ciencia. Quito, Ecuador.

Sagaró, E. (2009). Gastritis. *Revista Gastrohup*.11 (3): 156-161.

Sánchez, L., Amado, G., Criollo, P., Carvajal, T., Roa, J., Cuesta, A., Conde, A., Umaña, A., Bernal, L. & Barreto, L. (2010). El Saúco (*Sambucus nigra* L) como alternativa silvopastoril en el manejo sostenible de praderas en el trópico alto Colombiano (primera edición). Colombia.

Sánchez-Ocampo, P. M. (2013). Actividad citotóxica, anti-inflamatoria y anti-ulcerogénica de plantas silvestres *e in vitro* de *Castilleja tenuiflora* benth. *Journal of Ethnopharmacology*.150:1032–1037.

Sanjinés, A., Ollgaard, B. & Balslev, H.(2006). Frutos comestibles. Botánica Económica de Los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 2006: 329-346.

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

TAKAGI, K., y OKABE, S. (1968). Los efectos de los medicamentos en los procesos de producción y recuperación de la úlcera por estrés. *The Japanese Journal of Pharmacology*.18, 9-18.

Tejero, J. (sf). (2012) Caracterización químico-física y toxicológica de las lectinas antinutricionales ebulina f y SELfd de frutos de *Sambucus ebulus* L. (Tesis Doctoral). Universidad de Valladolid, Facultad de Medicina.

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.

Valdivia-Roldán, M. (2011). Gastritis y gastropatías. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 31(1), 38-48.

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.

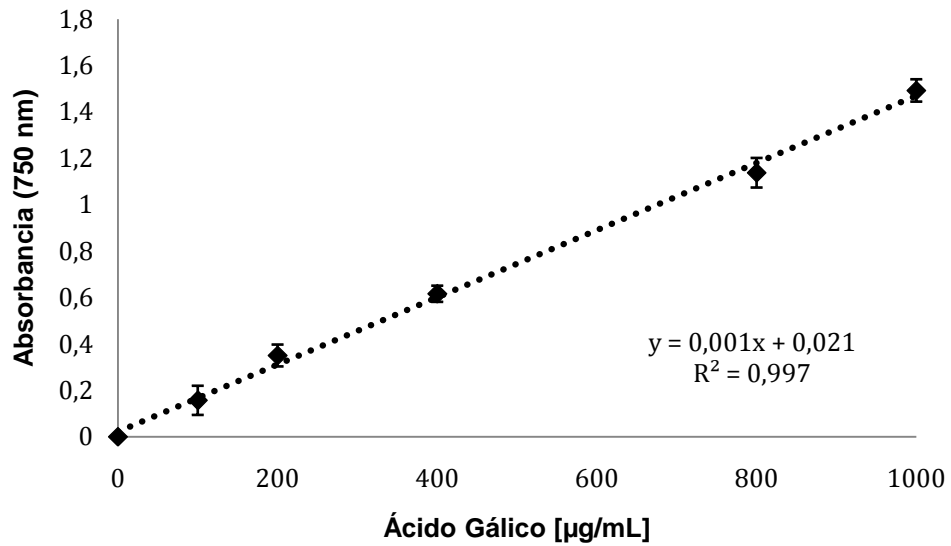
Vicente Pardo, A. (2017). Alteraciones histológicas causadas por la administración intraperitoneal de ebulina en ratones. Tesis. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid, España.

Yeşilada, E., Gürbüz, I., & Ergun, E. (1997). Efectos de las flores de *Cistus laurifolius* L. en lesiones gástricas y duodenales. *Journal of ethnopharmacology*. 55 (3): 201-211.

Yesilada, E., Gürbüz, İ., & Toker, G. (2014). Anti-ulcerogenic activity and isolation of the active principles from *Sambucus ebulus* L. leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 153(2), 478-483.

## 13.- ANEXOS.

### 13.1.-Curva de calibración para fenólicos.



### 13.2.- Curva de calibración para flavonoides.

