



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: Variación en la composición química y
en la capacidad antioxidante del *Sambucus ebulus* en
diferentes estadios de la planta**

Autor: María Victoria Tudanca Pacios

D.N.I.: 50330520B

Tutor: Olga María Palomino Ruiz Poveda

Convocatoria: 30 de junio de 2015

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. Estudio botánico	3-5
2.2. Estudio fitoquímico	5-6
2.3. Flavonoides	
a) Generalidades	6
b) Funciones de interés	6-7
3. OBJETIVOS	7
4. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1. Material vegetal	7
4.2. Metodología analítica	
a) Extracción	7-8
b) Preparación	8
c) Técnica analítica	
- HPLC	8-10
- ORAC	11-15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1. Determinación de la composición fitoquímica mediante HPLC	15-17
5.2. Determinación de la capacidad antioxidante a través del ORAC	17-18
6. CONCLUSIONES	18
7. BIBLIOGRAFÍA	19-20

1. RESUMEN

El *Sambucus ebulus* es una planta medicinal usada en diferentes continentes como medicina tradicional por la versatilidad farmacológica de sus flores, corteza y frutos; nunca consumidos por vía interna debido a su toxicidad.

En los últimos años, tanto la fitoquímica y la farmacología del vegetal han sido investigados debido, entre otras cosas, a su capacidad antioxidante. En este trabajo experimental se identifican dos flavonoides como posibles responsables de la capacidad antioxidante de la planta ($1,072 \pm 0,047$). Siendo ésta semejante a la de la sustancia de referencia utilizada para medir dicha actividad (Trolox®= 1). Estos nuevos datos podrían suscitar mayor interés en el campo de la investigación del *S. ebulus* para el desarrollo de nuevas vías terapéuticas en el futuro.

2. INTRODUCCION

2.1. Estudio botánico

Sambucus ebulus L. corresponde a la planta conocida como actea, saúco menor, yezgo menor, sauquillo, ébulo, enzo, ayebo, negrillos, negruchos, matapulgas, mielgo, chavos, yambú o yubo. ¹

El saúco menor es una planta perenne nativa de la División de las *magnoliófitas*, Clase *magnoliopsidas*, del Orden de las *Dipsacales*, de la Familia de las *Sambucaceae/ Caprifoliaceae* y del Género *Sambucus*. ²

S. ebulus es una hierba perenne con rizoma estolonífero y olor cianogénico. Posee tallos erectos, apenas ramificados- salvo distalmente-, verdosos, rara vez rojizos, glabros o más frecuentemente pelosos: con pelos unicelulares setosos aplanados y pelos pluricelulares, glandulíferos o no. ³

Es una planta herbácea vivaz que alcanza alturas de 1,50 metros. Sus hojas son pecioladas, opuestas, grandes, compuestas de 5-7 pares de foliolos sésiles, opuestos, lanceolados, dentados y de matriz verde oscuro. Sus flores son pequeñas, numerosas, pedunculadas, de color blanco, están reunidas en falsa umbela al extremo del tallo.

Florece entre primavera y verano dando lugar a una drupa globosa, de matriz negruzca cuando está madura ⁴, esférica, brillante, glabra ³ con 3-4 pequeños huesecillos (semillas) ovales puntiagudos de color ocre. ⁵

Su hábitat incluye bosques caducifolios, con frecuencia ribereños, y márgenes de ríos y acequias, en suelos preferentemente arcilloso-calcáreos. Crece en casi toda la Península e Islas Baleares, excepto en las regiones más occidentales y raramente crece en Portugal. ³

El Género *Sambucus* pertenece a la Familia de las madreselvas que incluyen dieciocho especies en todo el mundo, entre ellos seis especies distribuidas en las zonas subtropicales de América, Eurasia y África. Cuatro especies del Género *Sambucus* crece en Irán. De esas especies, *S.ebulus* y *S. nigra* nace en el crecimiento de los pastizales o márgenes de los bosques húmedos en la costa norte del mar Caspio.

En la medicina tradicional iraní se utilizan las hojas, frutas y rizomas de *S. ebulus* en el tratamiento de algunos casos inflamatorios tales como, picaduras de abeja o picores por ortigas, la artritis y el dolor de garganta. Además, ha demostrado ser un repelente de insectos, antihemorroidal, antiprotozario, antiardiático, antibacteriano frente a *Helicobacter pylori*, conveniente en el tratamiento de quemaduras y heridas infecciosas, edema, eczema y urticaria. ⁶

El *Sambucus ebulus* L. tiene un lugar muy destacado en la medicina popular de Turquía. Las hojas de la planta se practican externamente para aliviar el dolor reumático, para tratar el absceso, para la cicatrización de heridas e internamente contra las hemorroides y dolor de estómago.⁷

Estudios recientes han demostrado que el extracto hexánico de las partes aéreas de *S. ebulus* presenta una potente actividad antiinflamatoria en ratas (80 % de inhibición a 600 mg / kg por vía intraperitoneal vs 78% para diclofenaco a 100 mg / kg). ⁸

Tradicionalmente se consideraba que los frutos no maduros provocaban cierta toxicidad ocasionando trastornos digestivos pasajeros ⁵. Asimismo, es conocido que el consumo directo de frutos verdes, corteza o brotes de hoja de saúco produce náuseas, vómitos, dolor intestinal y hemorragias intestinales ⁹ cuya gravedad depende del grado de madurez de los frutos ¹⁰.

El Catálogo de Plantas Medicinales recoge las siguientes indicaciones tradicionales para la corteza, flores y hojas: como diurético para favorecer la

producción y eliminación de orina, y como coadyuvante en trastornos urinarios leves; para el reumatismo; y para el sobrepeso. En cuanto a la forma de empleo en adultos se aconseja aportar una cantidad adecuada de agua durante el tratamiento para favorecer los efectos diuréticos y no utilizarla entera por vía interna ya que es bastante tóxica ¹¹.

2.2. Estudio fitoquímico

Algunos estudios señalan como los principales componentes con propiedades terapéuticas de la planta a los compuestos fenólicos, que están asociados con las propiedades organolépticas, nutricionales y antioxidantes. Cuatro de ellos (4-ethylcatechol, 2-metoxi-6- (2-propil) fenol, 4-etil-1,3-bencenodiol, 1,2-bencenodiol, 2-metoxi-4-vinilfenol) son comunes en plantas medicinales y también son en parte responsables del efecto antiinflamatorio ¹².

En el fruto maduro del saúco enano se identificaron cinco flavonoides mediante diferentes técnicas cromatográficas: quercetina-3-O-laminaribioside, isorhamnetin-3-O-laminaribioside, quercetina-3-O-rutinósido, isorhamnetin-3-O-rutinósido e isorhamnetin-3-O- glucósido. Los compuestos 1 y 2 son identificados por primera vez en el género *Sambucus*. La evaluación de las propiedades anti-virus herpes simplex tipo 1 y antioxidante (mediante técnicas como el ORAC) sugiere que los frutos maduros podrían servir como una poderosa fuente de moléculas valiosas para diversos fines ¹³.

Debido a la toxicidad de la planta su uso ha sido restringido. Esto es debido a la presencia de proteínas bioactivas y/o compuestos de bajo peso molecular cuya ingestión podría desencadenar efectos deletéreos, como los citados anteriormente. En los últimos años, las características químicas y farmacológicas de las especies de *Sambucus* han sido investigadas. Entre las proteínas presentes en las especies de *Sambucus* se han obtenido tanto las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) de tipo 1 y de tipo 2. El papel biológico desempeñado por estas proteínas sigue siendo desconocido, aunque se conjeturaron estar involucrados en la defensa de las plantas contra los depredadores y los virus de insectos ¹⁴.

Las RIPs son enzimas ejercen actividad N-glicosidasa en la subunidad 28S del RNA ribosómico, conduciendo a la inhibición de la síntesis de proteínas por la detención de la etapa de elongación de la cadena de polipéptido ¹⁵. Las RIPs tipo

1 solo se han descrito en las hojas del *S. ebulus* denominándose ebulitinas (alfa, beta y gamma). Las RIPs tipo 2 son capaces de interactuar con las células del intestino de los insectos y mamíferos desencadenando una serie de señales de células específicas y, en su mayoría desconocidas, en la mucosa del intestino que podría afectar significativamente la fisiología animal. Las RIPs tipo 2 descritas en el saúco menor son la ebulina l en las hojas, la ebulina f en los frutos, la ebulina blo en las flores y la ebulina r1, ebulina r2 y SEA I en el rizoma de la planta ¹⁴. Esta ebulina f ha sido de las más estudiadas, donde un artículo reciente destaca que los frutos verdes que la contienen produce una mayor toxicidad en ratones de 6 semanas de edad que de 12 semanas y que el órgano afectado pasa de ser el intestino en los más jóvenes al pulmón e intestino (por una mayor tasa de apoptosis) en los otros, cuando se administra vía intraperitoneal. Por lo que el aumento de letalidad es resultado del aumento de la toxicidad de lectina junto con la alta tasa dependiente de la edad de la apoptosis promovida por ebulin f ¹⁶.

2.3. Flavonoides

a) Generalidades

Los flavonoides son pigmentos casi universales en los vegetales. Casi siempre hidrosolubles, son los responsables de la coloración de las flores, frutos y, a veces, de las hojas. Éstos se encuentran también en la cutícula foliar y en las células epidérmicas de las hojas, asegurando así la protección de los tejidos contra los efectos nocivos de las radiaciones ultravioletas ¹⁷.

El yezgo menor es particularmente rico en sustancias antioxidantes como son los flavonoides y ácidos fenólicos ².

En este caso me he centrado en la identificación de los flavonoides que estarían presentes en el fruto maduro de *S. ebulus* a través de una técnica cromatográfica de alta resolución.

b) Funciones e interés

En la actualidad se opina que captan los radicales formados en diversas circunstancias como pueden ser: la anoxia, la inflamación y la autooxidación lipídica. Normalmente, la cascada de reacciones que se debe al apareamiento de

uno de los electrones libres de oxígeno, se interrumpe por diversos sistemas enzimáticos:

- Superóxido dismutasa (mitocondrial y citoplásmica) que transforman el anión radical superóxido en peróxido de hidrógeno y agua.
- Catalasa peroxidasa y glutatión peroxidasa que reducen los peróxidos en agua y los hidroperóxidos.

Los antioxidantes son de interés porque ayudan a proteger el cuerpo humano contra el daño inducido por radicales libres que propician la aparición de cáncer, la aterosclerosis y el envejecimiento ².

3. OBJETIVOS

1. Estudio de la composición fitoquímica en flavonoides activos en el fruto maduro de *Sambucus Ebulus* L. mediante la metodología de HPLC (High Performance Liquid Chromatography).
2. Determinar la capacidad antioxidante de los frutos maduros (bayas) del *Sambucus Ebulus* L. a través del método ORAC (Oxygen radical absorbance capacity).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material vegetal

El material vegetal empleado se recolecta entre los meses de abril a julio en la localidad de Barruelo del Valle (Valladolid). Éste se deseca a temperatura ambiente y protegido de la luz, conservándose a -24°C.

En el caso de los frutos verdes y maduros se trituran con mortero de porcelana y el resto de las partes se trituran en un molinillo en pequeñas cantidades en presencia de 100 mL de tampón de extracción (NaCl 0,28 M, fosfato monosódico 5 mM pH=7,5).

4.2. Metodología analítica

a) Extracción

Después de la trituración de los frutos en un mortero, la extracción se realiza en agitación constante a una temperatura de 4° C durante un periodo de 30 minutos.

El extracto obtenido se filtra con doble gasa de nylon y el filtrado se somete a dos centrifugaciones a 3.500 rpm en centrífuga Beckman Coulter Avanti® Centrifuge J-30I a 2° C. Se recoge el sobrenadante y se filtra a través de papel de doble capa con pliegues. El volumen recuperado en este proceso lo denominamos extracto crudo. Medimos los volúmenes recogidos de los diferentes extractos crudos y acuosos; y lo guardamos a -24° C para su posterior análisis.

b) Preparación

A partir del extracto acuoso (viales de 20 mL) obtenemos el extracto seco llevándolos al liofilizador Telstar Lyo Quest®, a temperatura menor a 51.5° C y presión de 0.101 mbar.

c) Técnica analítica

- HPLC

La cromatografía líquida de alta presión o de alta eficacia (ambos se abrevian como HPLC o simplemente LC) es una técnica cromatográfica que se basa en la existencia de una fase móvil que es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. La separación cromatográfica en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases: móvil y estacionaria ¹⁸.

Para poder encuadrar la cromatografía líquida de alta resolución podemos dividir los métodos cromatográficos líquidos en:

- Cromatografía Líquido-Sólido: la fase estacionaria es un sólido y la fase móvil, un líquido.
- Cromatografía Líquido-Líquido: la fase estacionaria es un líquido inmovilizado por un sólido al que impregna y la fase móvil, un líquido.

Aunque según la naturaleza de la separación también podemos clasificarlos en:

- Cromatografía de adsorción. La fase estacionaria es un sólido adsorbente y la separación de las moléculas se debe a la distinta

adsorción de éstas en la fase fija. Por tanto, es una cromatografía líquido- líquido.

- Cromatografía de reparto. La fase estacionaria es un líquido no miscible con la fase móvil (también líquida), y la separación se basa en la distinta solubilidad de las moléculas en los distintos líquidos. Es una cromatografía líquido-líquido.
- Cromatografía de intercambio iónico o par iónico. Se aplica a la separación de moléculas fácilmente ionizables al aplicar un cambio de pH.
- Cromatografía de exclusión. La separación es debida a un mecanismo físico y depende sólo del tamaño de las moléculas, ya que la fase estacionaria es un sólido poroso cuyos poros presentan un diámetro semejante al de algunas de las moléculas a separar.

Existen 3 tipos de desarrollo cromatográfico: elución, análisis frontal y desplazamiento. En cromatografía líquida de alta resolución el desarrollo es casi exclusivamente por elución, consistiendo en impregnar la columna con la fase móvil y la solución problema.

El tiempo de retención en la fase estacionaria es distinto para cada compuesto problema y permite la identificación de los mismos, ya que los solutos migrarán más rápidamente cuanto menor es su afinidad por la fase estacionaria y mayor por la fase móvil ¹⁹. Los tres factores fundamentales en HPLC: retención, selectividad y eficiencia. Estos tres factores en última instancia controlan la separación del analito/s ¹⁸.

Utilizamos un cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent Technologies 1260 Infinity. Éste se compone de un sistema de bombeo, un inyector, una columna cromatográfica, un controlador de temperatura de la columna, un detector y un sistema de adquisición de datos. La fase móvil es suministrada desde uno o varios depósitos y circula a través de la columna de octadecilsilano, normalmente a caudal constante, y después a través del detector.



El procedimiento es el siguiente:

1. Se pesa 1 miligramo (mg) de extracto liofilizado de fruto maduro en una balanza de precisión (Mtelar AJ100) previamente calibrada; ya que se trata de una cantidad muy pequeña.
2. Se introduce el extracto en un vial y en este se añaden 5 mililitros (mL) de agua miliQ (Milli-Q Direct® está diseñado como un Sistema de Purificación de Agua individual que produce agua de uso general y agua ultrapura directamente a partir de agua potable).
3. Se agita el vial hasta ausencia de partículas visibles y se filtra el contenido del vial a un frasco topacio debidamente etiquetado, a través de una jeringa y un filtro Millipore Millex-HV de 0,45 μm de tamaño de poro. Se tapa el frasco con tapón y papel parafilm.
4. Las condiciones para la detección del cianidín-3-glucósido en extractos de *S. ebulus* se toman como base para el análisis de los compuestos flavonoides.

Estas condiciones se optimizan hasta obtener lo siguiente:

- Fase móvil formada por A (agua con ácido fosfórico al 1% y acético al 10%) y B (acetonitrilo)
- Temperatura de análisis: 40°C
- Flujo: 0,6 mL/ min
- Detección: 205 nm, 345 nm y 520 nm
- Volumen de inyección: 20 microlitros (μL)
- Concentración de la muestra: 1 mg/ 2 mL de agua miliQ

Se realiza una cromatografía sólido –líquido de adsorción con fase inversa.

Lo ideal es obtener una resolución elevada en un tiempo corto. La resolución puede aumentar: aumentando la longitud de la columna o disminuyendo el diámetro de las partículas.

- ORAC

El ensayo ORAC es un método estandarizado para determinar la capacidad antioxidante de una sustancia. Se basa en la inhibición de la oxidación inducida por radical peroxilo iniciado por descomposición térmica de compuestos azo tales como el [2, 2'-azobis (2-amidino-propano) dihidroclórico] (AAPH).

Con el tiempo las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas a partir de la descomposición térmica de AAPH se disminuye la señal de la sonda fluorescente fluoresceína. La adición posterior de un antioxidante produce una señal de fluorescencia más estable, con estabilidad de la señal en función de la capacidad del antioxidante. Estas mediciones se comparan con un estándar, el Trolox® y los resultados son expresados en micromoles de Trolox® equivalentes (TE) por gramo o por mililitro de muestra ²⁰.

Utilizamos el fluorímetro BMG FLUOstar OPTIMA Microplate reader. Éste es un lector multi-detección totalmente automatizado basado en la lectura de una microplaca, todo controlado por un microprocesador de ventilación de gas.

Está diseñado para mediciones de: flujo de calcio; de actividad enzimática; de toxicidad, proliferación y viabilidad celular; de cuantificación de ácido nucleico; de cuantificación de ATP (Adenosín trifosfato); de inmunoensayos; y ensayos antioxidantes como el ORAC.



El procedimiento experimental del ORAC es el siguiente:

1. Se preparan los reactivos:

- Reactivos que permiten conservación en el frigorífico (4 °C):

Tampón PBS 0,075 M (pH= 7,4):

- Se pesan 13,06 gramos (g) de Fosfato dipotásico (K_2HPO_4) y se diluyen en un litro de agua destilada (la llamaremos SOLUCION A).

- Se pesan 2,25 gramos de Fosfato sódico (NaHPO_4) y se diluyen en 250 mL de agua destilada (la llamaremos SOLUCION B).

- Se mezclan 810 mL de SOLUCION A y 190 mL de SOLUCION B. Se ajusta a pH 7,4 con un pHmetro y se conserva en la nevera.

Fluoresceína disodio (solución stock):

- Se pesan 0,01097 gramos de fluoresceína en ausencia de luz y se diluye en 25 mL de PBS. Se conserva en nevera.

Disolución madre de la muestra:

- Si la muestra es un extracto se diluye 1 miligramo de extracto en 1 mL de PBS; como es este caso que mi muestra es de frutos maduros de *S.ebulus*.

- Si la muestra es de aceite esencial se utiliza 1 gramo disuelto en 500 μL de metanol y 500 μL de PBS.

- Reactivos que han de prepararse diariamente (el día que se realice el ORAC):

Solución de fluoresceína:

Se mezclan en un matraz aforado de 10 mL, 100 μL de la solución stock con 10 mL de la solución PBS hasta enrase. Después tomar 250 μL de esta solución anteriormente preparada y añadirle la solución de PBS hasta enrase de un matraz aforado de 25 mL.

Solución de Trolox®:

- Se pesan 0,0125 gramos de Trolox® en un matraz aforado de 50 mL. A esto se le añade 1 mL de metanol y se enrasa hasta los 50 mL con PBS.

- Se toma 1 mL de la solución de Trolox® y se enrasa un matraz aforado de 10 mL con la solución de PBS.

Solución de AAPH:

- Se pesan 0,10848 gramos de AAPH y se añade solución de PBS hasta enrase de un matraz aforado de 10 mL.

3. Se realizan las diluciones de Trolox® y las diluciones de la muestra problema tal como se indica en las siguientes tablas:

Tabla 1. Diluciones de Trolox® empleadas

Dilución	Volumen de Trolox® (μL)	Volumen de solución de PBS (μL)
T ₁	100 μL	900 μL
T ₂	200 μL	800 μL
T ₃	300 μL	700 μL
T ₄	400 μL	600 μL
T ₅	500 μL	500 μL
T ₆	600 μL	400 μL
T ₇	700 μL	300 μL
T ₈	800 μL	200 μL

Tabla 2. Diluciones de la muestra problema empleada

Dilución	Volumen (μL)	Volumen de solución de PBS (μL)
1:2	100 de solución madre	100
1:4	25 de solución madre	75
1:6	50 de solución madre	250
1:10	200 de la dilución de 1:6	100
1:20	100 de la dilución de 1:10	100
1:40	100 de la dilución de 1:20	100
1:80	100 de la dilución de 1:40	100

Continuación de la Tabla 2. Diluciones de la muestra problema empleada

Dilución	Volumen (μL)	Volumen de solución de PBS (μL)
1:100	50 de la dilución de 1:10	450
1:200	100 de la dilución de 1:100	100
1:400	100 de la dilución de 1:200	100
1:800	100 de la dilución de 1:400	100
1:1000	50 de la dilución de 1:100	450

4. A continuación se procede de la siguiente manera:

- Las muestras deben prepararse a diferentes concentraciones para que su área bajo la curva (AUC) neta deba estar dentro del rango del Trolox®.



- Es preciso encender el fluorímetro, abrir el programa del ordenador conectado al mismo y definir la temperatura a 37°C.
- Se añaden a los pocillos de la placa el volumen Trolox®, muestra y fluoresceína correspondiente. Se incuba la placa unos 10 minutos dentro del fluorímetro y después se añade la cantidad de PBS necesaria en cada pocillo de tal manera que:

CONTROL (C) = 80 μ L de PBS + 120 μ L de Fluoresceína

BLANCO (B) = 20 μ L de PBS + 120 μ L de Fluoresceína + 60 μ L de AAPH

TROLOX (T) = 20 μ L de T+ 120 μ L de Fluoresceína + 60 μ L de AAPH

MUESTRA (M) = 20 μ L de M + 120 μ L de Fluoresceína + 60 μ L de AAPH

En cada placa se pueden analizar tres muestras (colocadas en cada pocillo de la más diluida a la más concentrada) y el fluorímetro tarda aproximadamente dos horas y media en analizar la placa. La placa se incuba los primeros diez minutos sin el AAPH y después se añaden los volúmenes necesarios en cada pocillo.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Determinación de la composición fitoquímica mediante HPLC

a) Patrones

Los cromatogramas de los patrones revelan lo expresado en la siguiente tabla.

Tabla 3. Parámetros obtenidos para los patrones analizados

Compuesto	Concentración (ppm)	Tiempo de retención-Tr* (minutos)
Apigenina	235	1,738
Arbutina	312	2,175
Rutina	500	3,870
Kaempferol	1000	5,08
Miricetina	364	5,311
Hesperetina	250	5,993
Luteolina	25	12,275
Quercetina	500	12,569

* Los compuestos están ordenados por valor creciente de Tr, es decir, de menor a mayor afinidad por la fase móvil.

Imagen 1. Cromatograma del patrón de arbutina a 345,4 nm

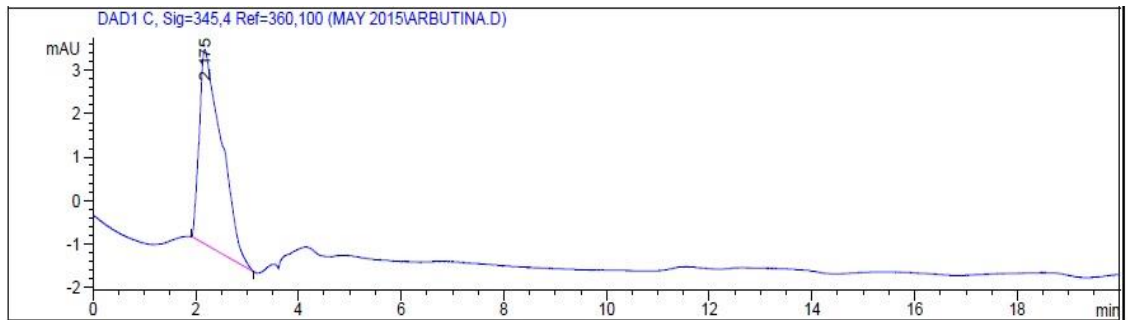


Imagen 2. Cromatograma del patrón de hesperetina a 345,4 nm

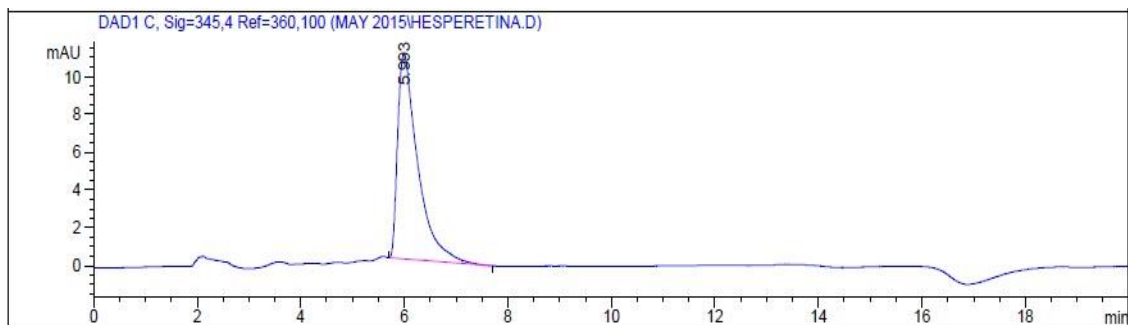
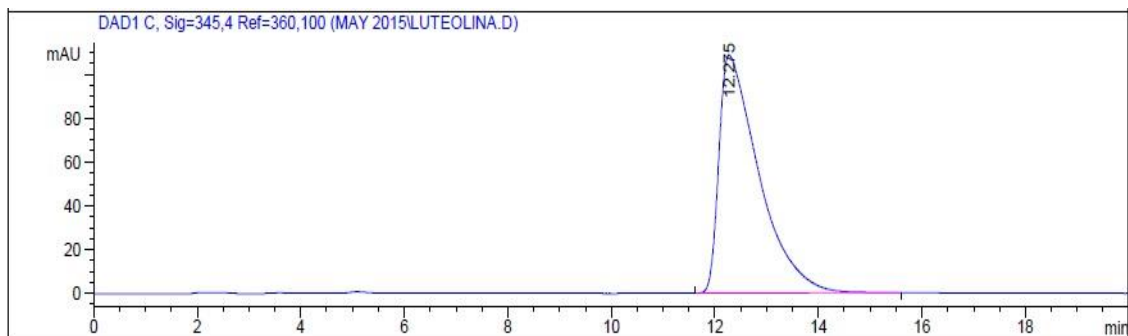
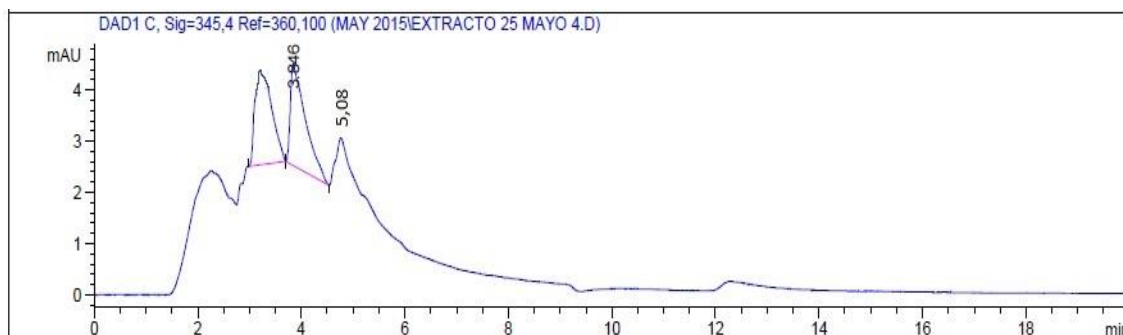


Imagen 3. Cromatograma del patrón de luteolina a 345,4 nm



b) Extracto de fruto maduro 1mg/2mL

Imagen 4. Cromatograma del extracto a 345,4 nm



En el cromatograma se identifican la rutina (Tr= 3,646) y kaempferol (Tr= 5,08). Comparando los respectivos tiempos de retención del patrón con los que aparecen en el extracto, se extrapolan que los valores son los de estos dos flavonoides.

5.2. Determinación de la capacidad antioxidante a través del ORAC

El fluorímetro mide el decrecimiento de fluorescencia si existe captación de radicales libres por parte de nuestro compuesto. El Trolox® tiene una capacidad antioxidante conocida por lo que se utiliza como estándar. Además, el estándar es un análogo de la vitamina E pero con la ventaja de ser hidrosoluble por lo que resulta más fácil trabajar con él.

A través de unas plantillas de Excel se incorporan los valores del Trolox® y de mi muestra de fruto maduro. Se realizaron 5 repeticiones de la misma prueba con la misma muestra en días diferentes pero consecutivos. Cada muestra se aplica por duplicado en cada placa.

Los resultados que obtuve realizando el ORAC de los frutos maduros de *S. ebulus* fueron los siguientes:

Tabla 4. Valor antioxidante de cada muestra y el valor medio antioxidante

Número de muestra	Valor antioxidante
1	0,95
2	1,12
3	1,3
4	1
5	0,99
MEDIA ± DS	1,072 ±0,047

El valor antioxidante se obtiene del cociente entre la pendiente de la recta de regresión de la muestra entre la pendiente de la recta del Trolox®; se deduce que el fruto maduro del *S. ebulus* posee un valor muy semejante al de la sustancia estándar al superar el valor de 1.

6. CONCLUSIONES

Se han identificado dos flavonoides en el extracto acuoso del fruto maduro de *S. ebulus* por HPLC: rutina y kaempferol.

La determinación de la capacidad antioxidante del extracto muestra un valor medio, similar a la del compuesto estándar de referencia (Trolox®). Debido a la composición química en sustancias fenólicas, esta capacidad antioxidante puede atribuirse a los mismos.

En primer lugar, para la realización de este trabajo se ha puesto en práctica una rigurosa revisión, documentación, búsqueda e investigación bibliográfica de diferentes referencias botánicas, fitoquímicas, analíticas e instrumentales sobre la situación actual del saúco menor. Posteriormente, siguiendo las anteriores directrices se elaboró este trabajo teórico- experimental desarrollado y con la colaboración del Departamento de Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid.

De tal manera que este trabajo de fin de Grado en Farmacia recoge disciplinas impartidas en la carrera tales como la fisiología vegetal, farmacognosia, farmacología y toxicidad del *S. ebulus*, así como las técnicas analíticas e instrumentales adecuadas para la determinación de su composición en flavonoides y de la capacidad antioxidante de los mismos.

El trabajo teórico- experimental reúne numerosas competencias adquiridas durante la carrera de Grado y perfeccionadas durante el mismo, suponiendo un primer contacto con el mundo de la investigación y del ámbito científico.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Chevallier A. Enciclopedia de las plantas medicinales. 1ª ed. Madrid. España; 1997. 335p.
2. Basterrechea Elizgaray JE. Capacidad antioxidante y antirradicalaria, y nuevas lectinas SELblo y ebulina blo presentes en las inflorescencias del saúco enano (*Sambucus ebulus* L) [tesis doctoral en Internet]. Valladolid: Universidad de Valladolid; 2013 [citado 15 junio 2015] 167 p. Disponible en: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/4264/1/TESIS456-140210.pdf>
3. Flora ibérica [Internet]. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC; 2015 [citado 15 junio 2015]. Disponible en: http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/15_155_03_Sambucus.pdf
4. Juscafresca B. Guía de la Flora Medicinal. 1ª ed. Madrid. España; 1994. 137 p.
5. Reynaud J. La Flora del Farmacéutico. 1ª ed. Madrid. España; 2003. 267 p.
6. Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA, Dooshan A et al. Antidepressant activities of *Sambucus ebulus* and *Sambucus nigra*. Eur Rev Med Pharmacol Sc [Internet]. 2014 Nov [citado 15 junio 2015]; 18: 3350-53. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/3350-3353.pdf>
7. Yesilada E, Gürbüz I, Toker G. Anti-ulcerogenic activity and isolation of the active principles from *Sambucus ebulus* L. leaves. J Ethnopharmacol [Internet]. 2014 Apr [citado 15 junio 2015]; 153(2):478-83. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24632015>
8. Ebrahimzadeha MA, Mahmoudib M, Salimib E. Antiinflammatory activity of *Sambucus ebulus* hexane extracts. Fitoterapia [Internet]. 2006 Jan [citado 15 junio 2015]; 77(2):146-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406693>
9. Vanaclocha B, Cañigueral S. Fitoterapia, Vademécum de Prescripción. 4ª ed. Barcelona. España; 2003. 1092 p.
10. Font-Quer P. Plantas Medicinales: El Dioscórides Renovado. 1ª ed. Barcelona. España; 1999. 1184 p.
11. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Catálogo de Plantas Medicinales. Madrid; 2011.

12. Chirigiu L, Chirigiu RG, Tircomnicu V et al. GC-MS analysis of chemical composition of *Sambucus ebulus* leaves. Chemistry of Natural Compounds [Internet]. 2011 March [citado 15 junio 2015]; 47(1): 126-7. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10600-011-9854-z>
13. Zahmanov G, Alipieva K, Denev P et al. Flavonoid glycosides profiling in dwarf elder fruits (*Sambucus ebulus* L.) and evaluation of their antioxidant and anti-herpes simplex activities. Ind Crop Prod [Internet]. 2015 Jan [citado 15 junio 2015]; 63: 58-64. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014006712>
14. Tejero J, Jiménez P, Quinto E et al. Elderberries: A source of Ribosome-Inactivating Proteins with Lectin Activity. Molecules [Internet]. 2015 Jan [citado 15 junio 2015]; 20:2364-87. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/2/2364>
15. Jiménez P, Tejero J, Cordoba-Diaz D et al. Ebulin from Dwarf Elder (*Sambucus ebulus* L.); A Mini-Review. Toxins [Internet]. 2015 Feb [citado 15 junio 2015]; 7:648-58. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25723322>
16. Garrosa M, Jiménez P, Tejero J et al. Toxicity of the Anti-ribosomal Lectin Ebulin f in Lungs and Intestines in Elderly Mice. Toxins [Internet]. 2015 Feb [citado 15 junio 2015]; 7:367-79. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2072-6651/7/2/367>
17. Bruneton. Farmacognosia. 2ª ed. Zaragoza. España; 2001. 1082 p.
18. Ornaf RM, Dong MW. Two Key concepts of HPLC in pharmaceutical analysis. Separ Sci Technol [Internet]. 2005 Feb [citado 15 junio 2015]; 6:19-45. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149639505800467>
19. Palomino Ruiz-Poveda OM. Flavonoides del Género Sideritis (Lamiaceae) por HPLC [tesis doctoral en formato papel]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1995 [citado 15 junio de 2015].
20. Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. Radical Bio Med [Internet]. 1993 March [citado 15 junio de 2015], 14(3):303-11. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/089158499390027R>