



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**Determinación de la capacidad antioxidante
de *Sambucus ebulus* L. utilizando el método**

ORAC

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor: Paula López Méndez

D.N.I.: 47550940G

Tutor: Olga María Palomino Ruiz-Poveda.

Convocatoria: 30/06/2015

ÍNDICE

Contenido	
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVO	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
Material de estudio.....	6
Determinación de la actividad antioxidante mediante el método ORAC (Oxigen Radical Absorbance Capacity).....	6
Material, equipos y Reactivos.....	9
Preparación del extracto acuoso:	10
Preparación de reactivos que permiten conservación:	10
Preparación de reactivos diariamente	10
Preparación de disoluciones a partir de la disolución madre	11
Preparación de la microplaca Costar UV.....	12
Análisis de los datos	12
RESULTADOS.....	13
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	16
BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

Objetivo: Las hojas de *Sambucus ebulus* L. han sido utilizadas en la medicina tradicional Iraní para el tratamiento de enfermedades de naturaleza inflamatoria. El objetivo de este estudio es determinar la capacidad antioxidante de los polifenoles presentes en el extracto acuoso de las hojas jóvenes de *Sambucus ebulus* L. mediante el método ORAC.

Métodos: El método ORAC es un método fluorescente donde se mide el retraso, en presencia de compuestos antioxidantes, de la disminución de la fluorescencia de la fluoresceína debida a la acción de agentes oxidantes. El agente oxidante utilizado fue el AAPH, y la actividad antioxidante de las muestras fue medida en relación al Trolox, utilizado como sustancia antioxidante de referencia. El extracto acuoso fue preparado a partir del extracto liofilizado de las hojas jóvenes de *S. ebulus*, a una concentración de 0,25mg/ml. Se prepararon 12 disoluciones en concentración decreciente de muestras de extracto acuoso a partir de la disolución madre. Se realizaron también 8 disoluciones en concentración decreciente de Trolox, a partir de la disolución madre a $2,54 \cdot 10^{-5}$ mg/ml. Se prepararon 7 placas obteniéndose 7 resultados de ORAC. Los valores finales de ORAC se expresaron como equivalentes de Trolox (mmol Trolox/100mg peso fresco).

Resultados: La media de los 7 valores de ORAC obtenidos fue de 1,301mmol TE/100g con una desviación estándar de 0,1552. Todos los valores obtenidos fueron superiores a 1mmol TE/100mg.

Conclusiones: El método ORAC es un método muy útil y práctico para medir la capacidad antioxidante de cualquier sustancia, y ofrece una gran sensibilidad y fiabilidad. Los extractos acuosos mostraron una elevada capacidad antioxidante, incluso superior a la del trolox, mostrando así apoyo experimental de los beneficios de utilizar las hojas de esta planta con fines antiinflamatorios, puesto que la acción antioxidante es fundamental para evitar complicaciones en estados de inflamación crónica.

Palabras clave: *Sambucus ebulus* L., ORAC, extracto acuoso, hojas jóvenes, capacidad antioxidante, polifenoles, inflamación crónica.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es un mecanismo de protección de los tejidos y es la primera reacción del sistema inmunitario frente a patógenos u otros estímulos dañinos con el fin de devolver a la célula a su estado inicial. Los macrófagos juegan un papel fundamental en la eliminación de los patógenos gracias a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos radicales libres ejercen un papel dual en el organismo: efectos beneficiosos y perjudiciales. Generalmente, los efectos beneficiosos incluyen la defensa frente a microorganismos patógenos. Sin embargo, la sobreproducción de estas especies altamente reactivas puede dañar macromoléculas biológicas importantes como ADN, proteínas y lípidos de membrana. Durante la inflamación, los sistemas antioxidantes celulares responden a la sobreproducción de especies oxidantes neutralizándolas e induciendo la activación de genes que reparan el ADN. Sin embargo, cuando la respuesta inflamatoria se prolonga en el tiempo, se agotan estos sistemas antioxidantes y la balanza se inclina hacia el aumento de las especies reactivas que causan daño celular. Como consecuencia, la inflamación crónica predispone a las células a la transformación y malignización. Estos hechos hacen que la inflamación sea considerada uno de los principales precursores del desarrollo del cáncer (1,2). Además, muchos estudios sugieren que la inflamación crónica ejerce un papel muy importante en una amplia variedad de enfermedades relacionadas con la edad, como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y autoinmunes (1).

En los últimos años, se ha incrementado el interés en la búsqueda de antioxidantes naturales como los polifenoles, presentes en muchas plantas medicinales y en muchos alimentos de origen vegetal (3). Muchos estudios confirman que la acción antioxidante de los productos vegetales se debe a su contenido en compuestos fenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos (3,4). Los polifenoles son, en realidad, los principales antioxidantes de la dieta, y su ingesta es 10 veces superior a la de la vitamina C y 100 veces superior a la de la vitamina E o los carotenoides (5).

Sambucus ebulus L. (Sauco enano o Yezgo) pertenece a la familia Caprifoliaceae. Es una planta herbácea muy bien conocida en la medicina tradicional Iraní. Nativa del sur y centro de Europa y del sureste asiático, ha sido utilizada durante mucho tiempo para el tratamiento de enfermedades de naturaleza inflamatoria como artritis reumatoide, fiebre, infecciones y edemas (6-11). Tradicionalmente, los iranís han utilizado las hojas de esta planta para tratar picaduras de insectos y de ortigas, así como

artritis, hemorroides y dolor de garganta. Además hay estudios experimentales que apoyan el uso tópico de *S. ebulus* como planta antiinflamatoria y antirreumática (10).

Sambucus ebulus L. crece entre 0.9 y 1.5 m de alto, y se caracteriza por un cierto olor cianogénico. Presenta un rizoma estolonífero del que surgen tallos erectos y apenas ramificados (salvo distalmente). Las hojas son pinnatisectas (a veces bipinnatisectas) con estípulas muy marcadas; y el limbo tiene entre 7-11 folíolos peciolados con forma lanceolada y el margen irregularmente aserrado. Las flores se reúnen en inflorescencias corimbiformes con hasta 250 flores. Estas inflorescencias pueden ser solitarias o más frecuentemente tríparas con una corola blanca, a veces externamente rosada. El fruto característico de *S. ebulus* es una drupa globosa, violeta-negruzca y glabra (12).

Los principales componentes químicos identificados en *S. ebulus* son flavonoides y antocianos, taninos, esteroides, glucósidos cardiacos, ácidos fenólicos y sustancias de naturaleza proteica como ebulitinas y ebulina 1 y sustancias volátiles (6-8). Es decir, que esta planta es particularmente rica en compuestos fenólicos. Diversos estudios demuestran que la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos acuosos de flores y frutos de *S. ebulus* se correlacionan muy bien con el contenido en polifenoles (7).

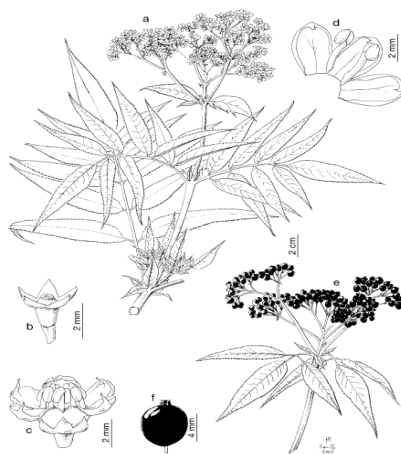


Figura 1 Hojas, flores y fruto de *Sambucus ebulus* L.

OBJETIVOS

Debido a la importancia de la acción antioxidante para combatir el estrés oxidativo que se produce en diversas enfermedades que cursan con inflamación crónica, el objetivo de este estudio es determinar la capacidad antioxidante del extracto acuoso

de las hojas jóvenes de *Sambucus ebulus* L. utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de estados inflamatorios.

MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental en este trabajo se ha desarrollado en el laboratorio de investigación del Departamento de Farmacología, (Farmacognosia y Farmacología Experimental), de la facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid).

Material vegetal

Hojas antes de senescencia de *Sambucus ebulus* L. proveniente de la localidad de Barruelo del Valle (Valladolid). Se recogieron durante los meses de abril a Julio, se desecaron a temperatura ambiente y se almacenaron a -24°C.

Determinación de la actividad antioxidante mediante el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

El método consiste en evaluar la degradación oxidativa de una molécula fluorescente (fluoresceína) en presencia de iniciadores de radicales libres como los azocompuestos (AAPH). El AAPH se utiliza como radical iniciador, que por descomposición térmica origina radicales peroxilo que causan daño a las moléculas fluorescentes. Las especies antioxidantes son capaces de bloquear estos radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno:



(Siendo AH las especies antioxidantes).

En este método, los radicales peroxilo oxidan a la fluoresceína de forma que esta pierde su fluorescencia. En presencia de un antioxidante, los ROO· captan preferiblemente un átomo de hidrógeno de este, de forma que se disminuye dicha pérdida de fluorescencia. El método ORAC mide por tanto el retraso, en presencia de compuestos antioxidantes, de la disminución de la fluorescencia debida a la acción de radicales peroxilo.

La actividad antioxidante de las muestras se mide en relación a la sustancia de referencia, Trolox (análogo de la vitamina E hidrosoluble). La medición combina tanto tiempo de inhibición como porcentaje de inhibición de la acción de radicales libres por los antioxidantes usando un área bajo la curva para la cuantificación.

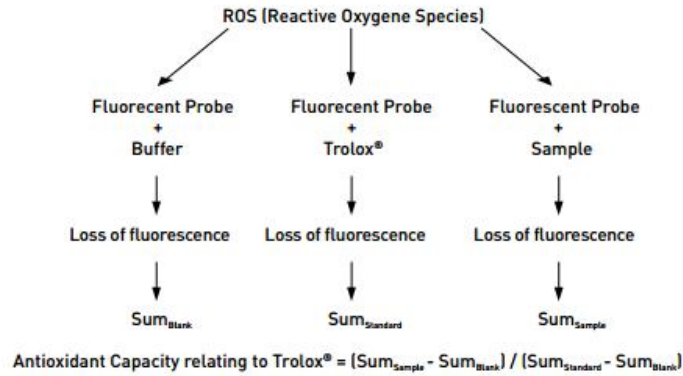


Fig 2. Fundamento del método ORAC.

Como se demuestra en la figura 3, la presencia de AAPH da lugar a una marcada pérdida de fluorescencia a lo largo del tiempo.

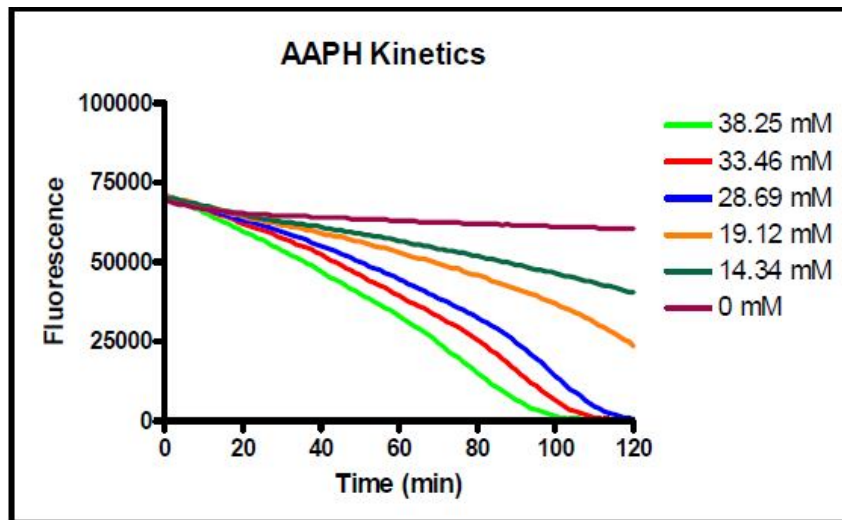


Figura 3. Descenso de la fluorescencia inducido por AAPH

Mientras que en las muestras que no contienen AAPH (0mM) la fluorescencia se mantiene relativamente estable en un periodo de 120 minutos, en las muestras con AAPH a una concentración superior a 28mM se observa una marcada pérdida en la fluorescencia. Además se observa que este efecto es dosis-dependiente. En nuestro estudio hemos utilizado una dosis constante de AAPH (60µL) en todas las muestras para poder comparar el efecto antioxidante a distintas concentraciones.

La pérdida de fluorescencia se puede evaluar midiendo el área bajo la curva (AUC) a cada concentración. Cuanto mayor es la pérdida de fluorescencia, menor es el valor de AUC.

La figura 4 representa la variación de la protección de la fluoesceína frente a la oxidación en función de la concentración de Trolox.

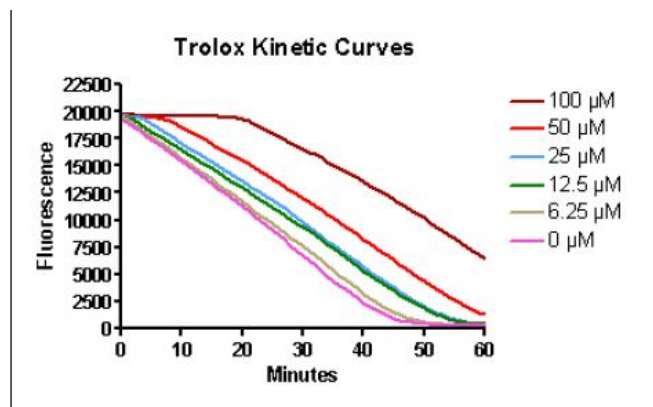


Figura 4. Curvas cinéticas del Trolox

A mayor concentración de Trolox, mayor es el AUC y por tanto, menor es la pérdida de fluorescencia de la fluoesceína.

La concentración más alta de Trolox (100μM) proporciona completa protección durante aproximadamente 20 minutos, antes de que la intensidad de la fluorescencia comience a disminuir.

Cuando el valor neto del AUC obtenido de cada una de estas curvas cinéticas se representa frente a su correspondiente concentración de Trolox, observamos que existe una adecuada correlación lineal (Figura 5).

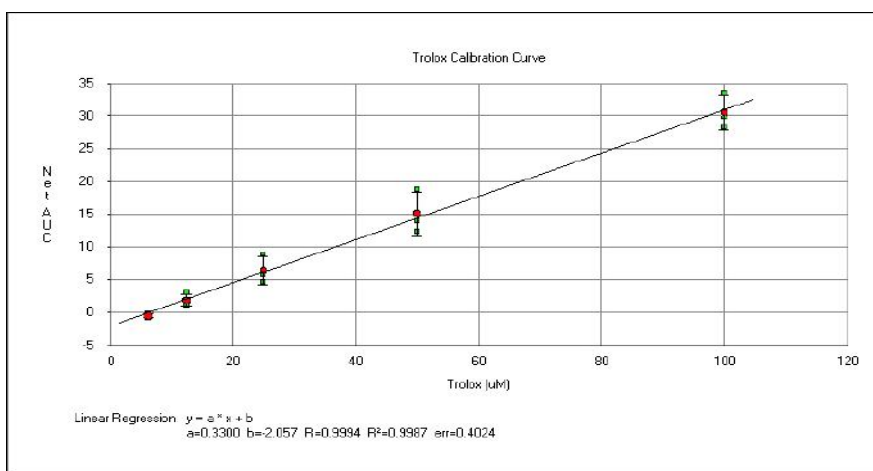


Figura 5. Curva estándar de Trolox.

Esta curva se puede usar por tanto, como patrón para extrapolar la capacidad antioxidante de muestras desconocidas (en nuestro estudio, muestras del extracto acuoso de las hojas jóvenes del *Sambucus ebulus* L.).

Material, equipos y Reactivos

- FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Offenburg, Germany
- Plate sealer, BMG LABTECH, Aylesbury, UK, Cat. No. 77400-05
- Thermostar, BMG LABTECH, Offenburg, Germany
- Microplaca Costar UV.
- Centrífuga
- Balanza analítica
- Matraz aforado y vaso de precipitados
- Pipetas, micropipetas y puntas.
- Ependorffs
- Agua destilada
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Solución buffer de Fosfato (PBS) 0.075 M (pH 7.4)
- Solución de Fluoresceína 116.66nM (Fluorescein sodium obtenido de Sigma-Aldrich)
- [2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)] obtenido de Sigma-Aldrich
- 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchroman-2-carboxylic acid (Trolox[®]) obtenido de Sigma-Aldrich
- Metanol R



Figura 6. FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Offenburg, Germany

Preparación del extracto acuoso:

Las hojas se trituraron con un molinillo y se realizó la extracción mediante un tampón compuesto por NaCl 0.28M y NaH₂PO₄ 5mM ajustado a pH 7.5. Posteriormente, el extracto resultante fue concentrado en un rotavapor a vacío hasta obtener un extracto sólido. Finalmente, el extracto sólido fue liofilizado mediante el liofilizador Telstar de la serie LyoQuest para eliminar completamente el disolvente.

Pesamos 0.002g del extracto liofilizado de las hojas jóvenes y añadimos 2000μL de solución buffer de fosfato (PBS) para obtener así la disolución madre a una concentración de 1mg/ml.

Inicialmente realizamos el experimento con esta disolución madre a la concentración de 1mg/ml; sin embargo, los resultados obtenidos fueron muy altos y no obtuvimos prácticamente ningún dato dentro de los valores marcados por la curva patrón del Trolox donde se cumplía linealidad. Por tanto, realizamos una dilución 1:4 de la disolución madre. Tomamos 250μL de la disolución madre y 750μL de PBS obteniendo así una concentración de 0,25mg/ml.

Preparación de reactivos que permiten conservación:

1. Solución buffer de fosfato (PBS) 0,075 M (pH 7.4)
 - Pesar 13,06 g de K₂ HPO₂ y llevar a 1 L de agua destilada (SOLUCIÓN A)
 - Pesar 2,59g de NaH₂PO₄*2H₂O y llevar a 250 mL con agua destilada (SOLUCIÓN B)
 - Mezclar 810mL de la SOLUCIÓN A con 190 mL de la SOLUCIÓN B hasta que el pH sea de 7,4
 - Conservar en nevera a 4°C
2. Preparación de Fluoresceína disodio (116,66nM)
 - Pesar 0,01097g de fluoresceína y se enrasa a 25mL con el tampón PBS (Solución Stock)
 - Conservar a 4°C durante un periodo máximo de 2 meses.

Preparación de reactivos diariamente

1. Preparación de la solución de fluoresceína
 - Tomar 100μL de la solución stock preparada y llevar a 10mL con PBS

- Tomar 250µL de la solución anterior y llevar a 25mL con PBS (esta es la solución empleada para el análisis diario)

2. Preparación del Trolox

- Pesamos 0.0127g de Trolox en un matraz de 50mL. Añadimos 1mL de metanol y enrasamos a los 50mL con PBS.
- Tomamos 1mL de la solución anterior y enrasamos a 10mL con PBS (solución T0 $2,54 \cdot 10^{-5}$ mg/ml). A partir de esta disolución, realizamos las correspondientes disoluciones en los ependorff por duplicado:
 - 800µL T0 + 200µL PBS (T8)
 - 700µL T0 + 300µL PBS (T7)
 - 600µL T0 + 400µL PBS (T6)
 - 500µL T0 + 500µL PBS (T5)
 - 400µL T0 + 600µL PBS (T4)
 - 300µL T0 + 700µL PBS (T3)
 - 200µL T0 + 800µL PBS (T2)
 - 100µL T0 + 900µL PBS (T1)

3. Preparación del AAPH

- Pesamos 0.10848g de AAPH y se lleva a 10mL con PBS. Siempre en oscuridad.

Preparación de disoluciones a partir de la disolución madre

Dilución	µL de PBS	µL de Disolución Madre
1:2 (M12)	100	100µL de disolución madre
1:4 (M11)	75	25µL de disolución madre
1:6 (M10)	250	50µL de disolución madre
1:10 (M9)	100	200µL de disolución 1:6
1:20 (M8)	100	100µL de disolución 1:10
1:40 (M7)	100	100µL de disolución 1:20
1:80 (M6)	100	100µL de disolución 1:40
1:100 (M5)	450	50µL de disolución 1:10
1:200 (M4)	100	100µL de disolución 1:100
1:400 (M3)	100	100µL de disolución 1:200
1:800 (M2)	100	100µL de disolución 1:400
1:1000 (M1)	450	50µL de disolución 1:100

Tabla 1. Disoluciones de las muestras.

En 12 ependorffs se prepararon 12 disoluciones distintas a partir de la disolución madre, para que su AUC neta esté dentro del rango del Trolox, aproximadamente entre 8 y 45.

Preparación de la microplaca Costar UV

C=Control: 80 μ L de PBS + 120 μ de fluoresceína (FL)

B= Blanco: 20 μ L de PBS + 120 μ de fluoresceína (FL) + 60 μ L de AAPH

Trolox: 20 μ L de Trolox (de las distintas concentraciones) + 120 μ de fluoresceína (FL) + 60 μ L de AAPH

Muestra: 20 μ L de Muestra (de las distintas concentraciones) + 120 μ de fluoresceína (FL) + 60 μ L de AAP



Figura 7: Microplaca Costar UV.

Se añadieron en los pocillos de la placa el volumen de PBS, Trolox o muestra y el volumen de fluoresceína. Las muestras se añadieron de la más diluida a la más concentrada. Posteriormente se llevó la placa a incubar al fluorímetro atemperado a 37°C durante 10 minutos. Durante estos 10 minutos, se preparó la disolución de AAPH en oscuridad. Pasados estos 10 minutos se añadió el AAPH para iniciar la reacción, excepto en los pocillos control. Finalmente, se introdujo la placa en el fluorímetro. La intensidad de la fluorescencia fue medida cada 2 minutos durante 2 horas con longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm, respectivamente.

Análisis de los datos

El proceso se repitió 7 veces y se lanzaron 7 placas. Todos los datos obtenidos fueron exportados a una plantilla de Excel previamente diseñada para analizar este

ensayo. El área bajo la curva (AUC) y el área neta bajo la curva (AUC) fueron calculadas con las siguientes ecuaciones:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i / f_0$$

$$\text{net AUC} = AUC_{\text{antioxidant}} - AUC_{\text{blank}}$$

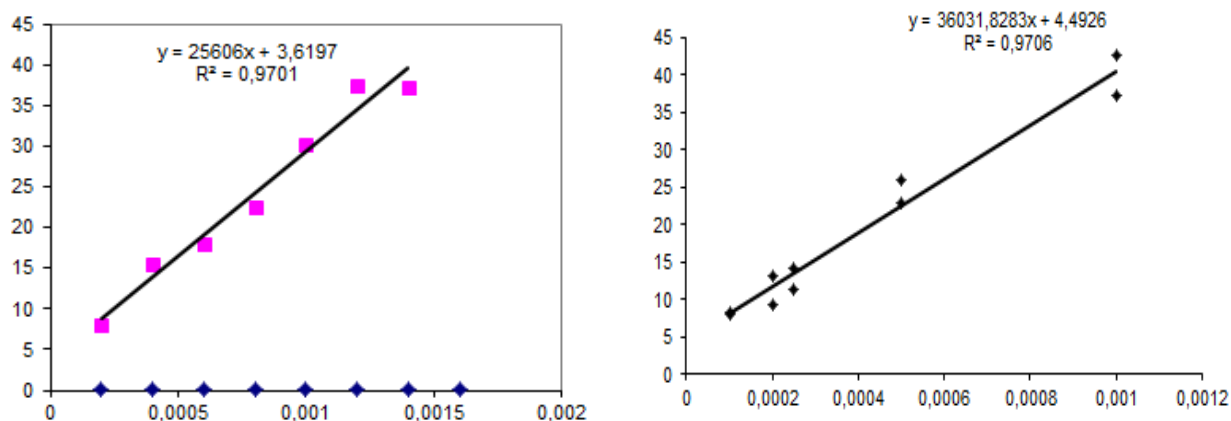
Donde f_0 es la fluorescencia inicial a tiempo 0 y f_i es la fluorescencia obtenida a tiempo i . La regresión lineal entre el valor neto del AUC y su correspondiente concentración fue calculada para todas las muestras y los resultados finales del ORAC fueron calculados utilizando la curva estándar de Trolox.

$$\text{ORAC} = \frac{\frac{AUC \text{ neta muestra}}{\text{Concentración muestra}}}{\frac{AUC \text{ neta Trolox}}{\text{Concentración Trolox}}} = \frac{\text{Pendiente de la muestra}}{\text{Pendiente de la curva estandar de Trolox}}$$

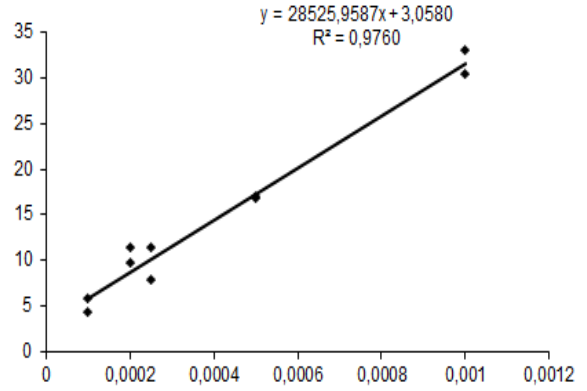
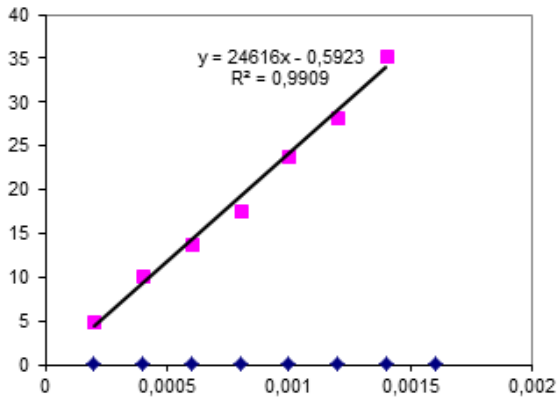
Los valores finales de ORAC se expresaron como equivalentes de Trolox (TE): mmol Trolox/100g peso fresco y el resultado final del estudio fue expresado como valor medio \pm la desviación estándar.

RESULTADOS.

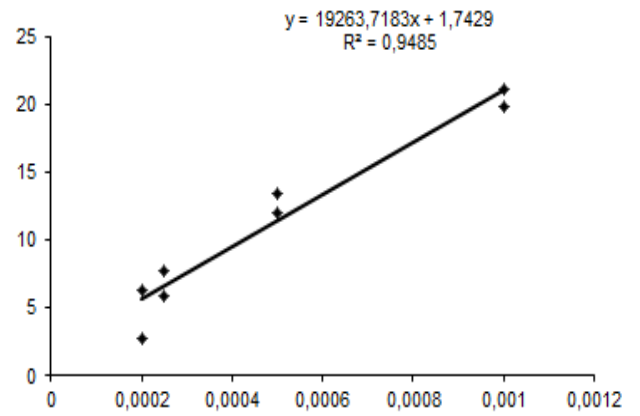
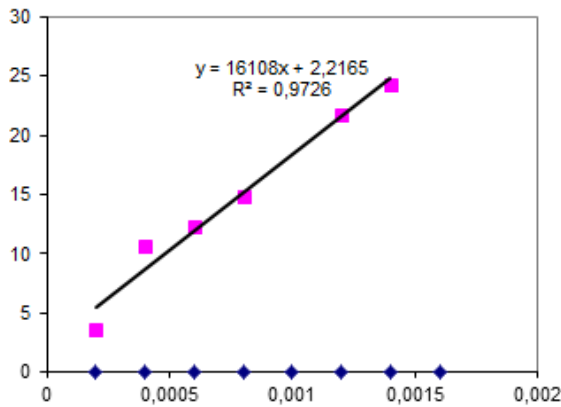
Obtuvimos 7 curvas estándar de Trolox, cada una con su correspondiente recta de las muestras.



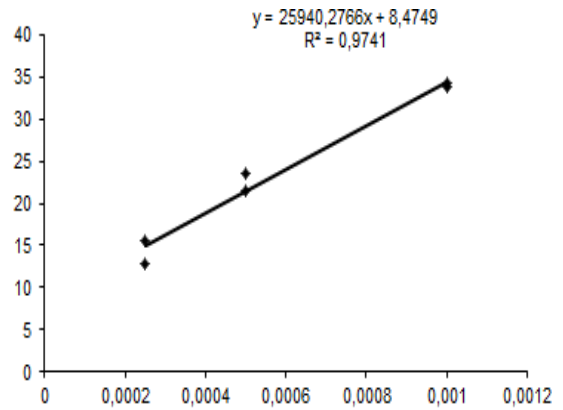
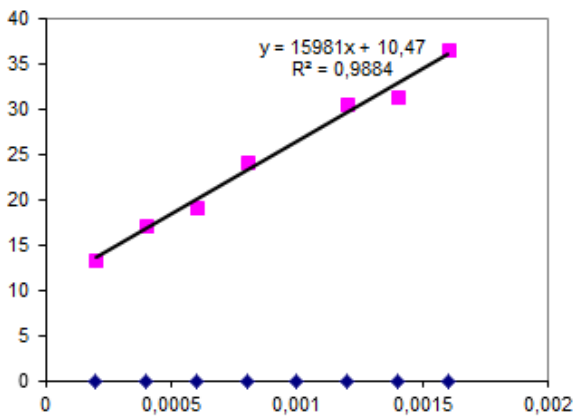
Gráfica 1. Curva de Trolox y Curva de las muestras de la placa 1. Rango entre 4 y 46.



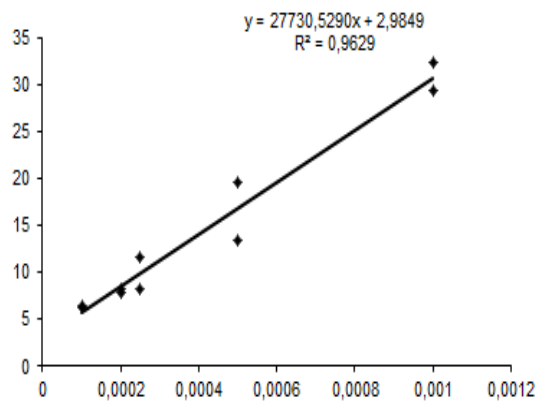
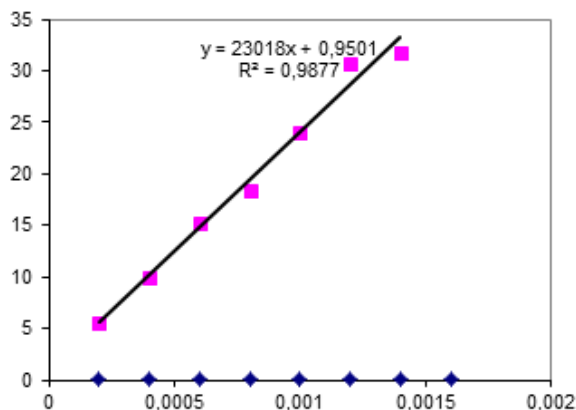
Gráfica 2. Curva de Trolox y Curva de las muestras de la placa 2. Rango entre 4 y 41.



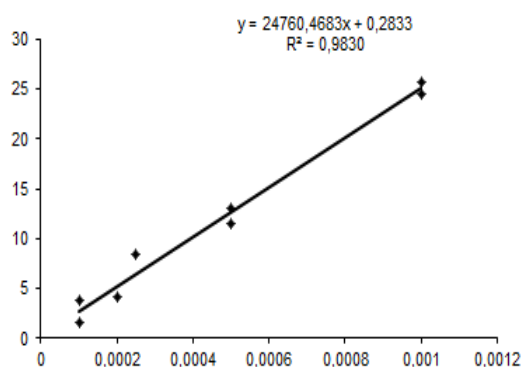
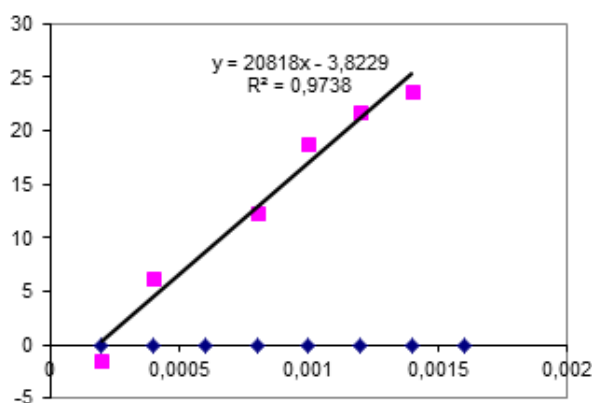
Gráfica 3. Curva de Trolox y Curva de las muestras de la placa 3. Rango entre 3 y 32



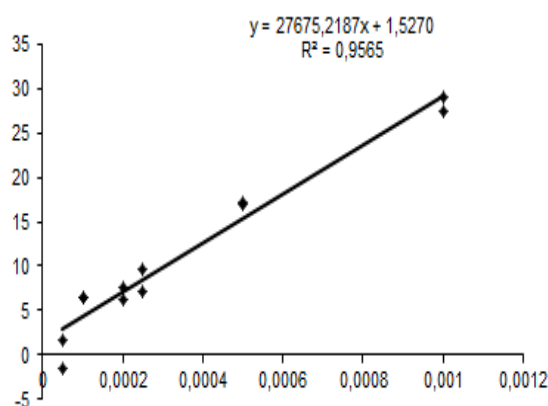
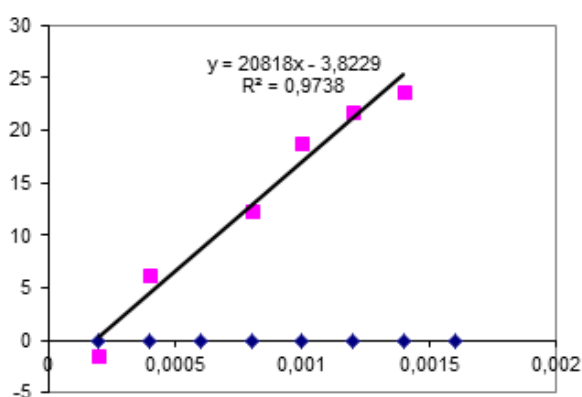
Gráfica 4. Curva de Trolox y Curva de las muestras de la placa 4. Rango entre 13 y 36.



Gráfica 5. Curva de Trolox y Curva de las muestras de la placa 5. Rango entre 5 y 38.



Gráfica 6. Curva de Trolox y Curva de las muestras de la placa 6. Rango entre 6 y 35.



Gráfica 7. Curva de Trolox y Curva de las muestras de la placa 7. Rango entre 6 y 35.

Todas las curvas estándar de Trolox obtenidas tuvieron un coeficiente de correlación lineal superior a 0,97, siendo la curva de la placa 2 la que tuvo el coeficiente

más próximo a 1. Todos los rangos de la curva estándar del Trolox que marcan dónde se cumple linealidad, estaban dentro de los recomendados (entre 8 y 45).

En todas las rectas en las que se representaron los datos netos del AUC de las muestras frente a su correspondiente concentración, el coeficiente de correlación lineal fue superior a 0,94. La recta con mejor coeficiente de correlación lineal fue la que se obtuvo en la placa n° 6.

Se obtuvieron 7 resultados de ORAC.

ENSAYO	VALORES ORAC HOJA JOVEN mmol TE/100 gr
PLACA 1	1,407
PLACA 2	1,159
PLACA 3	1,196
PLACA 4	1,623
PLACA 5	1,205
PLACA 6	1,189
PLACA 7	1,329
MEDIA	1,301 +/- 0,1552

Tabla 3. Resultados ORAC.

La media de los valores del ORAC fue de 1,301mmol TE/100g con una desviación estándar de 0,1552.

El valor más alto fue el obtenido en la placa 4 con un resultado de 1,623mmol TE/100g, seguido por el resultado de la placa 1 y 2 con valores de 1,407mmol TE/100g y 1,329mmol TE/100g respectivamente. El valor más bajo de ORAC fue el obtenido en la placa 2 (1,159mmol TE/100g). Todos los resultados fueron superiores a 1mmol TE/100g.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El método ORAC es un ensayo muy común y una herramienta muy útil para determinar la capacidad antioxidante de cualquier sustancia por comparación directa con la curva estándar de Trolox. Las ventajas de este método incluyen no solo la elevada sensibilidad de los métodos fluorescentes frente a los métodos

espectrofotométricos, sino también el hecho de que permite medir tanto el grado de inhibición como el tiempo de inhibición de la degradación de la fluoresceína. Los resultados obtenidos, con coeficientes de correlación lineal muy próximos a 1 y con una desviación estándar pequeña (0,1552) permiten confirmar que es un método muy sensible que ofrece una gran fiabilidad.

Los extractos acuosos de las hojas jóvenes de *Sambucus ebulus* L. presentan muy buena capacidad antioxidante (1,301mMol TE/100g), superior a la del Trolox. Estos datos se suman y se complementan con los del estudio de Miser-Salihoglu et al. (2013) donde también se comprueba la elevada capacidad antioxidante de las hojas de *S. ebulus*. El estudio de Miser-Salihoglu E. et al. evaluó además, el contenido en polifenoles de las hojas de *S. ebulus* y observó una buena correlación entre este contenido y la actividad antioxidante.

Este estudio proporciona apoyo experimental de los beneficios de utilizar las hojas de esta planta con fines antiinflamatorios, puesto que la acción antioxidante adicional de los polifenoles es fundamental para evitar complicaciones en estados de inflamación crónica. En vista de la implicación del estrés oxidativo en la patogénesis de enfermedades crónicas inflamatorias, sería lógico considerar a la terapia antioxidante como un nuevo enfoque para neutralizar este incremento en el estrés oxidativo. Estudios epidemiológicos han establecido una relación beneficiosa entre el consumo de polifenoles y una disminución en el riesgo de muchas enfermedades; atribuyendo los efectos clínicos beneficiosos tanto a su poder antioxidante como a sus propiedades antiinflamatorias (17).

Por tanto, la evidencia de la elevada actividad antioxidante de las hojas de *Sambucus ebulus* L. y su alto contenido en polifenoles y flavonoides como componentes responsables de esta acción antioxidante y antiinflamatoria, abre la puerta para posteriores estudios farmacológicos *in vivo* que evalúen el uso de *Sambucus ebulus* L. como nueva fuente de antioxidantes y sus beneficios en la salud humana.

Puesto que varios estudios han estudiado y comprobado la capacidad antioxidante de flores y frutos de *S. ebulus* L. (9,13,14), sería interesante realizar investigaciones donde se comparara la capacidad antioxidante de las flores y los frutos con los extractos acuosos de las hojas jóvenes, con el fin de determinar cuáles son los

órganos de la planta que presentan mayor interés desde el punto de vista de su actividad farmacológica.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Khansari N, Shakiba Y and Mahmoudi M. Chronic Inflammation and Oxidative stress as a Major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 2009, 3, 73-80.
- 2- Miser-Salihoglu E, Akaydin G, Caliskan-Can E y Yardim-Akaydin S. Evaluation of antioxidant activity of various herbal folk medicines. *J Nutr Food Sci* 2013. Vol 3:222
- 3- Eva Gimeno Creus. Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm.* 2004. Vol 23. N°6. 23:80-4.
- 4- Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat Prod* 63: 1035-1042
- 5- Quiñones M., Miguel M. y Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2012; 27(1):76-89.
- 6- M. Shokrzadeh and S.S. Saeedi Saravi. The chemistry, pharmacology and clinical properties of *Sambucus ebulus*: A review. *J. Med. Plant. Res.* 2010. Vol. 4(2), pp. 095-103.
- 7- Ezequiel Basterrechea Elizgaray J. Capacidad antioxidantes y antirradicalaria, y nuevas lectinas SELblo y ebulina blo presentes en las inflorescencias del sauco enano (*Sambucus ebulus* L). *P. Jimenez López, D. Córdoba Díaz, T. Girbés Juan. Tesis doctoral. 2013
- 8- Tasinov O., Kiselova-Kaneva Y., Ivanova D.. *Sambucus Ebulus*-from traditional medicine to recent studies. *Scripta Scientifica Medica*, 2013. Vol. 45 No 2, pp. 36-42.
- 9- Ebrahimzadeh M.A., Mahmoudi M, Karami M, Saeedi S, Ahmadi A.H., et al. Separation of active and toxic portions in *Sambucus ebulus*. *Pak J Biol Sci* 2007. 10: 4171-4173
- 10- Ahmadiani A, Fereidoni M., Semnianian S, Kamalinejad M, Saremi S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Sambucus ebulus* rhizome extract in rats. *J Ethnopharmacol* 1998 61: 229-235
- 11- Ghannadi A.R, Ghassemi-Dehkordi N. Pharmacognostical Investigations on *Sambucus ebulus* L. and *Sambucus nigra* L. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 1997. 7:55.

- 12- Ruiz Téllez t., Devesa J.A. CLV. Caprifoliaceae-Sambuaceae. Flora Iberica (revista en Internet) 1994 (acceso 9 de Junio de 2015) Vol XV(3). Disponible en http://www.floraiberica.es/PHP/familias_lista_.php?familia=Caprifoliaceae.
- 13- Ebrahimzadeh M.A., Nabavi S.F. and Nabavi S.M. Antioxidant Activities of methanol extract of *Sambucus ebulus* L. flower. Pak. J. Biol. Sci. 2009. 12(5): 447-450.
- 14- Ebrahimzadeh, M.A., F. Purnorad, A.R. Bekhradnia. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. Afr. J. Biotechnol, 7, 2008 No 18, 3188-3192.
- 15- Ebrahimzadeh, M.A., Enayatifard R., Khalili M., Ghaffarloo M., Saeedi M. and Charati J.Y. Correlation between Sun Protection Factor an Antioxidant activity, Phenol and Flavonoid Contents of some Medicinal Plants. IJPR, 2014. 13(3):1041-1047.
- 16- Tasinov O, Kiselova-Kaneva Y, Ivanova D. Antioxidant activity, total polyphenol content and anthocyanins content of *Sambucus ebulus* L. aqueous and aqueous-ethanolic extracts depend on the type and concentration of extragent. Science & Technologies. 2012 Vol II. 37-41.
- 17- Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. Pharmacology & Therapeutics 111. 2006 476-494.
- 18- Ganske F, Dell E.J. ORAC Assay on the FLUOstar OPTIMA to determine antioxidant Capacity. BMG LABTECH. Application Note 148. Rev. 12/2006.
- 19- Rojano B.A., Zapata Acosta K., Cortes Correa F.B. Capacidad atrapadores de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey (curuba). Rev Cubana Plant Med. 2012 Vol 17 n° 4. 17(4): 408-419.
- 20- Held P. Performing Oxygen Radical Absorbance Capacity Assays with SynergyTMHT. Bio Tek Instrumentes. Highland Park, Winooski, Vermont USA. Última Rev 08/15/05. Disponible en www.biotek.com