



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

**Departamento de Biología Celular, Histología y
Farmacología**

TESIS DOCTORAL

**“Capacidad antioxidante y antirradicalaria, y nuevas
lectinas SELblo y ebulina blo presentes en las
inflorescencias del saúco enano (*Sambucus ebulus* L)”**

Presentada por *José Ezequiel Basterrechea Elizgaray* para
optar al grado de doctor por la **Universidad de Valladolid**

Dirigida por: Dña. Pilar Jiménez López,
D. Damián Córdoba Díaz y Tomás Girbés Juan

D. Tomás Girbés Juan, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, Dña. Pilar Jiménez López, Profesora contratada Doctor de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y D. Damián Córdoba Díaz, Profesor Ayudante Doctor de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, directores de esta Tesis Doctoral certifican que el trabajo realizado por D. José Ezequiel Basterrechea Elizgaray puede ser presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid.

Valladolid, a 17 de Junio de 2013

Fdo.: Pilar Jiménez López

Fdo.: Damián Córdoba Díaz

Fdo.: Tomás Girbés Juan

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi agradecimiento a los profesores D. Tomás Girbés Juan, D^a Pilar Jiménez López, D. Damián Córdoba Díaz, por la dirección de esta Tesis Doctoral, por sus enseñanzas y por su amistad.

Agradezco la generosa ayuda en todo momento de mis compañeros de laboratorio Patricia Cabrero y Jesús Tejero.

Agradezco las enseñanzas y el apoyo de los profesores D. Manuel Gayoso, D. Salvador Hernández y D. Luís Alberto Bailón.

Quiero manifestar también mi agradecimiento al Sr. Gerente de la Universidad de Valladolid D. José Antonio Antona Montoro, por su inestimable apoyo.

En el recuerdo a Fabián de la Calle y Jesús Mingorance.

A Begoña, Gotzone, Iñaki, Maite, María Torre y Pilar.

A todos muchas gracias

Sagrada Biblia. Antiguo Testamento.
Ezequiel 47:12. "Sus frutos servirán para
comida, y sus hojas para medicina."

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.

Pilar Jiménez, Manuel Gayoso, Jesús Tejero, Patricia Cabrero, Damián Córdoba Díaz, José E. Basterrechea and Tomás Girbés. Toxicity in mice of lectin ebulin f present in dwarf elderberry (*Sambucus Ebulus L.*). **Toxicon**, 61, 26-29 (2013).

Pilar Jiménez, Jesús Tejero, Patricia Cabrero, José E. Basterrechea, Damián Córdoba and Tomás Girbés. Sensitivity of dwarf elder (*Sambucus ebulus L.*) fruit lectins to a simulated gastric fluid. **The FEBS Journal**, 279, 567 (2012).

Jesús Tejero, Pilar Jiménez, Patricia Cabrero, José E. Basterrechea, Damián Córdoba and Tomás Girbés. Toxicity of the type 2 ribosome-inactivating protein from dwarf elder (*Sambucus ebulus L.*) fruit on mice. **The FEBS Journal**, 279, 568 (2012)

Pilar Jiménez, José E. Basterrechea, Damián Córdoba Díaz, Patricia Cabrero, Jesús Tejero, and Tomás Girbés. Effects of heat on total polyphenols, antioxidant activity, anthocyanidins and lectin digestibility of dwarf elder fruits (*Sambucus ebulus L.*). **Plant Foods for Human Nutrition**, en preparación (2013).

Pilar Jiménez, Jesús Tejero, Patricia Cabrero, José E. Basterrechea, Damián Córdoba Díaz and Tomás Girbés. Oral administration of single oral bolus of concentrated green tea extract promoted delayed lethal toxicity in mice treated with sublethal ebulin f. **Food and Chemical Toxicology**, en preparación (2013).

COMUNICACIONES A CONGRESOS.

Damián Córdoba, Pilar Jiménez, Patricia Cabrero, Jesús Tejero, José E. Basterrechea y Tomás Girbés. Influencia de la administración de ebulina f a ratones en la absorción de vitamina C. **II Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria (ACOFESAL)**. Madrid, 19-21 junio de 2013.

Patricia Cabrero, Pilar Jiménez, Jesús Tejero, José E. Basterrechea, Damián Córdoba y Tomás Girbés. Efecto del calor sobre la sensibilidad a pepsina de las lectinas de los frutos del saúco enano (*Sambucus ebulus L.*). **II Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria (ACOFESAL)**. Madrid, 19-21 junio de 2013.

Pilar Jiménez, Patricia Cabrero, Jesús Tejero, José E. Basterrechea, Damián Córdoba y Tomás Girbés. Toxicidad de una nueva lectina (ebulina blo) aislada de las inflorescencias de *Sambucus ebulus L.* **II Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria (ACOFESAL)**. Madrid, 19-21 junio de 2013.

José E. Basterrechea, Damián Córdoba, Pilar Jiménez, Jesús Tejero, Patricia Cabrero y Tomás Girbés. Termosensibilidad de los fenoles y de la actividad antioxidante y antirradicalaria de los frutos de *Sambucus ebulus L.* **II Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria (ACOFESAL)**. Madrid, 19-21 junio de 2013.

Patricia Cabrero, Jesús Tejero, Pilar Jiménez, José E. Basterrechea, Damián Córdoba y Tomás Girbés. Efecto del calor sobre la sensibilidad a pepsina de las lectinas del saúco (*Sambucus nigra* L.). **XXXVI Congreso SEBBM** Madrid, 3-6 de septiembre de 2013. Presentado. P06r-5

Pilar Jiménez, Patricia Cabrero, Jesús Tejero, José E. Basterrechea, Damián Córdoba y Tomás Girbés. Aislamiento y caracterización molecular de dos nuevas lectinas específicas de D-galactosa de las flores de *Sambucus ebulus* L. **XXXVI Congreso SEBBM**. Madrid, 3-6 de septiembre de 2013. Presentado. P06-5

Tomás Girbés, José E. Basterrechea, Damián Córdoba, Pilar Jiménez, Patricia Cabrero, Jesús Tejero. Sensibilidad al calor de los fenoles y de la actividad antioxidante de los frutos de *Sambucus nigra* L. **XXXVI Congreso SEBBM**. Madrid, 3-6 de septiembre de 2013. Presentado. P8-15

FINANCIACIÓN.

Los proyectos de investigación que han financiado en parte el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral han sido:

Grupo de excelencia GR106. Organismo financiador: Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León. Centro de Ejecución: Univ. Valladolid. Investigador Principal: Tomás Girbés. Título: "Nigrina b e inmunotoxinas antitumorales: actividad sobre el desarrollo de los adenomas intestinales en los ratones APCMin". Periodo: 2008-2010.

Organismo financiador: Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León. Centro de Ejecución: Fac. Medicina Univ. Valladolid. Investigador Principal: Tomás Girbés. Título: "Investigación de las inmunotoxinas para la terapia del cáncer". Periodo: 2009-2012.

Grupo de Investigación reconocido GIR "Inmunotoxinas antitumorales". Organismo financiador: Universidad de Valladolid. Centro de Ejecución: Facs. Medicina y Ciencias Univ. Valladolid. Investigador Principal: Tomás Girbés. Periodo: 2009-2012.

ABREVIATURAS.

A. Absorbancia.

Å. Angström.

A₂₃₀. Absorbancia a 230 nanómetros.

A₂₆₀. Absorbancia a 260 nanómetros.

A₃₂₀. Absorbancia a 320 nanómetros.

A₅₁₀. Absorbancia a 510 nanómetros.

A₇₀₀. Absorbancia a 700 nanómetros.

aC. Antes de Cristo.

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

AINES. Antiinflamatorios.

AMT. Antocianidinas monoméricas totales.

AP. Ápices.

ARN. Ácido Ribonucleico.

ARNr. Ácido Ribonucleico ribosómico.

ARNt. Ácido Ribonucleico de transferencia.

ATP. Adenosín trifosfato.

BR. Brotes.

BSA. Seroalbúmina bovina.

° C. Grado centígrado.

CA. Capacidad antioxidante.

CAT. Catalasa.

CT26. Células de carcinoma de colon.

Co-A. Coenzima A.

Cols. Colaboradores.

COX. Ciclooxygenasa.

COX-2. Ciclooxygenasa-2.

CUPRAC. Reducción del ión Cobre actividad antioxidante.

Da. Dalton.

DE. Desviación estándar.

DTT. Ditionitrosol.

DPPH. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

DOPPH. 2, 2-Di (4-Tert-Octylphenyl) -1- picrylhydrazyl.

equiv. Equivalentes.

FD. Factor de dilución.

Fig. Figura.

FL. Flores.

FM. Frutos maduros.

FV. Frutos verdes.

FVP. Frutos verdes pequeños.

g. Gramo.

GSH-Px. Glutación peroxidasa.

GDP. Guanosín difosfato.

GTP. Guanosín trifosfato.

HM. Hojas maduras.

HPLC. Cromatografía líquida de alta eficacia.

IC₅₀. Concentración de proteína que inhibe el crecimiento del 50% de la población celular.

HepG2. Células de hepatocarcinoma.

kD. KiloDalton.

Kg. Kilogramo.

LIR. Lectinas Inactivadoras de Ribosomas.

M. Molar.

m². Metro cuadrado.

mA. Miliamperios.

ml. Mililitros.

mg/Kg. miligramos por Kilo.

mg/l. miligramos por litro.

ml/min. Mililitro por minuto.

mM. Milimolar.

nm. Nanómetros.

PAGE. Polyacrylamide gel electrophoresis.

PBS. Tampón fofato salino.

pH. Medida de la acidez o la alcalinidad de una disolución.

PH. Peso húmedo.

Pm. Peso molecular.

PVDF. Polivinilfluoruro.

ppm. Partes por millón.

PUFA. Ácidos grasos poliinsaturados.

p/v. Peso por volumen.

O. Oeste.

RLs. Radicales libres.

RIP. Proteína inhibidora de ribosomas.

ROS. Especies reactivas de oxígeno.

rpm. Revoluciones por minuto.

S. Sambucus.

SOD. Superóxido dismutasa.

SDS. Dodecilsulfato sódico.

TEMED. Tetrametiletildiamina.

TRIS. Hidroximetil aminometano.

TROLOX. 6-Hidroxi-2, 5,7, 8-tetrametilcromano-2-carboxilco ácido.

UCM. Universidad Complutense de Madrid.

UFM. Umbelas de frutos maduros.

UFV. Umbelas de frutos verdes.

VIH. Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

v/v. Volumen por volumen.

µg. Microgramos.

µl. Microlitros.

µm. Micrómetros.

µmoles. Micromoles.

ε. Coeficiente de extinción molar.

%. Tanto por ciento.

ÍNDICE

	págs
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. Introducción	17
1.2. Breve reseña histórica	19
1.3. Composición química del <i>S. ebulus</i>	20
1.4. Utilidad de <i>S. ebulus</i> en Fitoterapia	21
1.4.1. Efecto antiinflamatorio	21
1.4.2. Efecto antibacteriano contra <i>Helicobacter pylori</i>	22
1.4.3. Efectos bioquímicos y patológicos	22
1.4.4. Efecto antioxidante del <i>S. ebulus</i>	23
1.5. Compuestos fenólicos	24
1.5.1. Fenoles simples	25
1.5.1.1. Fenilpropanoides simples	25
1.5.1.2. Lactonas fenilpropanoides o ésteres cíclicos	26
1.5.1.3. Derivados del ácido benzoico	26
1.5.2. Fenoles complejos	26
1.5.3. Antocianos	27
1.6. Toxicidad del saúco	30
1.7. Proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs: ribosome inactivating proteins)	31
1.7.1. Lectinas antirribosómicas de <i>S. ebulus</i>	32
1.7.2. Toxicidad de ebulina en ratones	33
1.7.3. Lectinas no antirribosómicas	34
1.8. Etapa de la biosíntesis de proteínas afectada por ebulina	35
1.9. Mecanismo de acción molecular de ebulina I	37
1.10. Variación estacional de las lectinas de <i>Sambucus</i>	38

1.11.	Estructura de ebulina I	39
1.11.1.	Secuencia aminoacídica de ebulina I	39
1.12.	Tránsito intracelular de las lectinas antirribosómicas de <i>S. ebulus</i>	41
1.13.	Utilización de la ebulina en la construcción de conjugados e inmunotoxinas contra blancos celulares implicados en el cáncer	44
1.14.	Inmunotoxinas antivasculares contra los tumores	45
1.15.	Conjugados con transferrina contra células tumorales	46
2.	OBJETIVOS	47
2.1.	Objetivos	48
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1.	Material de laboratorio	50
3.1.1.	Equipos	50
3.1.2.	Material fungible	51
3.1.3.	Reactivos químicos	52
3.1.4.	Materiales biológicos	55
3.1.4.1.	Vegetales	55
3.1.4.2.	Animales de experimentación	55
3.2.	Métodos	56
3.2.1.	Obtención de extractos	56
3.2.2.	Método de Folin – Ciocalteu	58
3.2.3.	Método de CUPRAC	60
3.2.4.	Método del radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)	61
3.2.5.	Método del pH diferencial	62

3.2.6.	Cromatografía líquida de alta resolución para la determinación del contenido en cianidín-3-glucósido en extractos de <i>S. ebulus</i>	63
3.2.6.1.	Aparato	63
3.2.6.2.	Sistema de bombeo	64
3.2.6.3.	Inyectores	64
3.2.6.4.	Fases estacionarias	65
3.2.6.5.	Fases móviles	66
3.2.6.6.	Detectores	67
3.2.6.7.	Método	68
3.2.7.	Preparación de los extractos para electroforesis	71
3.2.8.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	71
3.3.	Purificación de proteínas de inflorescencia de <i>S. ebulus</i>	73
3.3.1.	Preparación del extracto crudo de inflorescencias de <i>S. ebulus</i>	73
3.3.2.	Preparación de Sepharose 6B tratada con ácido (AT-Sepharose 6B)	74
3.3.3.	Cromatografía de afinidad a través de AT-Sepharose 6B.	74
3.3.4.	Cromatografía de exclusión molecular a través de Superdex 75 HiLoad 26/60	76
3.3.5.	Medida de la concentración de proteínas por el método de Kalb&Bernlohr	77
3.3.6.	Determinación de la masa molecular de ebulina blo y SELblo por espectrofotometría de masas	78
3.3.7.	Identificación de proteínas por espectrofotometría de masas y análisis de secuencias de péptidos trípticos	78
3.4.	Toxicidad en ratones	80
3.5.	Análisis estadístico	80

4. RESULTADOS	82
4.1. Partes del <i>S. ebulus</i> utilizadas	83
4.2. Determinación de los fenoles totales con el reactivo de Folin – Ciocalteau	84
4.3. Determinación de la capacidad antioxidante (CA) por el método de CUPRAC	86
4.4. Determinación de la capacidad antirradicalaria con DPPH	89
4.4.1. Comparación de la reactividad de radicales libres DOPPH y DPPH frente a Trolox	89
4.4.2. Medida de la capacidad antirradicalaria (AR). Recta patrón del radical DPPH 0,1mM frente a Trolox 1mM	92
4.5. Medida de las antocianinas por el método diferencial de pH	94
4.6. Medida de la degradación por temperatura de los fenoles totales de la capacidad antioxidante y de las antocianidinas de los frutos verdes y maduros de <i>S. ebulus</i>	95
4.6.1. Medida de la degradación de por temperatura de los fenoles totales en frutos maduros y frutos verdes de <i>S. ebulus</i> por el método de Folin – Ciocalteau	95
4.6.2. Medida de la pérdida de capacidad oxidante por temperatura en frutos maduros y frutos verdes de <i>S. ebulus</i> por el método de CUPRAC	99
4.6.3. Medida de la pérdida de la capacidad antioxidante por temperatura en frutos maduros y frutos verdes en <i>S. ebulus</i> por el método del radical del DPPH	101

4.6.4.	Correlación entre los tres métodos: Folin – Ciocalteau, CUPRAC y radical DPPH en frutos maduros y frutos verdes	104
4.6.5.	Medida de la degradación de antocianidinas por la degradación de frutos maduros de <i>S. ebulus</i> por el método diferencial de pH	105
4.7.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los diferentes extractos de <i>S. ebulus</i>	107
4.7.1.	Determinación de cianidín-3-glucósido en los extractos de las distintas partes de <i>S. ebulus</i>	107
4.7.2.	Análisis semicuantitativo de los extractos de <i>S. ebulus</i>	112
4.7.3.	Influencia del tiempo de cocción en el contenido en cianidín-3-glucósido en extractos de frutos maduros de <i>S. ebulus</i>	118
4.8.	Electroforesis en geles de poliacrilamida de extractos crudos de las diferentes partes de <i>S. ebulus</i>	122
4.9.	Aislamiento y caracterización de las lectinas presentes en las inflorescencias de <i>S. ebulus</i>	125
4.9.1.	Aislamiento y purificación de las lectina de las Inflorescencias de <i>S. ebulus</i>	126
4.9.2.	Caracterización molecular de las lectinas de las Inflorescencias de <i>S. ebulus</i>	129
4.9.3.	Análisis de la masa molecular por espectrometría de masas de las lectinas ebulina blo y SELblo de extractos de flores de <i>S. ebulus</i>	129
4.10.	Efecto de la administración por vía nasal de ebulina blo a ratones Swiss	134
4.11.	Representaciones de Kaplan-Meier de la supervivencia	136

de ratones Swiss a ebulina blo nasal

5. DISCUSIÓN	138
6. CONCLUSIONES	149
7. BIBLIOGRAFÍA	153

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. INTRODUCCIÓN.

Sambucus ebulus L., cuyo nombre común es yezgo o saúco enano, es una planta perenne nativa de la División de las *magnoliófitas*, Clase *magnoliopsidas*, del Orden de las *Dipsacales*, de la Familia de las *Sambucaceae* y del Género *Sambucus*. Se localiza principalmente en el sur y centro de Europa, el noroeste de África y el suroeste de Asia (especialmente en el norte de Irán). El género *Sambucus* reúne más de 40 especies. Las principales especies son *S. ebulus*, *S. nigra*, *S. racemosa*, *S. mexicana*, *S. peruviana*, *S. palmensis* y *S. africana*, entre otras.

S. ebulus crece alrededor de 60 a 200 cm de altura, por lo general los tallos no están ramificados, tienen un amplio rizoma. Las hojas son opuestas, pinnadas, de 15 a 30 cm de largo, con 5-9 cm de anchura y finamente dentadas y lobuladas. Los tallos terminan en un corimbo (inflorescencia en la que el eje es corto y los pedicelos de las flores son largos y salen a diferentes alturas del eje). Todas las flores del corimbo abren a un mismo nivel, el tamaño es de 10 - 15 cm de diámetro con numerosas flores blancas (a veces color rosa).

El fruto es una pequeña baya de color negro brillante que tiene entre 5 - 6 mm de diámetro. Las flores de *S. ebulus* aparecen en julio y agosto, sus semillas maduran entre agosto y septiembre y desaparecen en invierno. Tienen rizomas subterráneos para formar grandes colonias. Las flores perfumadas son autofértiles y hermafroditas y son polinizadas por diferentes insectos como las abejas y escarabajos.

La planta prefiere la luz media y los suelos arcillosos y ácidos. También puede tolerar la contaminación atmosférica y el viento fuerte, pero no un ambiente marítimo.

En la provincia de Valladolid el *S. ebulus* es escaso, fue citado por Gutiérrez Martín (1908) en el partido judicial de Olmedo. Está descrita su localización en Barruelo del Valle (Fig. 1) a 810 m de altura en los alrededores frescos y umbrosos de la iglesia del pueblo (“Nuevas citas para la flora vallisoletana II”. Lázaro Bello J.A. 2002 y Herbario de la facultad de Biología de Salamanca).



Figura 11. Flores de *S. ebulus*.

Durante mucho tiempo, *S. ebulus* ha sido utilizado en medicina para el tratamiento de distintas enfermedades de naturaleza inflamatoria, por ejemplo, reumatismo, fiebre, infecciones, edemas o inflamaciones. En la antigua medicina oriental, sus hojas, rizomas (es un tallo subterráneo con varias yemas que crece de forma horizontal emitiendo raíces y brotes herbáceos de sus nudos) y raíces se administraron a los pacientes para el tratamiento de la picadura de abeja, picaduras de ortigas, la artritis y el dolor de garganta (Saeede Saravi y cols., 2009a). Esta planta también tiene otros usos, por ejemplo, para teñir el cabello con el jugo de la raíz, y las hojas se utilizan para repeler los ratones y topos (Duke y cols., 2002; Davis, 1988; Rechinger, 1963; Tutin, 1980).

Por otra parte, las bayas crudas son venenosas y todas las partes de la planta pueden ser tóxicas si se consumen en exceso. Las hojas y tallos de algunos, si no todos, los miembros de género *Sambucus* son algo tóxicos.

Incluso las hojas pueden causar dermatitis de contacto. *S. ebulus* contiene una diversidad de compuestos que incluye glucósidos cianogénicos, flavonoides, esteroides, taninos, glucósidos, derivados del ácido cafeico, y distintos tipos de lectinas y proteínas inactivadoras de ribosomas como ebulina l y ebulina f, SELld y SEL fd entre otras (Shokrzadeh y cols, 2010; Ebrahimzadeh y cols., 2006, 2007, 2009; Yesilada., 1995; Ghannadi y Ghassemi Dehkordi., 1997; De Benito y cols., 1995; Pribela y cols., 1992).

Los estudios farmacéuticos realizados con *S. ebulus* indican que posee actividades antiinflamatorias, antirreumatoides, antihemorroidales, y que posee efecto inhibitor contra *Helicobacter pylori*. Además, se han observado los efectos de esta planta en el tratamiento de quemaduras, heridas infecciosas, edemas, eccemas, y urticaria (Saeede Saravi y cols., 2009b; Ebrahimzadeh y cols., 2006, 2007; Tuzlaci y Tolón., 2000; Yesilada y cols., 1999; Guarrera., 1999). *S. ebulus* es por tanto una planta de gran potencial como medicamento, si tenemos en cuenta sus aplicaciones tradicionales, así como los recientes hallazgos en los diferentes estudios farmacológicos.

1.2. BREVE RESEÑA HISTÓRICA.

Diferentes estudios han descubierto evidencias de que 50.000 años aC, los seres humanos utilizaban las hojas de las plantas para dar sabor a las carnes. El análisis de los conjuntos arqueobotánicos recuperados en las excavaciones recientes en los Alpes del norte de Francia en "Le Chenet des Pierres" en Bozel (Savoie, Francia, 1.000 m sobre el nivel del mar) han permitido conocer las plantas que se utilizaban probablemente como alimento en un contexto de montaña durante el Neolítico Medio (4500-3500 aC) (Martin y cols., 2008). El estudio revela la presencia de semillas de

saúco negro (*Sambucus nigra*), de saúco rojo (*Sambucus racemosa*) y yezgo (*S. ebulus*) (Martin y cols., 2008; Rottoli y cols., 2009).

Hipócrates y Dioscórides describieron en sus tratados al saúco como una importante planta de uso medicinal. Los dacios y los romanos utilizaban sus remedios contra la hidropesía, la gota, las mordeduras de serpiente y como purgante.

En Europa está documentado el uso del saúco como planta medicinal desde muy antiguo, en el siglo XII se escribió “The Physicians of the Myddavai”, tratado que recoge los conocimientos tradicionales sobre las curas y remedios que se preparaban a base de saúco en la zona de Gales desde del siglo VI.

En 1651 el doctor alemán Blockwich publicó “Anatomía Sambuca”, tratado escrito en latín en donde se recoge una serie de hasta 70 enfermedades que pueden ser tratadas con remedios preparados a base de saúco. Este tratado será posteriormente traducido al inglés y publicado en Londres en 1655. En esta misma época el doctor Culpe en Inglaterra hacía referencia al saúco como “la medicina del tórax de la medicina popular”.

1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *S. EBULUS*.

Los compuestos fitoquímicos de *S. ebulus* más comúnmente conocidos son los flavonoides, esteroides, taninos, glucósidos, los derivados del ácido cafeico, y las lectinas de hojas, frutos y rizomas (Saeedi Saravi y cols., 2009a; Ebrahimzadeh y cols., 2006, 2007; Ghannadi y Ghassemi-Dehkordi., 1997; De Benito y cols., 1995; Yesilada., 1995; Pribela y cols., 1992). Los glucósidos cianogénicos *S*-sambunigrina y *R*-prunasina, así como la *R*-holocalina y la *S*-zierina se han aislado de *S. ebulus* y de los frutos se han aislado también *S*-sambunigrina y *S*-O-β-DGlucopyranosil-

mandelonitrilo). Las hojas y tallos contienen también *S*-sambunigrina (Buhrmester y cols., 2000; Jensen y Nielsen., 1973).

Las flores de *S. ebulus* contienen un 0,03 a 0,3% de un aceite esencial (aproximadamente el 0,01% de las bayas es aceite esencial) que contiene esencialmente ácidos grasos libres y un gran número de alcanos. También contienen al menos un 0,8% de flavonoides, además de ácido cafeico y sus derivados, incluyendo el ácido clorogénico y el ácido *p*-cumárico y el ácido quínico, y un glucósido denominado ebulosid (Rhee y cols., 2009; Bonita y cols., 2007; Bouayed y cols., 2007; Medina y cols., 2007).

El yezgo contiene proteínas con actividad antinutriente tales como lectinas y proteínas inactivadoras de ribosomas, estas últimas con actividad tóxica. Entre las lectinas sin actividad antirribosómica están SELIm, SELId de hojas, SELfd de frutos y SEAI en rizomas. Entre las lectinas con actividad antirribosómica están, ebulina l de hojas, ebulina f de frutos y SEAI, ebulina r1 y ebulina r2 en rizomas entre otras (Girbés y cols., 1993a; Girbés y cols., 2004; Ferreras y cols., 2011). El yezgo contiene también proteínas inactivadoras de ribosomas de una sola cadena denominadas ebulitinas (De Benito y cols., 1995).

1.4. UTILIDAD DE *S. EBULUS* EN FITOTERAPIA.

1.4.1. Efecto antiinflamatorio.

Las hojas de *S. ebulus* han sido funcionalmente utilizadas como un medicamento en el tratamiento de inflamaciones diversas (por ejemplo, dermatitis de contacto, picaduras de abeja y de ortiga, eczema, etc.) y hay varios informes que describen la influencia de los extractos *S. ebulus* en la

inflamación (Ebrahimzadeh y cols., 2006, 2007; Saeedi Saravi y cols., 2009b).

Los extractos de metanol y n-hexano de frutos de *S. ebulus* han demostrado actividad como antiinflamatorios en modelos animales, como por ejemplo diclofenaco, a través de la inhibición de cartagenino en edemas inducidos en ratas (Ebrahimzadeh y cols., 2006, 2007).

1.4.2. Efecto antibacteriano contra *Helicobacter pylori*.

El papel de *Helicobacter pylori* en la patogénesis de la úlcera péptica ha sido bien establecido y utilizando tratamientos combinados de inhibidores de la bomba de protones (omeprazol) con antibióticos (ampicilina, amoxicilina, ofloxacina o tetraciclina) ha demostrado tener éxito en los pacientes afectados, con tasas de curación de hasta el 90% (Yesilada y cols., 1999; Korman y cols., 1997). Los estudios mostraron que los extractos de cloroformo (CHCl_3) de las partes herbáceas de *S. ebulus* inhibieron el 37% de las cepas de *H. pylori* a prueba (3 de 8) frente a la cepa estándar, con CMI = 31,2mg/ml. (Yesilada y cols., 1999).

1.4.3. Efectos bioquímicos y patológicos.

Los estudios realizados con extractos orgánicos de *S. ebulus* han demostrado actividad antiinflamatoria importante (Ebrahimzadeh y cols., 2006, 2009). Recientemente se ha podido aislar el ácido ursólico como responsable de gran parte de la actividad antiinflamatoria de las hojas de *S. ebulus* (Schwaiger y cols., 2011).

Las hojas de *S. ebulus* poseen también actividad cicatrizante. Recientemente se ha aislado quercetin-3-O-glucosido que parece ser el

responsable de dicha actividad (Süntar y cols., 2010). El estudio de extractos de metanol, n-hexano y de acetato de etilo de *S. ebulus* han demostrado efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos en ratones consistentes en apoptosis y necrosis de las células del parénquima hepático y la hipertrofia de las células de Kupffer (Ebrahimzadeh y cols., 2007). Por otro lado, la exposición al extracto de acetato de etilo da lugar a un importante aumento de la urea sérica (concentración en suero sanguíneo) y un aumento de los niveles de creatinina en ensayos con ratones (Saeede Saravi y Shokrzadeh., 2008, 2009 a, b).

1.4.4. Efecto antioxidante del *S. ebulus*.

Un antioxidante se define habitualmente como "cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación a las de un sustrato oxidable, retrasa o impide significativamente la oxidación de ese sustrato" (Rhee y cols., 2009; Halliwell y cols., 1995; Wiseman y cols., 1997; Mates y cols., 1999).

Los antioxidantes son de interés porque ayudan a proteger el cuerpo humano contra el daño inducido por radicales libres que inducen la aparición de cáncer, la arterioesclerosis y el envejecimiento (Rhee y cols., 2009; Aruoma., 2003; Cho y cols., 2006). Se han realizado numerosos estudios para cuantificar la capacidad antioxidante de los alimentos, en particular los vegetales.

S. ebulus es particularmente rico en sustancias antioxidantes, en particular sustancias fenólicas simples como ácidos fenólicos y flavonoides, entre ellos los antocianos (Kiselova y cols., 2006). Aunque no se ha estudiado se cree que los frutos maduros son fuente de vitaminas en particular las antioxidantes C y E. La capacidad antioxidante *in vitro* de los

extractos acuosos de *S. ebulus* se correlaciona muy bien con el contenido en polifenoles (Kiselova y cols., 2006).

1.5. COMPUESTOS FENÓLICOS.

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional. Muchos son clasificados como metabolitos secundarios de las plantas. En general son sintetizados por una de estas dos vías biosintéticas: la ruta del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (o por las dos, por ejemplo los flavonoides).

Los compuestos fenólicos de las plantas son un grupo heterogéneo de productos con más de 10.000 compuestos. Algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua, y otros son polímeros muy grandes e insolubles.

Este grupo también juega una variedad muy heterogénea de funciones biológicas en las plantas, como por ejemplo como defensa ante herbívoros y patógenos; otros proveen de soporte mecánico a la planta; otros atraen insectos polinizadores o dispersores de frutos; algunos de ellos absorben la radiación ultravioleta, o actúan como agentes alelopáticos (agentes que reducen el crecimiento de plantas competidoras que estén cerca). Los compuestos fenólicos son atrapadores de radicales libres. El mecanismo de reacción es el descrito en la figura I2.

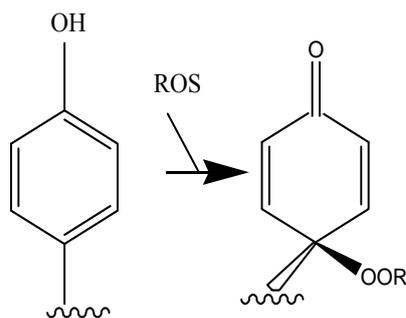


Figura I2. Mecanismo de reacción de los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos se oxidan por sustancias fuertemente oxidantes y por radicales libres generando quinonas.

En esta reacción el fenol se oxida a quinona y después a peróxido (-OOR). El peróxido más sencillo es el peróxido de hidrógeno (nombre vulgar: agua oxigenada) de fórmula H_2O_2 (HO-OH). Los peróxidos superiores se forman sustituyendo un hidrógeno del HO-OH por un resto **R** (RO-OH). Cuando el peróxido se forma en una biomolécula, se pierde la función de dicha biomolécula y ello puede provocar daños serios en el funcionamiento de las células y los tejidos.

1.5.1. Fenoles simples.

1.5.1.1. Fenilpropanoides simples.

Tienen un esqueleto básico de fenilpropanoide (un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos). Ejemplos: ácido trans-cinámico, ácido p-cumárico, y sus derivados como el ácido cafeico. El ácido cafeico es considerado un poderoso antitumoral y entre los alimentos que lo contienen están: crucíferas (coles, coles de Bruselas, rábanos), apio, naranjas, limones, calabazas, higos, lechuga, etc.

1.5.1.2. Lactonas fenilpropanoides o ésteres cíclicos.

Se les denomina también cumarinas. Poseen un esqueleto fenilpropanoide pero el propano está ciclado. Ejemplos: la umbeliferona (una cumarina simple). Originalmente la cumarina se aisló del haba de Tonka. Su rol en las plantas parece ser de defensa, dándole propiedades de

rechazo a la alimentación, antimicrobiana, captadora de radiación UV e inhibidora de la germinación.

La propiedad de rechazo a la alimentación que poseen las cumarinas puede ser correlacionada con el efecto que provoca como alimento en los animales. La ingesta de plantas como el trébol, rico en cumarinas, puede causar hemorragias internas en mamíferos.

1.5.1.3. Derivados del ácido benzoico.

El esqueleto es un anillo aromático unido a un carbono. Son formados a partir de fenilpropanoides. Ejemplos: la vainillina, el ácido salicílico. El ácido salicílico (o ácido 2-hidroxibenzoico) recibe su nombre de *Salix*, la denominación latina del sauce de cuya corteza fue aislado por primera vez. Se trata de un sólido incoloro que suele cristalizar en forma de agujas. Tiene una buena solubilidad en etanol y éter. Este producto sirve como materia prima para la obtención del ácido acetilsalicílico, comercialmente conocido como Aspirina. El ácido salicílico aparece en el comino y el ácido vainillínico en la salvia.

1.5.2. Fenoles complejos.

Los fenoles complejos los podemos clasificar en lignanos y Flavonoides. En función de los diversos sustituyentes y su colocación espacial, aparecen diversas familias de flavonoides. Los flavonoides se biosintetizan en todas las "plantas terrestres" o embriofitas, y también en algunas algas como la Charophyta, y aunque todas las especies comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su

biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente. Las familias más importantes son flavanoles, flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonas y antocianos.

1.5.3. Antocianos.

La calidad y madurez de los frutos rojos o negros procedentes de diversos tipos de plantas de interés alimentario o farmacéutico se determina parcialmente por la intensidad de su color. Estas bayas deben su color a diferentes tipos de compuestos polifenólicos entre los que destacan desde un punto de vista cuantitativo los antocianos. Las antocianidinas son los constituyentes básicos de este tipo de compuestos y están formados por un anillo aromático (C6) unido a un anillo heterocíclico (C3) que contiene un oxígeno protonado y unido a su vez a un tercer anillo aromático (C6). Las diferencias entre las distintas antocianidinas caracterizadas, radican en el número de hidroxilos, la naturaleza, posición y número de restos azucarados unidos a esta estructura básica, así como del número de restos de ácidos alifáticos o aromáticos unidos a estos azúcares.

En los últimos años, diversos estudios han puesto de manifiesto que estos compuestos poseen propiedades farmacológicas muy interesantes relacionadas con diversas patologías cardiovasculares, inmunológicas, antiinflamatorias o anticancerígenas entre otras, por lo que ha surgido un creciente interés en caracterizarlos.

De entre las variedades europeas de saúcos, todas ellas ricas en compuestos fenólicos, el saúco negro (*Sambucus nigra* L.) ha sido la más estudiada. Los principales antocianos identificados en esta especie son la cianidina-3-sambubiosido, cianidina-3-glucosido, cianidina-3-sambu-

biosido-5-glucosido, cianidina-3,5-diglucosido, cianidina-3-rutinosido, pelargonidina-3-glucosido y la pelargonidina-3-sambubiosido (Wu y cols., 2004; Kaack y cols., 2008). En la figura I3 se presentan las estructuras de tres cianidin-glucósidos importantes en *S. nigra*.

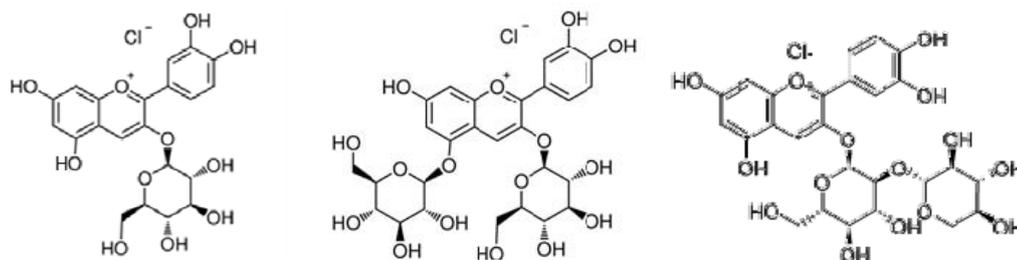


Figura I3. Estructura de cianidín-glucósidos. Izquierda cianidín-3-glucósido; centro: cianidín-3,5-di-O-glucósido; derecha: cianidín-3-sambubiósido. Las estructuras están en forma de clorhidrato.

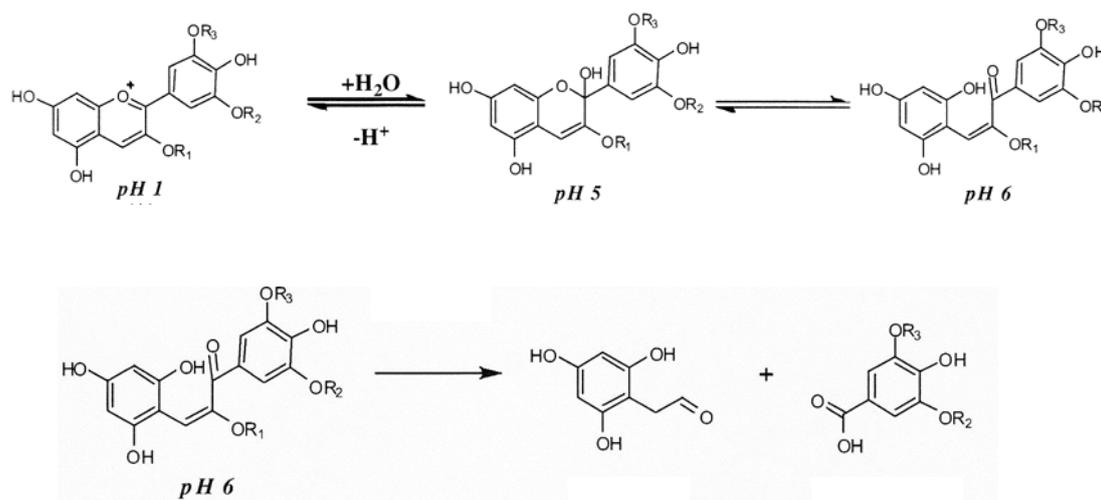


Figura I4. Degradación de cianidinas en función del pH. Parte superior: transformaciones dependientes del pH. Parte inferior: degradación a aldehído fenólico y ácido fenólico.

Los antocianos son estables a pH ácido, por lo que resisten el paso gástrico sin alterar su estructura antociánica. A pH cercano a la neutralidad el anillo antociánico (C) se abre dando lugar a un compuesto denominado chalcona (Figura I4).

Los glucósidos se degradan a sus aglicanos correspondientes por acción de glucosidasas, tanto en los tejidos vegetales como en el tracto gastrointestinal de los mamíferos.

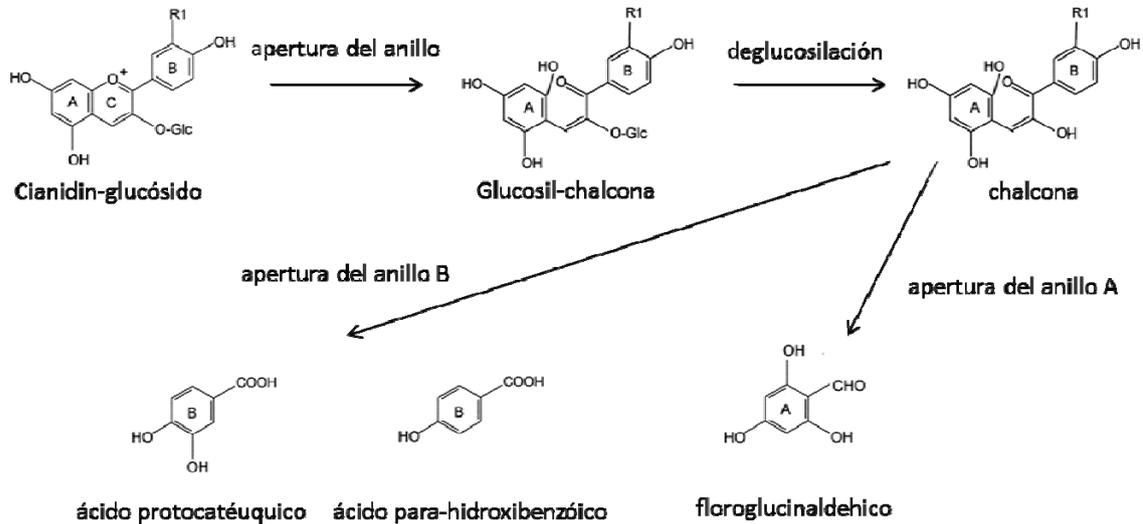


Figura I5. Degradación de los cianidín-glucósidos por apertura de los anillos A, B y C. Adaptado de Sadilova y cols., (2007).

Por otro lado, la degradación completa implica la apertura del anillo C para su conversión en chalcona, la deglicosilación y la apertura de los otros dos anillos A y B para rendir ácido protocatéuico, ácido para-hidroxibenzóico y floroglucinaldeido (Figura I5).

El Cianidín-3-glucósido es uno de los monoglucósidos más importantes aislados de las bayas, incluidas las de *S. nigra*, del que se han descrito sus propiedades antitumorales en modelo de ratón frente a células de carcinoma de pulmón humano en modelo de ratón inmunodeprimido (Ding y cols., 2006).

1.6. TOXICIDAD DEL SAÚCO.

El consumo directo de frutos verdes, corteza o brotes de hojas de saúco produce náuseas y vómitos cuya gravedad depende del grado de madurez de los frutos (Font-Quer, 1999). Los efectos pueden ser tan graves que incluso pueden provocar intoxicaciones gastrointestinales serias similares a las provocadas por la ingesta de frutos de *Ricinus communis* (Arteche y Uriarte., 1994), causada por la presencia de ricina, una proteína muy tóxica (Olsnes, 2004). Efectos gastrointestinales similares produce la ingestión de corteza o de brotes de hojas de saúco que tienen un fuerte carácter purgante (Olsnes y Pihl, 1982).

La decocción de los frutos, la corteza o los brotes de hojas de saúco, elimina la toxicidad (Font-Quer, 1999). Este tipo de efectos hacen pensar que esta toxicidad está relacionada con sustancias termolábiles que son más abundantes en los frutos verdes y la corteza. Se piensa que pueden ser proteínas, aunque no se descartan sustancias orgánicas con bajo peso molecular como las sustancias cianogenéticas que pueden liberar ácido cianhídrico al hidrolizarse, aunque no sea suficiente para explicar la intoxicación por cianhídrico ni la baja concentración, ni los síntomas de intoxicación.

Por otra parte los efectos tóxicos causados por la ingesta de frutos verdes, corteza y brotes de hoja a nivel intestinal ya descritos, náuseas, vómitos, dolor intestinal, hemorragias intestinales, etc., (Vanaclocha y Cañigüeral., 2003), coinciden con los resultados obtenidos por la acción de dos lectinas con actividad antirribosomica, nigrina y ebulina, al ser administradas por vía intravenosa a alta concentración a ratones.

1.7. PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS (RIPS: RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS).

Las proteínas inactivadoras de ribosomas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y se han descubierto también en otros reinos. Se caracterizan por presentar actividad inhibidora de biosíntesis de proteínas llevada a cabo por los ribosomas, de ahí su nombre (Girbés y cols., 2004). A pesar del gran número de trabajos sobre estas proteínas su papel en el organismo que la produce es todavía desconocido. Diversos autores (Peumans y Van Damme., 1995; Girbés y cols., 2004; Puri y cols., 2012; Stirpe., 2013) sugieren que estas proteínas forman parte del sistema de defensa de la planta frente a depredadores como insectos (Peumans y Van Damme., 1995), patógenos como virus (Girbés y cols., 1996) y hongos (Corrado y cols., 2005).

La clasificación actual de las RIPS las divide en dos categorías, las de tipo 1 y las de tipo 2 (Girbés y col., 2004). Las de tipo 1 están formadas por una única cadena polipeptídica que es la que presenta la actividad inhibidora de la síntesis de proteínas. Las de tipo 2 presentan dos cadenas polipeptídicas diferentes, una denominada cadena A que presenta la actividad inhibidora de la síntesis de proteínas y que es equivalente a la cadena única de las RIPS de tipo 1, y una segunda cadena denominada B que tiene propiedades de lectina. Las RIPS de tipo 2 pueden también estar formadas por dímeros unidos por fuerzas no covalentes, donde cada dímero es una molécula de dos cadenas polipeptídicas, equivalente cada una a una RIP de tipo 2.

Las RIPS de tipo 2 tienen la capacidad de atravesar las membranas celulares debido a que reconocen y pueden unirse a los receptores de membrana plasmática y entrar en el citosol (Girbés y col., 2004), lo que hace

que algunas de ellas como ricina, abrina, volkensina, viscumina y modeccina sean extremadamente tóxicas. Otras en cambio pueden ser mucho menos tóxicas que la ricina, como la ebulina y la nigrina (Girbés y cols., 2004), y por eso se las ha conocido como no tóxicas para células humanas cultivadas y para ratones de ensayo. Las RIPs de tipo 1 no reconocen a los receptores de membrana plasmática por lo que no pueden utilizarlos para atravesar la membrana y esto hace que sean menos tóxicas que las de tipo 2.

1.7.1. Lectinas antirribosómicas de *Sambucus ebulus*.

En la tabla II se muestran todas las lectinas con actividad antirribosómica descubiertas hasta la fecha. La letra que acompaña al nombre hace referencia a la parte de la planta de donde se aísla la proteína.

Tabla II. Lectinas antirribosómicas de *Sambucus ebulus*.

Especie	Tejido	Proteína	Pm aparente	
			Cadena A	Cadena B
<i>S. ebulus</i>	Hojas	ebulin l	26.000	30.000
	Frutos	ebulin f	26.000	30.000
	Rizomas	SEA I	67.000	67.000
	Rizomas	ebulin r1	26.000	30.000
	Rizomas	ebulin r2	26.000	30.000

La ebulina l del *S. ebulus* y la nigrina b de *S. nigra* fueron las primeras lectinas antirribosómicas que se aislaron en la familia *Sambucaceae* (Girbés y cols., 1993a, b).

La ebulina I forma parte de una familia de proteínas parecidas a la ricina pero cuya toxicidad *in vivo* y en células animales cultivadas es de 1.000-5.000 veces menor (Girbés y cols., 2004). La ebulina I, que es isoforma aislada de las hojas, inhibe la biosíntesis de proteínas llevada a cabo en lisados de reticulocitos de conejo con una IC₅₀ de 0,15 nM, valor muy cercano al de la ricina en las mismas condiciones (IC₅₀ de 0,1 nM). Ebulina I inhibe también otros sistemas acelulares de biosíntesis de proteínas derivados de tejidos de mamífero.

La ebulina I está compuesta por una cadena A (26 kD), que presenta la actividad enzimática responsable de la inhibición de la biosíntesis de proteínas y una cadena B (30 kD responsable de la actividad lectina, que en el entorno de 50 µg/ml es capaz de aglutinar completamente eritrocitos humanos del grupo O+). La cadena A presenta similitud secuencial con las RIPs monocatenarias de la familia *Cucurbitaceae*, mientras que la cadena B posee homología secuencial con la cadena B de la ricina y las lectinas no antirribosómicas de *Sambucus* (Girbés y cols., 2004)

La isoforma ebulina f se aísla de frutos verdes de *S. ebulus*, aunque no se encuentra en los frutos maduros y es algo más activa sobre los ribosomas de lisados de reticulocito de conejo que la ebulina I y también más tóxica en células HeLa (Cítores y cols., 1996a).

1.7.2. Toxicidad de ebulina en ratones.

Una de las mayores diferencias entre la familia de las lectinas antirribosómicas del saúco y la ricina es la baja toxicidad que tienen sobre células animales en cultivo y en los animales de experimentación, ratas y ratones (Girbés y cols., 1993a). Así tenemos que la IC₅₀ de ebulina I en

células HeLa es 64,3 nM (unas 60.000 veces superior que la IC₅₀ de la ricina).

En la experimentación con animales, la dosis de administración intraperitoneal de ebulina f a ratones es de 2-3 mg/kg de su peso corporal (Jiménez y cols., 2013a), mientras que para la ricina es de 8 µg/kg. La baja toxicidad de la ebulina con respecto a la ricina en células en cultivo podría deberse a las diferencias en sus cadenas B según se desprende de los estudios cinéticos y de transporte intracelular (Svinth y cols., 1998).

1.7.3. Lectinas no antirribosómicas.

Las lectinas homodiméricas (Tabla I2) resultan de la unión de dos cadenas polipeptídicas iguales unidas por un puente disulfuro, en el caso de las monoméricas la cisteína que forma el puente disulfúrico por mutación desaparece y no permite formar los dímeros (Girbés y cols., 2008).

Tabla I2. Lectinas del *S. ebulus* sin actividad antirribosómica.

Especie	Tejido	Proteína	Pm. ap.
<i>S. ebulus</i>	Hojas	SELIm	34.000
	Hojas	SELId	68.000
	Frutos	SELfd	68.000
	Rizomas	SEA II	33.500

1.8. ETAPA DE LA BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS AFECTADA POR EBULINA.

Comose indica en la figura I6, son tres las etapas que conforman el complejo proceso de la elongación de las cadenas polipeptídicas (Kaczanowska y Rydén-Aulin, 2007; Youngman y Green, 2007; Wilson y Nierhaus, 2006):

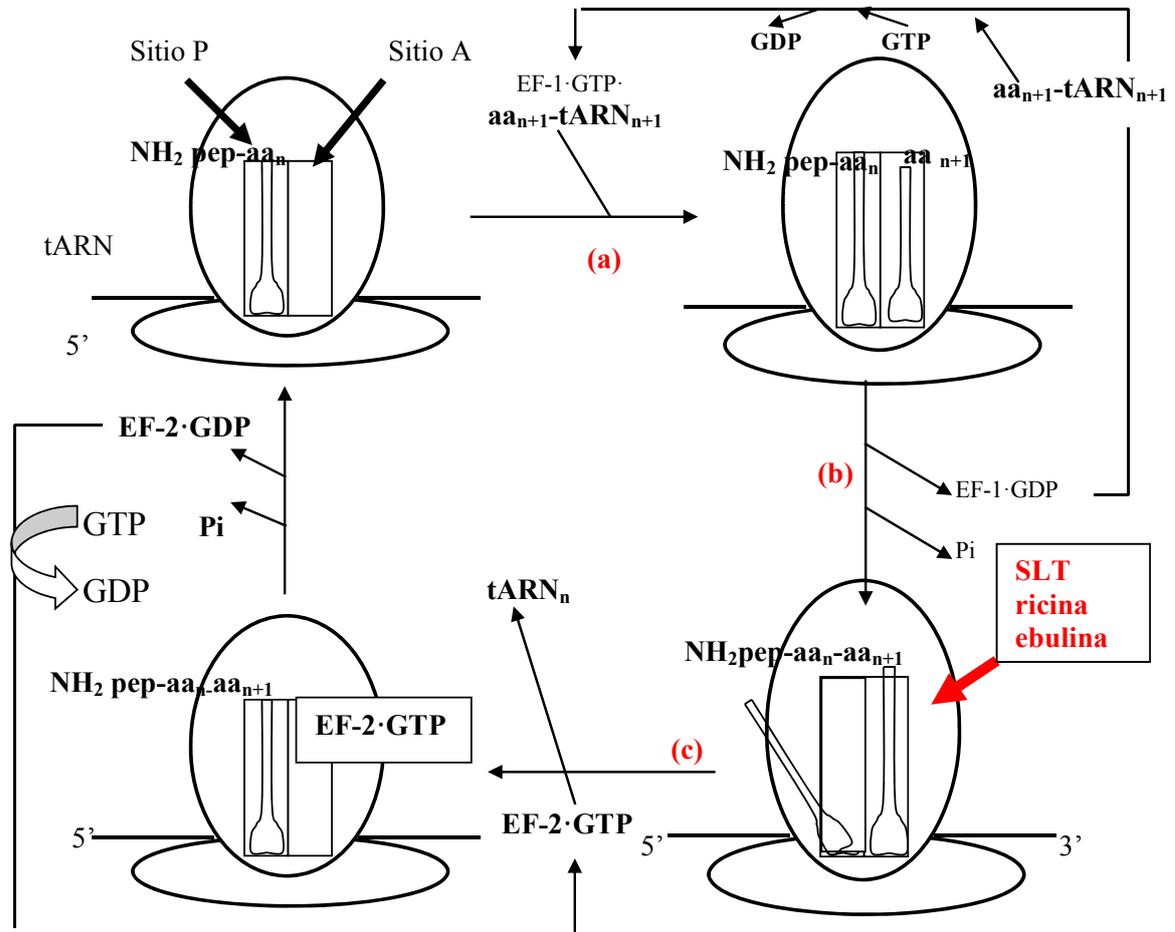


Figura I6. Alteración de la etapa de elongación en la síntesis de proteínas en organismos eucarióticos por la acción catalítica de las RIPs. El efecto de las RIPs no permite la interacción del ribosoma con el factor de elongación G de los procarionotas o del factor EF-2 en los eucariotas produciendo la interrupción de la síntesis de proteínas al no ser posible la translocación del peptidil-ARNt del sitio ribosómico aceptor (A) al sitio donador (P). La secuencia de fases de la elongación son (a) la fijación del peptidil-ARNt, (b) la formación del enlace peptídico y (c) la translocación. (Jiménez y cols., 2012b).

1ª.- la fijación de aminoacil-ARNt al sitio ribosómico aceptor o sitio A, que se encuentra vacío al iniciar el ciclo de elongación.

2^a.- la formación del enlace peptídico entre el peptidil-ARNt presente en el sitio ribosómico donador, o sitio P, y el aminoacil-ARNt presente en el sitio ribosómico aceptor.

3^a.- la translocación del nuevo peptidil-ARNt formado desde el sitio A al sitio P, que continúa con la eyección del ARNt deacilado presente en el sitio P y el avance del ribosoma respecto al ARN mensajero en la longitud de un codón.

Para la fijación del aminoacil-ARNt se forma un complejo ternario con factor de elongación 1 en los eucariontes y Tu en los procariontes, y GTP, con una estequiometría 1:1:1. Este proceso hidroliza el GTP a GDP y ortofosfato, utilizándose la energía liberada en la separación rápida de los factores de elongación (Girbés y cols., 1976; Girbés y cols., 1977).

Cuando el peptidil-ARNt se encuentra en el sitio donador y el aminoacil-ARNt ocupa su lugar en el sitio aceptor, se completa la formación del enlace peptídico entre el peptidilo y el aminoácido formando un peptidil-ARNt que está situado en el sitio A y tiene un aminoácido más que el inicial.

Seguidamente se produce la translocación del peptidil-ARNt formado, favorecida por los factores de elongación 2 en los eucariontes y G en los procariontes, formando un complejo binario con GTP. Posteriormente a la translocación se completa la hidrólisis de GTP a GDP y ortofosfato, reacción que produce la energía utilizada en la liberación del ARNt deacilado que se encuentra en el sitio de salida del ARNt, o sitio E (Spiegel y cols., 2007) y de los factores de translocación 2 y G (Modolell y cols., 1975; Girbés y cols., 1976; Spiegel y cols., 2007). En conclusión, la interrupción en la síntesis de las proteínas está provocada por la depurinación del ARNr que impide al ribosoma fijar los factores de elongación en la etapa de translocación de las cadenas polipeptídicas.

Se ha constatado también que las RIPs pueden actuar sobre ácidos nucleicos no ribosómicos (Nielsen y Boston, 2001; Barbieri y cols., 1997). Esto justifica la denominación de las RIPs como N-glucosidasas (Barbieri y cols., 1997).

1.9. MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR DE EBULINA L.

En 1987, casi un siglo después del descubrimiento de la ricina, se fijó y describió el proceso molecular por el que ejercen su efecto sobre el ribosoma de las células, la ricina y otras lectinas antirribosómicas, e incluso proteínas inactivadoras de ribosomas sin actividad lectina (Endo y Tsurugi., 1987). La toxina *Shiga* y la ricina ejercen como N-glucosidasas sobre el ARN mayor de los ribosomas de mamíferos y en otros casos en plantas, bacterias y hongos (Barbieri y cols., 1993; Stirpe y Battelli., 2006).

En la figura I7 se muestra el esquema del mecanismo de acción de las lectinas antirribosómicas realizando una depurinación que consiste en la hidrólisis del ácido ribosómico mayor del ribosoma. Este mecanismo es similar en todos los sistemas mencionados anteriormente.

La adenina eliminada es el centro de un bucle bien conservado a lo largo de la evolución, que muestra las secuencias nucleotídicas del ARNr mayor de diversas especies animales, vegetales y microbianas. Esta adenina eliminada por la acción de las proteínas antirribosómicas se encuentra junto a la posición de acción de de ARNasas muy específicas de hongos, como son la α -sarcina de *Aspergillus giganteus* (Endo y Wool. 1982), y las restrictocina y mitogilina de *Aspergillus restrictus* (López-Otín y cols., 1984; Fando y cols., 1985). El resultado en estos casos es el mismo, la inhibición de la síntesis de proteínas de manera irreversible. Con otras proteínas como las inactivadoras de ribosomas SLT de *Escherichia coli*,

ricina de *Ricinus communis* y ebulina de *S. ebulus* se produce el mismo efecto.

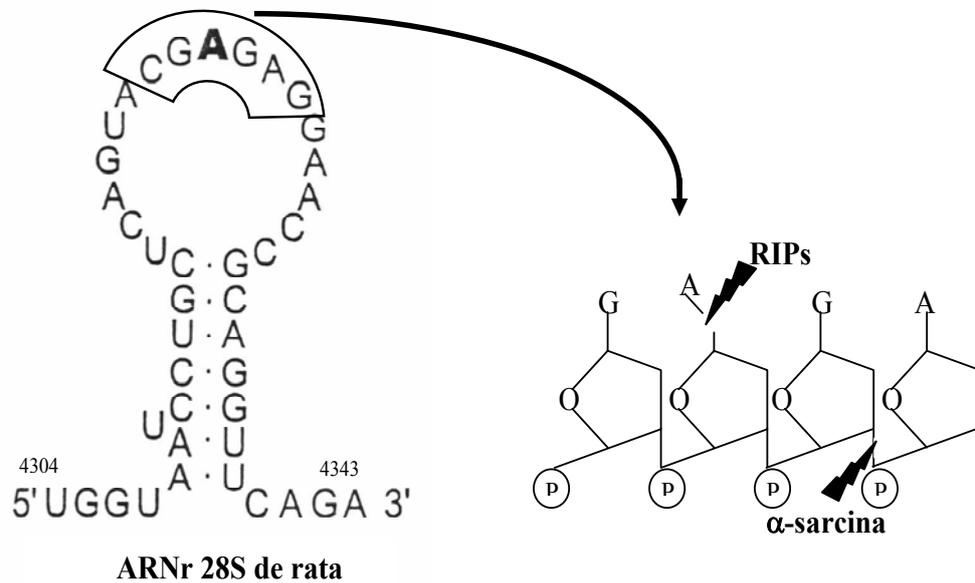


Figura I7. Secuencia de nucleótidos del bucle del ARNr responsable de la interacción del factor de elongación 2. La figura de la izquierda representa la estructura secundaria del ARNr 28S del ribosoma de rata donde el efecto de la RIP produce la eliminación de una adenina (señalada en negrita). La figura de la derecha muestra la posición de interacción de la ribonucleasa fúngica α -sarcina en la unión con la ribosa siguiente con el esqueleto de polifosfato del ARNr (Girbés y cols., 2004; Jiménez y cols. 2012b).

1. 10. VARIACIÓN ESTACIONAL DE LAS LECTINAS DE *SAMBUCUS*.

De las hojas maduras de *S. ebulus* se aislaron ebulina 1 y la lectina dimérica relacionada denominada SEL1d (Girbés y cols., 1993b; Rojo y cols., 2003). La concentración de cada una de estas proteínas depende del estadio de desarrollo de las hojas, así la ebulina 1 que aparece en los brotes jóvenes y hojas maduras y progresivamente desaparece al pasar las hojas a estado senescente, por el contrario la SEL1d que inicialmente en los brotes y hojas jóvenes se encuentra en pequeñas concentraciones, al madurar las

hojas aumenta su concentración hasta ser prácticamente la única lectina que se encuentra en las hojas senescentes (Rojo y cols., 2003).

Por otro lado, la ebulina f es una proteína inactivadora de ribosomas similar a ebulina l pero presente en los frutos de *S. ebulus* que tiene la capacidad de polimerizarse a diferencia de otras como la ebulina l de hojas que no lo hace, hecho este que sugiere una función de almacenamiento de proteína (Cítores y cols., 1996a).

1.11. ESTRUCTURA DE EBULINA L.

1.11.1. Secuencia aminoacídica de ebulina l.

Se han realizado estudios sobre la estructura de los genes que codifican a ebulina l (Pascal y cols., 2001) y nigrina b (Van Damme y cols., 1996) y así compararlos con los de ricina (Lord y cols., 1994). En las figuras 8 y 9 se presentan las estructuras primarias deducidas de la secuencia de los genes de la nigrina b y de la ebulina l en comparación con la estructura primaria de la ricina (Pascal y cols., 2000; Lord y cols., 1994).

		10	20	30	40	50	
1	EBULINA L	MR-VVKAAMLYLHIVVLAIYSVGIQG-----ID-----YPSVSFNLAG	37				
2	RICINA	MKPGGNTIIVIWMYAVATWLCFGSTSGWSFTLEDNNIFPKQYPIINF'TTAG	50				
		60	70	80	90	100	
1	EBULINA L	AKSTTYRDFLKNLRDRVATGTYEVNGLPVLRRSEVQVKNRFVLVRLTNY	87				
2	RICINA	ATVQSYTNFIRAVRGRLLTGADVRHEIPVLPNRVGLPINQRFILVELSNH	100				
		110	120	130	140	150	
1	EBULINA L	NGDTVTSAVDVTNLYLVAFSANGNSYFFK-DATELQK--SNLFLGTT-QH	133				
2	RICINA	AELSVTLALDVTNAYVVGYRAGNSAYFFHPDNQEDAEAITHLF'TDVQNR	150				
		160	170	180	190	200	
1	EBULINA L	TLSFTGNYDNLETAAGTRRESIELGPNPLDGAITSLWYDGG-----VA	176				
2	RICINA	TFAFGGNYDRLEQLAGNLRENIELGNOPLEEAISALYYYSTGGTQLPTLA	200				
		210	220	230	240	250	
1	EBULINA L	RSLLVLIQMVPEAARFRYIEQEVRRLQQLTSFTPNALMLSMENNWSSMS	226				
2	RICINA	RSFIICIQMISEAARFQYIEGEMRTRIRYNRRSAPDPSVITLENSWGRLS	250				
		260	270	280	290	300	
1	EBULINA L	LEVQLSGDNVSPFSGTVQLQNYDHTPRLVDNFEELYKITGIAILLFRCVA	276				
2	RICINA	TAIQES--NQGAFASPIQLQRRNGSKFSVYDVSILIP--IALMVYRCAP	296				
		310	320	330			
1	EBULINA L	TKTTHNAIRMPHVLVGEDNKFN	298				
2	RICINA	PPSSQF-----	302				

Figura I8. Estructura primaria de cadena A de ebulina l y ricina.

		10	20	30	40	50	
1	EBULINA 1	DGETCAIPAPFTRRIVGRDGLCVDVRNGYDTDGTPIQLWPCG--TQRNQQ	48				
2	RICINA	-ADVCMDEPEPIVR-IVGRNGLCVDVRDGRFHNGNAIQLWPCKSNTDANQL	48				
		60	70	80	90	100	
1	EBULINA 1	WTFYNDKTIRSMGKCMTANGLNSGSYIMITDCSTAAEDATKWEVLIDGSI	98				
2	RICINA	WTLKRDNTIRSNKCLTTYGYSPGVYVMIYDCNTAATDATRWQIWDNGTI	98				
		110	120	130	140	150	
1	EBULINA 1	INPSSGLVMTAPSGASRTTLLLENNIHAASQGWTVSNDVQPIATLIVGYN	148				
2	RICINA	INPRSSLVLAATSGNSGTTLTVQTNIIYAVSQWLPNTNTQPFVTTIVGLY	148				
		160	170	180	190	200	
1	EBULINA 1	EMCLQANGENNNVWMECDVTSVQQWALFDDRTIRVNNRGLCVTSNGY	198				
2	RICINA	GLCLQAN--SGQWIEDCSSEKAEQQWALYADGSIRPQQNRDNCLTSDSN	196				
		210	220	230	240	250	
1	EBULINA 1	VSKDLIVIRKCQGLAT-QRWFNSDGSVVNLKSTRVMDVKESDVSLQEVI	247				
2	RICINA	IRETVVKILSCGPASSGQRWFMKNDGTILNLYSGLVLDVRASDPSLKQII	246				
		260	270	280			
1	EBULINA 1	IFPATGNPNQQWRTQVPQI	266				
2	RICINA	LYPLHGDPNQIWLPLF---	262				

Figura I9. Estructura primaria de cadena B de ebulina I y ricina.

1.12. TRÁNSITO INTRACELULAR DE LAS LECTINAS ANTIRRIBOSÓMICAS DE *S. EBULUS*.

La diferencia funcional fundamental entre ebulina I y ricina está en la cadena B que es responsable de la interacción de estas RIPs con los receptores

de la membrana plasmática que permiten su internalización en el citosol (Svinth y cols., 1998; Pascal y cols., 2001). Los estudios de toxicidad y de captación dependiente de fase fluida de la cadena A aislada de la ricina muestran como ambos procesos son iguales a los que permiten la internalización de las RIPs monocatenarias sin actividad lectina (Svinth y cols., 1998). Las diferencias entre las cadenas B de la ricina y de la ebulina I son la causa de la falta de toxicidad de la ebulina, ya que disminuye en gran medida su afinidad por los galactósidos (Pascal y cols., 2001).

En la figura I10 se presenta un modelo hipotético de las primeras etapas del tráfico intracelular de la ebulina, la nigrina y la ricina, que como podemos comprobar siguen caminos diferentes.

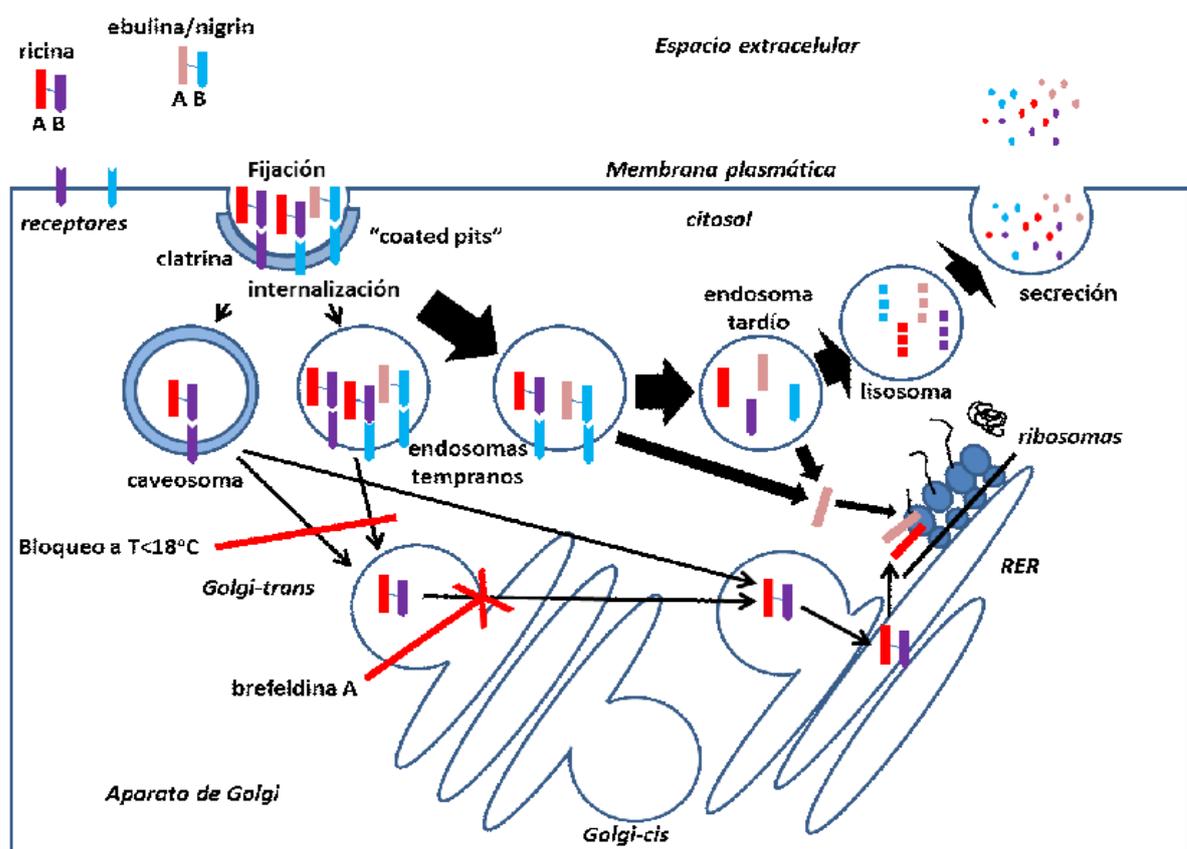


Figura I10. Rutas intracelulares seguidas por ebulina y ricina. (Jiménez y cols., 2012b).

La ruta seguida por las moléculas de ricina para alcanzar el citosol de las células se inicia con su internalización mediante receptores de membrana y su integración en compartimentos endosómicos sensibles al NH_4Cl , seguidamente pasa por compartimentos sensibles a la temperatura que se bloquean a 18°C y finalmente la ricina es translocada en el aparato de Golgi, este proceso es sensible a la brefeldina A que es una droga que tiene un efecto desorganizador del aparato de Golgi (Battelli y cols., 1997). Solo unas pocas moléculas de ricina alcanzan el citosol a través del aparato de Golgi y son eficaces para inactivar los ribosomas, ya que la mayor parte de la ricina internalizada es degradada completamente en los lisosomas (Battelli y cols., 2005).

Aunque los estudios de internalización de las RIPs de *Sambucus* se han realizado con nigrina b (Battelli y cols., 2005), dada la similitud de nigrina b y ebulina 1 se acepta que ambas, nigrina b y ebulina 1, se internalizan aproximadamente de la misma manera. La ruta seguida por nigrina/ebulina es inicialmente la misma que la seguida por la ricina. Cuando ebulina se internaliza pasa por endosomas sensibles a NH_4Cl y continúa por lisosomas donde se degrada en su mayor parte. Finalmente no logra alcanzar el aparato de Golgi.

Desde los endosomas, las rutas de nigrina/ebulina y ricina son diferentes ya que los efectos antirribosómicos de nigrina/ebulina que se producen a altas concentraciones son independientes de la temperatura e insensibles a la brefeldina A. En el caso concreto de nigrina b se ha visto que prácticamente todas las moléculas de lectina son transportadas desde los endosomas hasta los lisosomas donde son completamente degradadas (Battelli y cols., 2005).

Con concentraciones 4 ó 5 veces superior a la ricina se llegan a acumular suficientes moléculas de nigrina/ebulina en los endosomas como para forzar su translocación espontánea desde los endosomas hasta el citosol.

La diferencia entre las rutas intracelulares seguidas por nigrina/ebulina y ricina puede estar en que los receptores de unión de ambas proteínas sobre la membrana plasmática, sean diferentes (Pascal y cols., 2001; Muñoz y cols., 2001).

Por otra parte, la diferente toxicidad de la ricina y la ebulina podría tener relación con el hecho de que la toxicidad de la ricina contribuya a una actividad lipasa inherente a las subunidades A-B localizada en un sitio conformado por residuos pertenecientes a las dos subunidades (Morlon-Guyot y cols., 2003). Esta actividad ayudaría a que algunas moléculas de ricina pudieran alcanzar el retículo endoplasmático más fácilmente y finalmente el citosol. La ausencia de este sitio con actividad lipasa en sus moléculas podría ser la causa de la baja toxicidad de las lectinas antirribosómicas no tóxicas (Morlon-Guyot y cols., 2003). Esta ausencia de actividad lipasa obligaría a nigrina/ebulina a continuar la ruta degradativa lisosómica inevitablemente.

1.13. UTILIZACIÓN DE LA EBULINA EN LA CONSTRUCCIÓN DE CONJUGADOS E INMUNOTOXINAS CONTRA BLANCOS CELULARES IMPLICADOS EN EL CÁNCER.

Las lectinas y las proteínas inactivadoras de ribosomas de *S. ebulus* se han utilizado para la construcción de nuevos fármacos experimentales contra el cáncer. Entre ellos se encuentran las inmunotoxinas antivasculares construidas frente a uno de los receptores del TGF- β denominado CD105 o endoglina. Otros fármacos diana construidos con proteínas de *S. ebulus* han sido los conjugados con transferrina activos sobre células tumorales que sobre expresan el receptor de transferrina.

1.14. INMUNOTOXINAS ANTIVASCULARES CONTRA LOS TUMORES.

El desarrollo del tumor se caracteriza por el establecimiento de una red vascular que abastece a la masa del tumor de oxígeno y nutrientes. La inducción de una red depende de factores proangiogénicos liberados por las células tumorales (Benítez y cols., 2005; Hanahan y Folkman., 1996; Folkman., 1995). El crecimiento de las células cancerosas en el tumor crea una presión positiva que impide la entrada de medicamentos. Esto hace que los tratamientos convencionales de quimioterapia reduzcan su eficacia y pierdan parte de su potencial terapéutico (Benítez y cols., 2005; Jain., 1990).

Uno de los avances en la terapia experimental contra los tumores consiste en la supresión de la formación de vasos del tumor (neovasculatura) que evitará el crecimiento de un gran número de células cancerosas (Folkman., 1995). Como se indica en la figura I11, la destrucción de la neovasculatura conlleva la destrucción parcial o total de la misma (Muñoz y cols., 2013).

Otra forma de actuar contra los tumores consiste en atacar los vasos ya formados con fármacos dirigidos contra proteínas presentes en la neovasculatura, como los receptores del TGF- β denominado CD105 o endoglina, con inmunoconjugados e inmunotoxinas (Benítez y cols, 2005).

Estos fármacos experimentales están constituidos por dos partes, una parte conductora (anticuerpo monoclonal frente a la proteína blanco o una lectina) y una parte efectora tóxica (proteínas inactivadora de ribosomas de origen vegetal, quimioterápicos, isótopos radioactivos) que una vez identificado el blanco celular lo destruye.

Las proteínas de *S. ebulus* se han utilizado en la construcción de conjugados e inmunotoxinas (Benítez y cols., 2005; Cítores y cols., 2002).

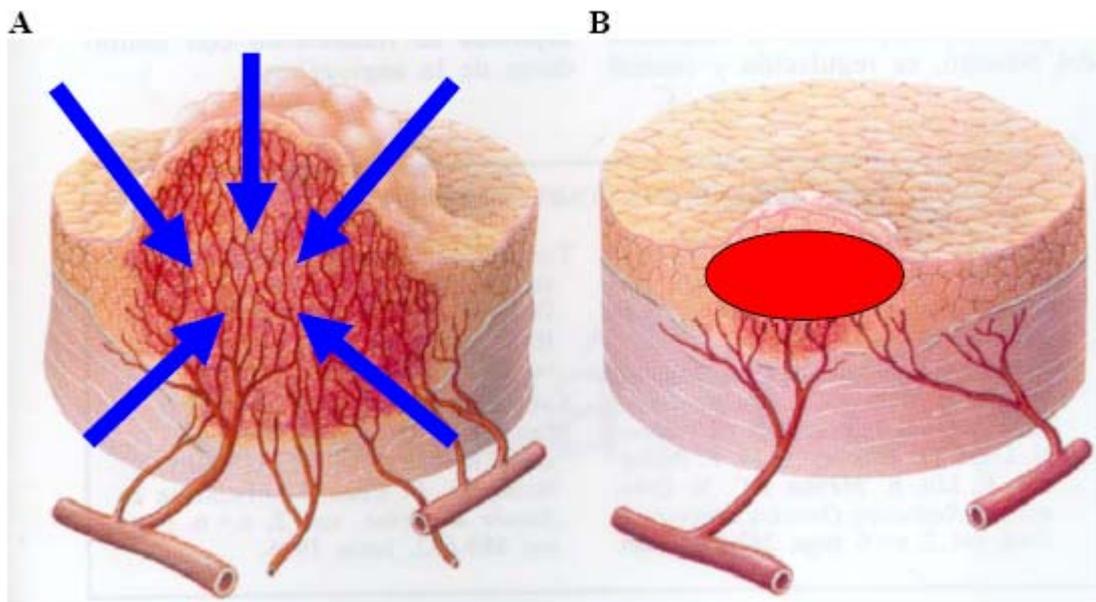


Figura I11. Ataque de la neovascularización tumoral con inmunotoxinas. El tumor presenta una fina capa capilar que nutre la masa tumoral con oxígeno y nutrientes (A). Las inmunotoxinas contra la neovascularización destruyen la red capilar y provocan el colapso del tumor (B). Girbés, 2009 (modificado de Folkman., 1996).

1.15. CONJUGADOS CON TRANSFERRINA CONTRA CÉLULAS TUMORALES.

Todas las células humanas expresan normalmente el receptor de transferrina (Cheng y cols., 2004). En contraste, las células malignas sobreexpresan dicho receptor varias veces más que las células normales (Singh y cols., 2011). Por ello el receptor de transferrina se ha convertido en blanco de la terapia con fármacos diana de diverso tipo (Daniels y cols., 2012).

Las proteínas nigrina b de *S. nigra* y ebulina 1 de *S. ebulus* se han utilizado para la construcción de conjugados con transferrina humana que han demostrado ser activos frente a células cancerosas creando una ventana terapéutica que podría ser de utilidad en la terapia experimental del cáncer (Cítores y cols., 2002).

2. OBJETIVOS DE LA TESIS.

En base a los antecedentes presentados se propusieron los siguientes objetivos:

1. Medida de los fenoles totales, capacidad antioxidante, y antocianidinas de las siguientes partes del *S. ebulus*: umbelas de frutos verdes, umbelas de frutos maduros, frutos verdes, frutos verdes pequeños, ápices, brotes, flores, hojas maduras y frutos maduros, mediante los métodos de Folin-Ciocalteu, CUPRAC, DPPH y diferencial de pH.
2. Estudio del efecto de la incubación a 100⁰C sobre los fenoles totales, la capacidad antioxidante de frutos maduros de *S. ebulus*.
3. Determinación del contenido de cianidín-3-glucósido en las diferentes partes del *S. ebulus* y su variación con la incubación a 100⁰C por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).
4. Estudio electroforético de los extractos acuosos de las diferentes partes del *S. ebulus*.
5. Obtención y aislamiento de nuevas lectinas específicas de D-galactosa de las inflorescencias de *S. ebulus*.
6. Obtención de datos estructurales de las lectinas encontradas y estudio de los efectos tóxicos de su administración por vía nasal a ratones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIAL DE LABORATORIO.

3.1.1. Equipos.

Autoclave de esterilización Stericlav-S 110 Litros.

Agitador de tubos: Raypa.

Agitador magnético ACS-160: J.Jimeno S.A.

Balancín: Labnet.

Balanza de precisión: KERN ABS.

Balanza: KERN 572.

Baño de agua: Velp Scientifica (multistirrer 6).

Baño Ultrasons H. Selecta.

Bomba de vacío. Ref. Büchi Vac V-500.

Célula con agitación (concentrador): Amicon.

Centrifuga: Digen-R ORTO ALRESA.

Columnas cromatográficas. GE Healthcare.

Concentrador de 50 y 10 ml: Amicon.

Congelador -24°C: Fagor.

Cubetas electroforéticas mini-VE Amersham Biosciences.

Disgregador MICCRA D-9 /RT.

Equipo de agua Hellix. Millipore.

Escáner CanonScan Lide 200 acoplado a un ordenador SAMSUNG NC10.

Espectrofotómetro: HELIOS α Thermo.

Espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer MALDI TOF/TOF.

Estufa: P.SELECTA 150 litros.

HPLC. Sistema modular cromatográfico Jasco.

Columna para HPLC Spherisorb Relleno ODS-1 5 μ m.

Guarda-columna para HPLC. Phenomenex 4 x 3 mm relleno C18.

Interfaz LC-NET II/ADC.

Desgasificador DG-2080-54.

Unidad de gradiente cuaternario LG-2080-04.

Bomba PU-2080 Plus.

Inyector UV-2070.

Horno CO-2065 Plus.

Equipo pHmetro: pH-meter basic 20 + CRISON.

Pipetas automáticas: Proline Plus de Biohit.

Pipeteador automático: IsolabSonicador: P-Selecta.

3.1.2. Material fungible.

Botellas de vidrio de diversos volúmenes, desde 5 ml hasta 5 litros.

Cubetas de cuarzo para espectrofotómetro 104-QS Hellma 10mm.

Cubetas de plástico de espectrofotometría de 4,5ml.

Cubreobjetos de 12mm Ø.

Espátulas.

Frascos Erlenmeyers de vidrio de diferentes volúmenes.

Gradillas para tubos Falcon y para microtubos.

Guantes de látex.

Imanes agitadores.

Jeringuillas de plástico.

Matraces erlenmeyers de diferentes volúmenes.

Membranas 450 47 mm 0,45µm de Pall.

Membrana Inmobilon P de polivinilfluoruro (PVDF) 0,45 µm.

Membranas de filtración MF Millipore 0,45 µm.

Microtubos de plástico de 1,5 y 2 ml.

Papel de filtro convencional (Afora).

Papel de filtro Whatman N°3.

Parafilm M.

Pinzas y tijeras de acero inoxidable.

Pipetas de plástico estériles de 5, 10 y 25 ml.

Placas Petri cuadradas.

Probetas de vidrio y de plástico de diferentes volúmenes.

Puntas de pipeta automática.

Puntas especiales de pipetas para cargar geles de poliacrilamida.

Tubos Falcon de 15 y 50 ml.

Tubo de silicona de diferentes diámetros.

Vasos de precipitados de vidrio y plástico de diferentes volúmenes.

3.1.3. Reactivos químicos.

Todos los reactivos empleados en la realización de este trabajo quedan incluidos en la siguiente tabla, siendo todos ellos de una alta pureza (Tabla M1).

Tabla M1. Reactivos utilizados.

Reactivos	Marca
Acetato de amonio	Sigma
Acetona	Merck
Acetonitrilo HPLC-isocrático 254 nm grade	Scharlab
Ácido acético	Baker
Ácido acético glacial	Merck
Ácido clorhídrico	Merck

Ácido gálico	Sigma
Ácido ortofosfórico	Scharlab
Acrilamida/bisacrilamida 37,5.1	Ameresco
Amonio acetato	Sigma
Amonio persulfato	Sigma
Amonio sulfato	Fluka
Azul de Evans	Sigma
Cloruro de cobre II	Sigma
Coomassie brilliant blue G-250	Panreac
Di-potasio hidrogeno fosfato	Merck
Dodecil sulfato sódico	Fluka
DOPPH	Aldrich
DPPH	Aldrich
Etanol	Merck
Fosfato de potasio monobásico	Sigma
Fosfato de sodio monobásico	Sigma
Glutaraldehido	Sigma
Glicerol	Merck
Glicina para electroforesis	Sigma
Hidróxido de sodio	Carlo Erba
Kuramycin chloride	Sigma
Lactosa	Panreac
Metanol	Merck
N,N, dimetilformamida	Sigma
N, N, N', N', tetrametiletieno	Sigma
N-acetilcisteína	Sigma
Neocuproína	Sigma
Patrón de cianidín-3-glucósido	Fluka

Peróxido de hidrógeno	Sigma
Potasio sodio tartrato	Panreac
Potasio cloruro	Sigma
Potasio hidróxido	Panreac
Potasio hidróxido 85 %	Panreac
Quercitina	Sigma
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Fluka
Sepharose 6B	GE
Superdex 75	GE
Sigma marker (marcadores de masa molecular)	Sigma
Sodio carbonato	Panreac
Sodio cloruro	Panreac
Sodio hidróxido	Panreac
Sodio acetato	Sigma
Sodio carbonato	Sigma
Sodio dihidrógeno	Merck
Sodio hidrógeno carbonato	Panreac
Sodio hidróxido	Baker
Sodio fosfato dibásico	Sigma
Temed	Sigma
Tris	Roche
Trolox	Aldrich
Trypsin	Merck

Todas las soluciones se preparan con agua tipo Milli Q (Millipore), y se esterilizan, cuando es necesario, en autoclave (Stericlav-S 110 litros) a 120° C y a 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos.

3.1.4. Materiales biológicos.

3.1.4.1. Vegetales.

Como material vegetal empleado para la obtención de los extractos necesarios para la realización del presente trabajo, se han utilizado, diferentes partes de *S. ebulus* recogido entre los meses de abril a julio en la localidad de Barruelo del Valle (Valladolid) almacenados a -24° C.

124. NUEVAS CITAS PARA LA FLORA VALLISOLETANA. II

Jesús Antonio LÁZARO BELLO

New floristic records for Valladolid province. II

Palabras clave. Corología, flora vascular, España, Valladolid.

Key words. Chorology, vascular flora, Spain, Valladolid.

Dando continuidad al trabajo emprendido en los últimos años por algunos autores (Delgado *et al.*, 2001; Lázaro Bello, 2002a; Lázaro Bello, 2002b), que tiene por finalidad aumentar el conocimiento del catálogo florístico de la provincia de Valladolid, se presentan veintiocho taxones que constituyen primeras (señaladas con un *) o segundas citas para la flora vallisoletana, siendo, muchas de éstas últimas, muy antiguas.

Para cada taxón se indican las coordenadas U.T.M. para cuadrículas de 1 x 1 km, la altitud y otros datos ecológicos. Dichos taxones están ordenados alfabéticamente, y para la nomenclatura y autoría de los mismos se sigue *Flora iberica* o, cuando faltan en esta obra, *Flora europaea*. Los testimonios de los ejemplares citados se encuentran depositados en el Herbario de la Facultad de Biología de Salamanca (SALA).

LÁZARO BELLO, J. A. -2002a- Nuevas citas para la flora vallisoletana. *Acta Bot. Malacitana* 27: 249-253.

Sambucus ebulus L.

VALLADOLID: Barruelo del Valle, 30TUM2715, 810 m, 18-VIII-2002, alrededores frescos y umbrosos de la iglesia del pueblo, *Lázaro Bello* (SALA 108151).

Muy escaso a nivel provincial, el taxón que aquí se trata sólo ha sido citado por Gutiérrez Martín (1908) para el partido judicial de Olmedo.

Figura M1. Bibliografía para localizar el *S. ebulus* en la provincia de Valladolid.

3.1.4.2. Animales de experimentación.

Para las pruebas de toxicidad y para la obtención de las muestras usadas en el estudio histológico se emplearon ratones Swiss. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales a base de dieta de pellets Harlam 2014 y agua potable, *ad libitum*.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Obtención de extractos.

Partimos de 25g de las distintas partes recogidas de *S. ebulus*.

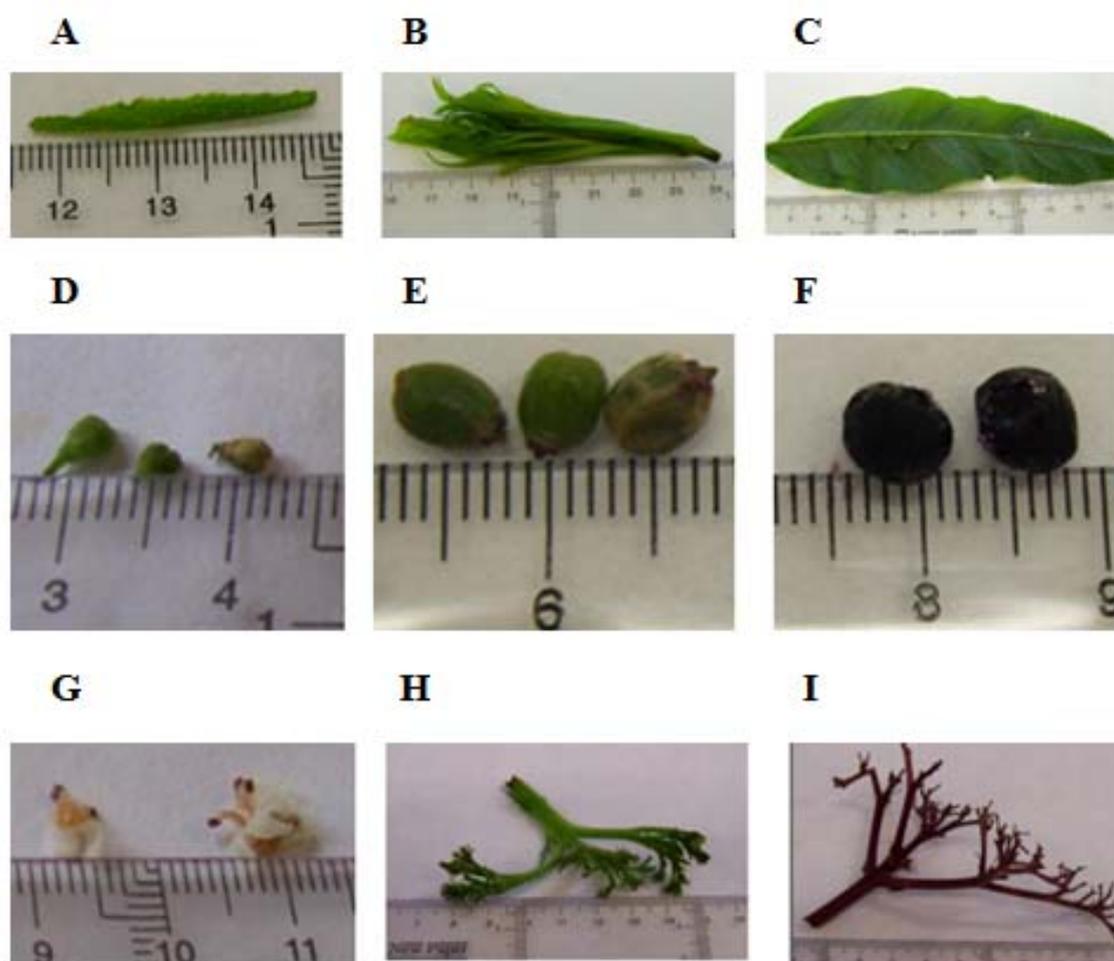


Figura M2. Partes utilizadas de la planta. (A) Ápices, (B) Brotes, (C) Hojas maduras, (D) Frutos verdes pequeños, (E) Frutos verdes, (F) Frutos maduros, (G) Flores, (H) Umbelas de frutos verdes, (I) Umbelas de frutos maduros de *S. ebulus*.

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).

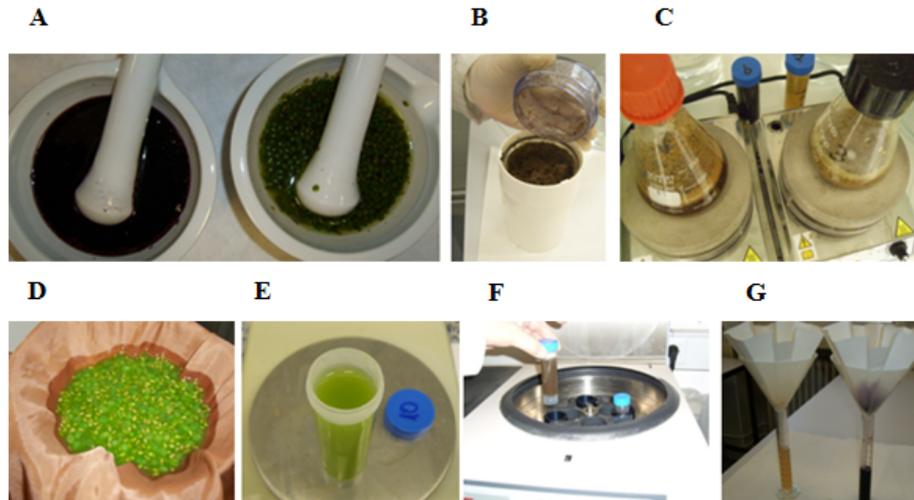


Figura M3. Procedimiento para obtener los diferentes extractos para su posterior análisis. (A) Frutos verdes y maduros triturados en mortero de porcelana, (B) Resto de partes trituradas en el molinillo, (C) Agitación en frío, (D) Filtración en malla de nylon, (E) Equilibrado de tubos, (F) Centrifugación, (G) Filtración en papel de filtro.

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 una primera centrifugación de 45 min a 3.500 rpm en centrífuga Digicen-R de rotor basculante RT142 en tubos de 50 ml cada uno a 2° C. Se recupera el sobrenadante y se somete a una segunda centrifugación durante 30 min a 3.500 rpm a 2° C.

Se recoge el sobrenadante y se filtra a través de papel de doble capa con pliegues (73 g/m²). El volumen recuperado en este proceso lo denominamos extracto crudo. Medimos los volúmenes recogidos de los

diferentes extractos crudos y lo guardamos a -20°C para su posterior análisis.

3.2.2. Método de Folin – Ciocalteu.

Los fenoles reaccionan con el reactivo de Folin - Ciocalteu dando un color azul propio de la reacción con fenoles. El reactivo de Folin - Ciocalteu se obtiene ya preparado de las casas comerciales (Sigma). Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con restos fenólicos presentes en las proteínas (tirosinas) y en compuestos como ácido gálico y sus derivados, flavonoides, etc.

El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, es el que medimos a una longitud de 760 nm (Singleton y Rossi, 1965).

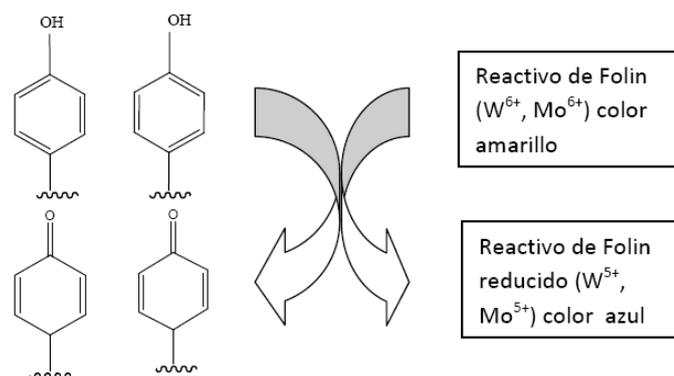


Figura M4. Reacción de Folin – Ciocalteu. Tomado de Girbés y Jiménez. Cuaderno de Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición (2010).

Es un método de medida de contenido en fenoles totales y otros compuestos que no siendo fenólicos muestran una cierta capacidad de reacción. Esta reacción es una medida también de la capacidad antioxidante.

Por lo que en muchos trabajos se ha asimilado como un método de determinación de capacidad antioxidante.

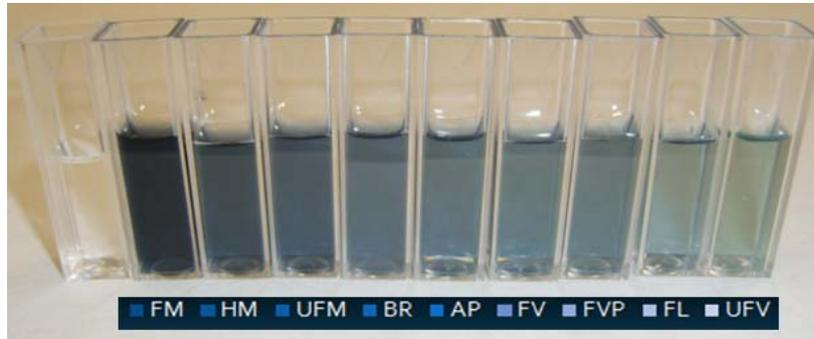


Figura M5. Determinación de fenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu. Se muestran las cubetas de espectrofotometría con las reacciones correspondientes a: blanco, (FM) Frutos maduros, (HM) Hojas maduras, (UFM) Umbelas de frutos maduros, (BR) Brotes, (AP) Ápices, (FV) Frutos verdes, (FVP) Frutos verdes pequeños, (FL) Flores, (UFV) Umbelas de frutos verdes.

Para realizar la recta patrón añadimos cantidades variables de 2,5mM de ácido gálico, 600 μ l de solución de carbonato sódico al 7,5 % y el agua correspondiente para alcanzar un volumen total de 1,5 ml. Posteriormente se añade a cada tubo 200 μ l de reactivo de Folin - Ciocalteu, e incubamos los tubos a 50°C durante 10 minutos. A continuación se mide la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro.

La medida de los diferentes extractos se realiza sustituyendo en el método, el patrón de ácido gálico, por un volumen de extracto. Para los cálculos debemos tener en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida (extracto crudo). Los resultados se interpolan en la curva de calibrado de 2,5mM de ácido gálico y se expresan en μ g equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. Para los ensayos de degradación de los fenoles totales se incuban las muestras a 100° C a

diferentes tiempos que van desde los 0 a los 80 minutos y los resultados se expresan en tanto por ciento (%) de degradación.

3.2.3. Método de CUPRAC.

En este ensayo medimos la capacidad antioxidante (CA). Este método está basado en la reducción de Cu (II) a Cu (I) por la acción combinada de todos los antioxidantes (agentes reductores) en una muestra. Para realizar el ensayo de CUPRAC se utiliza como reactivo la neocuproína (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline).

Estos complejos tienen una solubilidad muy limitada en agua y por tanto deben ser disueltos en disolventes orgánicos como el etanol. Para ello se utilizará un procedimiento consistente en utilizar el reactivo Cu (II)-neocuproína [Cu (II)-Nc] como agente oxidante cromogénico.

La reacción que tiene lugar es la siguiente: Los protones liberados pueden neutralizarse con la solución de acetato amónico. En esta reacción los polifenoles (-OH) se oxidan a las correspondientes formas quinónicas (= O) y el Cu (II) - Nc es reducido a Cu (I) - Nc que es muy coloreado y muestra un máximo de absorción a 450 nm.

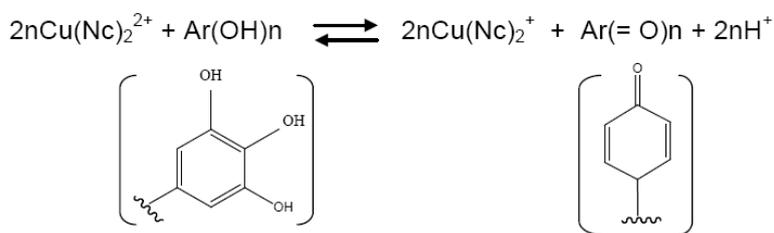


Figura M6. Reacción del método CUPRAC. Tomado de Girbés y Jiménez. Cuaderno de Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición. (2010).

Para realizar la recta patrón utilizamos 1mM de ácido gálico en etanol como patrón. Se añade a cada tubo 1ml de 10 mM de Cloruro de Cobre (II), y la misma cantidad de 7,5 mM de neocuproína en etanol.

Posteriormente se añade a cada tubo 1ml de 1mM de acetato de amonio (pH = 7), añadimos los diferentes volúmenes del patrón de ácido gálico y la cantidad correspondiente de agua para alcanzar un volumen final de 4 ml. Se espera 1 hora y se mide la absorbancia a 450 nm.

La medida de los diferentes extractos se realiza sustituyendo en el método, el patrón de ácido gálico, por un volumen de extracto. Para los cálculos debemos tener en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida (extracto crudo). Los resultados se interpolan en la curva de calibrado de 1mM de ácido gálico y se expresan en μg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. Para los ensayos de degradación de los fenoles totales se incuban las muestras a 100° C, a diferentes tiempos que van desde los 0 a los 80 minutos y los resultados se expresan en tanto por ciento (%) de degradación.

3.2.4. Método del radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

El DPPH es un radical orgánico nitrogenado y estable que nos sirve para medir la capacidad antioxidante (CA). En presencia de sustancias antioxidantes se produce un descenso de la absorbancia del radical DPPH a 515 nm (Brand-Williams y cols., 1995). El radical tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente.

La reacción se mide a los 10 minutos del inicio, ya que en este intervalo, la mayoría de sustancias completan la reacción con el DPPH. El ensayo DPPH es un método rápido y sencillo.

El DPPH sólo puede disolverse en un medio orgánico y la concentración que hemos utilizado es 0,1 mM. La cuantificación se realiza empleando una solución patrón de 1mM de Trolox en metanol. Para realizar la recta patrón añadimos la cantidad de metanol al 80 % correspondiente para obtener un volumen final de 3 ml, así como 2.900 µl de DPPH 0,1 mM en metanol. Se añade a cada tubo 25, 50, 75 y 100 µl respectivamente de solución de Trolox 1 mM (patrón) en metanol y se agitan los tubos. A continuación y transcurridos 10 minutos se mide la absorbancia a 515 nm. La medida de los diferentes extractos (los ensayos se realizan en tres extractos diferentes y por triplicado cada uno de ellos) se realiza sustituyendo en el método, el patrón de Trolox por un volumen determinado de extracto (30 µl). Los resultados se interpolan en la curva de calibrado de Trolox (1 mM) y se expresan en µg equivalentes de Trolox por gramo de peso húmedo. Para los ensayos de pérdida de la capacidad antirradicalaria se incuban las muestras en baño de agua a ebullición a diferentes tiempos que van desde los 0 a los 80 minutos y los resultados se expresan en tanto por ciento (%) de degradación.

3.2.5. Método del pH diferencial.

Para la obtención de las antocianidinas monoméricas totales se utiliza el método diferencial de pH (Giusti y Wrolstad, 1996). La antocianidina experimenta una transformación reversible con los cambios de pH manifestado con un llamativo cambio en la absorbancia. La forma oxonium predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4,5. El pH diferencial es un método basado en esta reacción, y permite una rápida y exacta medida, incluso en la presencia de pigmentos degradados polimerizados y de otros compuestos interferentes.

Se utilizan dos disoluciones a diferente pH. Por un lado el tampón de 0,2M KCl a pH 1 y por otro el tampón de 0,2M NaAc a pH 4,5.

Para la obtención de la concentración de antocianidinas se utiliza la fórmula del pH diferencial:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH1}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH4.5}}$$

En donde A_{510} es la absorbancia a 510 nm a pH 1 y a pH 4,5, y A_{700} es la absorbancia a 700 nm. Para calcular la concentración de la muestra original se sigue la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianidina monomérica (mg/l)} = (A * P_m * FD * 1000) / (\epsilon * l)$$

Donde A es la absorbancia antes calculada. FD es el factor de dilución. ϵ es el coeficiente de extinción molar ($26\ 900\ \text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) y P_m es el peso molecular de la cianidín-3-glucósido (449,6 g/mol).

Para los ensayos de degradación, las muestras se incuban a 100° C a diferentes tiempos que van desde los 0 a los 80 minutos y los resultados se expresan en tanto por ciento (%) de degradación.

3.2.6. Cromatografía líquida de alta resolución para la determinación del contenido en cianidín-3-glucósido en extractos de *S. ebulus*.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica de separación cromatográfica basada en la diferencia de distribución de las especies entre dos fases no miscibles, en la que la fase móvil es un líquido que atraviesa por percolación una fase estacionaria contenida en una columna.

3.2.6.1. Aparato.

El aparato se compone de un sistema de bombeo, un inyector, una columna cromatográfica, un controlador de la 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, normalmente a un caudal constante, y después a través del detector.

3.2.6.2. Sistemas de bombeo.

Los sistemas de bombeo para la HPLC, deben suministrar la fase móvil a un caudal constante. Las fluctuaciones de presión se deben minimizar, por ejemplo, haciendo pasar el disolvente a presión a través de un dispositivo que amortigüe los pulsos. Los tubos y conexiones deben poder resistir las presiones desarrolladas por el sistema de bombeo. Los sistemas controlados por microprocesador son capaces de suministrar exactamente una fase móvil de composición constante (elución isocrática) o variable (elución en gradiente), según un programa definido. En el caso de la elución en gradiente, existen sistemas de bombeo que suministran los disolventes desde diversos depósitos y la mezcla de los disolventes se puede efectuar en el lado de baja presión o en el lado de alta presión de la bomba o bombas.

3.2.6.3. Inyectores.

La disolución de la muestra se introduce en la fase móvil circulante en la cabeza de la columna, o cerca de ella, utilizando un sistema de inyección que puede trabajar a alta presión. Se utilizan dispositivos de bucle fijo y de volumen variable que funcionan manualmente o mediante un inyector de

muestras automático. El rellenado parcial de los bucles de forma manual puede llevar a una menor precisión del volumen de inyección.

3.2.6.4. Fases estacionarias.

En HPLC se utilizan muchos tipos de fases estacionarias, principalmente:

—sílice, alúmina o grafito poroso, utilizados en cromatografía en fase normal, en la que la separación se basa en las diferencias de adsorción y/o de distribución de masas;

—resinas o polímeros con grupos ácidos o básicos, utilizados en cromatografía de intercambio iónico, en la que la separación se basa en la competición entre los iones a separar y los de la fase móvil;

—sílice o polímeros porosos, utilizados en cromatografía de exclusión por tamaño, en la que la separación se basa en las diferencias de volumen entre las moléculas, lo que corresponde a una exclusión estérica;

—una variedad de soportes modificados químicamente preparados a partir de polímeros, sílice o grafito poroso, utilizados en HPLC en fase inversa, en la que la separación se basa principalmente en el reparto de las moléculas entre la fase móvil y la fase estacionaria;

—fases estacionarias modificadas químicamente especiales, por ejemplo derivados de la celulosa o la amilosa, proteínas o péptidos, ciclodextrinas, etc., para la separación de enantiómeros (cromatografía quiral).

La mayor parte de las separaciones se basan en mecanismos de reparto utilizando sílice modificada químicamente como fase estacionaria y disolventes polares como fase móvil. La superficie del soporte, por ejemplo los grupos silanol de la sílice, se hace reaccionar con diferentes reactivos de

silano para producir derivados de sililo ligados covalentemente que abarcan un número variable de sitios activos sobre la superficie del soporte. La naturaleza de la fase ligada es un parámetro importante para determinar las propiedades de separación del sistema cromatográfico.

Para las separaciones analíticas, el tamaño de las partículas de las fases estacionarias más comúnmente utilizadas varía entre 3 μm y 10 μm . Las partículas pueden ser esféricas o irregulares, de porosidad y área superficial específica variables. Estos distintos parámetros contribuyen al comportamiento cromatográfico de una fase estacionaria particular.

En el caso de fases inversas, son factores determinantes adicionales, la naturaleza de la fase estacionaria, el grado de ligamiento, por ejemplo expresado como la carga de carbono, y el hecho de que la fase estacionaria esté recubierta o no en los extremos («end-capping», es decir, sililación de los grupos silanol residuales). Cuando están presentes grupos silanol residuales pueden aparecer colas en los picos, particularmente en las sustancias básicas.

Para cromatografía analítica se utilizan columnas, de acero inoxidable de longitud y diámetro interior variables. La temperatura de la fase móvil y de la columna se debe mantener constante durante el análisis para obtener una mayor eficacia. Se recomienda no calentar las columnas por encima de 60° C a causa de la posible degradación de la fase estacionaria o posibles cambios en la composición de la fase móvil.

3.2.6.5. Fases móviles.

Para la cromatografía en fase normal, se emplean disolventes menos polares. La presencia de agua en la fase móvil debe ser estrictamente

controlada para obtener resultados reproducibles. En HPLC en fase inversa, se emplean fases móviles acuosas, con o sin modificadores orgánicos.

Los componentes de la fase móvil generalmente se filtran para eliminar las partículas de tamaño superior a 0,45 μm . Los disolventes normalmente se desgasifican antes del bombeo, mediante el paso de una corriente de helio, tratamiento con ultrasonidos o utilización en línea de módulos de membrana/vacío, para evitar la creación de burbujas de gas en la cubeta del detector.

Los disolventes utilizados para preparar la fase móvil están normalmente exentos de estabilizantes y son transparentes a la longitud de onda de la detección, si se emplea un detector ultravioleta. Los disolventes y otros componentes empleados deben ser de calidad apropiada. El ajuste del pH, si fuera necesario, se efectúa exclusivamente sobre el componente acuoso de la fase móvil y no sobre la mezcla. Si se utilizan disoluciones tampón, se realiza un lavado adecuado del sistema con una mezcla de agua y el modificador orgánico de la fase móvil (5 por ciento V/V) para evitar la cristalización de las sales una vez finalizada la cromatografía.

Las fases móviles pueden contener otros componentes, por ejemplo un contra-ión para la cromatografía de par iónico o un selector quirál para la cromatografía que utiliza una fase estacionaria quiral.

3.2.6.6. Detectores.

Los detectores más utilizados son los espectrofotómetros en el ultravioleta/visible (UV/Vis), incluyendo los detectores de barra de diodos. También se pueden utilizar espectrofotómetros de fluorescencia, refractómetros diferenciales, detectores electroquímicos, espectrómetros de

masas, detectores de difusión de la luz, detectores de radiactividad u otros detectores especiales.

3.2.6.7. Método.

Equilibrar la columna con la fase móvil y el caudal prescritos, a temperatura ambiente o a la temperatura especificada en la monografía, hasta que se consiga una línea base estable. Preparar las disoluciones de la sustancia a examinar y de las sustancias de referencia requeridas. Las disoluciones deben estar exentas de partículas sólidas. Para ello en el presente trabajo se han filtrado todas las soluciones a través de filtros de jeringa de 13 mm de diámetro con membranas de nylon de 0,45 μm .

En el presente trabajo se ha utilizado un sistema cromatográfico modular Jasco ubicado en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica - Instituto Universitario de Farmacia Industrial de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, formado por los siguientes componentes:

- Interfaz LC-NET II/ADC.
- Desgasificador DG-2080-54.
- Unidad de gradiente cuaternario LG-2080-04.
- Bomba PU-2080 Plus.
- Inyector AS-2050 Plus para 100 muestras.
- Inyector UV-2070 Plus con función PDA.
- Horno CO-2065 Plus.

Los datos generados son transmitidos a través de una interfaz LC-NET II/ADC a un ordenador dotado del programa ChromNav y SpectraManager.

Los parámetros cromatográficos empleados en esta memoria son los siguientes:

- Fase estacionaria: Spherisorb ODS-1 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) acoplado a un guardacolumna (4 x 3 mm)
- Temperatura de análisis: 40 ° C
- Fase móvil: A: 1% fosfórico-10% acético (pH 1,5)
 B: ACN

Composición de la fase móvil respecto al tiempo de cromatograma:

t cromatograma (min)	Incremento en A (%)	Modalidad
0-10	2-20	Gradiente
10-15	20-2	Gradiente

- Flujo: 1 ml/min (P 20,3 bar)
- Detección: PDA 520 nm
- Volumen de inyección: 20 μ l

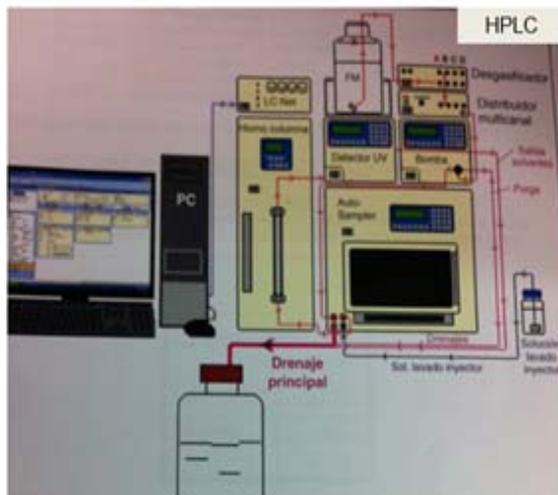
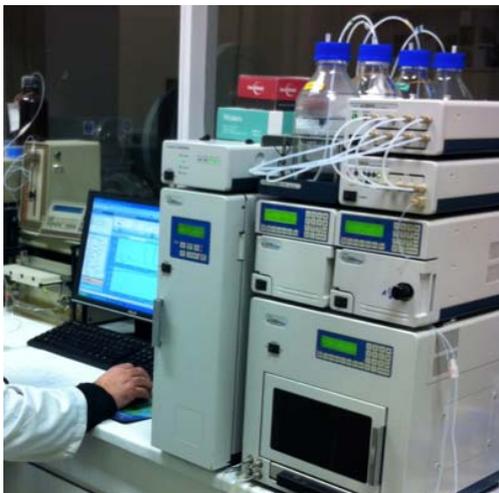


Figura M7. Sistema cromatográfico “JASCO”. Instituto Universitario de Farmacia Industrial. Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Los componentes de la fase móvil se filtraron a través de membranas Supor[®] (Pall) de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de diámetro interno empleando una unidad de filtración Millipore[®] acoplada a un sistema de vacío (Büchi Vac V-500), conforme al procedimiento interno PGL 001/0. La desgasificación de los medios recién filtrados se llevó a cabo en un baño de ultrasonidos Ultrasons H. Selecta durante 25 minutos.

Localizamos el pico de cianidín-3-glucósido en las diferentes partes del *S. ebulus* así como en la degradación de los frutos maduros a partir del estándar pinchando los siguientes viales:

Vial 1: 100 µl de extracto de frutos maduros de *S. ebulus* + 900 µl agua Elix-Millipore.

Vial 2: 100 µl de extracto de hojas maduras de *S. ebulus* + 900 µl agua Elix-Millipore.

Vial 3: 100 µl de extracto de umbelas de frutos maduros de *S. ebulus* + 900 µl agua Elix-Millipore.

Vial 4: 100 µl de extracto de brotes de *S. ebulus* + 900 µl agua Elix-Millipore.

Vial 5: 100 µl de extracto de ápices de *S. ebulus* + 900 µl agua Elix-Millipore.

Vial 6: 100 µl de extracto frutos verdes de *S. ebulus* + 900 µl agua Elix-Millipore.

Vial 7: 100 µl de extracto de frutos verdes pequeños de *S. ebulus* + 900 µl agua Elix-Millipore.

Vial 8: 100 μ l de extracto de flores de *S. ebulus* + 900 μ l agua Elix-Millipore.

Vial 9: 100 μ l de extracto de umbelas de frutos verdes de *S. ebulus* + 900 μ l agua Elix-Millipore.

Vial 10. 100 μ l Patrón de Cianidín-3-glucósido + 900 μ l agua Elix-Millipore.

3.2.7. Preparación de los extractos para electroforesis.

Para obtener los extractos proteicos pesamos 10 g de cada tejido (ápices, brotes, flores, frutos verdes pequeños, umbelas de frutos verdes, frutos verdes, umbelas de frutos maduros, frutos maduros, hojas maduras) de *S. ebulus*. Se trituran en el mortero con 100 ml de tampón de extracción PBS (NaCl 0,28 M y NaP 5mM) a pH = 7,5, en el caso de frutos verdes y maduros, y el resto de tejidos se cortan y se muelen en el molinillo con 100 ml de tampón de extracción PBS. La fracción proteica se extrae por agitación durante 30 minutos a 4° C. Filtramos con malla de nylon y centrifugamos 45 min a 3.500 r.p.m a 4° C; realizándose una segunda centrifugación durante 30 min en las mismas condiciones. Recogemos el sobrenadante y filtramos en papel de filtro, alicuotamos y guardamos las muestras así obtenidas a -20° C. Parte de las muestras se dializaron frente a agua MiliQ y parte no, para comparar los efectos en los dos casos.

3.2.8. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. Uno de los métodos más comúnmente empleado de electroforesis de proteínas es el que emplea geles de

poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecil sulfato sódico. Esta técnica es conocida como SDS-PAGE de Laemmli (1970). En nuestro caso se utilizó un sistema de Amersham Biosciences.

Para la realización de la electroforesis, en primer lugar, se limpian los cristales necesarios para la formación del gel con acetona, se montan los cristales y los separadores en su soporte específico, posteriormente se prepara el gel que está formado por dos fases con distinta concentración de poliacrilamida.

El gel separador se forma con una mezcla de un 14,6% (p/v) para geles del 15% de acrilamida y un 0,4% (p/v) de bisacrilamida, Tris-HCl 375mM (pH=8,8), SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,1% (p/v) y TEMED 0,07% (v/v). El gel de apilamiento o de “stacking” está formado por 3,9% (p/v) de acrilamida, 0,1% (p/v) bisacrilamida, Tris-HCl 125mM (pH=6,8), SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,08% (p/v) y TEMED 0,08% (v/v). Las muestras se incuban durante 5 minutos a 100° C en Tris-HCl 62,5mM (pH=6,8), SDS al 2% (p/v), glicerol 10% (v/v) y 0,025% (p/v) de azul de bromofenol.

En la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, la separación de proteínas se hace en función de la masa molecular. Tanto es así que la representación del logaritmo de la masa molecular frente a la distancia migrada obedece a una línea recta para gran número de proteínas. Para que esta dependencia sea correcta y los dos valores representados guarden una relación lineal, es preciso romper los puentes disulfuro intra e intercatenarios, para lo cual se añade, durante la preparación de la muestra, un agente reductor, generalmente 2- mercaptoetanol.

Para aplicar la muestra al gel, se le suele añadir un agente que provoque una restricción de la difusión, que haga la muestra más densa, en este caso, glicerol. Además, para seguir el avance de la separación, se añade

un colorante, como azul de bromofenol, que sirve como medio de contraste para el seguimiento (“tracking dye”).

Posteriormente, se llenan las cámaras superior e inferior de la cubeta con tampón de electroforesis de modo que entre en contacto con ambos extremos del gel. Después de depositar las muestras en los pocillos, la electroforesis se lleva a cabo a 20° C con una intensidad de corriente de 25mA por gel en tampón Tris-HCl 25mM (pH=8,3), glicina 192mM y SDS 0,1% (p/v). El proceso finaliza cuando el azul de bromofenol sale del gel por la parte inferior.

3.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE INFLORESCENCIA DE *S. EBULUS*.

3.3.1. Preparación del extracto crudo de inflorescencias de *S. ebulus*

El material del que se parte es de 200 g de inflorescencias (recogidos en el mes de Julio de 2012 en Barruelo del Valle localidad de la provincia de Valladolid), se congelaron a -24° C y se almacenaron hasta su uso.

Las inflorescencias se trituran en presencia de 4 volúmenes de tampón de extracción (NaCl 0,28 M y NaP 5mM pH = 7,5). La extracción se realiza con agitación constante durante 12 horas a 4° C de temperatura. Se filtra el extracto con una gasa doble de nylon, y se centrifuga a 4° C, durante 45 min y a 3.500 rpm.

Posteriormente se realiza una segunda centrifugación en las mismas condiciones durante 30 minutos. Recogemos el sobrenadante y filtramos con filtro de papel de doble capa con pliegues. El extracto obtenido en el proceso se denomina extracto crudo y es el punto de partida para la purificación.

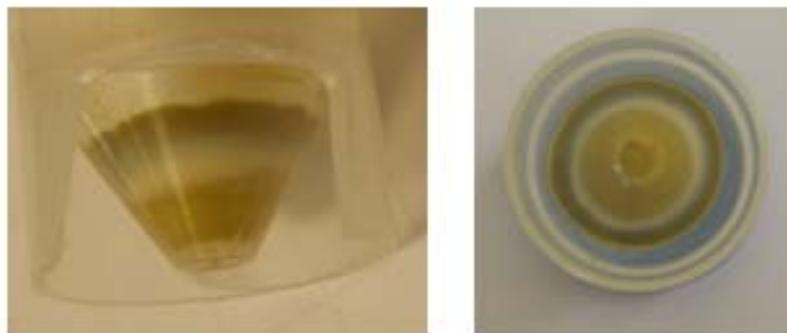


Figura M8. Sedimento obtenido en la 1ª centrifugación del extracto de flores de *S. ebulus*. En el sedimento obtenido de la primera centrifugación se observan varias capas de distinto color. El fondo de color verde oscuro está constituido por partículas no retenidas por la grasa de filtrado. La capa central de color blanco constituida por un mucílago plástico muy pegajoso que se adhiere fuertemente a la superficie de los materiales empleados para la extracción y que está presente en todas las preparaciones de *S. ebulus*, lo que hace necesario su eliminación previa del extracto.

3.3.2. Preparación de Sepharose 6B tratada con ácido (AT-Sepharose 6B).

Partimos de un volumen de 350 ml de AT-Sepharosa 6B. Lavamos el gel repetidas veces con agua MiliQ para eliminar el etanol. Se trata con HCl 0,1 N a 50° C durante 3 horas. Posteriormente se realizan varios lavados por decantación con 5 volúmenes de agua hasta obtener un pH del sobrenadante entre 6 y 6,5. En los procesos de decantado se eliminan partículas finas que se generan con el tratamiento. El gel se almacena en disolución acuosa a 4° C.

3.3.3. Cromatografía de afinidad a través de AT-Sepharose 6B.

El extracto crudo se carga en columna refrigerada GE-Pharmacia XK50 rellena con AT-Sepharose 6B. El flujo de la columna se ve determinado, además de otras variables, por la acción de la gravedad siendo

aproximadamente de 8 ml/min. Controlamos el pH de salida hasta que llegue a pH de 7,5. Las proteínas se fijan por afinidad a D-galactosa al gel de AT-Sepharose 6B y el resto (proteínas pigmentos, polifenoles, etc.) eluye de la columna. Debe procurarse que al final la resina esté perfectamente empaquetada y su superficie superior perfectamente horizontal sin oquedades generadas en la carga del extracto. Posteriormente se lava la columna con tampón de extracción hasta que se produce la decoloración de la resina por eliminación del material no retenido.



Figura M9. (A) Detalle de carga del extracto crudo de flores. (B) posterior lavado con buffer de extracción pH 7,5.

En algunos casos se observa un ligero poso en la parte superior del gel (con mucho cuidado y con una pipeta Pasteur lo quitamos para que el lavado sea perfecto). Después se lava con tampón salino 5mM fosfato monosódico, 0,28M NaCl (pH=7,5). Todo el proceso se realiza a una temperatura de 0° C.

El lavado se da por finalizado cuando la densidad óptica a 280 nm es inferior a 0,1 utilizando como blanco el mismo buffer de extracción. Posteriormente se eluye con el mismo tampón conteniendo lactosa 0,2M, se recogen fracciones de 10 ml y se miden A_{280} . A la fracción proteica eluida se le denomina pico de afinidad.

3.3.4. Cromatografía de exclusión molecular a través de Superdex 75 HiLoad 26/60.

La muestra obtenida en el apartado anterior, se carga en una columna de exclusión molecular Superdex 75 HiLoad 26/60 (preparative grade) de GE-Pharmacia previamente equilibrada con tampón de baja fuerza iónica 0,025M fosfato sódico y 0,075 M NaCl pH 7,2 y seguidamente con dos volúmenes de otro tampón constituido por 0,05 M fosfato sódico y 0,15 M NaCl (pH = 7,2), y finalmente antes de cargar las proteínas concentradas, se pasa un volumen del tampón con el que finalmente serán eluidas las proteínas. A este tampón le denominamos tampón de proteína, constituido por 0,005M fosfato sódico y 0,4 M NaCl a pH 7,5.

Los primeros 60 ml se recogen con una probeta y a continuación se recogen fracciones de 5ml. Medimos las absorbancias de las diferentes fracciones a 280 nm e identificamos tres picos bien diferenciados. El primer pico corresponde a SNAI, el segundo a nigrina b y el tercero a SNAII. Se juntan las fracciones con proteína de cada uno de los picos y la mezcla se somete a diálisis frente agua Elix-Millipore por separado, para eliminar los restos de lactosa, y posteriormente se concentran las muestras en una celda de filtración Amicon, usando una membrana YM-10.

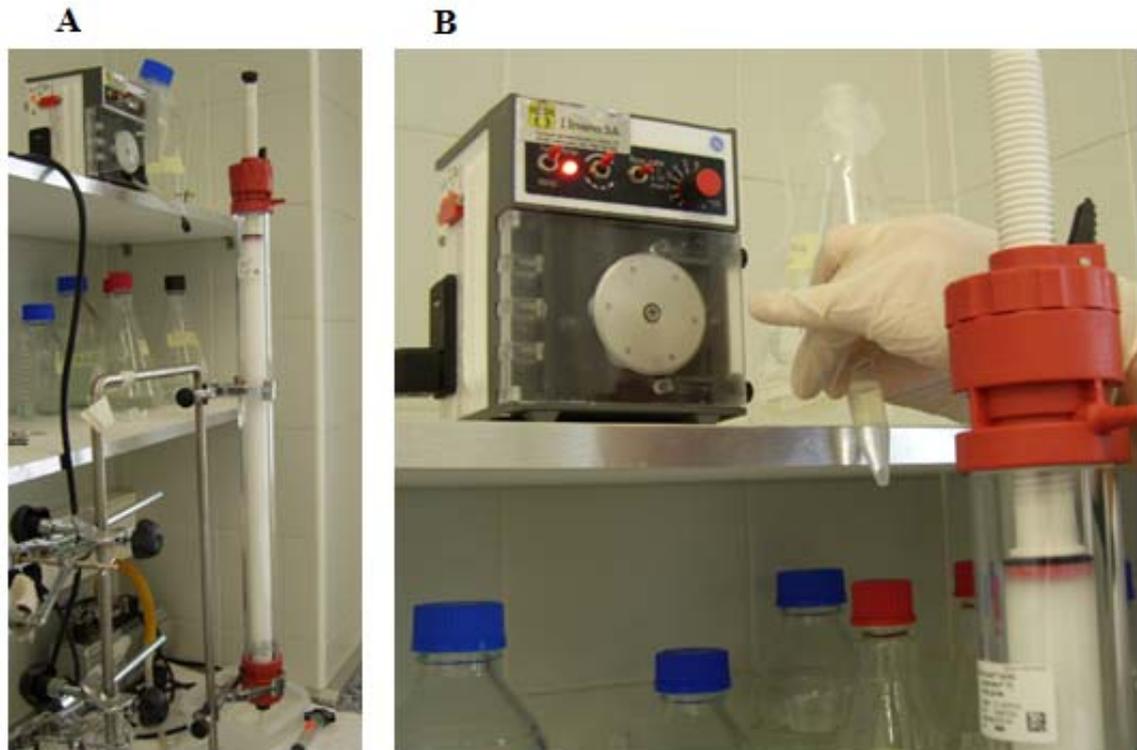


Figura M10. Cromatografía de exclusión molecular a través de Superdex 75.

3.3.5. Medida de la concentración de proteínas por el método Kalb & Bernlohr.

Para el cálculo de la concentración de proteínas de las fracciones proteicas recogidas durante la fase de extracción y purificación, utilizamos la fórmula propuesta por Kalb y Bernlohr (1977) que está basada en mediciones realizadas por espectrofotometría. La formula tiene la siguiente expresión:

$$[\text{Proteína}] = 183 (A_{230} - A_{320}) - 75,8 (A_{260} - A_{320}) = X \mu\text{g/ml}$$

A_{230} , A_{320} y A_{260} son las medidas de la absorbancias obtenidas de la muestra a las respectivas longitudes de onda 230, 320 y 260 nm. Las absorbancias se midieron en el espectrofotómetro.

3.3.6. Determinación de la masa molecular de ebulina blo y SELblo por espectrofotometría de masas.

Las determinaciones de espectrometría de masas se realizaron en el Centro de Genómica y Proteómica de la Facultad de Farmacia-UCM por personal altamente especializado.

La determinación de las masas moleculares de la ebulina blo y la SELblo, se realizó tomando 1 µl de muestra (3,8 µg/µl) y colocándolo sobre la placa de muestra blanco donde se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se coloca sobre la mancha de la muestra seca 0,5 µl de una solución saturada de ácido sinapínico en 30% acetonitrilo y 0,3% trifluoroacético, y se vuelve a dejar secar a temperatura ambiente.

Se obtuvieron los espectros de masas de las muestras usando como estándar externo albúmina sérica bovina (BSA) con un espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems MDS Sciex) operado en modo lineal positivo a un voltaje de aceleración de 20.000 V y una intensidad de disparo laser entre 20.000 y 150.000.

3.3.7. Identificación de proteínas por espectrometría de masas y análisis de secuencias de péptidos trípticos.

La identificación de proteínas se realizó mediante péptidos trípticos. El tratamiento de las muestras para su análisis consistió en su reducción con 10 mM ditioneitol (DTT) en 24 mM bicarbonato amónico durante 30 minutos a una temperatura de 37° C. Posteriormente se someten a alquilación con 55 mM iodoacetamida en 25 mM bicarbonato durante 15 minutos en oscuridad. Por último las muestras se digieren con tripsina de grado de secuencia (Roche Molecular Biochemicals) a una disolución de

1:20 en 25 mM bicarbonato amónico (pH= 8,5) durante toda la noche a una temperatura de 37° C.

Terminada la digestión se coloca 1µl de la muestra digerida sobre la placa blanco MALDI y se deja secar a temperatura ambiente. A continuación se añade 0,5 µl de una matriz de 3 mg/ml de ácido α -cyano-4-hidroxi-trans-cinámico (Sigma) a las manchas de péptidos de la muestra digerida y se deja secar a temperatura ambiente.

Los análisis MALDI-TOF de espectrometría de masas de los péptidos trípticos se realizaron con el mismo espectrómetro que el utilizado para las proteínas. Para la calibración interna de los espectros de masas se usaron péptidos de la auto-digestión de la tripsina. Aquellos péptidos de las huellas trípticas con un cociente señal/ruido mayor a 20 fueron capturados y se representaron en forma de lista, similar a una lista de pesos moleculares monoisotópicos.

La identificación de las proteínas se realizó usando la base de datos NCBI Viridiplantae (Green Plants, que contiene 1.716.557 secuencias), buscando homologías con MASCOT 2.3 a través de Global Protein Server v3.6 de Applied Biosystems. Los parámetros para la búsqueda fueron los estándares utilizados en el Centro de Genómica y Proteómica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Para todas las identificaciones de proteínas su cálculo de probabilidad fue mayor que las fijadas por MASCOT con una significación $p < 0,5$.

3.4. TOXICIDAD EN RATONES.

La determinación de la actividad de las proteínas aisladas se realizó comprobando su toxicidad en ratones Swiss. Para ello se inyectaron diferentes dosis de 5, 3.75 y 2.5 mg/kg de peso corporal en solución acuosa

de ebulina blo por vía nasal en 24 ratones hembras (7 por cada diferente concentración y 3 ratones control). Los animales antes y después del tratamiento se mantuvieron en jaulas individuales con comida (dieta de pellets Harlam 2014) y agua potable *ad libitum*.



Figura M11. Toxicidad de ebulina blo vía nasal en ratones Swiss. La solución se instaló por igual en las dos fosas nasales con una punta especial de pipeta automática.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para analizar los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico utilizando los programas de software Microsoft Office Excel 2007 y Graph Pad Prism 6 Demo.

El software Microsoft Office Excel 2007 se utilizó para la realización de las diferentes gráficas, así como para la obtención de la desviación

estándar de las diferentes medidas con respecto a la media. El software Graph Pad Prism 6 Demo se utilizó para obtener el índice de correlación de Pearson entre los métodos de Folin – Ciocalteau, CUPRAC y DPPH.

4. RESULTADOS.

4.1. PARTES DEL *S. EBULUS* UTILIZADAS.

La recogida de las diferentes partes del *S.ebulus* se realizó en la localidad de Barruelo del Valle (Valladolid). Las características del lugar son idóneas para el crecimiento de esta especie vegetal: altitud: 810 metros sobre el nivel del mar; coordenadas: 41° 40' 27" N, 5° 4' 9" O; la temperatura media de mínimas es de -9,0° C y la media de máximas es de 18,6° C. El mes más frío es enero y el más cálido es julio siendo el periodo de heladas de casi 8 meses. Los meses más lluviosos corresponden, por este orden, a mayo y a noviembre siendo las precipitaciones máximas en 24 horas de 34 milímetros. La pluviometría media es de 464 mm anuales y el terreno es de suelos arcillosos (45 %) de drenaje lento o muy lento.

En las tablas R1 y R2 se muestran los datos correspondientes a los meses de recogida del material biológico y las dimensiones del mismo.

Tabla R1. Meses de recogida de las diferentes partes del *S. ebulus*.

<i>S. ebulus</i>	Mes de recogida
Ápices	Abril
Brotes	Mayo
Flores	Junio
Frutos verdes pequeños	Junio
Umbelas de frutos verdes	Julio
Frutos verdes	Julio
Umbelas de frutos maduros	Agosto
Frutos maduros	Agosto
Hojas maduras	Agosto

Tabla R2. Descripción de las diferentes partes del *S. ebulus*.

<i>S. ebulus</i>	Largo (mm)	Ancho (mm)
Ápices	18 mm	3 mm
Brotes	80 mm	15 mm
Flores	5 mm	5 mm
Frutos verdes pequeños	3 mm	2 mm
Umbelas de frutos verdes	70 mm	80 mm
Frutos verdes	4 mm	3 mm
Umbelas de frutos maduros	80 mm	100 mm
Frutos maduros	6 mm	5 mm
Hojas maduras	130 mm	50 mm

Las extracciones se realizaron por triplicado. Estos extractos se utilizaron en los distintos métodos espectrofotométricos aplicados: determinación de fenoles totales con el reactivo de Folin - Ciocalteau, determinación de la capacidad antioxidante total por el método CUPRAC, determinación de la capacidad antirradicalaria total con DPPH y determinación de los antocianos totales mediante el método diferencial de pH.

4.2. DETERMINACIÓN DE LOS FENOLES TOTALES CON EL REACTIVO DE FOLIN – CIOCALTEAU.

En primer lugar se realizaron rectas patrón con ácido gálico. Los experimentos se realizaron por triplicado y se calculó el valor medio de las diferentes absorbancias. En la figura R1 se representa la recta patrón de

absorbancias a 760 nm frente a diferentes volúmenes de ácido gálico 2,5 mM.

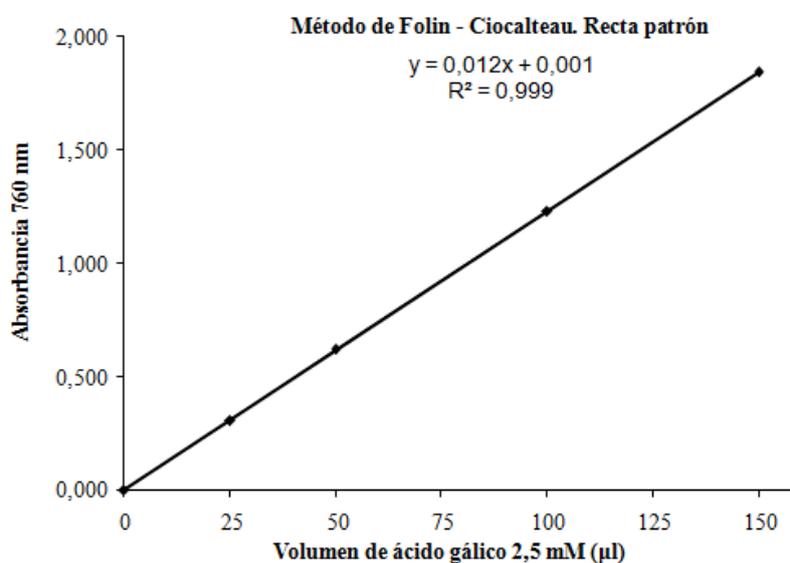


Figura R1. Recta patrón de la reacción de ácido gálico con el reactivo de Folin – Ciocalteu.

Para medir las muestras de extractos sustituimos el patrón por 100 µl de extracto crudo de cada parte del *S. ebulus*, excepto en los frutos maduros que se utilizan 60 µl de extracto crudo. Los resultados se muestran en la tabla R3.

Tabla R3. Método de Folin – Ciocalteu. Fenoles Totales de las diferentes partes de *S. ebulus*. PH: peso húmedo.

Fenoles totales. Folin - Ciocalteu	µg equiv. de ac. gálico/g de PH Media ± Desviación Estándar
Umbelas de fruto verde	1.176 ± 47
Flores	1.316 ± 41
Frutos verdes pequeños	1.598 ± 62
Frutos verdes	1.721 ± 60

Ápices	1.997 ± 190
Brotes	2.240 ± 71
Umbelas de frutos maduros	2.274 ± 36
Hojas maduras	2.365 ± 83
Frutos maduros	7.561 ± 83

En la figura R2 se muestran dichos valores en forma de histograma para apreciar mejor las diferencias.

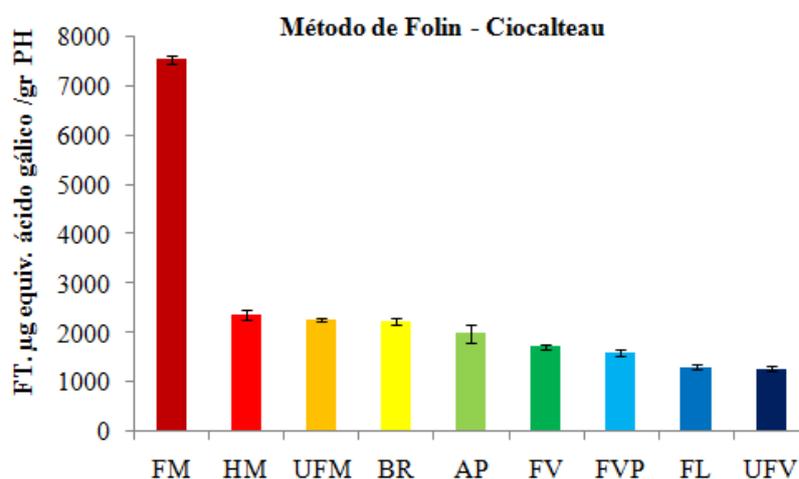


Figura R2. Fenoles totales presentes en las distintas partes de *S. ebulus*. Extractos de las partes de *S. ebulus*. (FM) Frutos maduros, (HM) Hojas maduras, (UFM) Umbelas de frutos maduros, (BR) Brotes, (AP) Ápices, (FV) Frutos verdes, (FVP) Frutos verdes pequeños, (FL) Flores, (UFV) Umbelas de frutos verdes.

4.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CA) POR EL MÉTODO DE CUPRAC.

Aunque el procedimiento de determinación de fenoles totales con el reactivo de Folin – Ciocalteu evalúa también la capacidad antioxidante de

una muestra, dado que el proceso se basa en una reacción de oxidoreducción, se considera conveniente también evaluar la actividad antioxidante utilizando el método CUPRAC (Apak y cols., 2007).

En primer lugar se determinó la recta patrón también con ácido gálico. Los experimentos se realizaron por triplicado y se calculó el valor medio de las diferentes absorbancias. En la figura R3 se representa la recta patrón de absorbancias a 450 nm frente a los volúmenes de ácido gálico 1 mM. Para medir las muestras de extracto se sustituyó el patrón por 50 µl de extracto crudo de cada parte del *S. ebulus*, excepto en los frutos maduros que se utilizaron 20 µl de extracto crudo.

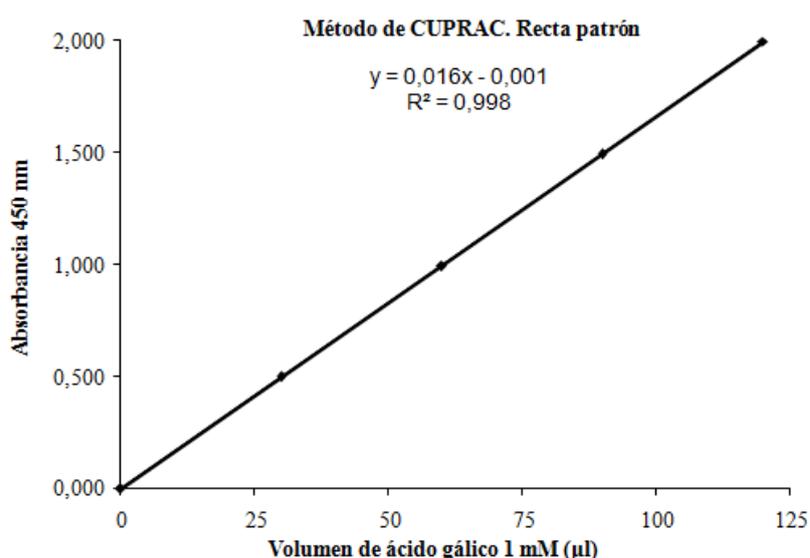


Figura R3. Recta patrón de la capacidad antioxidante de ácido gálico por el método CUPRAC.

Tabla R4. Método de CUPRAC. Capacidad antioxidante de las diferentes partes de *S. ebulus*. PH: peso húmedo.

Capacidad antioxidante.	µg equiv. de ac. gálico/g de PH
-------------------------	---------------------------------

CUPRAC	Media \pm Desviación Estándar
Umbelas de fruto verde	509 \pm 12
Flores	668 \pm 9
Frutos verdes pequeños	703 \pm 14
Frutos verdes	747 \pm 4
Ápices	782 \pm 5
Brotes	810 \pm 21
Umbelas de frutos maduros	951 \pm 26
Hojas maduras	1.108 \pm 32
Frutos maduros	3.529 \pm 66

En la figura R4 se muestran los mismos valores en histograma para visualizar mejor las diferencias.

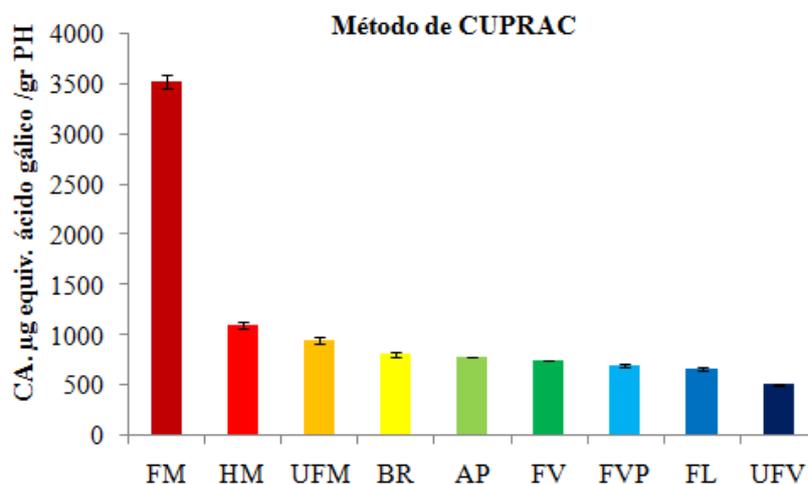


Figura R4. Histograma. Método de CUPRAC. Capacidad antioxidante. Extractos de las partes de *S. ebulus*. (FM) Frutos maduros, (HM) Hojas maduras, (UFM) Umbelas de frutos maduros, (BR) Brotes, (AP) Ápices, (FV) Frutos verdes, (FVP) Frutos verdes pequeños, (FL) Flores, (UFV) Umbelas de frutos verdes.

4.4.DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA CON DPPH.

La determinación de la capacidad antirradicalaria se realizó mediante el análisis de la caída de absorción frente a radicales libres estables tales como DOPPH y DPPH con el tiempo. En primer lugar se estudió DOPPH, radical libre ofrecido por la empresa SIGMA-ALDRICH como similar a DPPH.

4.4.1. Comparación de la reactividad de radicales libres DOPPH y DPPH frente a Trolox.

El radical libre estabilizado que se utilizó en la determinación de la actividad antirradicalaria es el DPPH y el compuesto patrón el Trolox, un análogo de la vitamina E. La empresa SIGMA-ALDRICH ofrecía también el DOPPH como “sinónimo” del DPPH (probablemente se refería a equivalente). En las figuras R5, R6, R7 se presentan las fichas de seguridad de ambos productos

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006
Versión 4.0 Fecha de revisión 08.07.2010
Fecha de impresión 27.03.2012

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA/MEZCLA Y DE LA COMPAÑÍA O EMPRESA

Nombre del producto : 2,2-Di(4-*tert*-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl, free radical
Referencia : 257621
Marca : Aldrich

3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

Sinónimos : DPPH
Formula : C₃₄H₄₅N₅O₆
Peso molecular : 618,74 g/mol

Figura R5. Ficha de seguridad (FDS) del radical DOPPH: (2,2-Di (4-Tert-Octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) donde indica que es sinónimo del DPPH de forma incorrecta.

SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD
de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006
Versión 5.2 Fecha de revisión 18.05.2013
Fecha de impresión 23.05.2013

SECCIÓN 1: Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa

1.1 Identificadores del producto

Nombre del producto : 2,2-Di(4-*tert*-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl, free radical

Referencia : 257621
Marca : Aldrich

SECCIÓN 3: Composición/información sobre los componentes

3.1 Sustancias

Formula : C₃₄H₄₄N₅O₆
Peso molecular : 618,74 g/mol
No. CAS : 84077-81-6

Figura R6. Fichas de seguridad (FDS) del radical DOPPH: (2,2-Di (4-Tert-Octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) donde desaparece el DPPH como sinónimo del DOPPH. Pm 618,74 g/mol.

SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD
de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006
Versión 5.0 Fecha de revisión 16.01.2013
Fecha de impresión 23.05.2013

SECCIÓN 1: Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa

1.1 Identificadores del producto

Nombre del producto : 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil

Referencia : D9132
Marca : Aldrich

SECCIÓN 3: Composición/información sobre los componentes

3.1 Sustancias

Sinónimos : DPPH
1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical
2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl

Formula : C₁₈H₁₂N₅O₆
Peso molecular : 394,32 g/mol

Figura R7. Fichas de seguridad (FDS) del radical DPPH: (2,2-Difenil-1-picrylhydrazyl). Pm 394,32 g/mol.

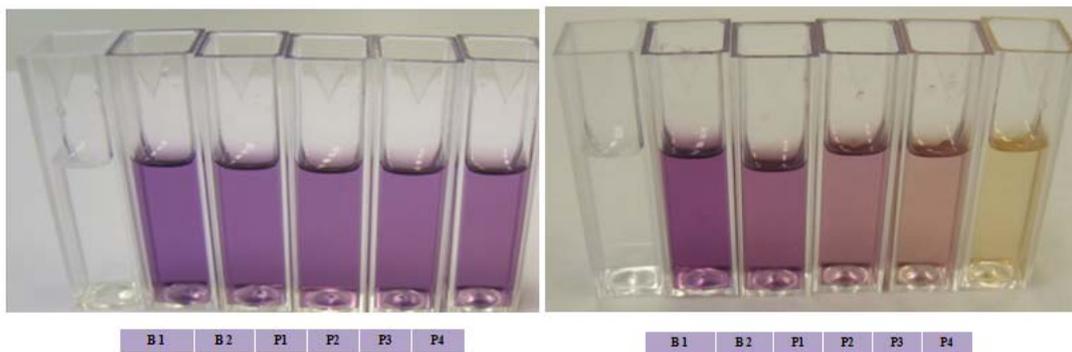


Figura R8. Detalle de las cubetas de reacción con DOPPH 0,1 mM y Trolox 4mM en 10 min (parte izquierda) y DPPH 0,1 mM y Trolox 1 mM en 10 min (parte derecha).

Nuestros estudios indicaron que ambos radicales reaccionaron de manera distinta al Trolox (Figura R8). El radical DOPPH necesitaba mayor concentración de Trolox y mucho más tiempo para su degradación. Concentraciones de Trolox 4 mM no consiguieron degradar el DOPPH 0,1 mM. En contraste, 1 mM de Trolox consiguió degradar el DPPH 0,1 mM en 10 minutos. Después de diferentes concentraciones y tiempos conseguimos una recta patrón lineal de DPPH 0,1 mM y Trolox 1 mM.

Nos pusimos en contacto con la empresa proveedora SIGMA-ALDRICH para comentar al servicio técnico de la empresa el diferente funcionamiento de los dos radicales. La empresa decidió quitar de la ficha de seguridad del DOPPH la palabra equivalente del DPPH (comparativa Figuras R5 y R6). En la actualidad si consultamos la página web de Sigma comprobamos que han eliminado en la FDS, que el radical DOPPH es sinónimo del DPPH. En las FDS se puede comprobar que los pesos moleculares son muy diferentes.

4.4.2. Medida de la capacidad antirradicalaria (AR). Recta patrón del radical DPPH 0,1 mM frente a Trolox 1 mM.

Realizamos la recta patrón por triplicado y calculamos el valor medio de las diferentes absorbancias. En la figura R9 se representa la recta patrón de (%) de degradación del radical DPPH 0,1 mM frente a los volúmenes de Trolox 1 mM. Para medir las muestras de extractos sustituimos el patrón por 30 μ l de extracto crudo de cada parte del *S. ebulus*.

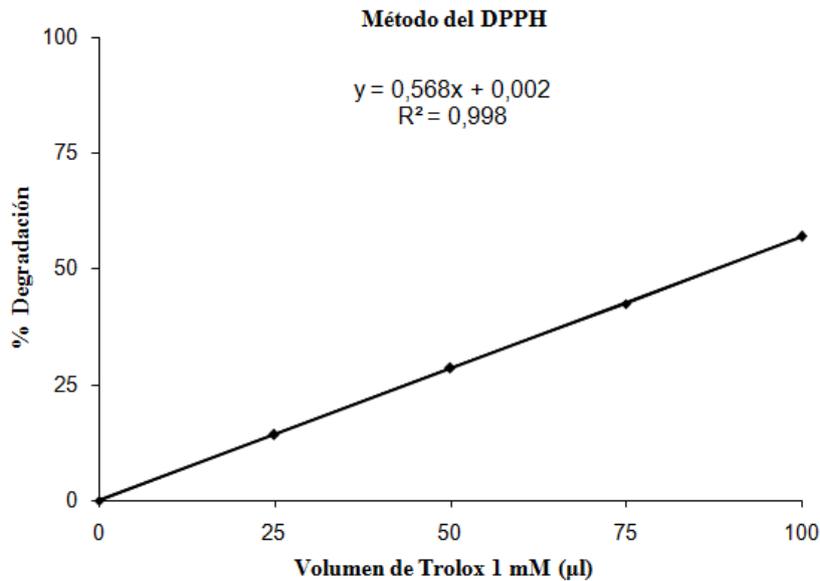


Figura R9. Gráfica. Recta patrón. Degradación (%) DPPH 0,1 mM – Trolox 1 mM.

Una vez obtenidas las absorbancias calculamos los μ gr equivalentes de Trolox por gr de peso húmedo de cada parte del *S. ebulus* (tabla R5) y representamos gráficamente a través de un histograma (figura R10) los resultados obtenidos.

Tabla R5. Método del radical DPPH. Capacidad antirradicalaria de las diferentes partes de *S. ebulus*. PH: peso húmedo.

Capacidad antirradicalaria.	μ g equiv. de Trolox/g de PH
-----------------------------	----------------------------------

DPPH	Media ± Desviación Estándar
Umbelas de fruto verde	405 ± 3
Flores	633 ± 95
Frutos verdes pequeños	755 ± 83
Frutos verdes	838 ± 60
Ápices	931 ± 50
Brotes	1.014 ± 70
Umbelas de frutos maduros	1.256 ± 58
Hojas maduras	1.557 ± 230
Frutos maduros	3.074 ± 78

En la figura R10 se muestran los mismos valores en histograma para visualizar mejor las diferencias.

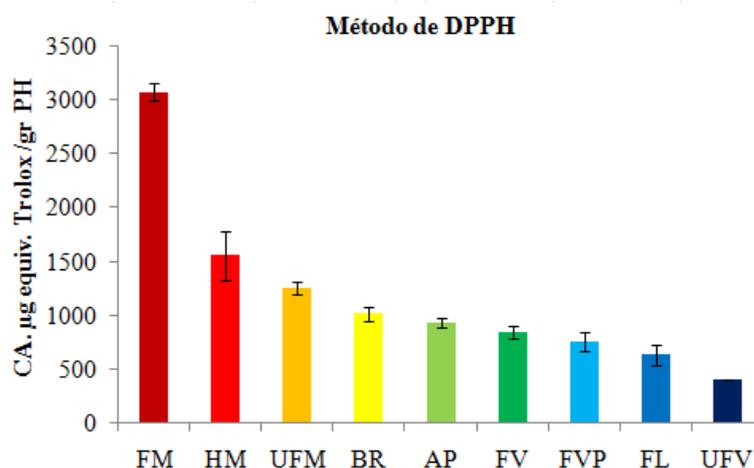


Figura R10. Histograma. Método del radical DPPH. Extractos de las partes de *S. ebulus*. (FM) Frutos maduros, (HM) Hojas maduras, (UFM) Umbelas de frutos maduros, (BR) Brotes, (AP) Ápices, (FV) Frutos verdes, (FVP) Frutos verdes pequeños, (FL) Flores, (UFV) Umbelas de frutos verdes. PH: peso húmedo.

4.5. MEDIDA DE LAS ANTOCIANIDINAS POR EL MÉTODO DIFERENCIAL DE PH.

Se realizan las medidas de las diferentes partes pero sólo son significativas las medidas en frutos maduros. En la tabla (tabla R6) se recogen los resultados expresados como antocianidinas monoméricas totales (AMT) en μg equivalentes de cianidín-3-glucósido por gramo de peso fresco.

Tabla R6. Método diferencial de pH. Antocianidinas monoméricas totales (μg equivalentes de cianidín-3-glucósido por gramo de peso húmedo de frutos maduros de *S. ebulus*). PH: peso húmedo.

Antocianidinas monoméricas totales. Método diferencial de pH	μg equiv. de cianidin-3-glucósido /g de PH Media \pm Desviación Estándar
Frutos maduros	2.175 \pm 25

Los volúmenes de muestra utilizados de extractos de frutos maduros fueron de 50 μl .



Figura R11. Medida de las antocianidinas por el método diferencial de pH. El color de las cubetas corresponde a pH 1 (parte superior) y pH 4,5 (parte inferior). Antocianidinas monoméricas totales. Detalle de cubetas de espectrofotometría. Extractos de las partes de *S. ebulus*. (B) Blanco, (FM) Frutos maduros, (HM) Hojas maduras, (UFM) Umbelas de frutos maduros, (BR) Brotes, (AP) Ápices, (FV) Frutos verdes, (FVP) Frutos verdes pequeños, (FL) Flores, (UMFV) Umbelas de frutos verdes.

4.6. MEDIDA DE LA DEGRADACIÓN POR TEMPERATURA DE LOS FENOLES TOTALES, DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y DE LAS ANTOCIANIDINAS DE LOS FRUTOS VERDES Y MADUROS DE *S. EBULUS*.

4.6.1. Medida de la degradación por temperatura de los fenoles totales en frutos maduros y frutos verdes de *S. ebulus* por el método de Folin-Ciocalteu.

Se midió la degradación de los fenoles totales a diferentes tiempos por el método de Folin – Ciocalteau. Se hirvieron los extractos crudos a 100° C a diferentes tiempos (0, 5,10, 15, 20, 40, 60 y 80 minutos). Los experimentos de degradación se realizaron con extractos crudos de frutos verdes y frutos maduros de *S. ebulus*.

La recta patrón utilizada es la misma que en el apartado anterior y también son coincidentes los factores de dilución. Los fenoles totales se expresaron en µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. A partir de ahí se obtuvieron las tablas en porcentaje de degradación respecto del tiempo (Tablas R7 y R8) y para una mejor visualización de los datos presentamos los valores en forma de histograma (Figuras R12 y R13).

Tabla R7. Determinación de fenoles totales en frutos maduros a diferentes tiempos y degradación. Se utilizó la reacción con el reactivo de Folin - Ciocalteau. PH: peso húmedo. DE: desviación estándar.

Fenoles totales. Tiempo (min)	µg equiv. de gálico/g de PH Media ± DE	Degradación (%) por ebullición. Media ± DE
0	7.561 ± 83	0,00 ± 0,00
5	7.456 ± 126	2,55 ± 1,64
10	7.255 ± 64	5,18 ± 0,83
15	7.037 ± 30	8,02 ± 0,39
20	6.730 ± 45	12,04 ± 0,59
40	4.115 ± 3	46,22 ± 0,03
60	2.695 ± 14	64,77 ± 0,18
80	1.687 ± 145	77,94 ± 1,89

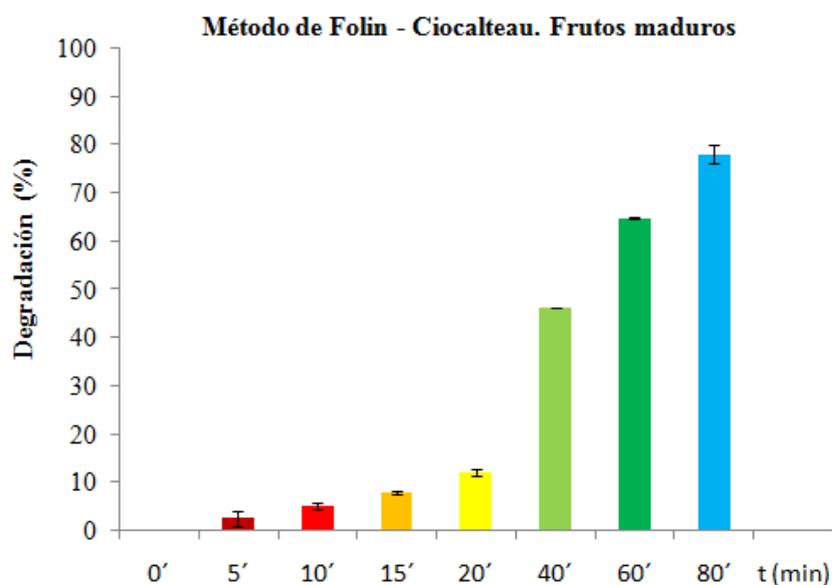


Figura R12. Degradación de los fenoles totales con respecto al tiempo. Se utilizó la reacción con el reactivo de Folin - Ciocalteu. Los extractos de frutos maduros de *S. ebulus* se sometieron a ebullición.

Tabla R8. Determinación de fenoles totales en frutos verdes a diferentes tiempos y degradación. Se utilizó la reacción con el reactivo de Folin - Ciocalteu. PH: peso húmedo. DE: desviación estándar.

Fenoles totales. Tiempo (min)	µg equiv. de gálico/g de PH Media ± DE	Degradación (%) por ebullición. Media ± DE
0	1.721 ± 60	0,00 ± 0,00
5	1.658 ± 79	3,69 ± 1,41
10	1.587 ± 92	7,85 ± 2,19
15	1.493 ± 108	13,32 ± 3,39
20	1.386 ± 67	19,47 ± 1,17
40	929 ± 28	45,99 ± 1,31

60	638 ± 19	62,94 ± 0,87
80	455 ± 38	73,61 ± 1,44

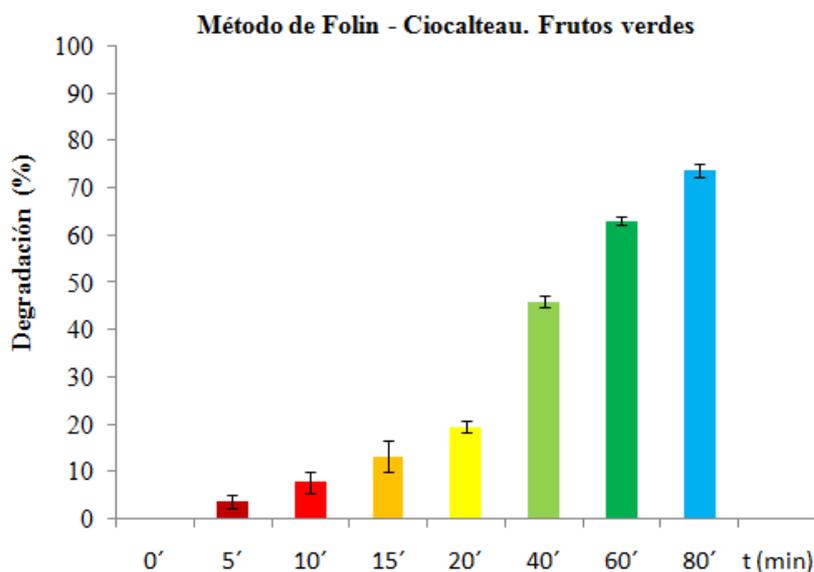


Figura R13. Degradación de los fenoles totales con respecto al tiempo. Se utilizó la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteau. Los extractos de frutos verdes de *S. ebulus* se sometieron a distintos tiempos de ebullición.

4.6.2. Medida de la pérdida de la capacidad antioxidante por temperatura en frutos maduros y frutos verdes de *S. ebulus* por el método de CUPRAC.

Se midió la pérdida de la capacidad antioxidante a diferentes tiempos por el método de CUPRAC. Se hirvieron los extractos crudos a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20, 40, 60 y 80 minutos). Los experimentos de degradación se realizaron con extractos crudos de frutos verdes y frutos maduros de *S. ebulus*.

La recta patrón utilizada es la misma que en el apartado anterior y también son coincidentes los factores de dilución. La capacidad antioxidante se expresó en μg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. A

partir de ahí se obtuvieron las tablas en porcentaje de degradación respecto del tiempo (Tablas R9 y R10) y para una mejor visualización de los datos presentamos los valores en forma de histograma (Figuras R14 y R15).

Tabla R9. Determinación de la capacidad antioxidante en frutos maduros a diferentes tiempos y degradación. Se utilizó el método CUPRAC. Los extractos de frutos maduros de *S. ebulus* se sometieron a distintos tiempos de ebullición. PH: peso húmedo. DE: desviación estándar.

Tiempo (min)	µg equiv. gálico/g de PH. Media ± DE	Degradación (%). Media ± DE
0	3.529 ± 66	0,00 ± 0,00
5	3.451 ± 62	2,22 ± 0,57
10	3.337 ± 36	5,42 ± 1,31
15	3.173 ± 27	10,08 ± 2,88
20	3.009 ± 27	14,71 ± 1,24
40	1.975 ± 77	44,04 ± 1,17
60	1.334 ± 41	62,18 ± 1,18
80	1.008 ± 56	71,43 ± 1,07

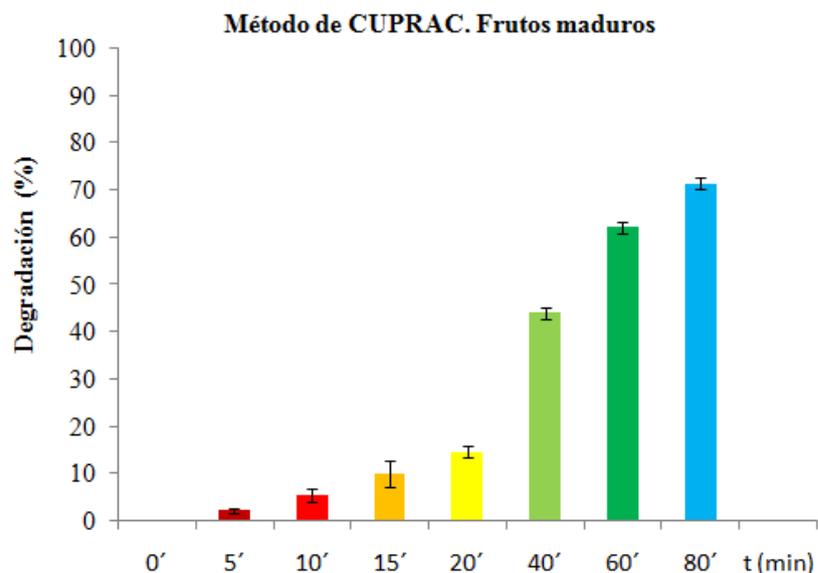


Figura R14. Pérdida de actividad antioxidante de frutos maduros de *S. ebulus* por ebullición. Se utilizó el método CUPRAC. Los extractos de frutos verdes de *S. ebulus* se sometieron a distintos tiempos de ebullición.

Tabla R10. Determinación de la capacidad antioxidante en frutos verdes a diferentes tiempos y degradación. Se utilizó el método CUPRAC. Los extractos de frutos verdes de *S. ebulus* se sometieron a distintos tiempos de ebullición. PH: peso húmedo. DE: desviación estándar.

Tiempo (min)	µg equiv. gálico/g de PH. Media ± DE	Degradación (%). Media ± DE
0	747 ± 4	0,00 ± 0,00
5	721 ± 8	3,48 ± 0,60
10	681 ± 2	8,88 ± 0,64
15	627 ± 3	16,06 ± 0,06
20	596 ± 1	20,26 ± 0,57
40	380 ± 6	49,09 ± 0,62
60	267 ± 8	64,26 ± 0,85
80	186 ± 12	75,15 ± 1,61

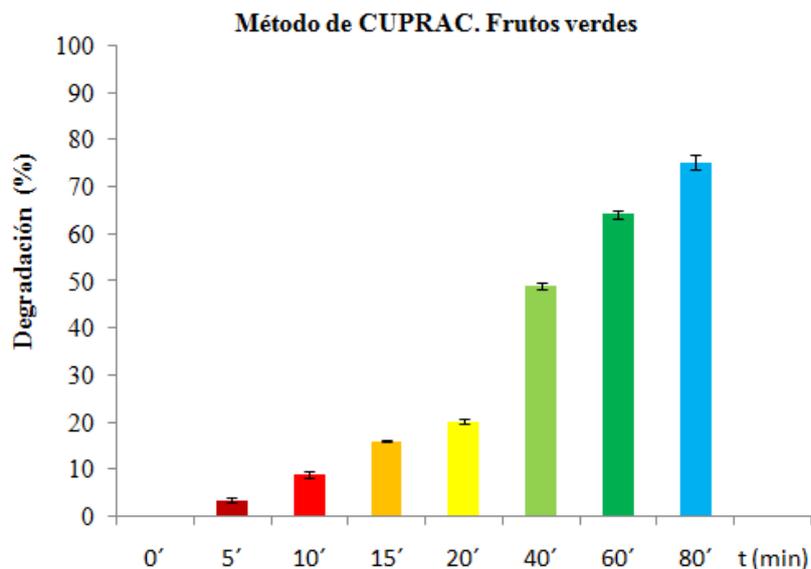


Figura R15. Pérdida de actividad antioxidante de frutos verdes de *S. ebulus* por ebullición. Se utilizó el método CUPRAC. Los extractos de frutos verdes de *S. ebulus* se sometieron a distintos tiempos de ebullición.

4.6.3. Medida de la pérdida de la capacidad antioxidante por temperatura en frutos maduros y frutos verdes de *S. ebulus* por el método del radical DPPH.

Se midió la pérdida de la capacidad antioxidante a diferentes tiempos por el método del radical DPPH. Se hirvieron los extractos crudos a 100° C a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20, 40, 60 y 80 minutos). Los experimentos de degradación se realizaron con extractos crudos de frutos verdes y frutos maduros de *S. ebulus*. La recta patrón utilizada es la misma que en el apartado anterior y también son coincidentes los factores de dilución. La capacidad antioxidante se expresó en µg equivalentes de Trolox por gramo de peso fresco. A partir de ahí se obtuvieron las tablas en porcentaje de degradación respecto del tiempo (Tablas R11 y 12) y para una mejor visualización de los datos presentamos los valores en forma de histograma (Figuras R16 y R17).

Tabla R11. Determinación de la capacidad antirradicalaria en frutos maduros a diferentes tiempos y degradación. Se utilizó el método del radical DPPH. Los extractos de frutos maduros de *S. ebulus* se sometieron a distintos tiempos de ebullición. PH: peso húmedo. DE: desviación estándar.

Tiempo (min)	$\mu\text{g equiv. trolox/g de PH. Media} \pm \text{DE}$	Degradación (%). Media \pm DE
0	3.074 ± 78	$0,00 \pm 0,00$
5	2.790 ± 70	$9,17 \pm 3,92$
10	2.665 ± 46	$13,26 \pm 3,65$
15	2.555 ± 50	$16,85 \pm 3,61$
20	2.405 ± 60	$21,67 \pm 3,81$
40	1.732 ± 53	$43,69 \pm 1,23$
60	1.234 ± 50	$58,53 \pm 2,33$
80	934 ± 27	$69,63 \pm 0,40$

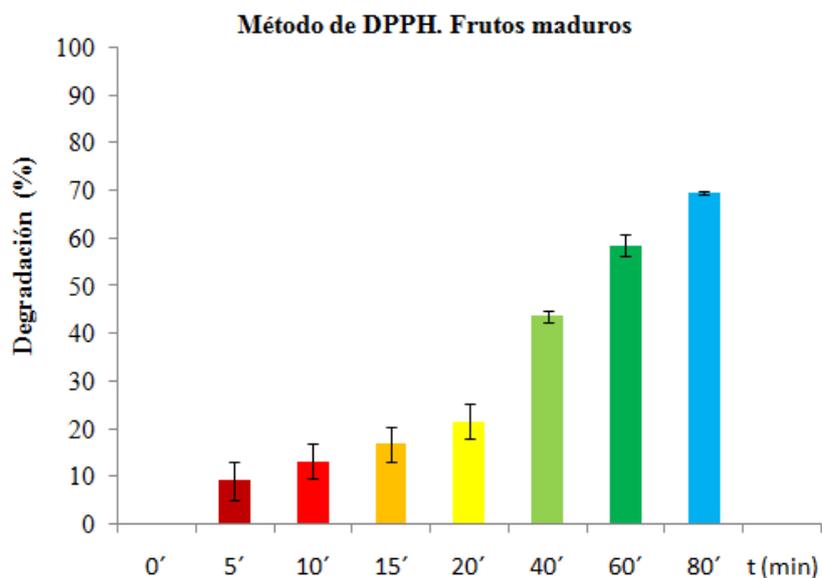


Figura R16. Pérdida de actividad antirradicalaria de frutos maduros de *S. ebulus* por ebullición. Se utilizó el método del radical DPPH. Los extractos de frutos maduros de *S. ebulus* se sometieron a distintos tiempos de ebullición.

Tabla R12. Determinación de la capacidad antirradicalaria en frutos verdes a diferentes tiempos y degradación. Se utilizó el método del radical DPPH. Los extractos de frutos verdes de *S. ebulus* se sometieron a distintos tiempos de ebullición. PH: peso húmedo. DE: desviación estándar.

Tiempo (min)	µg equiv. trolox/g de PH. Media ± DE	Degradación (%). Media ± DE
0	838 ± 60	0,00 ± 0,00
5	788 ± 58	5,87 ± 1,92
10	756 ± 70	13,51 ± 3,66
15	638 ± 68	23,81 ± 2,77
20	591 ± 53	29,53 ± 1,56
40	378 ± 13	54,78 ± 2,44
60	300 ± 18	64,09 ± 1,64
80	213 ± 15	74,58 ± 1,15

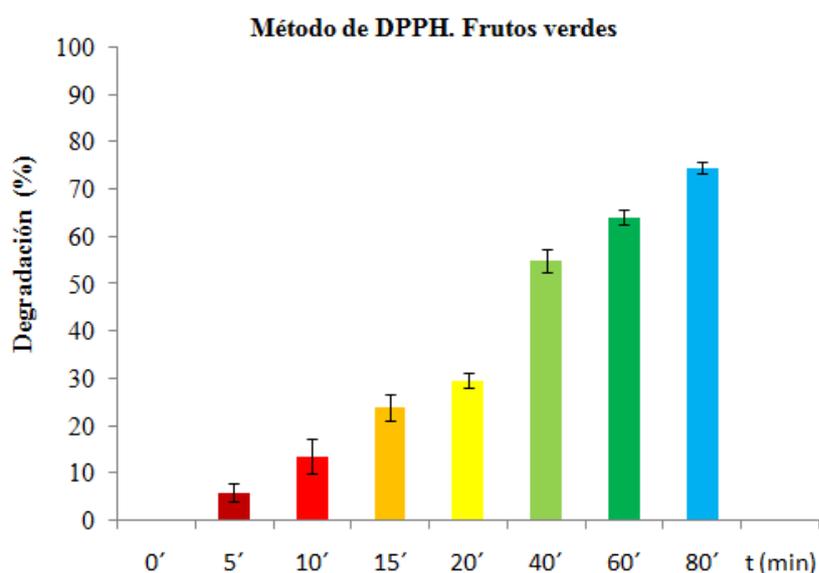


Figura R17. Pérdida de actividad antirradicalaria de frutos verdes de *S. ebulus* por ebullición. Se utilizó el método del radical DPPH. Los extractos de frutos verdes de *S. ebulus* se sometieron a distintos tiempos de ebullición.

4.6.4. Correlación entre los tres métodos: Folin – Ciocalteu, CUPRAC y radical DPPH en frutos maduros y frutos verdes.

A través del programa de software estadístico Graph Pad Prism 6 Demo establecemos la correlación entre los tres métodos: Folin – Ciocalteu, CUPRAC y radical DPPH a partir del índice de correlación de Pearson.

Tabla R13. Índice de correlación de Pearson de los tres métodos utilizados, Folin – Ciocalteu, CUPRAC y radical DPPH. Degradación en frutos maduros.

Índice de Correlación de Pearson	Folin	CUPRAC	DPPH
Folin	-	0,999	0,997
CUPRAC	0,999	-	0,993
DPPH	0,997	0,993	-

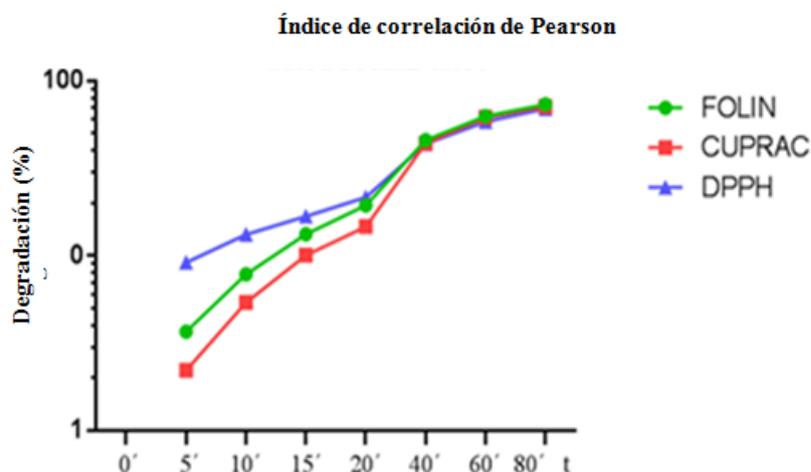


Figura R18. Gráfica. Índice de correlación de Pearson de los tres métodos utilizados, Folin – Ciocalteu, CUPRAC y radical DPPH. Degradación en frutos maduros.

Tabla R14. Índice de correlación de Pearson de los tres métodos utilizados, Folin – Ciocalteu, CUPRAC y radical DPPH. Degradación en frutos verdes.

Índice de Correlación de Pearson	Folin	CUPRAC	DPPH
Folin	-	0,999	0,998
CUPRAC	0,999	-	0,992
DPPH	0,998	0,992	-

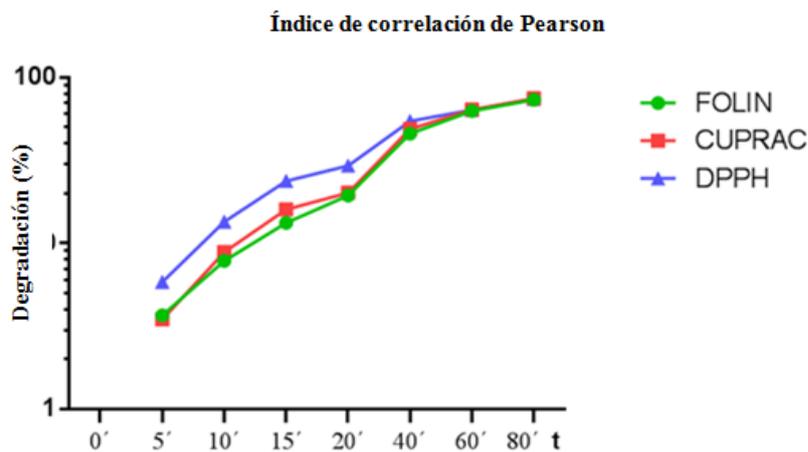


Figura R19. Gráfica. Índice de correlación de Pearson de los tres métodos utilizados, Folin – Ciocalteu, CUPRAC y radical DPPH. Degradación en frutos verdes.

4.6.5. Medida de la degradación de antocianidinas por temperatura en frutos maduros de *S. ebulus* por el método diferencial de pH.

Se midió la degradación de las antocianidinas a diferentes tiempos por el método diferencial de pH. Para ello se sometieron a ebullición los extractos crudos a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20, 40, 60 y 80 minutos). Solo se determinaron en extractos crudos de frutos maduros de *S. ebulus* puesto que son los únicos que dan medidas significativas.

En la tabla R15 se recogen los resultados expresados como antocianidinas monoméricas totales (AMT) en μg equivalentes de cianidin-3-glucósido puro por gramo de peso fresco.

Tabla R15. Determinación de antocianidinas monoméricas totales (AMT) en frutos maduros de *S. ebulus* por el método diferencial de pH. Los extractos de frutos maduros de *S. ebulus* se sometieron a distintos tiempos de ebullición. C3G: cianidin-3-glucósido.

Tiempo (min)	μg equiv. de C3G/g de PH. Media \pm DE	Degradación (%). Media \pm DE
0	2.175 \pm 25	0,00 \pm 0,00
5	2.122 \pm 24	2,42 \pm 0,89
10	2.071 \pm 11	4,75 \pm 0,13
15	2.015 \pm 8	7,35 \pm 0,72
20	1.642 \pm 14	24,47 \pm 1,06
40	1.109 \pm 15	49,01 \pm 1,28
60	351 \pm 10	82,49 \pm 0,64
80	220 \pm 11	89,90 \pm 0,49

Para una mejor visualización de los datos presentamos los valores en forma de histograma (Figura R20).

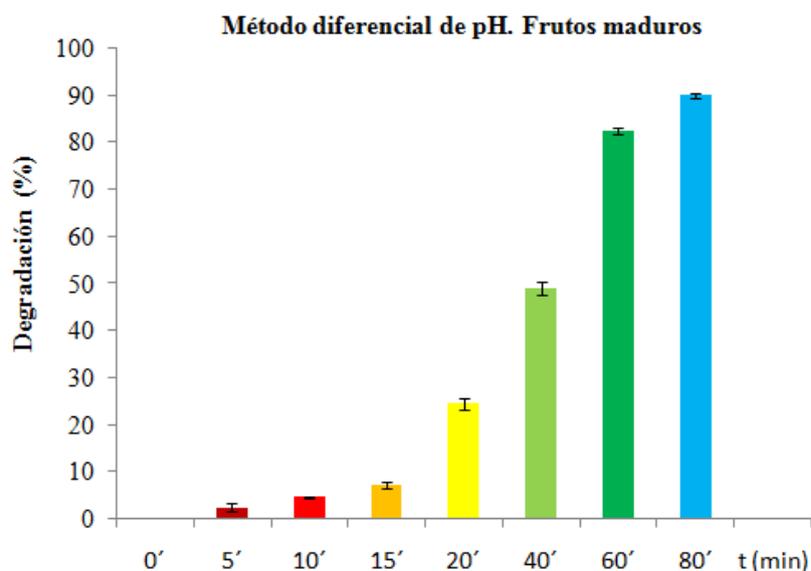


Figura R20. Determinación de antocianidinas monoméricas totales (AMT) en frutos maduros de *S. ebulus* por el método diferencial de pH. Los extractos de frutos maduros de *S. ebulus* se sometieron a distintos tiempos de ebullición.

4.7. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *S. EBULUS*.

4.7.1. Determinación de cianidín-3-glucósido en los extractos de distintas partes de *S. ebulus*.

A la hora de evaluar antocianos en muestras biológicas y debido a la gran cantidad de componentes similares presentes en los extractos, es indispensable recurrir a técnicas cromatográficas. La cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE o HPLC según su acrónimo sajón), es la técnica más eficaz. Debido a la naturaleza química de los antocianos, las condiciones cromatográficas más habituales incluyen el uso casi exclusivo de fases estacionarias con rellenos C18 de fase reversa, detectores UV-Vis de

fotodiodo array y fases móviles complejas formadas por soluciones acuosas aciduladas y modificadores orgánicos en gradiente.

La posibilidad de acoplar estos sistemas a detectores de masas ha hecho posible determinar con precisión el contenido cualitativo y cuantitativo de estos compuestos en numerosas plantas.

En la siguiente tabla se recogen algunos ejemplos de métodos de HPLC desarrollados en los últimos años.

Tabla R16. Métodos de HPLC desarrollados en los últimos años.

Cuantificación (método)	Fase estacionaria	Fase móvil	Referencia
HPLC-DAD (510 nm)	Novapak C18 (150 x 3,9 mm, 4 µm)	A: 2,5% ác. fórmico B: ACN	Wang and Zheng (2001) Wang and Lin (2003) Wang, Bunce, and Maas (2003)
HPLC-DAD	Nucleosil C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	A: 2,5% ác. fórmico B: 2,5% ác. fórmico/ACN	Kosar, Karkas, Paydas, Husnu, and Baser (2004)
HPLC-DAD	LiChroCART Purospher RP-18e (125 x 3 mm, 5 µm)	A: 5% ác. fórmico B: ACN	Määttä-Riihinen, Kamal-Eldin, Mattila, González-Paramás, and Törrönen (2004)
HPLC-DAD	LiChroCART Purospher RP-18e (125 x 3 mm, 5 µm)	A: 4,5% ác. fórmico B: 80% ACN + 20% A	Skupien and Oszmianski (2004)
HPLC-DAD	Hypersil ODS (60 x 4,6 mm, 3 µm)	A: 5% ác. fórmico B: ACN	Anttonen and Karjalainen (2006)
HPLC-DAD LC/ESI/MS/MS	Symmetry C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: 1% ác. fórmico B: ACN	Seeram, Lee, Scheuller, and Heber (2006)
HPLC-DAD ESI-MS	Betasil C18 (250 x 2,1 mm, 5 µm)	A: 2% ác. acético B: ác. acético-ACN-H ₂ O (2:50:48)	Aaby, Ekeberg, and Skrede (2007)
HPLC-DAD (500 nm)	Betasil C18 (250 x 2,1 mm, 5 µm)	A: fosfórico-acético-H ₂ O (1:10:89) B: ACN	Aaby, Wrolstad, Ekeberg, and Skrede (2007)
HPLC-DAD	C18 Novapack (300 x 3,9 mm, 5 µm)	A: ACN-fórmico-H ₂ O (3:10:87) B: ACN-fórmico-H ₂ O (50:10:40)	Hernanz et al. (2007)
HPLC-DAD	LiChroCART Purospher RP-18e (125 x 3 mm, 5 µm)	A: 8,5% ác. fórmico B: ACN-MeOH (85:15)	Koponen, Happonen,

			Mattila, and Torronen (2007)
HPLC-DAD (520 nm)	AQUA C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	A: 0,1% ác. fórmico B: ACN	Lopes da Silva et al., 2004
HPLC-DAD (520 nm)	Alltech Allosphere ODS-1 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: 1% fosfórico-10% acético B: ACN	Terry et al. (2007)
HPLC-DAD (520 nm)	Alltech Allosphere ODS-1 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: 1% fosfórico-10% acético B: ACN	Bordonaba and Terry (2008)
HPLC-DAD (520 nm)	Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: 2% ác. acético B: 2% TFA/MeOH	Bordonaba et al., 2011
HPLC-DAD	C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: 0,1% ác. fórmico B: 0,1% ác. fórmico/ACN	Tulipani et al. (2008)

En estos métodos y con el fin de incrementar la sensibilidad y disminuir el límite de detección, es fundamental llevar a cabo procesos previos de preconcentración y purificación de los extractos crudos. Para ello lo más habitual es recurrir a una extracción L/L previa y una posterior extracción en fase sólida (SPE) con columnas de alta afinidad. (Seabra y cols. 2010), desarrollaron una técnica de extracción con fluidos supercríticos para incrementar la resolución en el análisis de antocianos en concentrados de saúco, por la importancia que está cobrando la adulteración de vinos con este producto.

En nuestro estudio se ha tomado como referencia el método propuesto por Terry para la cuantificación de antocianinas en extractos de fresas por HPLC con extracción en fase líquida como paso previo (Terry y cols. 2007), debido a su adecuado límite de detección, sencillez y accesibilidad del sistema de detección.

A la hora de cuantificar un compuesto en una muestra, es necesario calibrar adecuadamente el método instrumental empleado. Los principales procedimientos de calibración son los siguientes:

- Comparación con estándares: comparación directa o titulación.
- Calibración de un estándar interno: método de mínimos cuadrados.
- Métodos de adición de estándar.

-
- Método del patrón interno.

En el presente trabajo experimental y bibliográfico no se ha considerado necesario llevar a cabo una cuantificación de ninguno de los antocianos presentes en la muestra, sino más bien, cómo varía su cantidad relativa en función de la parte de la planta que se estudie. Por lo tanto, se ha realizado una implantación de la metodología analítica de referencia para asegurar que las características de resolución de dicho método se ajustan a los requerimientos del estudio.

Por lo tanto, los parámetros cromatográficos empleados en esta memoria son los siguientes:

- Fase estacionaria: Spherisorb ODS-1 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) acoplado a un guardacolumna (4 x 3 mm)
- Temperatura de análisis: 40 °C
- Fase móvil: A: 1% fosfórico-10% acético (pH 1,5)

B: ACN

Tabla R17. Composición de la fase móvil respecto al tiempo de cromatograma.

Tiempo del cromatograma (min)	Incremento en A (%)	Modalidad
0-10	2-20	Gradiente
10-15	20-2	Gradiente

Debido a la fórmula estructural del compuesto que se desea caracterizar, la cianidin-3-glucósido, se ha reducido a la mitad el tiempo del

gradiente inicial y no ha sido necesario aumentar el modificador orgánico hasta un 40%. Con ello se ha logrado acortar notablemente el tiempo global de análisis, se ha abaratado el costo por muestra y se reduce el impacto ambiental de los residuos generados respecto al método de referencia.

- Flujo: 1 ml/min (P 20, 3 bar)
- Detección: PDA 520 nm
- V de inyección: 20 μ l

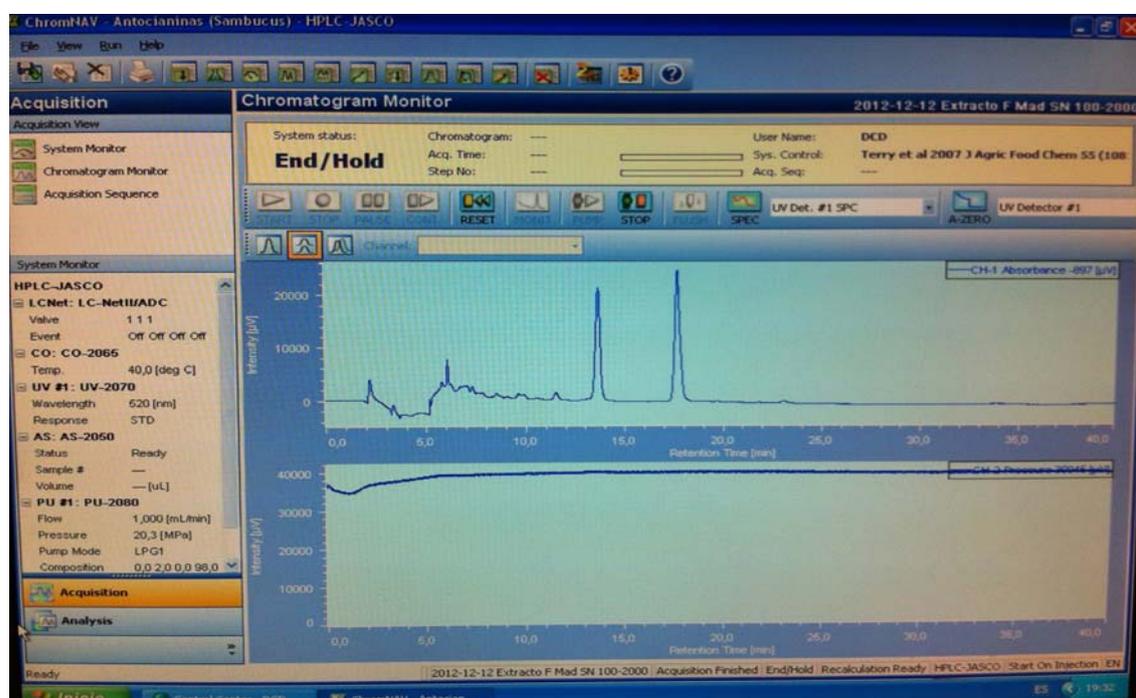


Figura R21. Detalle de la monitorización de la presión y absorbancia de una muestra de extractos de frutos maduros diluida 1:2 con agua Milli-Q según el método propuesto por Terry y cols., 2007.

Basándonos en el contenido total de antocianidinas obtenido por el método diferencial, se realiza una dilución 1:2 en el extracto de frutos maduros y se inyecta en el sistema cromatográfico variando la composición de la fase móvil según el método propuesto por Terry y cols. (2007)

observándose dos picos principales bien resueltos antes de 20 minutos y a una presión constante a lo largo de todo el cromatograma, por lo que se decide acortar el tiempo y la composición del gradiente a las condiciones finales.

4.7.2. Análisis semicuantitativo de los extractos de *S. ebulus*.

En este análisis se pretende llevar a cabo un análisis cualitativo de la presencia de cianidín-3-glucósido en extractos homogéneos de diferentes partes de *S. ebulus* L. Para ello se realiza una dilución 1:10 en agua Milli-Q de los extractos y se filtran a través de filtros de nylon de 0,45 μm como paso previo a su incorporación al sistema cromatográfico. Se analiza además un estándar de 100 $\mu\text{g/ml}$ de cianidín-3-glucósido para determinar el espectro cromatográfico y realizar los ensayos de resolución y pureza de pico, así como un análisis semicuantitativo de los extractos.

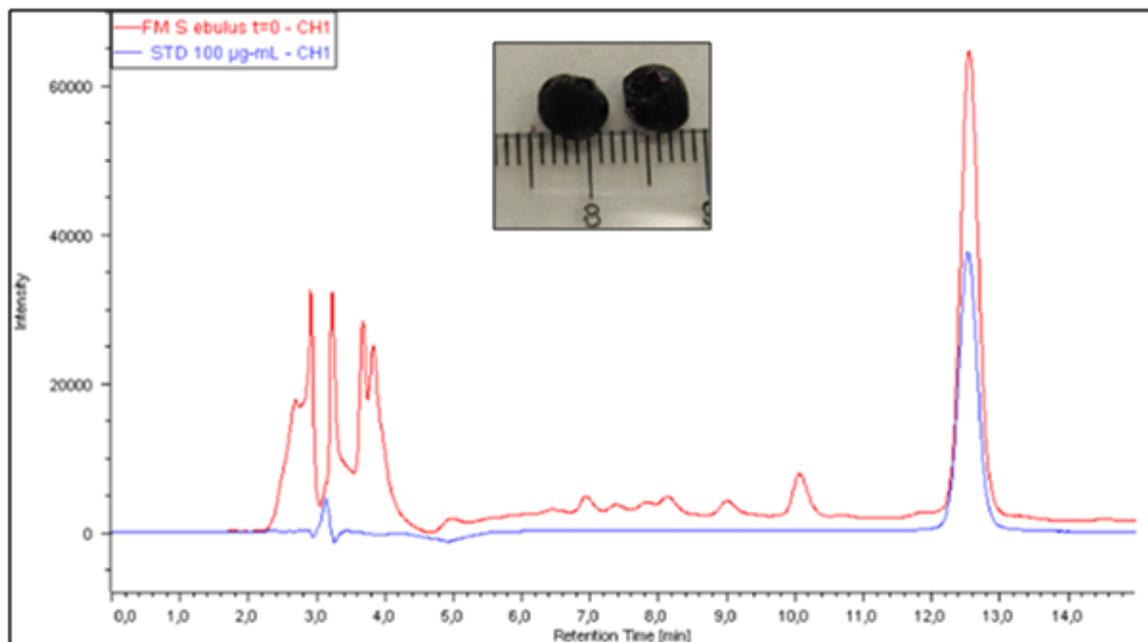


Figura R22. Cromatogramas superpuestos de los extractos de frutos maduros de *S. ebulus* L. y patrón de cianidín-3-glucósido (100 $\mu\text{g/mL}$).

La señal de cianidín-3-glucósido no posee ningún tipo de interferencia analítica con el resto de componentes presentes en la muestra y en todos los casos estudiados el factor de resolución es superior a 2, tal y como aconseja la monografía correspondiente de la Real Farmacopea Española. El análisis semicuantitativo revela que el extracto analizado posee una concentración aproximada de 175 $\mu\text{g/ml}$ de cianidín-3-glucósido, si bien este valor debería confirmarse con un análisis cuantitativo calibrado mediante la adición de patrón externo o por calibración con estándar interno mediante el método de mínimos cuadrados.

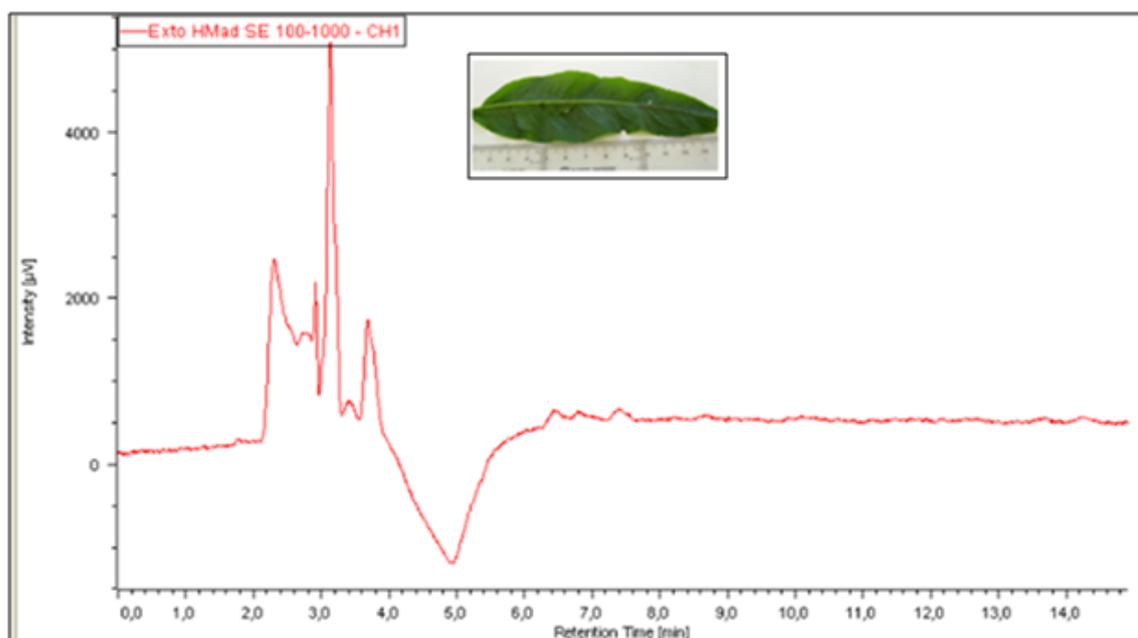


Figura R23. Cromatograma del extracto de hojas maduras.

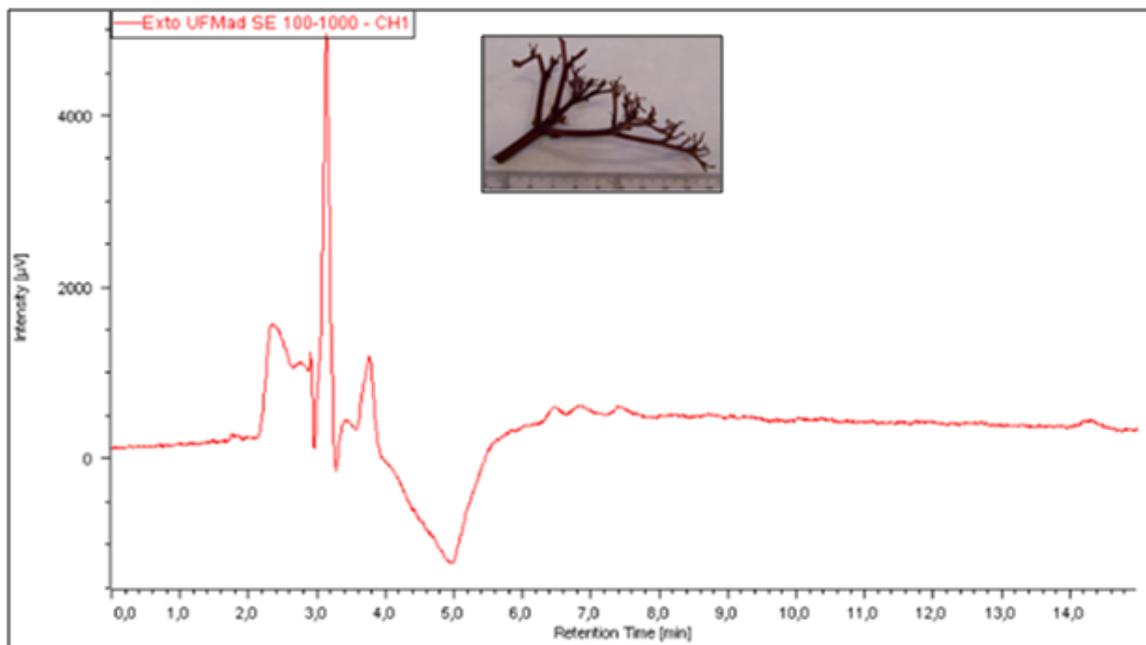


Figura R24. Cromatograma del extracto de umbelas de frutos maduros.

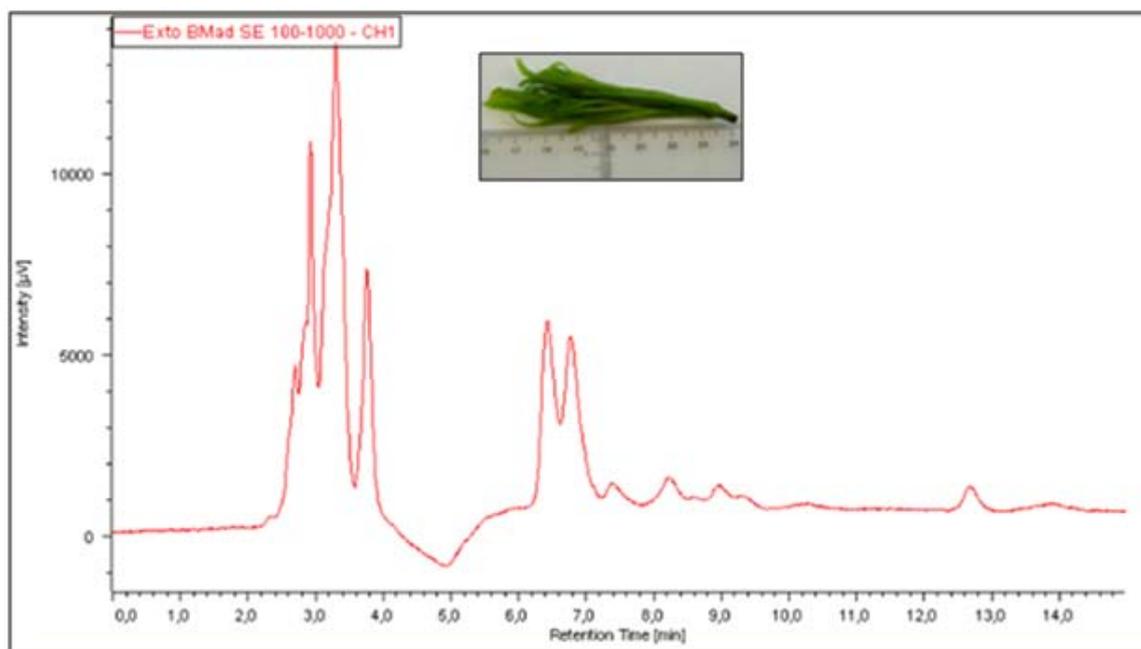


Figura R25. Cromatograma del extracto de brotes.

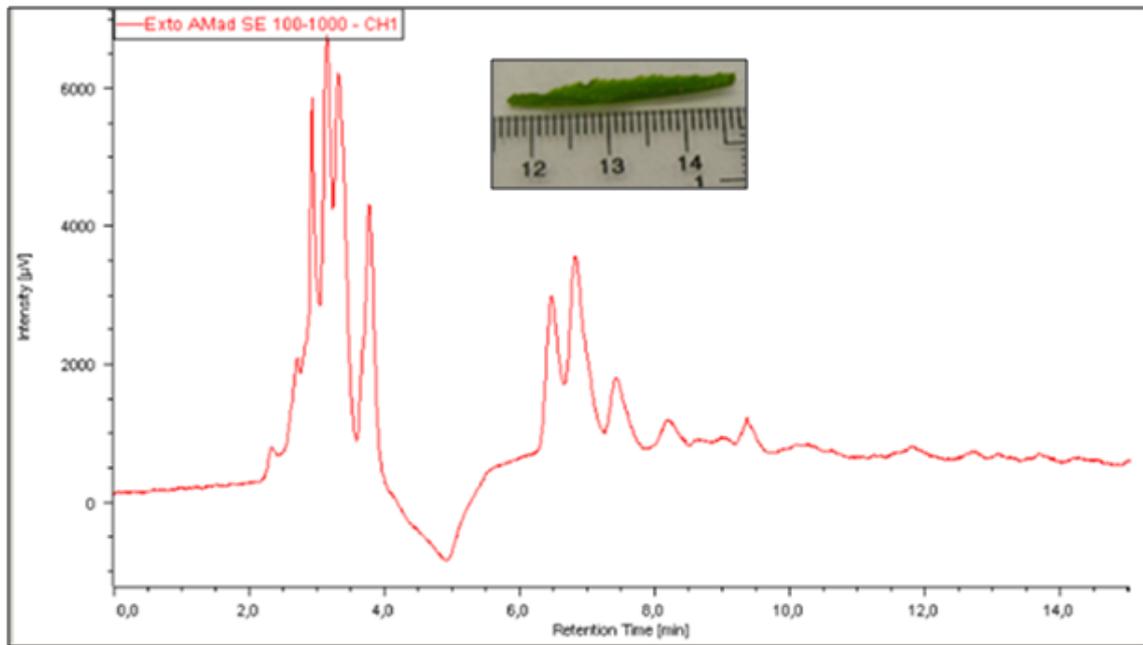


Figura R26. Cromatograma del extracto de ápices.

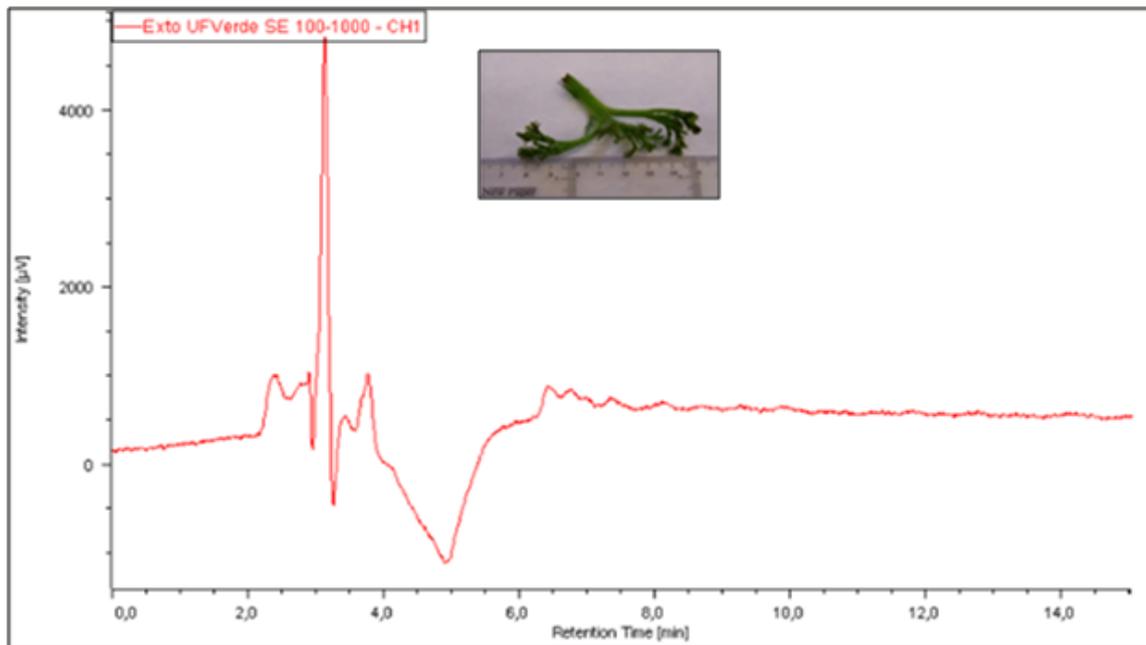


Figura R27. Cromatograma del extracto de umbelas de frutos verdes.

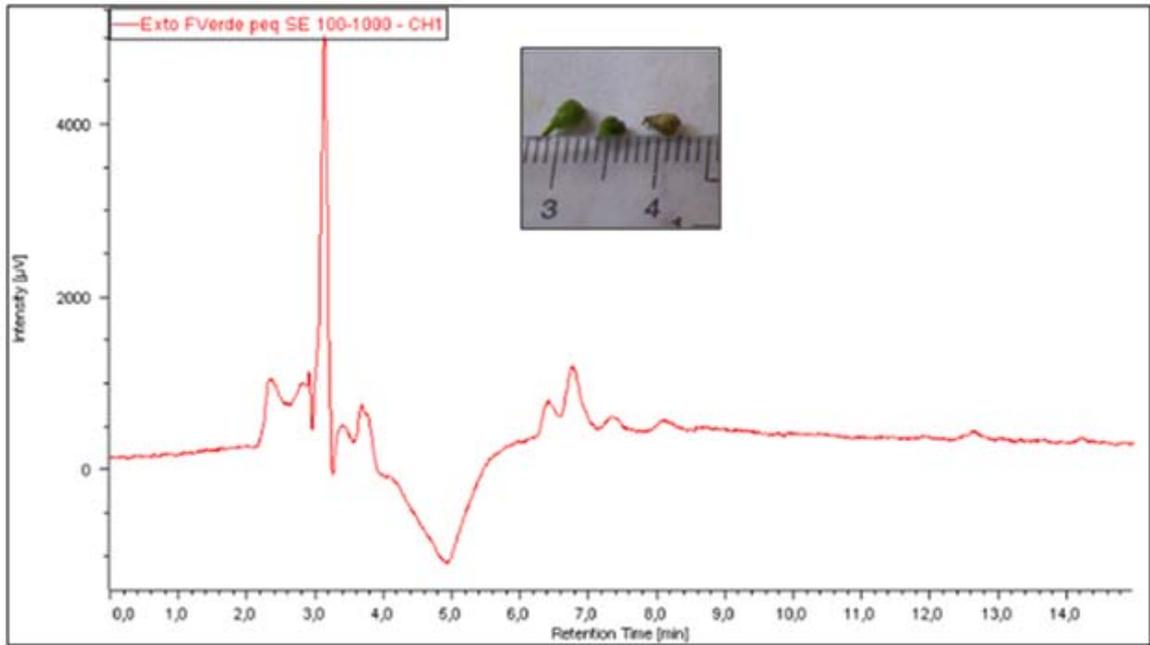


Figura R28. Cromatograma del extracto de frutos verdes pequeños.

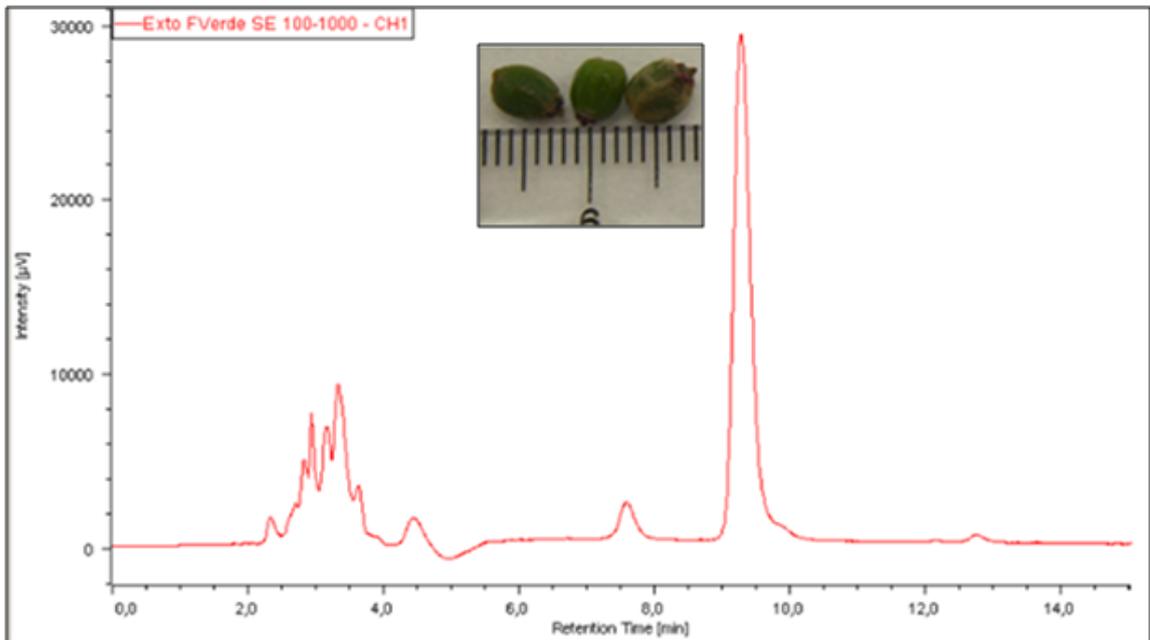


Figura R29. Cromatograma del extracto de frutos verdes.

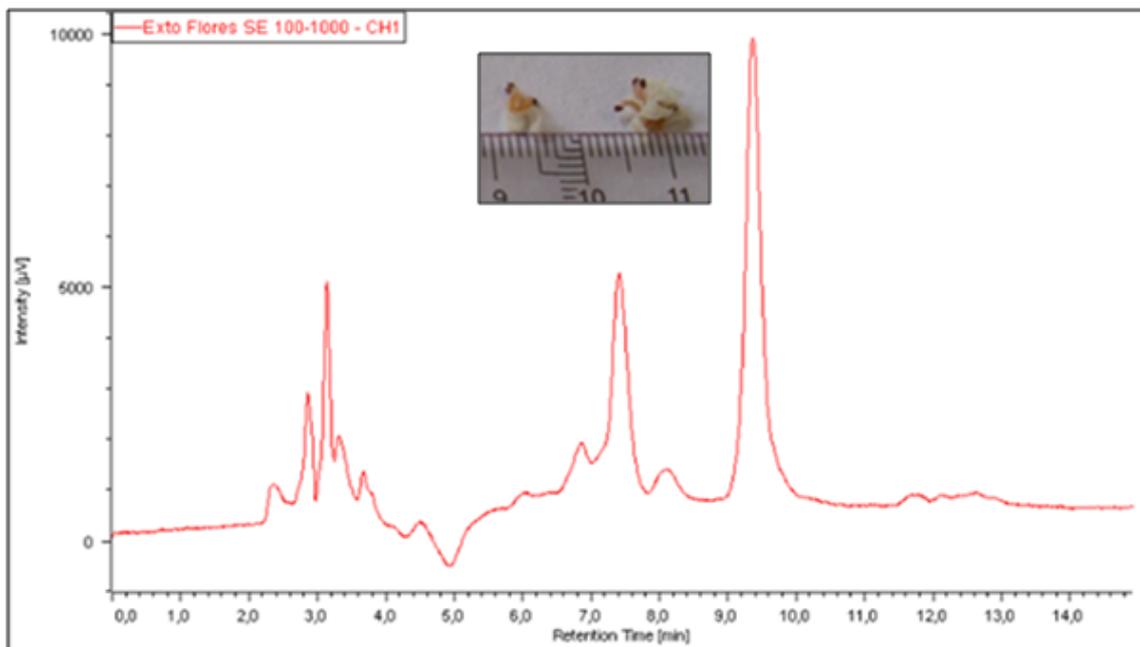


Figura R30. Cromatograma del extracto de flores.

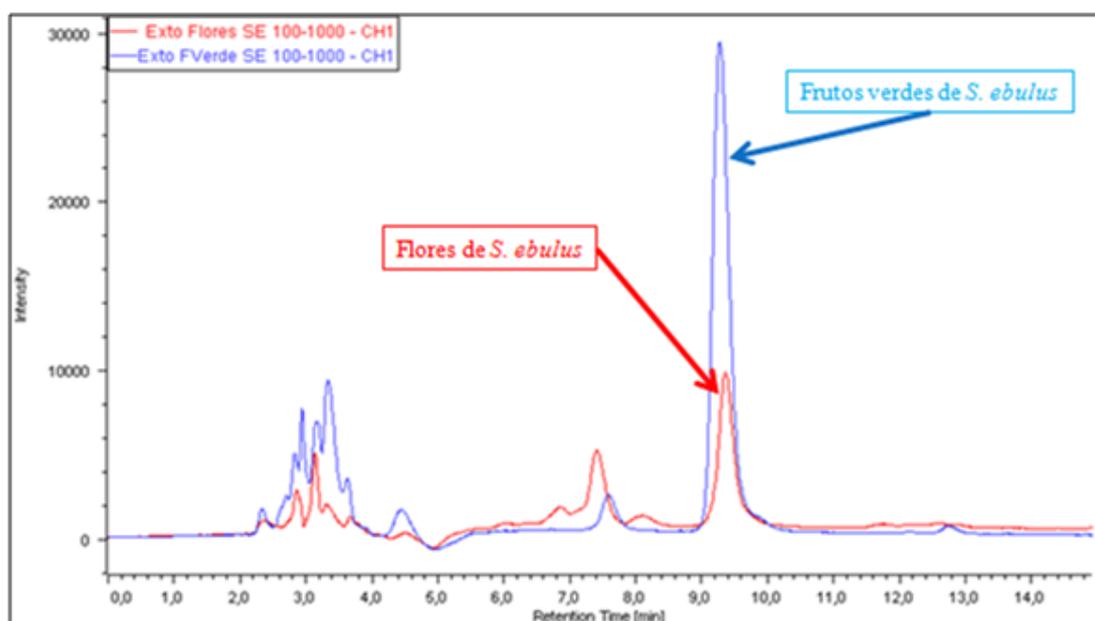


Figura R31. Cromatograma comparativo de los extractos de flores y frutos verdes.

Cianidín-3-glucósido aparece en cantidades apreciables como pico principal a un tiempo de retención de 12,57 minutos en las condiciones

cromatográficas establecidas, sólo en los extractos de frutos maduros. En los otros extractos analizados aparece como pico secundario. Tanto en flores como en frutos verdes, aparece un pico mayoritario a un tiempo de retención de 9,46 minutos.

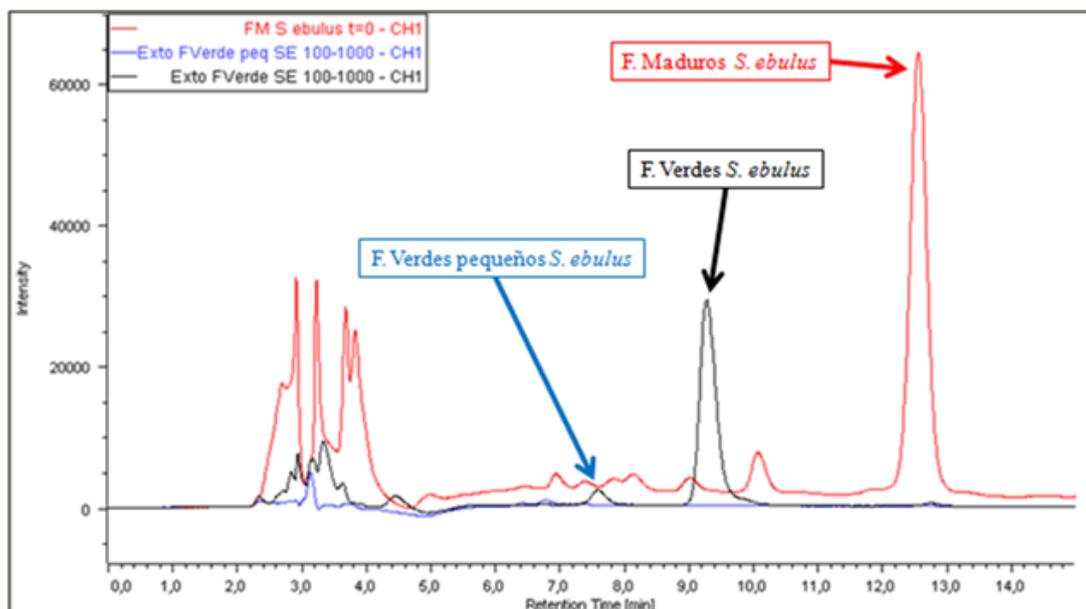


Figura R32. Cromatograma comparativo de los extractos de frutos verdes pequeños, frutos verdes y frutos maduros.

A medida que se incrementa el estado de maduración de los frutos, se modifica notablemente el perfil cromatográfico obtenido. Como consecuencia de este cambio, aparece en frutos maduros el pico correspondiente a cianidín-3-glucósido.

4.7.3. Influencia del tiempo de cocción en el contenido en cianidín-3-glucósido en extractos de frutos maduros de *S. ebulus*.

En este estudio se pretende determinar la influencia del tiempo de cocción en la estabilidad de la cianidín-3-glucósido en extractos homogéneos de frutos maduros de *S. ebulus*. Para ello tal y como se describe

en el apartado de materiales y métodos, se somete a cocción a tiempos previamente establecidos a fracciones homogéneas de extractos de frutos maduros; transcurrido ese tiempo, se realiza una dilución 1:10 en agua Milli-Q de los extractos y se filtran a través de filtros de nylon de 0,45 μm como paso previo a su incorporación al sistema cromatográfico.

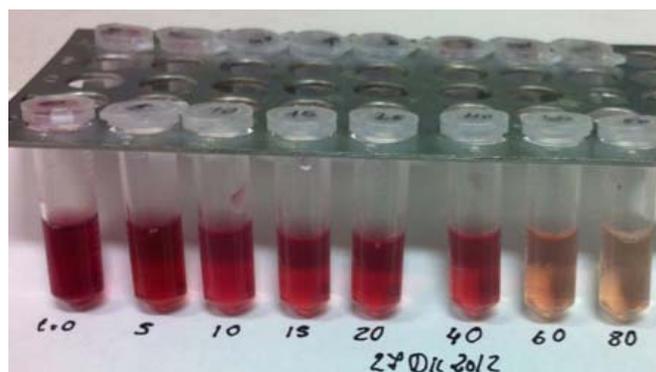


Figura R33. Detalle del aspecto de uno de los extractos ensayados a los diferentes tiempos de cocción evaluados.

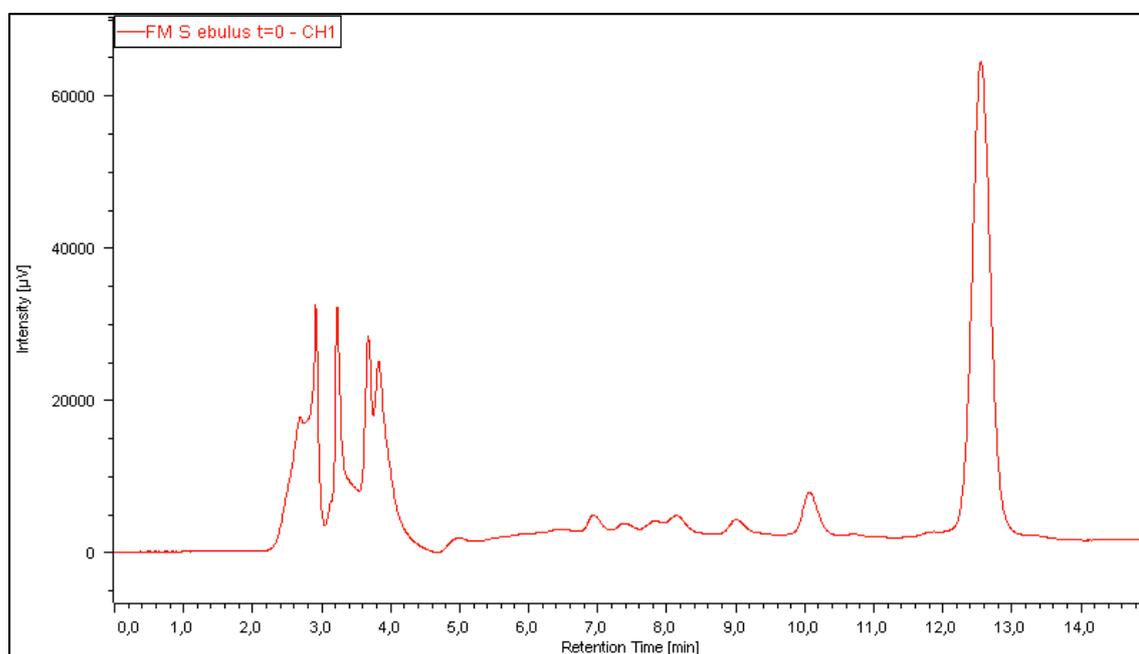


Figura R34. Cromatograma del extracto de frutos maduros de *S. ebulus* sin tratamiento térmico. A 12,57 minutos aparece el pico correspondiente a cianidín-3-glucósido.

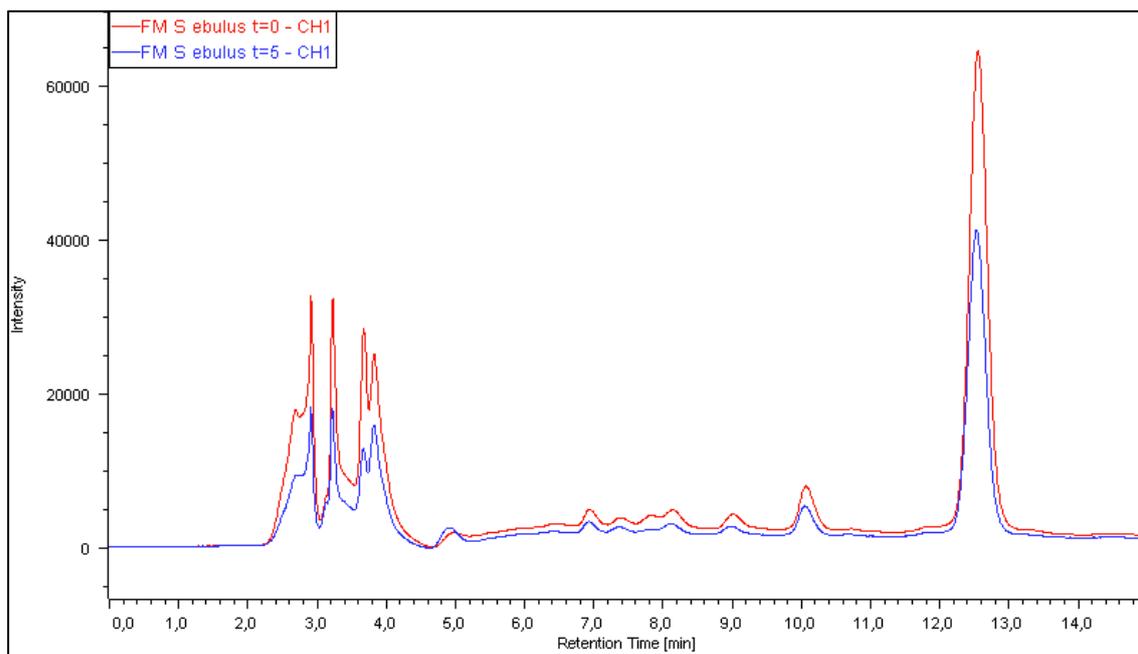


Figura R35. Cromatogramas del extracto de frutos maduros de *S. ebulus* a los 5 minutos de cocción.

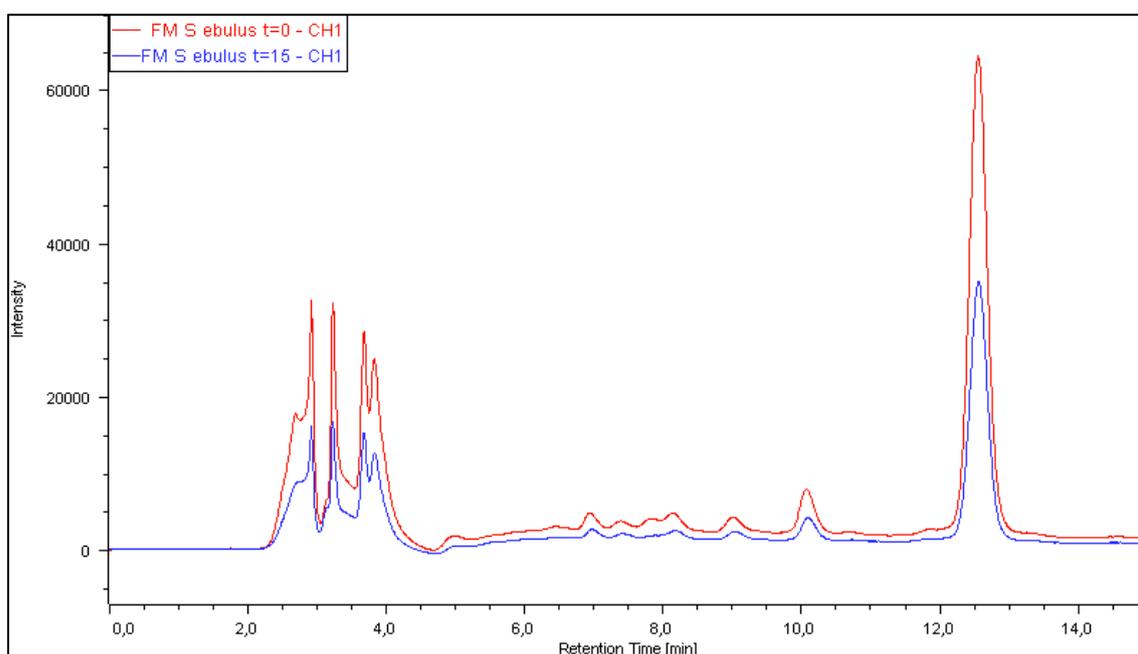


Figura R36. Cromatogramas del extracto de frutos maduros de *S. ebulus* a los 15 minutos de cocción.

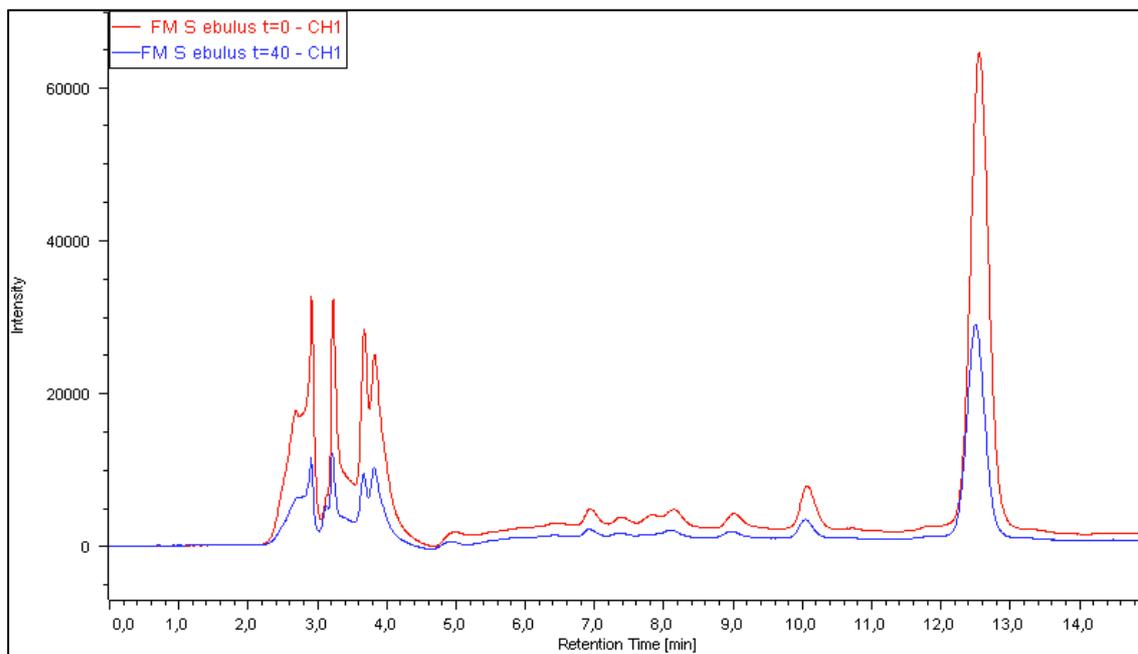


Figura R37. Cromatogramas del extracto de frutos maduros de *S. ebulus* a los 40 minutos de cocción.

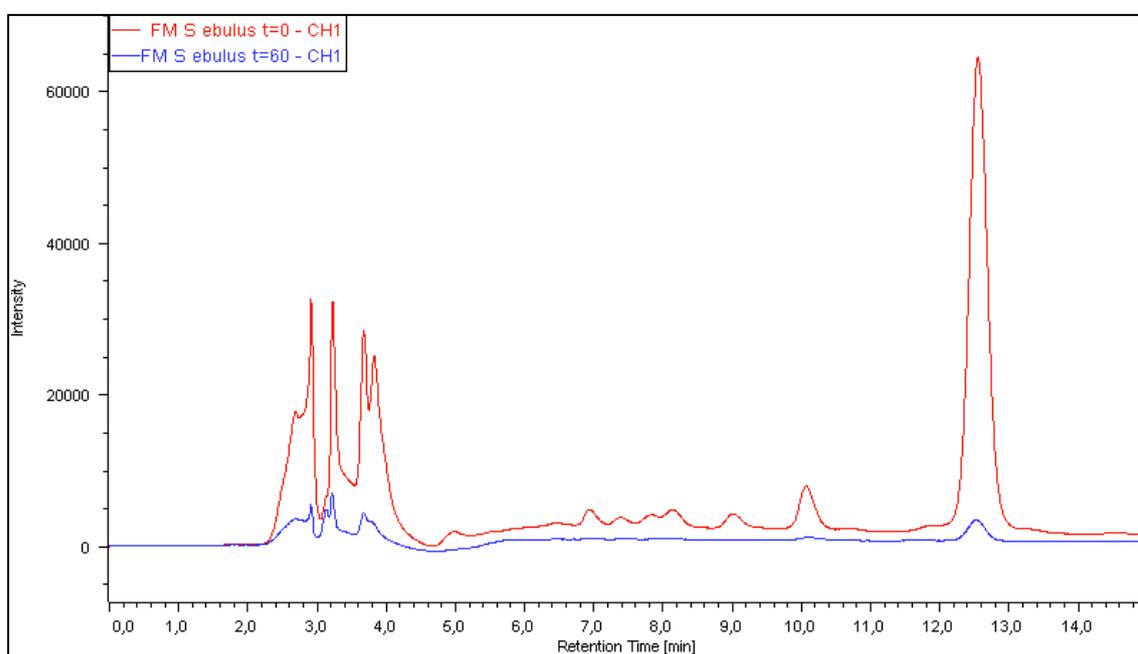


Figura R38. Cromatogramas del extracto de frutos maduros de *S. ebulus* a los 60 minutos de cocción.

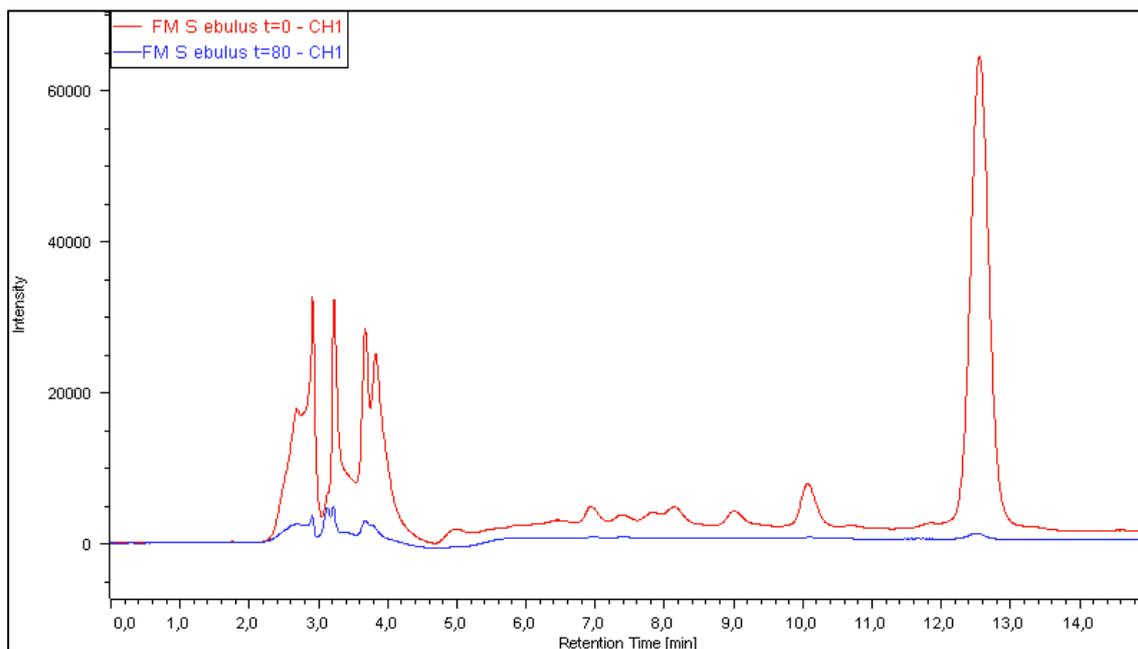


Figura R39. Cromatogramas del extracto de frutos maduros de *S. ebulus* a los 80 minutos de cocción.

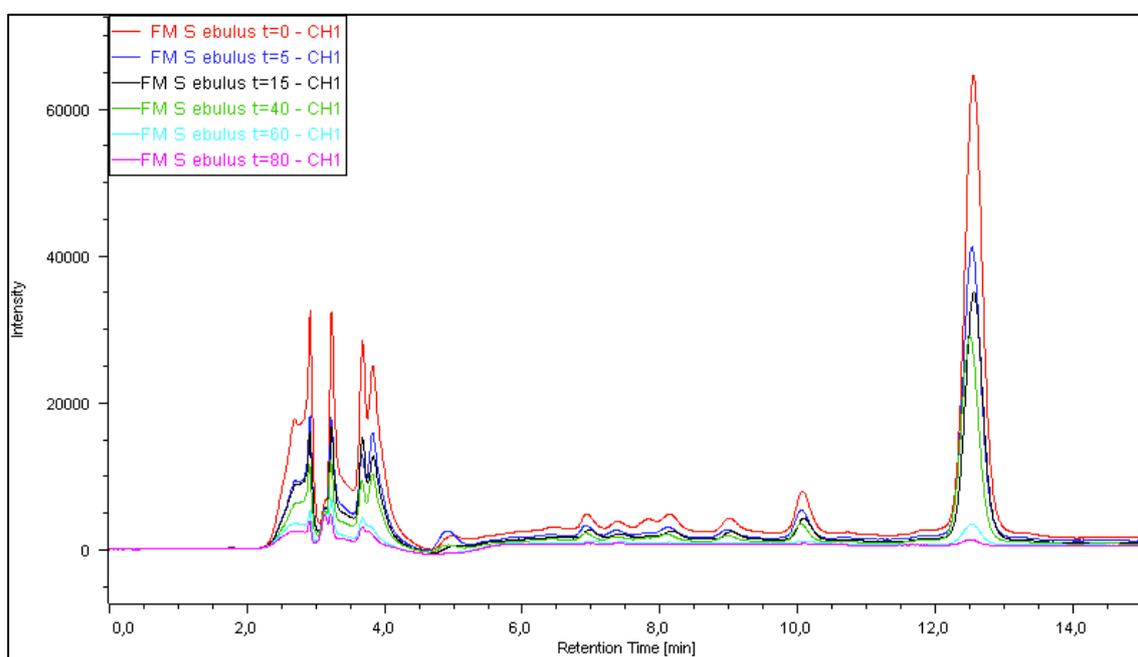


Figura R40. Cromatogramas del extracto de frutos maduros de *S. ebulus* sin tratamiento térmico y a los 5, 15, 40, 60 y 80 minutos de cocción.

4.8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE EXTRACTOS CRUDOS DE LAS DIFERENTES PARTES DEL *S. EBULUS*.

En los resultados se recogen cuatro geles de poliacrilamida de extractos de las distintas partes de *S. ebulus* que consideramos de interés (Figuras R41, R42, R43, R47). La primera electroforesis corresponde a extractos crudos sin dializar de las diferentes partes del *S. ebulus* en la que se observa que al menos en tres partes de la planta aparecen proteínas no descritas anteriormente. Se trata de proteínas en flores, umbelas de frutos verdes y umbelas de frutos maduros.

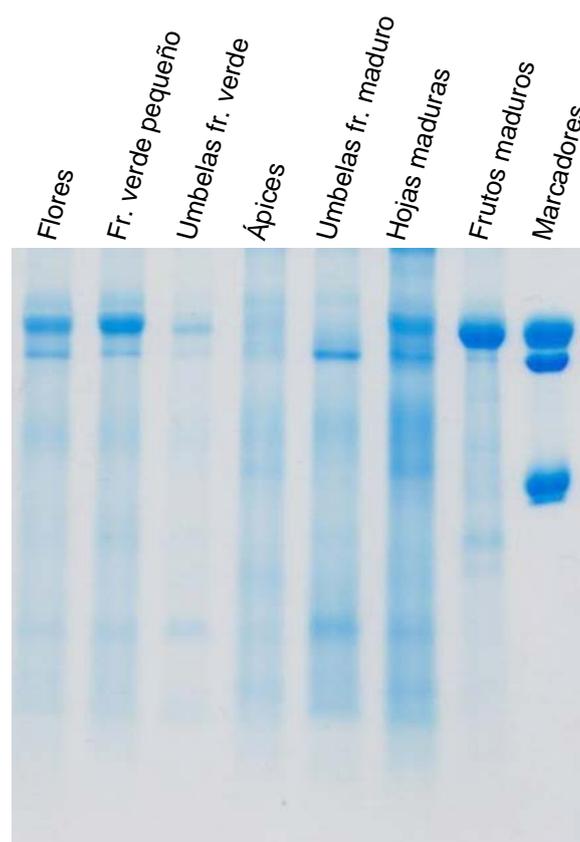


Figura R41. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de diferentes partes de *S. ebulus*. Marcadores SELfd (Mr 68.000), Nigrina b (Mr 58.000) y SNAIV (Mr 30.000).

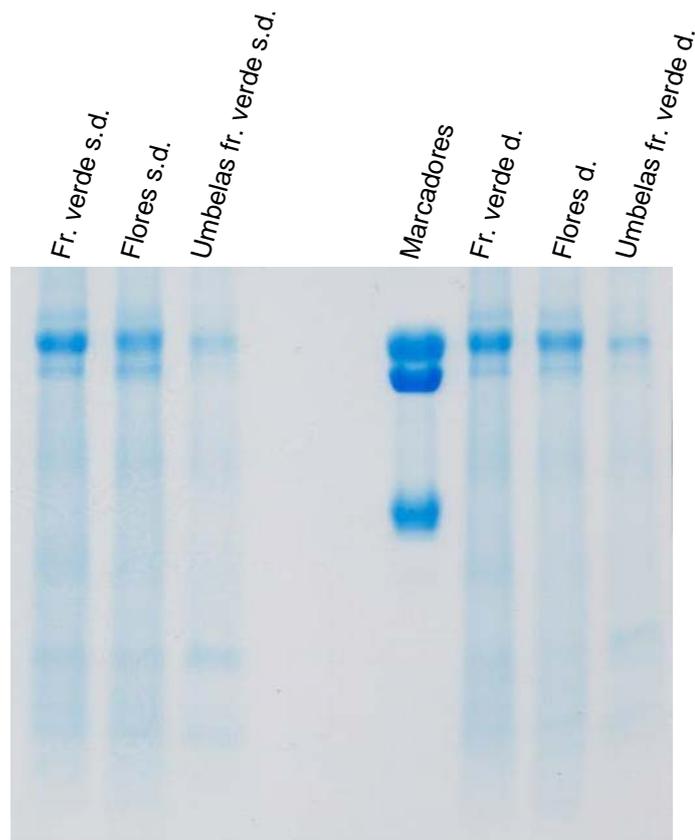


Figura R42. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de extractos de diferentes partes de *S. ebulus*. Sometidos o no a diálisis. s.d. indica sin dializar. Marcadores SELfd (Mr 68.000), Nigrina b (Mr 58.000) y SNAIV (Mr 30.000).

Se destaca la presencia de dos proteínas mayoritarias que por su posición pudieran ser los equivalentes de ebulina f y SELfd (Jiménez y cols., 2013b) en las inflorescencias. Como se verá posteriormente, se trata de isoformas de ambas proteínas.

Se estudió también el efecto de la diálisis de los extractos sobre sus perfiles proteicos. Como se muestra en la Figura R42, no se observan diferencias apreciables en ambas condiciones.

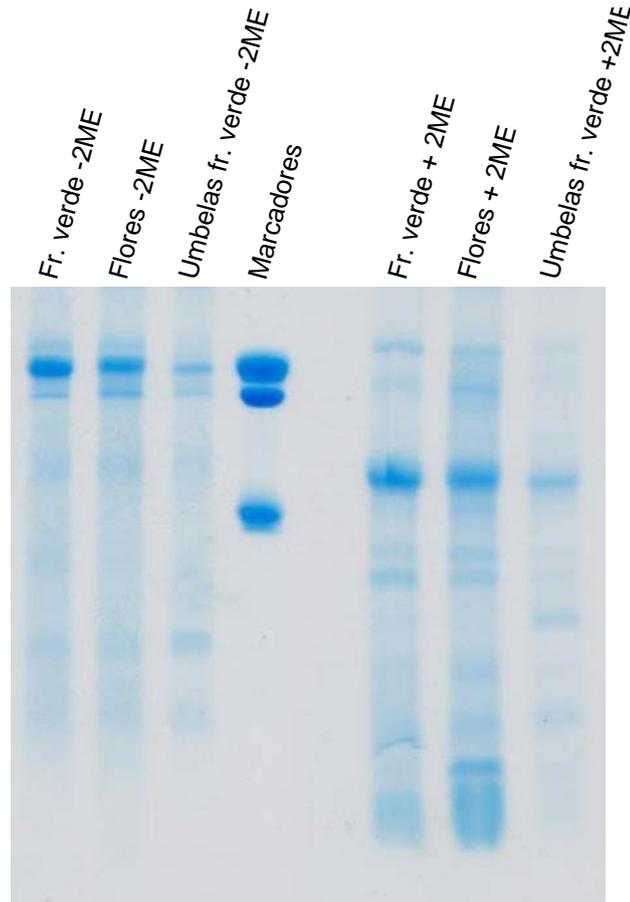


Figura R43. Gel de electroforesis. Frutos verdes (FV), flores (FL) y umbelas de frutos verdes (UFV) en condiciones de +/- 2ME. Marcadores SELfd (Mr 68.000), Nigrina b (Mr 58.000) y SNAIV (Mr 30.000).

En la figura R43 se muestra el efecto de 2-mercaptoetanol sobre la estructura de las proteínas de los extractos de frutos verdes, flores y umbelas de frutos verdes. Como puede apreciarse las proteínas mayoritarias detectadas en estas partes de *S. ebulus* se reducen y generan subunidades de menor peso molecular, en el entorno de la Mr de SNA IV.

4.9. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS LECTINAS PRESENTES EN LAS INFLORESCENCIAS DE *S. EBULUS*.

4.9.1. Aislamiento y purificación de las lectinas de las inflorescencias de *S. ebulus*.

Se trataba de confirmar la presencia de nuevas proteínas en las flores de *S. ebulus*, que habíamos detectado por electroforesis de los extractos. Las inflorescencias de *S. ebulus* se recogieron en Barruelo del Valle (Valladolid) durante el mes de Junio con unas medidas promedio de 5 mm x 5 mm.

La obtención de proteínas nuevas se realizó por cromatografía de afinidad según un procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio recientemente (Jiménez y cols., 2013b). Un factor muy importante es la eliminación del mucílago plástico muy pegajoso que se adhiere fuertemente a la superficie de los materiales empleados en la extracción y que está presente en todas las preparaciones de *S. ebulus*.

Su eliminación se realizó en una primera fase durante la centrifugación del extracto, donde se depositó la mayor parte en el fondo de los tubos de centrifugación. El resto se adhirió al papel (73 g/m²) del filtro de doble capa que se utilizó para filtrar el sobrenadante de la centrifugación del extracto crudo.



Figura R44. Flores de *S. ebulus*. Se muestran inflorescencias recogidas en junio en Barruelo del Valle (Valladolid).

Se realizó una primera cromatografía de afinidad a través de una columna de Sepharose 6B tratada con ácido (AT-Sepharose 6B) cuyos resultados se representaron en la figura R45.

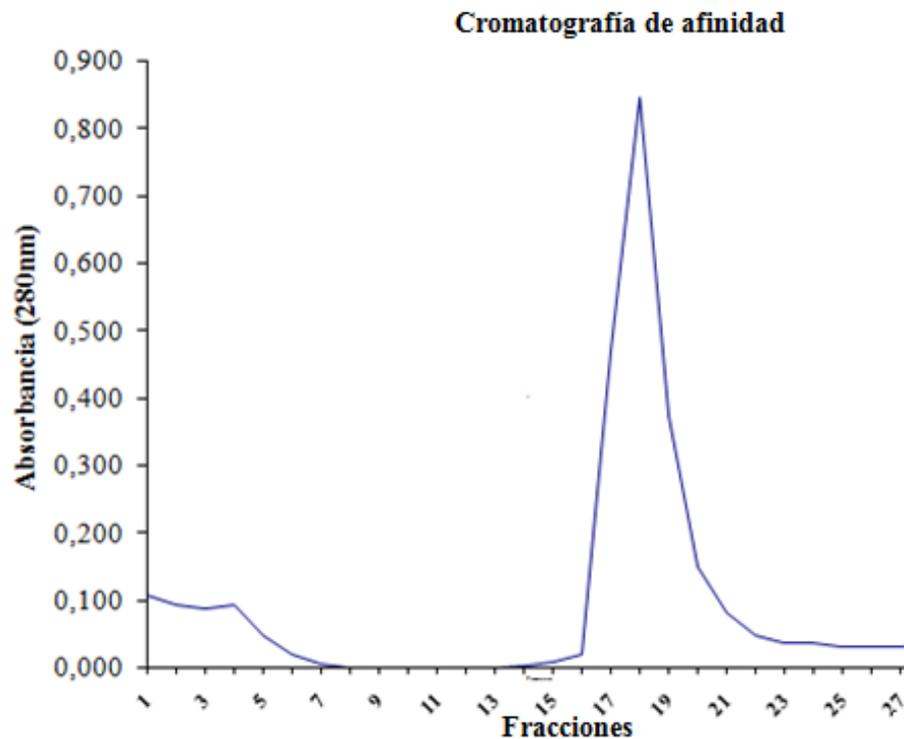


Figura R45. Perfil de absorción obtenido por cromatografía de afinidad en Sepharose 6B tratada con ácido (AT-Sepharose 6B) de extracto de flores. Se partió del extracto crudo de las inflorescencias de *S. ebulus* previamente filtrado con doble gasa para eliminar los restos de tejido vegetal. Se realizó una doble centrifugación y filtrado a través de doble capa de papel de filtro para eliminar el mucílago contaminante y el sobrenadante clarificado se aplicó a una columna de cromatografía GE XK50 (5 x 10 cm) con 200 ml de gel AT-Sepharose 6B. Se lavó la columna con tampón salino (5mM fosfato monosódico, 0,28 M NaCl (pH=7,5) y se eluyó la proteína retenida con el mismo tampón conteniendo 0,2 M de lactosa, recogiendo fracciones de 10 ml hasta que la absorbancia a 280 nm se estabiliza en valores cercanos a 0.

La proteína eluida se sometió a cromatografía de exclusión molecular con una columna de Superdex 75 lo cual que permitió la separación de dos proteínas (Figura R46). Estas proteínas se describen por primera vez en este trabajo y decidimos denominarlas ebulina blo y SELblo (blo de “blossoms”). El rendimiento de ebulina blo fue de 26,52 $\mu\text{g/g}$ y el de SELblo de 42,10 $\mu\text{g/g}$ en ambos casos referido a inflorescencia húmeda.

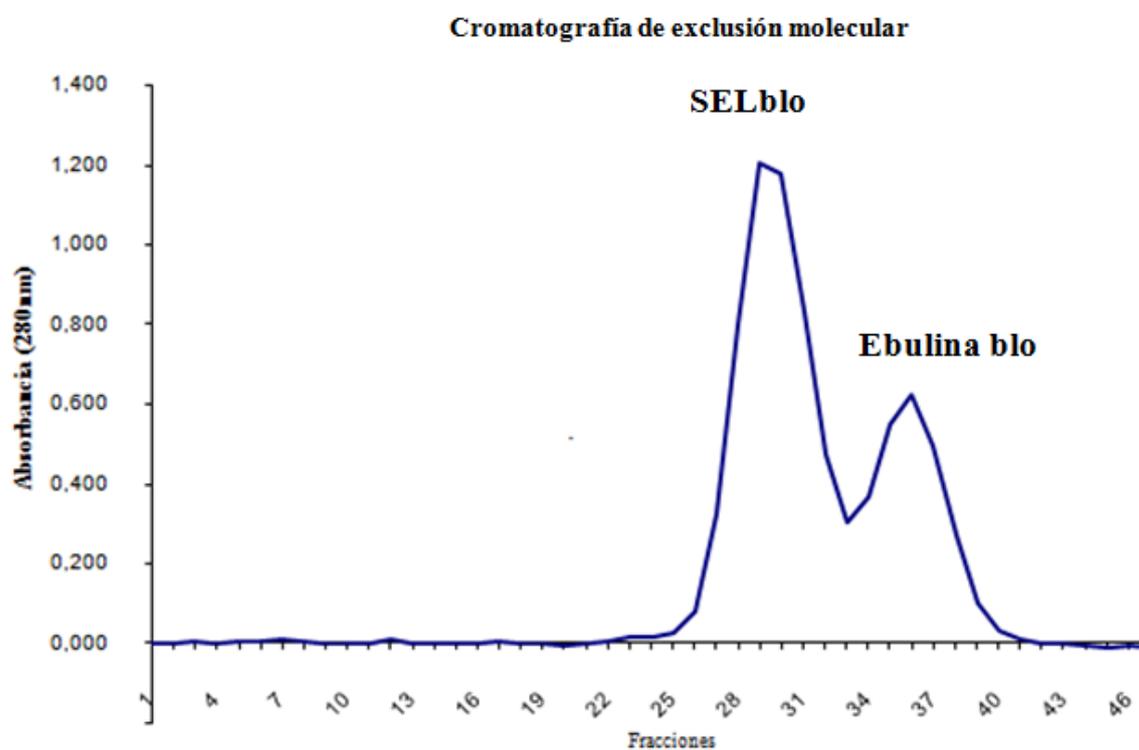


Figura R46. Perfil de Cromatografía en Superdex 75 de las lectinas totales de *S. ebulus* aisladas por cromatografía de afinidad en flores. La proteína total extraída en la columna de afinidad se concentró a un volumen de 5 ml y se aplicó a una columna de cromatografía de exclusión molecular HiLoad 26/60 Superdex 75 (preparative grade) que se resolvió con tampón de elución (NaCl 0,14 M en 5 mM (pH 7,5) a un flujo de 2,5 ml/min. Se descontaron los primeros 70 ml y se tomaron fracciones de 2,5 ml a las que se midió su absorbancia a 280 nm. Se juntaron las fracciones de cada lectina por separado y se dializaron frente H₂O (4 cambios de 5 litros cada uno).

4.9.2. Caracterización molecular de las lectinas de las inflorescencias de *S. ebulus*.

Para determinar la pureza y la masa molecular relativa de ambas proteínas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y ausencia o presencia de 2-mercaptoetanol.

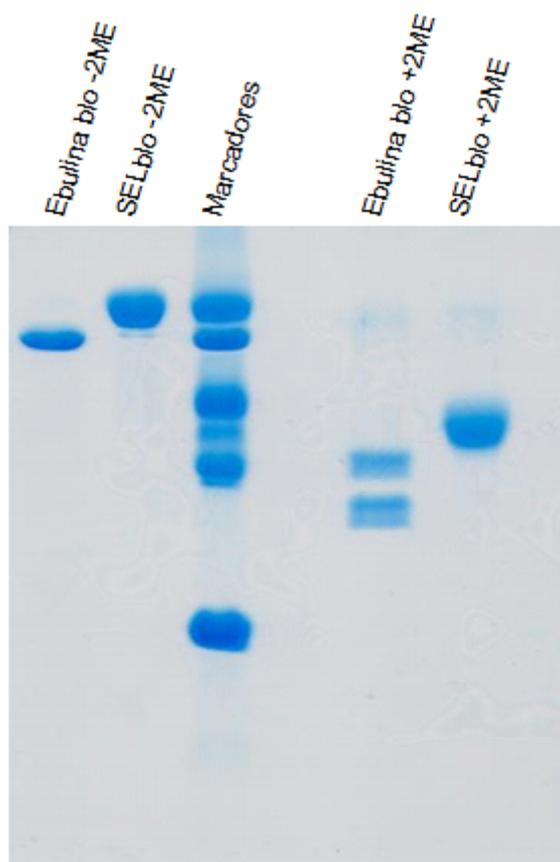


Figura R47. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de extractos de las nuevas lectinas SELblo y ebulina blo. En condiciones de +/- 2ME. Extractos dializados. Patrones. SELfd (Mr. 68.000), ebulina f (Mr. 56.000), Ovoalbúmina (Mr. 45.000), SNAIV (Mr. 30.000), inhibidor de tripsina (Mr. 20.000).

4.9.3. Análisis de la masa molecular por espectrometría de masas de las lectinas ebulina blo y SELblo de extractos de flores de *S. ebulus*.

La masa molecular exacta de ambas lectinas se determinó por espectrometría de masas en el servicio de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. Se enviaron al servicio 0,57 mg de ebulina blo y 0,81 mg de SELblo cada una de las proteínas congeladas en porciones de 0,19 y 0,27 mg. Los valores de masas relativas fueron: Mr = 63.225 para ebulina blo y Mr = 68.432 para SELblo. Los pI estimados fueron 5,56 para ebulina blo y 5,54 para SELblo.

Por otro lado, se obtuvieron los péptidos tripticos de ambas proteínas por digestión con tripsina y se determinaron sus masas moleculares por espectrometría de masas. En las figuras R48 y R49 se muestran los resultados.

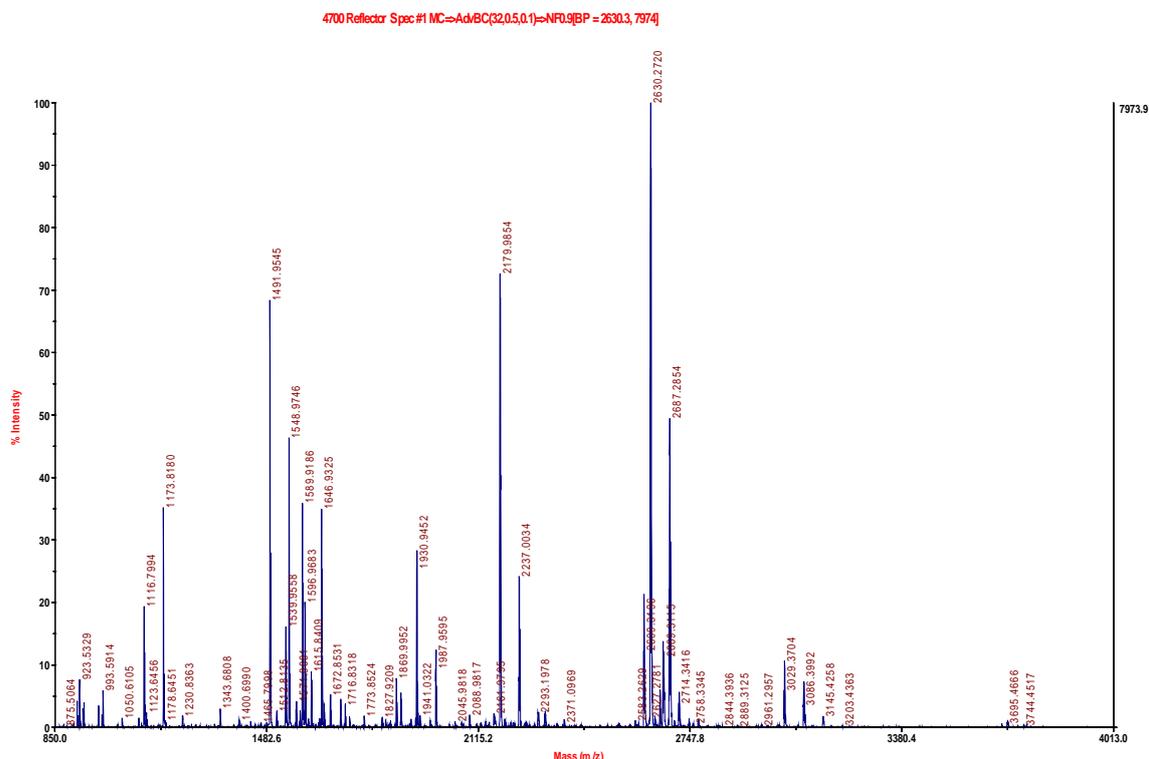


Figura R48. Espectro de masas ebulina blo.

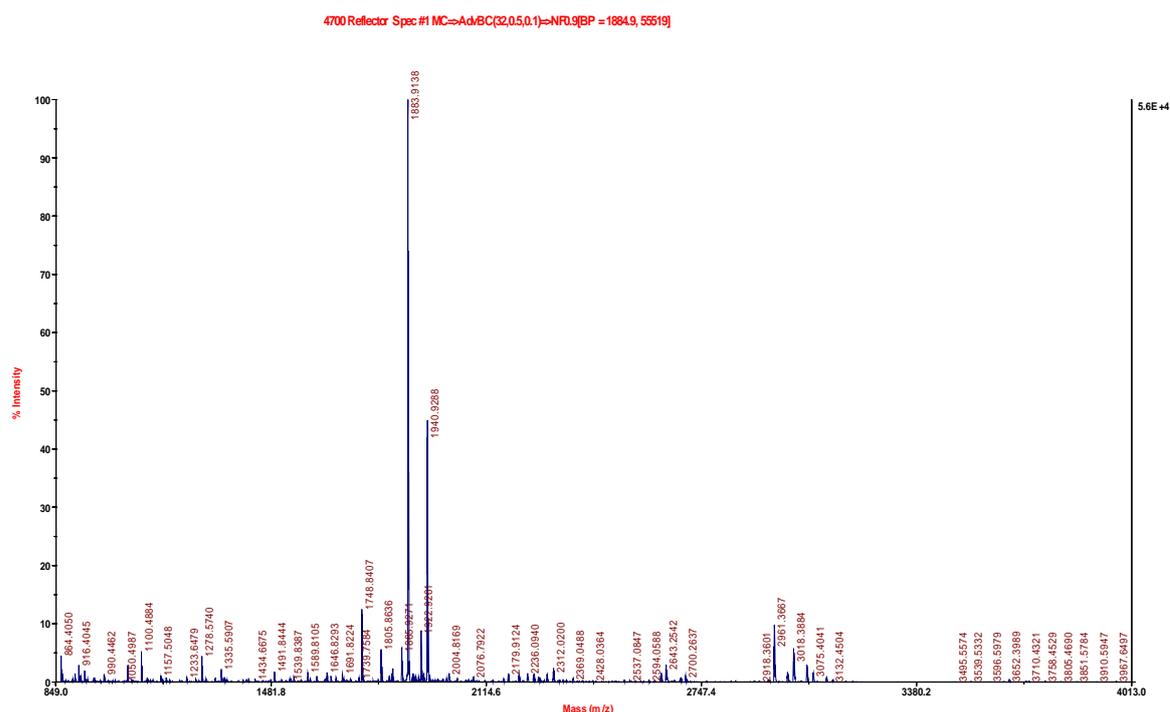


Figura R49. Espectro de masas de SELblo.

Una vez identificados los distintos péptidos trípticos se secuenciaron por espectrometría de masas mediante el procedimiento MALDI-TOF. En las figuras R50 se presentan las secuencias de distintos péptidos que por su abundancia pudieron secuenciarse con relativa facilidad.

***Ebulina blo* (estructura A-B; Mr 63.225)**

VATGTYEVNGLPVLR

SNLFLGTTQHTLSFTGNYDNLETAAGTR

ESIELGNPLDGAITSLWYDGGVARSLLVLIQMVPEAAR

YIEQEVRIITGIAILLFR

NGYDTDGTPIQLWPCGTQRNQQWTFYNDK

WEVLIDGSIINPSSGLVMTAPSGASR

CQGLATQRWFFNSDGSVVNLKESDVSLEQEVIIIFPATGNPNQQWR

SELblo (estructura B-B; Mr 34216 x 2)

FNAIRMPHDFVGEDNK

DGLCV DAR

DLCLTSRDIIISFTC

QGLPTQR

Figura R50. Secuencias de los péptidos trípticos de SELblo.

En la figura R51 se presentan las secuencias de algunos péptidos trípticos de Ebulina blo y SELblo comparados con las secuencias completas de Ebulina 1 (gi|13171073) y SNAld (gi|32892180) como referencia. Como puede apreciarse, los péptidos de ambas lectinas guardan una muy elevada homología secuencial con las secuencias utilizadas como referencia, Ebulina 1 y SNAld. Creemos que dicho grado de homología deriva de la gran equivalencia espacial de las estructuras terciarias de las lectina de *Sambucus* que permite una acción muy similar sino idéntica de la tripsina y por lo tanto la generación de péptidos muy parecidos.

Ebulin 1	1	MRVVKAAMLY	LHIVVLAIYS	VGIQ GIDYPS	VS INLAGAKS	TTYRDFLKNL
Ebulin blo	1					
SNald	1	MRVVAAMLC	LYIVVLAICS	VGIQ GIDYPS	VS -----	-----
SEL blo						
Ebulin 1	51	RDRVATGTYE	VNGLPVLRR	SEVQVKNRFV	LVRLTNYNGD	TVTSAVDVTN
Ebulin blo	51	VATGTYE	VNGLPVL			
SNald	51	-----	-----	-----	-----	-----
SEL blo	51	-----	-----	-----	-----	-----
Ebulin 1	101	LYLVAFSANG	NSYFFKDATE	LQKSNLFLGT	TQHTLSFTGN	YDNLETAAGTE
Ebulin blo	101			SNLFLGT	TQHTLSFTCN	YDNLETAAGR
SNald	101	-----	-----	-----	-----	-----
SEL blo	101					
Ebulin 1	151	RRESIELGPN	PLDGAITSLW	YDGGVARSL	VLIQMVPEAA	RFRYIEQEV
Ebulin blo	151	R	ESIELGPN	PLDGAITSLW	YDGGVARSL	VLIQMVPEAA
SNald	151	-----	-----	-----	-----	-----
SEL blo						
Ebulin 1	201	RSLQQLTSFT	PNALMLSMEN	NWSSMSLEVQ	LSGDNVSPFS	GTVQLQNYDH
Ebulin blo	201					
SNald		-----	-----	-----	-----	-----
SEL blo						
Ebulin 1	251	TPRLVDNFEE	LYKITGIAIL	LFRCVATKTT	HNAIRMPHVL	VGEDNKF NDG
Ebulin blo	251					
SNald	251	-----	-----	-----	CK	FNAIRMPHDL
SEL blo	251					FNAIRMPHDF
Ebulin 1	301	ETCAIPAPFT	RRIVGRD GLC	VDV RNGYDTD	GTPIQLWPCG	TQR QQWTFY
Ebulin blo	301			NGYDTD	GTPIQLWPCG	TQR QQWTFY
SNald	301	E-----PFT	RHIIGRD GLC	VDARTGCD--	---IQLWPCG	SQTS QQWTFY
SEL blo	301		D GLC	VDAR		
Ebulin 1	351	ND X TIR ---S	MGKCMTANGL	NSGSYIMITD	CSAA	EDATK
Ebulin blo	351	ND X				WEVLIDGSII
SNald		ED X TIR SNLS	MGKCMTANGF	NSGSYIMIFD	CSSATEDATK	WDVTIDGSII
SEL blo	351	ED X TIR ---	MGKCMTANGF	NSGSYIMIFD	CSSATENATK	WEVTIDGSII
Ebulin 1	401	NPSSGLVMTA	PSGASRTTLL	LENNIHAASQ	GWTVSNQVQP	IATLIVGYNE
Ebulin blo	401	NPSSGLVMTA	PSGASR			
SNald		SVLVMTSPSR	ASGTA-LVLD	--NNILAASQ	GWTVSNQVQP	NVTLIVGYNN
SEL blo						
Ebulin 1	451	MCLQANGENN	NVWMEDCDVT	SVQQQ WALFD	DRT IRVNNSR	GLCVTSNGYV
Ebulin blo	451					
SNald		MCLKANGENN	KVWMENCVST	SVQQQ WALFG	DRT IRVNSSR	DLCLTSRQYV
SEL blo						DLCLTRS
Ebulin 1	501	SKDLIVIRKC	QGLATQRWFFNSD	GSVVNLKSTR	VMDVKE	SDVS LQ VIIF
Ebulin blo	501		C QGLATQRWFFNSD	GSVVNLK		ESDVS LQ VIIF
SNald		SKDIIISFTC	QGLPTQRWFFKSD	GTIVNPNTTL	VMDVKG	SDVS LR IIII
SEL blo			DIIISFTC	QLGPTQR		
Ebulin 1	551	PATG NP QQW	RTQVPQI			
Ebulin flo	551	PATG NP QQW	RTQ			
SNald		PS VGSS NO QW	KTEVLPS			

Figura R51. Secuencias de ebulina I, péptidos de ebulina blo, SNAId y péptidos de SELblo. Las secuencias marcadas en amarillo son algunos de los péptidos trípticos obtenidos de ebulina blo. Las secuencias en verde son algunos de los péptidos trípticos obtenidos de SELblo. Los rectángulos indican las zonas en las que se encuentran secuencias parecidas de algunos de los péptidos trípticos del alérgeno Sam n1.

4.10. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN POR VÍA NASAL DE EBULINA BLO A RATONES SWISS.

Para determinar la toxicidad de ebulina blo en ratones Swiss se procedió a la administración nasal de diferentes concentraciones a grupos de 7 ratones cada uno. Los pesos de los ratones control no varían prácticamente en el tiempo que dura el experimento debido a que estos animales están ya en el peso máximo que suelen alcanzar (R52).

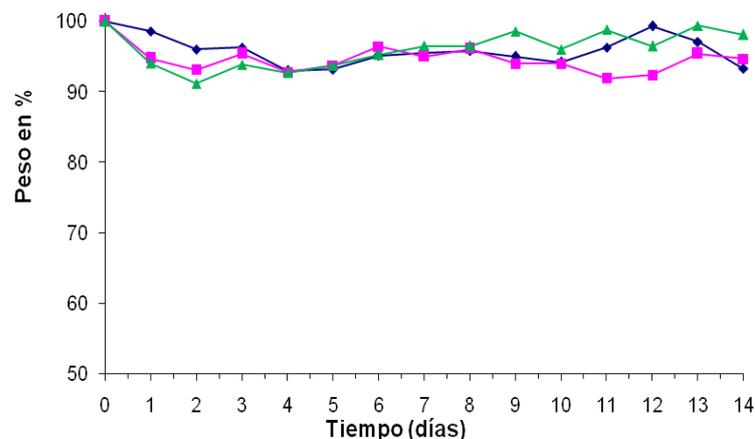


Figura R52. Gráfica que representa la variación en tanto por ciento (%) en peso en ratones Swiss en ratones control (sin ebulina blo vía nasal).

La administración de 5 mg/kg de peso corporal de ebulina blo provoca un efecto tóxico que provoca la muerte de los ratones ya al quinto día y mata al 60% a los 14 días. La reducción de peso (30% de pérdida) fue muy

notable y se produce de manera continua hasta la muerte de los ratones (R53).

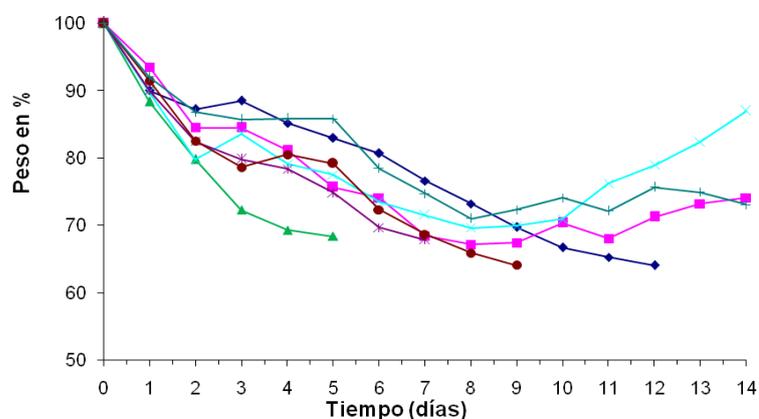


Figura R53. Gráfica que representa la variación en tanto por ciento (%) en peso en ratones Swiss a 5 mg/kg vía nasal de ebulina blo.

La administración de 3,75 mg/kg de peso corporal de ebulina blo mata a los ratones ya a los 7 días y a los 11 días mueren un 70%, con una pérdida de peso continua de hasta el 30% en cada ratón (R54).

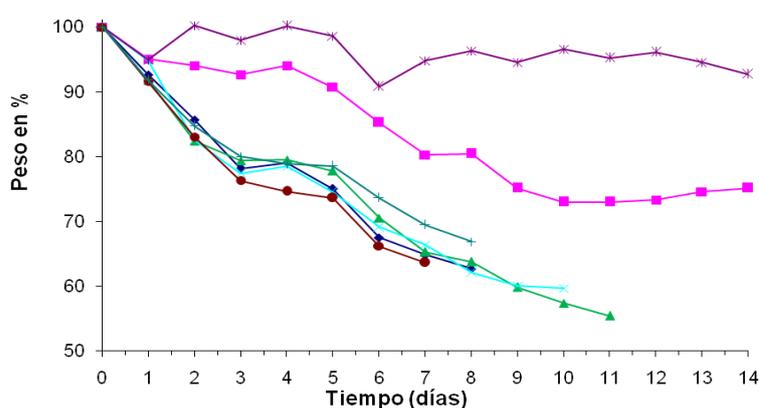


Figura R54. Gráfica que representa la variación en tanto por ciento (%) en peso en ratones Swiss a 3,75 mg/kg vía nasal de ebulina blo.

En los resultados obtenidos con la administración de 2,50 mg/kg de peso corporal de ebulina blo no se observa reducción por debajo del 70% (R55).

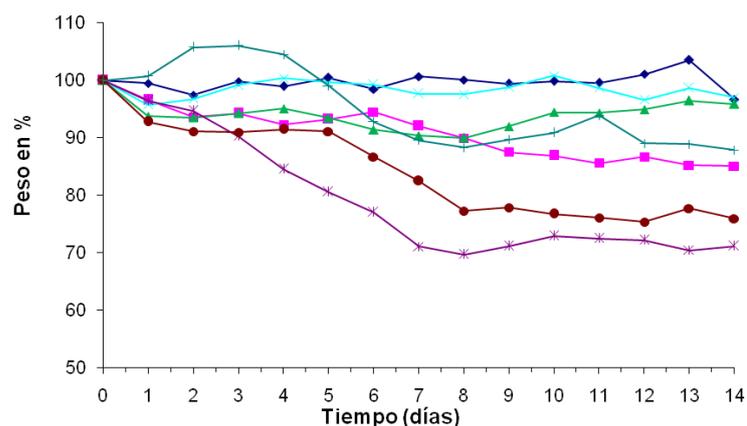


Figura R55. Gráfica que representa la variación en tanto por ciento (%) en peso en ratones Swiss a 2,50 mg/kg vía nasal de ebulina blo.

4.11. REPRESENTACIONES DE KAPLAN-MEIER DE LA SUPERVIVENCIA DE RATONES SWISS A EBULINA BLO NASAL.

Las representaciones de Kaplan-Meier de la administración de distintas cantidades de ebulina blo a ratones Swiss (Figuras R56, R57, R58), indican que ebulina blo es tóxica por administración nasal en forma de disolución por encima de 2,5 mg/kg de masa corporal.

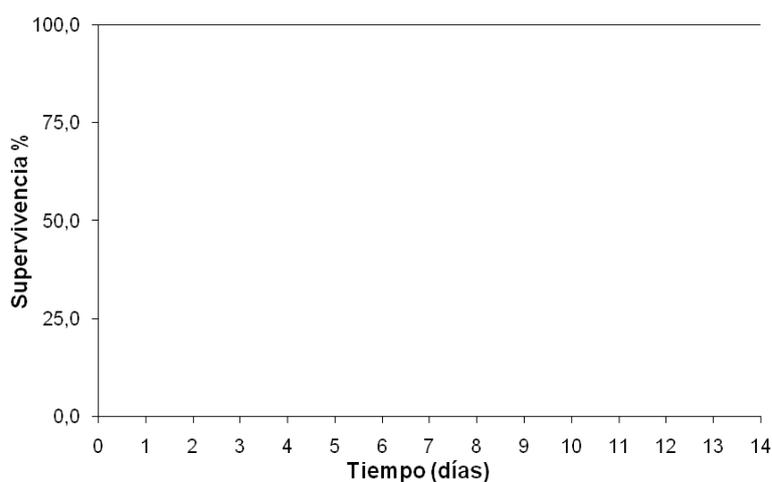


Figura R56. Representación de Kaplan-Meier de la supervivencia en ratones Swiss a 2,50 mg/kg vía nasal de ebulina blo.

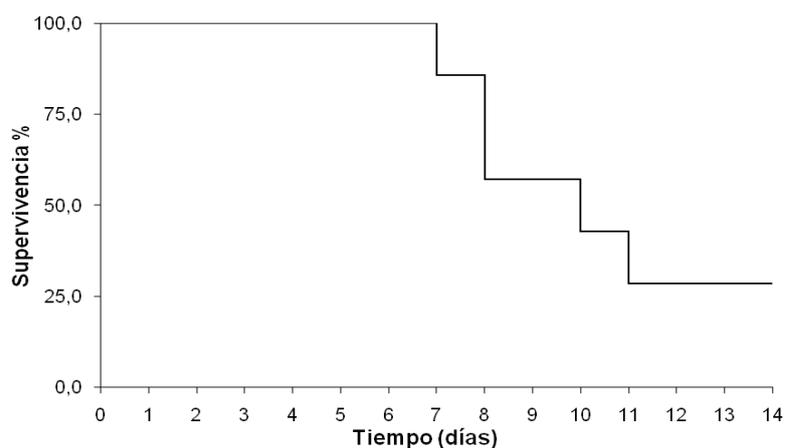


Figura R57. Representación de Kaplan-Meier de la supervivencia en ratones Swiss a 3,75 mg/kg vía nasal de ebulina blo.

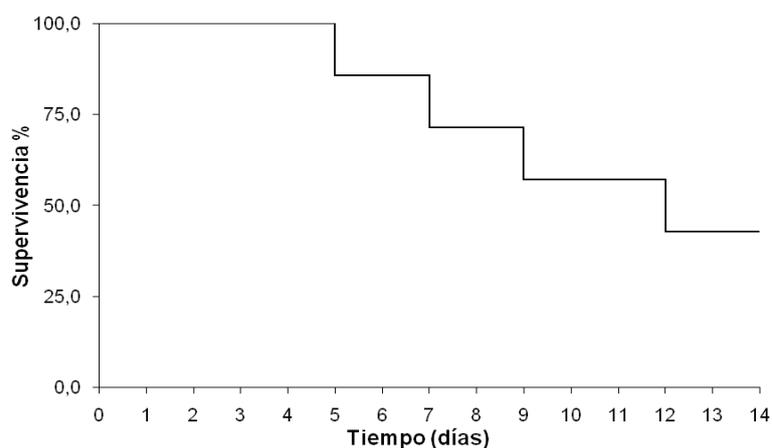


Figura R58. Representación de Kaplan-Meier de la supervivencia en ratones Swiss a 5 mg/kg vía nasal de ebulina blo.

5. DISCUSIÓN.

S. ebulus es una planta medicinal con una gran capacidad antioxidante, y una elevada concentración de polifenoles, entre los que se incluyen los cianidín-glucósidos (Kiselova y cols., 2006). Se ha descrito que los frutos de *S. ebulus* pueden llegar a ser tóxicos, e incluso mortales para niños y ancianos y esto limita grandemente su utilidad (Font-Quer., 1999).

Esta planta contiene una serie de proteínas denominadas ebulinas que se han caracterizado como proteínas inactivadoras de ribosomas del tipo II que presentan una toxicidad a tener en cuenta si la planta se utiliza con finalidad fitoterapéutica y sin procesar, es decir sin manipulaciones térmicas encaminadas a destruir su toxicidad.

La primera parte de los objetivos de este trabajo ha estado encaminada precisamente a determinar la capacidad antioxidante y antirradicalaria presente en las distintas partes de la planta. Nuestros resultados indican que son los frutos las partes que tienen mayor concentración de compuestos que reaccionan con el reactivo Folin - Ciocalteau. Este reactivo es característico de fenoles y mide también capacidad antioxidante de compuestos como vitaminas E y C, y ácidos orgánicos como ácido clorogénico, cafeico, sinápico, etc. Los frutos maduros acumulan algo más de 4 veces compuestos reactivos con el reactivo Folin - Ciocalteau que los frutos verdes.

Entre los fenoles complejos que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteau se encuentran los flavonoides. Se acepta que los flavonoides son productos del metabolismo secundario producidos por la ruta del fenilpropano que podrían servir en la planta que los produce como protección frente a la luz ultravioleta, como agentes protectores frente al ataque por patógenos y como moduladores de la acción de las hormonas vegetales.

La otra medida de capacidad antioxidante es la que utiliza el método CUPRAC, por este procedimiento se obtienen valores de capacidad antioxidante en frutos maduros 4,5 veces más que en frutos verdes y la mitad que con el reactivo de Folin - Ciocalteu. Aunque los fenoles poseen también capacidad antioxidante, la diferencia entre ambos procedimientos indica que el método del Folin - Ciocalteu valora además de los compuestos antioxidantes, otros compuestos sin capacidad reductora aparente del complejo cobre (II) - neocuproína.

No obstante, la relación de actividad en equivalentes de ácido gálico se mantiene en otras partes de la planta con excepción de los ápices, brotes y hojas maduras, en dónde la proporción de sustancias reactivas con Folin-Ciocalteu en relación con las reactivas con cobre (II)-neocuproína es mayor de 2.

Otra propiedad importante de plantas medicinales con capacidad antioxidante, es que presentan actividad antirradicalaria y por lo tanto, son útiles para el atrapamiento de radicales libres generados en el metabolismo, particularmente radicales libres, el oxígeno, nitrógeno, fósforo y cloro.

Estos radicales libres, de los cuales, los del oxígeno son los más conocidos (ROS: "radical oxygen species"), atacan a las moléculas biológicas en particular los fosfolípidos de las membranas y los ácidos nucleicos. En el primer caso los radicales libres forman lipoperóxidos inestables que evolucionan a derivados cuya presencia en la membrana es una característica química de la denominada respuesta de estrés o estrés oxidativo; estos derivados se escinden del fosfolípido por sistemas enzimáticos especiales que se encargan de mantener la membrana lo más funcional posible.

En el segundo caso, el ataque más importante es el que se produce sobre el ADN que provoca roturas, deleciones y formación de aductos en

las cadenas de ADN y que tienen efectos notables en la promoción del envejecimiento y la carcinogénesis (Girbés y Jiménez., 2012 a, b). En ambos casos el bloqueo de la respuesta oxidante es importante para prevenir el desarrollo de patologías.

Muchas de las sustancias antirradicalarias que ingerimos se encuentran en los alimentos vegetales y en particular en determinadas plantas, muchas de ellas, plantas medicinales. En el presente trabajo se escogió el modelo del radical libre DPPH, que es estable en condiciones normales y presenta absorción a 515 nm. La presencia de sustancias antirradicalarias puede por tanto detectarse con esta sustancia simplemente valorando la reducción de la absorción. Este procedimiento es utilizado ampliamente en la literatura sobre el tema (Barros y cols., 2007).

El DPPH tiene mayor utilidad para nuestro estudio que el DOPPH. En los experimentos se utilizó el Trolox, que es un análogo de la vitamina E, como patrón. Los resultados indican que los frutos maduros de nuevo, presentan el doble de actividad antirradicalaria.

La maduración de los frutos de *S. ebulus* es concomitante con la biosíntesis de antocianos en particular los derivados de cianidina, cianidín-3-glucósido, cianidín-3-glucósido-5-sambubiósido y cianidín-5-diglucósido (Bermúdez-Soto y Tomás-Barberán., 2004), siendo más abundante el primero. La biosíntesis se produce por la ruta de la chalcona sintetasa y la transición verde maduro se produce muy rápidamente, de manera, que es posible encontrar simultáneamente frutos verdes y maduros en la misma umbela.

Nuestros resultados indican que la única parte de la planta que acumula antocianos son los frutos maduros, mientras que las demás partes estudiadas prácticamente carecen de ellos. La determinación de la concentración de antocianos se realizó mediante el método diferencial del

pH, que consiste en determinar la absorción diferencial que se produce a pH 1 (coloración rojiza) y a pH 4,5 (de coloración muy pronunciada). A valores de pH 6 y superiores el anillo flavilio se abre dando lugar a la chalcona correspondiente que posee una coloración mucho menor, por lo tanto, y de acuerdo con resultados publicados previamente (Prior y cols., 2005) los antocianos son estables en el estómago pero inestables en el intestino delgado. Esta puede ser la causa de la baja biodisponibilidad de las antocianidinas (Prior y cols., 2005).

Los valores obtenidos en equivalentes de cianidín-3-glucósido son muy elevados (2,1 mg/gr de fruto maduro), lo que les convierte en las bayas conocidas más ricas en este compuesto. El análisis por HPLC de los extractos crudos de frutos maduros confirma que el cianidín-3-glucósido, es el glucósido más abundante. Por contra, los frutos verdes y las inflorescencias presentan un pico de absorción mayoritario que no hemos podido identificar pero que se mueve en la zona del cianidín-3,5-diglucósido (Bermúdez-Soto y Tomás-Barberán., 2004).

El tratamiento térmico reduce en 1/3 la concentración de cianidín-3-glucósido ya a los 5 minutos y de 1/2 a los 5 minutos, y desaparece prácticamente a los 30 minutos. Esto demuestra que este antociano es más sensible que el conjunto de los antocianos y de antioxidantes, que experimenta pérdidas inferiores al 10% en los primeros 15 minutos del tratamiento. No hay que olvidar que entre las sustancias antioxidantes de los frutos maduros se encuentran vitamina C, vitamina E y sustancias polifenólicas que pueden llegar a ser más resistentes que los antocianos.

La limitación en el uso de estas bayas como fuente rica en antocianos y otros polifenoles y antioxidantes, estriba en la presencia de lectinas cuya concentración depende del grado de maduración entre otros factores.

Resultados recientes indican que las lectinas de frutos de *S. ebulus*, ebulina f y SELfd, se sensibilizan a pepsina ácida por incubación en baño de agua en ebullición durante 5 minutos (Cabrero y cols., 2013).

En este trabajo se estudió si dicho tratamiento térmico, que inactivaría las lectinas en el proceso de digestión gástrica, y por tanto, reduciría su toxicidad y alergenicidad, afectaría a la concentración de fenoles totales, capacidad antioxidante y capacidad antirradicalaria.

Nuestros resultados indican que este tratamiento térmico que sensibilizan las lectinas a pepsina no elimina las propiedades antioxidantes y antirradicalarias de los extractos de fruto maduro.

La baja sensibilidad de la ebulina I y su ausencia en la SELfd de frutos probablemente se debe a la conformación y de las cadenas polipeptídicas que no permite el acceso de la pepsina a sus enlaces peptídicos diana. El tratamiento térmico desnaturaliza a las lectinas y permite su rápida degradación por pepsina ácida.

Las lectinas nativas, que como hemos comentado, guardan una estrecha homología con el alérgeno Sam nI pasarían intactas el compartimento gástrico y podrían desencadenar la respuesta alérgica en el intestino delgado.

Por otro lado, dado que la ebulina f presenta una toxicidad apreciable cuando se administra por vía oral (Jiménez y cols. 2013b) es concebible que la ingesta de los frutos maduros sin procesar pudiera desencadenar la toxicidad que se ha observado en animales intactos (Jiménez y cols. 2013a).

La relevancia de nuestros resultados estriba principalmente en que hemos podido demostrar que se puede reducir o eliminar la amenaza de ebulina f sin afectar las propiedades que se han asignado a los frutos de *S. ebulus*.

S. ebulus contiene ebulina en hojas (Girbés y cols., 1993 a, b), rizomas (Cítores y cols., 1997), y frutos (Cítores y cols., 1998 y Jiménez y cols. 2013b). Dada la importancia de esta proteína y su carácter tóxico (Jiménez y cols. 2013a) decidimos estudiar su presencia en distintas partes de la planta.

Resulta muy interesante el hecho de que estas proteínas se encuentren entre las mayoritarias en las distintas partes de *S. ebulus* en particular en inflorescencias, frutos verdes y maduros, umbelas y hojas.

La mayor concentración de lectinas en particular SELfd se produce en inflorescencia y en frutos. Aunque no se sabe el papel biológico de estas proteínas debe de ser importante habida cuenta de su importancia.

Peumans y Van Damme., (1995) han sugerido que las proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo II y particularmente las que poseen actividad lectina, así como las lectinas sin actividad antirribosómica podrían desempeñar un papel como proteínas de reserva para almacenar nitrógeno biodisponible rápidamente. En el caso de los frutos maduros, la lectina SELfd representa más del 95% de la proteína total y presenta trazas de ebulina f.

En los frutos verdes se produce también acumulación de la lectina pero en menor cantidad que en frutos maduros. En inflorescencias se acumulan dos lectinas parecidas a SELfd y ebulina f, que hemos denominado SELblo y ebulina blo (de “blossoms”).

Para determinar si las lectinas de las inflorescencias son las mismas que las de los frutos, procedimos a su aislamiento según la metodología desarrollada previamente por nuestro laboratorio (Jiménez y cols. 2013b) ambas lectinas SELblo y ebulina blo pudieron aislarse de la misma manera que SELfd y ebulina f.

Recientemente se ha aislado nigrina b de la corteza de *S. nigra*, mediante un proceso que requiere una primera columna de cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose, posterior elución con tampón fosfato sódico y una cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-100 (Ferrerías y cols., 2011). Este procedimiento que es distinto del de afinidad rinde 4 veces más ebulina que el procedimiento original por cromatografía de afinidad (Girbés y cols., 1993a).

No obstante, este procedimiento de intercambio iónico rinde cadenas polipeptídicas que pueden ser inactivas porque el procedimiento no las separa por actividad de fijación de azúcares. El resultado es importante si se utiliza esta proteína para la construcción de inmunotoxinas y conjugados dirigidos contra células blanco (Muñoz y cols., 2007; Muñoz y cols., 2013). En estos casos lo que se necesita es una proteína muy activa tanto en su parte antirribosómica (cadena A) como en su parte lectina (cadena B).

Se ha descrito que la internalización de las RIPs de tipo II se produce con mayor eficiencia en forma de dímero A-B, en el cual la cadena B ayuda al proceso de traslocación a través de las membranas endosómicas y en su caso del retículo endoplásmico rugoso, como sucede con la ricina. La estabilidad de las inmunotoxinas construidas con dímeros con RIPs A-B, es mayor que las construidas con cadenas A purificadas a partir de dímeros A-B o proteínas recombinantes derivadas del gen que codifica a la cadena A de las RIPs de tipo II (Antolín y cols. 2004).

El análisis de las masas moleculares obtenidas por espectrometría de masas revela que ebulina blo posee una masa relativa de 63.225, diferente de la masa relativa de ebulina f que es de 58.904. Por otro lado, la masa molecular de SELblo es muy parecida a la de SELfd (68.432 en el primer caso y 68.678 en el segundo).

Ebulina blo y SELblo presentan un comportamiento electroforético diferente. Así ebulina blo en presencia de 2-mercaptoetanol se comporta como dos bandas de peso molecular diferente (cadenas A y B) que estuviesen glicosiladas y por lo tanto, migran como bandas anchas más definida en la parte superior. Este comportamiento se ha apreciado en otras glicoproteínas, en cambio, SELblo presenta una única banda nítida consistente con una estructura B*-B*.

Resultados no publicados de nuestro laboratorio utilizando la técnica de doble inmunodifusión (Higuchi y cols., 1989), indican que ambas lectinas reaccionan con anticuerpos policlonales de conejo contra la mezcla de ebulina f y SELfd dos lectinas equivalentes aisladas de frutos de *S. ebulus*, siendo SELblo la proteína que más reacciona con los anticuerpos.

El comportamiento electroforético de SELblo es también característico de proteínas muy glicosiladas. Tradicionalmente se ha aceptado que las cadenas polisacáridas de las glucoproteínas son más antigénicas que las cadenas polipeptídicas de las mismas glucoproteínas. Esto sugiere que la lectina de las inflorescencias puede ser un alérgeno notable lo que encajaría con hipótesis previas (Jiménez y cols., 2013b).

En este sentido, hay que recordar que el alérgeno Sam nI, aislado del polen de *S. nigra* guarda homología secuencial con las lectinas de *S. ebulus* y *S. nigra* (Föster-Walde., 2003).

La digestión con tripsina seguida de la espectrometría de masas permite obtener la huella tríptica de las dos lectinas que es claramente diferente. Por otro lado, la comparación con las dos lectinas obtenidas de frutos, indica que si bien, en el caso de SELblo, se obtiene un péptido mayoritario (1.884 Da) que se observa también en SELfd, es difícil encontrar péptidos equivalentes entre ambas lectinas. Una comparación

similar entre la ebulina f y la ebulina blo, revela un péptido de 1.539 Da en ambas proteínas.

Se secuenciaron diversos péptidos trípticos para tener la secuencia de aminoácidos y poder comparar con la secuencia de aminoácidos derivada del gen de la ebulina l (Pascal y cols., 2001) y de la SNAld de la base de datos NCBI *Viridiplantae* (Green plants) database.

Los resultados indican que estas proteínas se parecen entre sí, en la cadena B y B*, y también con péptidos trípticos derivados del alérgeno Sam nI. Este hecho junto con la gran reactividad de la lectina SELblo apoya la hipótesis de que las lectinas antirribosómicas, por su cadena B, y las lectinas sin actividad antirribosómica (cadenas tipo B) configuran una familia de alérgenos siendo Sam nI el primero de los aislados (Ferrerías y cols., 2011 y Jiménez y cols., 2013b).

Resultados recientes indican que la ebulina aislada de frutos, ebulina f presenta una elevada toxicidad en ratones tanto por administración intraperitoneal como por administración oral (Jiménez y cols., 2013a, b). Dado que, el alérgeno Sam nI se aisló de polen y nuestra tesis es que las lectinas de las inflorescencias son alérgenos equivalentes y/o relacionados, se pensó que estas proteínas podrían tener toxicidad por administración nasal. Se estudió únicamente la ebulina blo porque es la lectina antirribosómica, y en forma de solución que se instiló por vía nasal para evitar la formación de aerosoles que, dada la toxicidad de las ebulinas, podría entrañar un serio peligro.

A este respecto hay que recordar que la ricina es un arma de guerra del grupo B, que se utilizaría como aerosol dada su gran toxicidad por vía nasal (Griffiths, 2011). Recientemente los medios de comunicación se han hecho eco de diversos ataques a políticos en E.E.U.U. con cartas que contenían ricina.

Según se ha demostrado recientemente, la toxicidad de ebulina f administrada por vía oral es mayor que la de la ricina administrada por la misma vía (Jiménez y cols. 2013b). En contraste es mucho menos por vía intraperitoneal, lo cual se ha interpretado en base a la vía de internalización de las proteínas inactivadoras de ribosomas nigrina b (Battelli y cols., 2004) y ebulina l (Svinth y cols., 1998).

Ebulina blo presenta una alta toxicidad nasal que es patente por encima de los 2,5 mg/kg. Debido a la forma de instilación, como solución acuosa, cabría la posibilidad de que parte de la solución pasase al estómago. Sin embargo esta posibilidad puede descartarse por dos factores: 1) la ebulina es sensible a la degradación por pepsina ácida; 2) la toxicidad por vía nasal es similar a la vía oral por lo que pequeñas cantidades desviadas al estómago no deberían tener efecto ya que a 2,5 mg/kg por vía oral no se observa mortalidad. La combinación de ambos factores hace muy improbable que la ebulina blo nasal ejerza toxicidad a través del estómago.

Hay que resaltar que hemos utilizado series de pocos ratones habida cuenta de que la finalidad era simplemente detectar la toxicidad, pero no obstante se puede observar un efecto dependiente de la dosis, dado que a 3,75 mg/kg algunos animales mueren a los 7 días y a 5 mg/kg algunos lo hacen lo hacen ya a los 5 días.

6. CONCLUSIONES

-
1. *Sambucus ebulus* es una planta medicinal con gran capacidad antioxidante, siendo los frutos maduros con gran diferencia la parte de la planta con mayor capacidad antioxidante y antirradicalaria.
 2. Los frutos maduros contienen 4,4 veces mayor concentración de fenoles reactivos con el reactivo de Folin - Ciocalteu que los frutos verdes.
 3. Los frutos maduros contienen 4,7 veces mayor concentración de sustancias antioxidantes, determinadas por el método CUPRAC, que los frutos verdes.
 4. La actividad antioxidante de los frutos maduros determinada con el reactivo Folin – Ciocalteu es 2,1 veces mayor que la determinada por CUPRAC, probablemente debido a que el reactivo de Folin – Ciocalteu, reacciona también con sustancias no antioxidantes.
 5. Los frutos maduros de *Sambucus ebulus* poseen una gran capacidad antirradicalaria, medida por reacción con el radical libre estable DPPH, es 3,6 veces mayor que en frutos verdes y 2 veces mayor que en hojas maduras.
 6. Los frutos maduros son los únicos que contienen antocianos, en cantidad de 2.165 µg equivalentes de cianidín-3-glucósido por gramo de peso húmedo.
 7. El tratamiento de los extractos de frutos con calor en baño de agua en ebullición, reduce la cantidad de polifenoles y cianidín-3-glucósido, y

las capacidades antioxidante y antirradicalaria. Estas reducciones fueron inferiores al 6% en 5 minutos de incubación.

8. El proceso de inactivación por calor sigue una cinética bifásica con una primera parte hasta los 20 minutos y un salto pronunciado a partir de los 20 minutos.
9. Las distintas partes de *Sambucus ebulus* contienen en mayor o menor medida isoformas de las lectinas ebulina y SEL, que son más abundantes y poseen mayor relevancia en los frutos verdes y en las inflorescencias.
10. De las inflorescencias de *Sambucus ebulus* hemos aislado las lectinas ebulina blo y SELblo por cromatografía de afinidad en resina con soporte de D-galactosa que permite aislar lectinas que fijan este azúcar, y cromatografía de exclusión molecular.
11. Las masas moleculares determinadas por espectrometría de masas revelan valores de 63.225 para ebulina blo y 68.422 para SELblo.
12. La obtención y secuenciación por espectrometría de masas de algunos péptidos trípticos de ambas lectinas revelan una elevada homología secuencial con las lectinas presentes en frutos y con algunos péptidos trípticos aislados del alérgeno Sam nI del polen de *Sambucus nigra*.

-
13. El análisis de la toxicidad en ratones Swiss de ebulina blo administrada por instilación nasal, indica que se produce mortalidad dependiente de la dosis a partir del 5° día.

 14. La toxicidad de la ebulina blo es concomitante a efectos fisiológicos que cursan con una notable reducción de la masa corporal.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Aaby, K., Ekeberg, D., Skrede, G. (2007a). Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC Detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(11), 4395–4406.

Aaby, K., Wrolstad, R., Ekeberg, D., Skrede, G. (2007b). Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees; impact of achene level and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(13), 5156–5166.

Antolín, P., Girotti, A., Arias, F.J., Barriuso, B., Jiménez, P., Rojo, M.A., Girbés T. *J Biotechnol.* (2004). Bacterial expression of biologically active recombinant musarmin 1 from bulbs of *Muscari armeniacum* L. and Miller. *J. Biotechnol.* 112(3), 313-22.

Anttonen, M.J., Karjalainen, R.O. (2006). High performance liquid chromatography analysis of black currant (*Ribes nigrum* L.) fruit phenolics grown either conventionally or organically. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(20), 7430–7538.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Ozyürek, M., Celik, S.E., Bektaşoglu, B., Berker, K.I., Ozyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*. 12(7), 1496-1547.

Arteche, A., Uriarte, C. (1994). *Fitoterapia: Vademécum de Prescripción*.

Aruoma, O. I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res.* 523-524, 9-20.

Barbieri, L., Battelli, M.G., Stirpe F. (1993) Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta*. 1154, 237-282.

Barbieri, L., Valbonesi, P., Bonora, E., Gorini, P., Bolognesi, A., Stirpe, F. (1997). Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly (A). *Nucleic Acids Research*. 25, 518-522.

Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Morais, J.S., Ferreira, I. C. (2007). Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition

and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *J Agric Food Chem.* 55, 4781-4788.

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

Battelli, M.G., Musiani, S., Buonamici, L., Santi, S., Riccio, M., Maraldi, N. M., Girbés, T., Stirpe F. (2004). Interaction of volkensin with HeLa cell: binding, endocytosis, intracellular localization, degradation and exocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 6, 1975-1984.

Battelli, M.G., Polito, L., Falà, F., Musiani, S., Tazzari, P.L., Stirpe, F., y Bolognesi, A. (2005). Toxicity of xanthine oxidoreductase to malignant B lymphocytes. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 19(3-4), 120-9.

Benítez, J., Ferreras, J.M., Muñoz, R., Arias, Y., Iglesias, R., Córdoba-Díaz M., del Villar, R., Girbés T. (2005). Cytotoxicity of an ebulin l-anti-human CD105 immunotoxin on mouse fibroblasts (L929) and rat myoblasts (L6E9) cells expressing human CD105. *Med. Chem* (1), 65-70.

Bermúdez-Soto, M.J., Tomás-Barberán, F.A. (2004). Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. *European Food Research and Technology.* Volumen 219, 133-141.

Bonita, J.S., Mandarano, M., Shuta, D., Vinson, J., (2007). Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacol. Res.* 55, 187-198.

Bordonaba, J.G., Crespo, P., Terry, L.A. (2011). A new acetonitrile-free mobile phase for HPLC-DAD determination of individual anthocyanins in blackcurrant and strawberry fruits: A comparison and validation study. *Food Chemistry.* 129(3), 1265–1273.

Bordonaba, J.G., Terry, L.A. (2008). Biochemical profiling and chemometric analysis of seventeen UK-grown black currant (*Ribes nigrum* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56(16), 7422–7430.

Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., Soulimani, R. (2007). Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled. *J Neurol Sci.* 262(1-2), 77-84.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie.* 28, 25–30.

Buhrmester, R.A., Ebinger, J.E., Seigler, D.S. (2000). Sambunigrin and cyanogenic variability in populations of *Sambucus Canadensis* L. (Caprifoliaceae). *Biochem. Sys. Ecol.* 28, 689-695.

Cabrero, P., Jiménez, P., Tejero, J., Basterrechea, J. E., Córdoba, D., y Girbés, T. Efecto del calor sobre la sensibilidad a pepsina de las lectinas de los frutos del saúco enano (*Sambucus ebulus* L). II Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria (ACOFESAL). Madrid, 19-21 junio de 2013.

Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S.C., Walz, T. (2004). Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex, *Cell.* 116 (565–576).

Cho, J.Y., Park, S.C., Kim, T.W., Kim, K.S., Song, J.C., Kim, S.K., Lee, H.M., Sung, H.J., Park, H.J., Song, Y.B., Yoo, E.S., Lee, C.H., Rhee, M.H. (2006). Radicals scavenging and anti-inflammatory activity of extracts from *Opuntia humifusa* Raf. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 113-119.

Cítores, L., De Benito, F.M., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Argüeso, P., Jiménez, P., Méndez, E., Girbés, T. (1998) Presence of polymerized and free forms of the non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein ebulin and a structurally-related new heterodimeric lectin in fruits of *Sambucus ebulus* L. *Planta.* 204, 310-317.

Cítores, L., De Benito, F.M., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Argüeso, P., Jiménez, P., Testera, A., Camafeita, E., Méndez, E., Girbés, T. (1997) Characterization of a new non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein and a structurally-related lectin from rhizomes of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 43(4), 485-99.

Cítores, L., Ferreras, J.M., Muñoz, R., Benítez, J., Jiménez, P; Girbés T. (2002). Targeting cancer cells with transferrin conjugates containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins nigrin b or ebulin l. *Cancer Lett.* 184(1), 29-35.

Corrado, P.D., Bovi, R., Ciliento, L., Gaudio, A., Di Maro, S., Aceto, M., Lorito, R., Rao. (2005). Inducible expression of a *Phytolacca heterotepala* ribosome-inactivating protein leads to enhanced resistance against major fungal pathogens in tobacco. *Phytopathology*. 95 (2), 206–215.

Daniels, T.R., Bernabeu, E., Rodríguez, J.A., Patel, S., Kozman, M., Chiappetta, D.A., Holler, E., Ljubimova, J.Y, Helguera, G., Penichet, M.L. (2012). The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1820(3), 291-317.

Davis, P.H. (1965–1988). *Flora of Turkey and the east Aegean islands*. (F. Turk).

De Benito, F.M., Cítores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Soriano, F. (1995). Ebulitins: A new family of type 1 ribosome-inactivating proteins (rRNAN-glycosidases) from leaves of *Sambucus ebulus* L. that coexist with the type 2 ribosome-inactivating protein ebulin 1. *FEBS Lett*. 360(3), 299-302.

Ding, M., Feng, R., Wang, S.Y., Bowman, L., Lu, Y., Qian, Y., Castranova, V., Jiang, B.H., Shi, X. (2006). Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J Biol Chem*. 281(25). 17359-68.

Duke, J.A., Vinson, J., Lord, J.M (2002). *CRC Handbook of medicinal herbs*.

Ebrahimzadeh MA, Mahmoudi M, Karami M, Saeedi S, Ahmadi AH, Salimi E. (2007). Separation of active and toxic portions in *Sambucus ebulus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(22):4171-4173.

Ebrahimzadeh, M.A., Mahmoudi, M., Salimi, E. (2006). Antiinflammatory activity of *Sambucus ebulus* hexane extracts. *Fitoterapia*. 77(2), 146-148).

Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M. (2009). Antioxidant activities of methanol extract of *Sambucus ebulus* L. flower. *Pak J Biol Sci*. 12(5), 447-50.

Endo, Y., Tsurugi, K. (1987). RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosome *Sambucus*. *J Biol Chem*. 262(17), 8128-8130.

Endo, Y., Wool, I.G. (1982). The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the alpha-sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. *J Biol Chem.* 257, 9054-9060.

Fando, J.L., Alaba, I., Escarmis, C., Fernandez-Luna, J.L., Mendez, E., Salinas, M. (1985). The mode of action of restrictocin and mitogillin on eukaryotic ribosomes. Inhibition of brain protein synthesis, cleavage and sequence of the ribosomal RNA fragment. *Eur J Biochem.* 149, 29-34.

Ferreras, J.M., Citores, L., Iglesias, R., Jiménez, P., Girbés, T. (2011). Use of ribosome-inactivating proteins from sambucus for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. *Toxins (Basel).* 3(5), 420-41.

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* (1), 27-31.

Folkman, J. (1996). Cáncer y suministro sanguíneo. *Investigación y ciencia.* N° 242.

Font-Quer, P. (1999). *Plantas Medicinales: El Dioscorides Renovado.* Península, Barcelona.

Förster-Waldl, E., Marchetti, M., Schöll, I., Focke, M., Radauer, C., Kinaciyan, T., Nentwich, I., Jäger, S., Schmid, E.R., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., Jensen-Jarolim, E. (2003). Type I allergy to elderberry (*Sambucus nigra*) is elicited by a 33.2 kDa allergen with significant homology to ribosomal inactivating proteins. *Clin Exp Allergy.* 33(12), 1703-1710.

Ghannadi, A.R., Ghassemi-Dehkordi, N. (1997). Pharmacognostical Investigations on *Sambucus ebulus L.* and *Sambucus nigra L.* *Daru.* 7(1), 55.

Girbés T. (2009). Mecanismos de acción de las lectinas antinutrientes con actividad antirribosómica ricina, volkensina, nigrina y ebulina y aplicaciones terapéuticas de nigrina y ebulina. *Tesis doctoral.* Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Girbés, T., Citores, L., Ferreras, J.M., Rojo, M.A., Iglesias, R., Muñoz, R., Arias, F.J., Calonge, M., García, J.R., Méndez, E.(1993a) Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-

inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra* L. *Plant Mol Biol.* 22, 1181-1186.

Girbés, T., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Muñoz, R., Rojo, M.A., Arias, F.J., García, J.R., Méndez, E., Calonge, M. (1993b) Ebulin 1, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from *Sambucus ebulus* L. leaves. *J Biol Chem.* 268, 18195-18199.

Girbés, T., De Torre, C., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Méndez, E. (1996) RIP for viruses. *Nature.* 379, 777-778.

Girbés, T., Ferreras, J.M., Arias, F.J., Stirpe, F. (2004). Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini-Rev Med Chem.* 4, 461-476.

Girbés, T., Jiménez, P. (2010). *Cuaderno de Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición.* Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

Girbés, T., Jiménez, P. (2012). Nutrición y envejecimiento. *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid.* 49, 32-43.

Girbés T., Vazquez D., Modolell J. (1976). Polypeptide-chain elongation promoted by guanyl-5'-yl imidodiphosphate. *European Journal of Biochemistry.* 67, 257-265.

Girbés T., Vázquez D., Modolell J. (1977). Detection of guanosine-nucleotide.elongation-factor-G complexes produced during the decay of guanosine-nucleotide.elongation-factor-G. Ribosome complexes. *Eur J Biochem.* 81(3), 473-81

Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. (1996). Characterization of red radish anthocyanins. *J. Food Sci.* 61, 322-326.

Griffiths, G.D. (2011). Understanding ricin from a defensive viewpoint. *Toxins (Basel).* 3, 1373-1392.

Guarrera, P.M. (1999). Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J. Ethnopharmacol.* 68(1-3), 183-192.

Halliwell, B., Aeschbach R., Lölliger J., Aruoma OI. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol.* 33(7), 601-17.

Hanahan, D., Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 86(3), 353-64.

Hernanz, D., Recamales, A. F., Melendez-Martinez, A. J., Gonzalez-Miret, M. L., Heredia, F. J. (2007). Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in two different soilless systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(5), 1846–1852.

Higuchi, M., Kawada, T., Iwai, K. (1989). In vivo binding of the winged bean basic lectin labeled with iodo [2-14C] acetic acid to the intestinal epithelial cells of the rat. *J Nutr*. 119(3), 490-5.

Jain, R.K. (1994) Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci. Am*. 271(1), 58-65.

Jensen, S.R., Nielsen, B.J. (1973). Cyanogenic glucosides in *Sambucus nigra* L. *Acta. Chem. Scand*. 27, 2661-2662.

Jiménez, P., Gayoso, M., Tejero, J., Cabrero, P., Córdoba, Díaz D., Basterrechea, J.E., Girbés, T. (2013a). Toxicity in mice of lectin ebulin f present in dwarf elderberry (*Sambucus Ebulus* L.). *Toxicon*. 61, 26-29.

Jiménez, P., Córdoba Díaz, D., Córdoba Díaz, M., Aracil, M., Girbés, T. (2012a). Las toxinas Shiga de *Escherichia coli* y su convergencia enzimática con ricina, ebulina y nigrina (I). *Industria farmacéutica*. 171, 70-75.

Jiménez, P., Córdoba Díaz, D., Córdoba Díaz, M., Aracil, M., Girbés, T. (2012b). Las toxinas Shiga de *Escherichia coli* y su convergencia enzimática con ricina, ebulina y nigrina (y II). *Industria farmacéutica*. 173, 76-82.

Jiménez, P., Tejero, J., Cabrero, P., Córdoba-Díaz, D., Girbés, T. (2013b). Differential sensitivity of D-galactose-binding lectin from fruits of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) to a simulated gastric fluid. *Food Chem*. 136(2), 794-802

Kaack, K., Fretté, X. C., Christensen, L. P., Landbo, A.-K., Meyer, A. S. (2008). Selection of elderberry genotypes best suited for the preparation of juice. *European Food Research and Technology*. 226, 843–855.

Kaczanowska, M., Rydén-Aulin, M. (2007) Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71, 477-494.

Kalb, V.F. Jr., Bernlohr, R.W. (1977). A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal Biochem.* 82(2), 362-371.

Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., Yankova, T. (2006). Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytother Res.* (11), 961-965).

Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H., & Torronen, A. R. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 55(4), 1612–1619.

Korman, M.G., Bolin, T.D., Engelmann, J.I., Pianko S. (1997). Sucralfate as an alternative to bismuth in quadruple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter.* 2, 140-143.

Kosar, M., Karkas, E., Paydas, S., Husnu, K., Baser, C. (2004). Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 52(6). 1586–1589.

Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259). 680-685.

Lázaro Bello, J.A. 2002. *Nuevas citas para la flora vallisoletana II.* 187.

Lopes da Silva, F., Escribano-Bailon, M. T., Perez Alonso, J. J., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C. (2004). Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT – Food Science and Technology.* 40(2), 374–382.

López-Otín, C., Barber, D., Fernández-Luna, J.L., Soriano, F., Méndez, E. (1984). The primary structure of the cytotoxin restrictocin. *Eur J Biochem.* 143, 621-634.

Lord, J.M., Roberts, L.M., Robertus, J.D. (1994). Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.* 8, 201-208.

Määttä-Riihinen, K.R., Kamal-Eldin, A., Mattila, P.H., González-Paramás, A. M., Törrönen, A.R. (2004). Distribution and contents of phenolic

compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(14), 4477–4486.

Martin, L., Jacomet, S., Thiebault, S. (2008). Plant economy during the Neolithic in a mountain context: the case of “Le Chenet des Pierres” in the French Alps (Bozel-Savoie, France). *Veget Hist Archaeobot*. 17 (Suppl 1), S113–S122.

Mates, J.M., Perez-Gomez, C., Nunez de Castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem*. 32, 595-603.

Medina, I., Gallardo, J.M., Gonzalez, M.J., Lois, S., Hedges, N. (2007). Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *J. Agric. Food Chem*. 55, 3889-3895.

Modolell, J., Girbés, T., Vázquez, D. (1975). Ribosomal translocation promoted by guanylylimido-diphosphate and guanylyl-methylene diphosphonate. *FEBS Letters*. 60,109-113.

Morlon-Guyot, J., Helmy, M., Lombard-Frasca, S., Pignol, D., Piéroni, G., Beaumelle, B. (2003). Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. *J Biol Chem*. 278, 17006-17011.

Muñoz, R, Arias, Y., Ferreras, J.M., Jiménez, P., Langa, C., Rojo, M.A., Gayoso, M.J., Córdoba-Díaz, D., Bernabéu, C., Girbés, T. (2013). In vitro and in vivo effects of an anti-mouse endoglin (CD105)-immunotoxin on the early stages of mouse B16MEL4A5 melanoma tumours. *Cancer Immunol Immunother*. 62(3), 541-51.

Muñoz, R., Arias Y., Ferreras J.M., Rojo M.A., Gayoso M.J., Nocito M., Benitez J., Jiménez P., Bernabéu C. y Girbés T. (2007). Targeting a marker of the tumour neovasculature using a novel anti-human CD105-immunotoxin containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b. *Cancer Lett*. 256(1), 73-80.

Muñoz, R., Arias, Y., Ferreras, J.M., Rojo, A., Jiménez, P., Girbés, T. (2001). Sensitivity of several cancer cell lines to ricin and the novel type 2 ribosome- inactivating protein nigrin b. *Cancer Lett*. 167, 163-169.

Nielsen, K., Boston, R. (2001). Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 52, 785-816.

Olsnes, S. (2004). The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*; 44, 361-370.

Olsnes, S., Pihl A.C (1982). In: Cohen, P., Van Heyningen, S. Editors. *Molecular Action of Toxins and Viruses*. 51-105.

Pascal, J.M., Day, P.J., Monzingo, A.F., Ernst, S.R., Robertus, J.D., Iglesias, R., Pérez, Y., Ferreras, J.M., Citores, L., Girbés T. (2001). 2.8-A crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin 1. *Proteins*. 43, 319-326.

Peumans, W.J., Van Damme, E.J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*. 109(2), 347-52.

Pribela, A., Durcanska, J., Piry, J., Karovicova, J. (1992). Volatile substances of dwarf elder *Sambucus ebulus* L. fruits. *Biología. (Bratislava)* 47(3), 225-230.

Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53 (10), 4290-4302

Puri, M., Kaur, I., Perugini, M.A., Gupta, R.C. (2012). Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. *Drug Discov Today*. 17(13-14), 774-83

Rechinger KH. (1963). *Flora iránica*. (F. Iran).

Rhee, M.H., Park, H.J., Cho, J.Y. (2009). *Salicornia herbacea*: Botanical, chemical and pharmacological review of halophyte marsh plant. *J. Med. Plants Res.* 3(8), 548-555.

Rojo, M.A., Citores, L., Arias, F.J., Ferreras, J.M., Jiménez, P., Girbés, T. (2003). Molecular cloning of a cDNA coding for the D-galactose-binding dimeric lectin of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) leaves. *Int J Biochem Cell Biol.* 35, 1061-1065.

Rottoli, M., Castiglioni, E. (2009). Prehistory of plant growing and collecting in northern Italy, based on seed remains from the early Neolithic and Chalcolithic (c.5600-2100 cal BC). *Vegetation History and Archaeobotany*. 18, 91-103.

Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F.C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Mol Nutr Food Res.* 51(12), 1461-71.

Saeedi Saravi, S.S., Shokrzadeh, M. (2008). Histopathological and biochemical disorders following administration of *Sambucus ebulus* extract on mice and rats and preventive effects of vitamins C and E on renal and hepatic disorders. *Phcog Mag.* 5, 131-5

Saeedi Saravi, S.S., Shokrzadeh, M. (2009a). Anti-inflammatory, toxic effects, biochemical and pathological analysis in presence or lack of vitamins C and E, and cytotoxicity of n-hexane, methanolic and ethyl acetate extracts of *Sambucus ebulus*. *Toxicol. Lett.* 189S, 166-167.

Saeedi Saravi, S.S., Shokrzadeh M. (2009b). Histopathological and Biochemical Disorders Following Administration of *Sambucus ebulus* Extract on Mice and Rats and Preventive Effects of Vitamins C and E on Renal and Hepatic Disorders. *Phcog. Mag.* 5, 131-135.

Schwaiger, S., Zeller, I., Pölzelbauer, P., Frotschnig, S., Laufer, G., Messner, B., Pieri, V., Stuppner, H., Bernhard, D. (2011). Identification and pharmacological characterization of the anti-inflammatory principal of the leaves of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). *J. Ethnopharmacol.* 133 (2), 704-709

Seabra, I.J., Braga, M.E. M., Batista, M.T., de Sousa H.C. (2010). Effect of solvent (CO₂/ethanol/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. *The Journal of Supercritical Fluids.* 54(2), 145–152.

Seeram, P., Lee, R., Scheuller, S., Heber, D. (2006). Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionisation mass spectroscopy. *Food Chemistry.* 97(1), 1–11.

Shokrzadeh, M., S. Saeedi Saravi. (2010). The chemistry, pharmacology and clinical properties of *Sambucus ebulus*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research.* Vol. 4(2), 095-103, 18.

Singh, M., Mugler, K., Hailoo, D.W., Burke, S., Nemesure, B., Torkko, K., Shroyer, K.R. (2011). Differential expression of transferrin receptor (TfR) in a spectrum of normal to malignant breast tissues: implications for *in situ* and invasive carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 19, 417-423.

Singleton, V.L; Rossi J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (3) 144-158.

Skupien, K., Oszmianski, J. (2004). Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *European Food Research and Technology.* 219, 66-70.

Spiegel, P.C., Ermolenko, D.N, Noller, H.F. (2007). Elongation factor G stabilizes the hybrid-state conformation of the 70S ribosome. *RNA.* 13, 1473-1482.

Stirpe, F., Battelli, M.G. (2006). Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Mol Life Sci.* 63, 1850-1866.

Stirpe, F. (2013). Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. *Toxicon.* 1, 67:12-6

Süntar, I.P., Akkol, E.K., Yalçın, F.N., Koca, U., Keleş, H., Yesilada, E.. (2010). Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. *J Ethnopharmacol.* 4,129 (1):106-14.

Svinth, M., Steighardt, J., Hernandez, R., Suh, J.K., Kelly, C., Day, P., Lord, M., Girbes, T., Robertus, J.D. (1998). Differences in cytotoxicity of native and engineered RIPs can be used to assess their ability to reach the cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun.* 249, 637-642.

Terry, L. A., Chope, G. A., Giné Bordonaba, J. (2007). Effect of water deficit irrigation and inoculation with *Botrytis cinerea* on strawberry (*Fragaria ananassa*) fruit quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 55(26), 10812–10819.

Tulipani, S., Mezzetti, B., Capocasa, F., Bompadre, S., Beekwilder, J., De Vos, C. H. R., et al. (2008). Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56(3), 696–704.

Tutin, T.G. (1964-1980). *Flora europaea.* (F. Eur). Tuzlaci, E., Tolon E. (2000). Turkish folk medicinal plants, part III: Sile (Istanbul). *Fitoterapia.* 71, 673-685.

Vanaclocha, B., Cañigueral, S. (2003). *Fitoterapia, Vademécum de Prescripción*, 4ª edición. Barcelona. Masson.

Van Damme, E.J., Barre, A., Rougé, P., Van Leuven, F., Peumans, W.J. (1996). Characterization and molecular cloning of Sambucus nigra agglutinin V (nigrin b), a GalNAc-specific type-2 ribosome-inactivating protein from the bark of elderberry (Sambucus nigra). *Eur J Biochem*; 237(2), 505-513.

Wang, S. Y., Zheng, W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(10), 4977–4982.

Wang, S.Y., Bunce, J.A., Maas, J.L. (2003a). Elevated carbon dioxide increases contents of antioxidant compounds in field grown strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(15), 4315–4320.

Wang, S.Y., Lin, H.S. (2003b). Compost as a soil supplement increases the level of antioxidant compounds and oxygen radical absorbance capacity in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(23), 6844–6850.

Wilson, D.N., Nierhaus, K.H. (2006) The E-site story: the importance of maintaining two tRNAs on the ribosome during protein synthesis. *Cellular and Molecular Life Science*. 63, 2725-37.

Wiseman, S.A., Balentine, D.A., Frei, B. (1997). Antioxidants in tea. *Crit.Rev. Food. Sci. Nutr.* 37, 705-718.

Wu, X., Gu, L., Prior, R.L., McKay, S. (2004). Characterization of anthocyanins and procyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia and Sambucus and their antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 7846– 7856.

Yesilada E. (1995). Evaluation of the anti-inflammatory activity of the Turkish medicinal plant *Sambucus ebulus*. *Chem. Nat. Comp.* 33(5), 539-540.

Yesilada, E., Gurbuz, I., Shibata, H. (1999). Screening of Turkish antiulcerogenic folk remedies for anti-Helicobacter pylori activity. *J. Ethnopharmacol.* 66, 289-293.

Youngman, E.M., Green, R. (2007). Ribosomal translocation: LepA does it backwards. *Curr Biol.* 17R, 136-139.