

**ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Sambucus nigra* (SAUCO)**

Estudiante

ANGIE SALAZAR SÁNCHEZ

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

FACULTAD DE EDUCACIÓN

PROGRAMA DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA Y EDUCACIÓN AMBIENTAL

ARMENIA- QUINDÍO

Septiembre 2019

**ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Sambucus nigra* (SAUCO)**

Estudiante

ANGIE SALAZAR SÁNCHEZ

Director del proyecto

NELSY LOANGO CHAMORRO PhD.

Docente del programa de Biología, Universidad del Quindío.

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

FACULTAD DE EDUCACIÓN

PROGRAMA DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA Y EDUCACIÓN AMBIENTAL

ARMENIA- QUINDÍO

Septiembre 2019

DEDICATORIA

A mis amados padres Rubiela y Duván por su dedicación, amor y cuidados para conmigo, por sus esfuerzos incansables por hacer de sus hijas personas con el privilegio de haber tenido una educación superior.

A la maravillosa compañera de vida que he tenido, mi hermana Yazmin y a mi sobrino Juan Esteban quien con sus hermosas sonrisas nos alegra la vida.

AGRADECIMIENTOS

Ofrezco sincero y afectuoso agradecimiento a Nelsy Loango Chamorro por su apoyo y acompañamiento durante todo este tiempo. A Luis Hernando Hurtado Tobón, Mónica Vivian Moncada Restrepo, Juan Camilo Guerrero Ospina, David Andrés García Rodríguez, Johan Alexander Villada Ramos y Alejandra Ramírez López, por su colaboración en las distintas fases que conformaron este proceso.

Al Grupo de Investigaciones en Ciencias Básicas y Educación (GICBE) de la Universidad del Quindío por el financiamiento de este proyecto y a todas las personas que me animaron durante su ejecución.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	2
INDICE DE TABLAS.....	4
INDICE DE FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
MARCO TEÓRICO.....	11
Especie Vegetal A Estudiar.....	11
Clasificación taxonómica.....	11
Generalidades.....	11
Morfología.....	12
Reproducción y fenología.....	12
Etnobotánica.....	14
Composición Química.....	14
Microorganismos Utilizados Para Determinar Actividad Antimicrobiana.....	15
<i>Escherichia coli</i>	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	16
<i>Candida albicans</i>	16
Metabolitos En Las Plantas.....	17
Terpenos.....	19
Compuestos fenólicos.....	19
Glicósidos.....	20
Alcaloides.....	21
Determinación De La Capacidad Antioxidante.....	22
Captación de radicales DPPH.....	23
ANTECEDENTES.....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	28

OBJETIVOS.....	29
General.....	29
Específicos	29
METODOLOGÍA.....	30
Materiales	30
Material vegetal.....	30
Material biológico.	30
Métodos	31
Obtención del extracto.	31
Caracterización fitoquímica preliminar.....	31
Actividad antimicrobiana.	34
Determinación de la capacidad antioxidante.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
Análisis Fitoquímico	36
Capacidad Antioxidante.....	38
Actividad Biológica.....	40
<i>Staphylococcus aureus.</i>	40
<i>Escherichia coli.</i>	41
<i>Candida albicans</i>	43
CONCLUSIONES.....	45
RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXOS	56
Anexo 1.....	56
Anexo 2.....	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cualitativos para la evaluación de los metabolitos secundarios.....	31
Tabla 2. Pruebas colorimétricas utilizadas para caracterización fitoquímica preliminar. ...	32
Tabla 3. Eluyentes usados para caracterización fitoquímica mediante cromatografía en capa fina.....	33
Tabla 4. Patrones y reveladores utilizados en cromatografía en capa fina para detección de metabolitos secundarios.....	33
Tabla 5. Metabolitos secundarios detectados en el extracto etanólico de <i>Sambucus nigra</i> mediante caracterización fitoquímica preliminar.	36
Tabla 6. Metabolitos secundarios detectados en el extracto etanólico de <i>Sambucus nigra</i> mediante cromatografía en capa fina.....	36
Tabla 7. Porcentaje de captación de radicales 2,2 difenil-1-picrílhidrazil (DPPH) del extracto etanólico de hojas de <i>Sambucus nigra</i>	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Sambucus nigra</i> . (a) vista general, (b) detalles de las hojas, (c) detalles de la inflorescencia, (d) detalles de la corteza.....	13
Figura 2. Esquema general de la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios en plantas. Tomado de (Leyva, Navarro-Tovar, Loredó & Santos-Díaz, 2011).....	22
Figura 3. Placas cromatográficas. De izquierda a derecha: Alcaloides, Flavonoides, Terpenoides, Fenoles y Esteroides; (E) extracto, (C) control.....	37
Figura 4. Curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> sometido a tres concentraciones del extracto etanólico de <i>Sambucus nigra</i> , cloranfenicol (control +) y sin estos (control -).	40
Figura 5. Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> sometido a tres concentraciones del extracto etanólico de <i>Sambucus nigra</i> , cloranfenicol (control +) y sin estos (control -).....	42
Figura 6. Curva de crecimiento de <i>Candida albicans</i> sometido a tres concentraciones del extracto etanólico de <i>Sambucus nigra</i> , ketoconazol (control +) y sin estos (control -).	43

RESUMEN

Actualmente se ha incrementado el interés por parte de la medicina en encontrar medicamentos más eficientes y con menos efectos secundarios adversos para el tratamiento de diversas enfermedades. Este interés por ofrecer una mejor calidad en medicamentos conlleva al estudio de alternativas para tratar las enfermedades, en las que se incluye el uso de plantas, las cuales, virtualmente, son ricas en compuestos biológicamente activos. Los estudios han demostrado que los productos naturales o bien estructuras derivadas de productos naturales desempeñan un papel muy importante en el descubrimiento de fármacos (Newman & Cragg, 2012). Para el desarrollo de medicamentos son necesarios estudios enfocados en la identificación de dichos compuestos biológicamente activos que, al ser aislados, purificados y si se determina su actividad biológica, pueden utilizarse en la medicina. Por lo anterior, el presente estudio estuvo orientado a determinar metabolitos secundarios en el extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra* (Sauco), la capacidad de captación del radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. El material vegetal fue colectado en la vereda Planadas de Calarcá, Quindío, Colombia. La obtención de extracto se realizó mediante lixiviación con etanol al 96%. En la caracterización fitoquímica preliminar se evidenció la presencia de glucósidos, fenoles, flavonoides, taninos y alcaloides, además la ausencia de saponinas y esteroides. La cromatografía en capa fina confirmó la presencia de fenoles, flavonoides y alcaloides y la ausencia de terpenoides y esteroides. La capacidad de captación del radical DPPH que presentó el extracto fue del 64,8% respecto al control positivo. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas de

Sambucus nigra para *Candida albicans* fue de 500 µg/mL.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, metabolitos secundarios, *Sambucus nigra*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Nowadays, there is an increasing interest on the side of medicine in finding more efficient medicines with fewer adverse side effects for the treatment of various illnesses. This interest in offering better quality medicines leads to the study of alternatives for treating diseases, including the use of plants, which are virtually rich in biologically active compounds. Studies have shown that natural products or structures derived from natural products play a very important role in drug discovery (Newman et al., 2012). The development of medicines requires studies focused on the identification of these biologically active compounds which, when isolated, purified and if their biological activity is determined, can be used in medicine. Therefore, the present research was oriented to determine the secondary metabolites, the capacity of captation of the radical 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* in the ethanolic extract of *Sambucus nigra* (Elder) leaves. The plant material was collected in Planadas village of Calarcá, Quindío, Colombia. The extract was obtained by leaching with 96% ethanol. Regarding the preliminary phytochemical characterization, the presence of glycosides, phenols, flavonoids, tannins and alkaloids was evidenced, as well as the absence of saponins and steroids. The uptake capacity of the DPPH radical presented in the extract was 64.8% with regard to the positive control. The minimum inhibitory concentration (MIC) of *Sambucus nigra* leaves ethanolic extract for *Candida albicans* was 500 µg/mL.

INTRODUCCIÓN

La utilización empírica de las plantas como agentes de la salud es ampliamente conocida en múltiples culturas del mundo. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, tamizado por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos que buscan los principios activos para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permiten además la vigencia de su empleo (Muñoz, Montes & Wilkomirsky, 2001, p. 15).

En la antigüedad, si bien los humanos sabían que algunas plantas tienen efectos sobre el cuerpo, en ese momento no pudieron dar explicación a ello, es así como atribuyeron dicho poder a fuerzas sobrenaturales (Salamon & Grulova, 2015). Actualmente se conoce que las plantas producen y almacenan una gran cantidad de sustancias químicas denominadas metabolitos secundarios, estos se caracterizan por ser la fuente de compuestos biológicamente activos, es decir, que tienen algún efecto sobre la materia viva. La composición, concentración y localización de estos varía de acuerdo con la especie o la fuente donde fueron aislados. Muchos de estos compuestos pueden ser inducidos por la acción de microorganismos, insectos o herbívoros que afectan el desarrollo normal de la planta (Waller, Meow-Chang & Fujii, 2001). Cuando estos metabolitos secundarios son aislados, purificados e identificados, y su actividad biológica es probada, pueden utilizarse en la medicina moderna.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016), una de las problemáticas actuales a nivel mundial en el ámbito de la salud es la resistencia de microorganismos a tratamientos antibacterianos. Esto, debido a la capacidad mutagénica y de transferencia

genética que poseen y al mal uso de tratamientos antibióticos comerciales. Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno (ERO) que pueden ser oxidantes y fácilmente convertidas en radicales, son capaces de reaccionar con una amplia gama de estructuras celulares y alterarlas. Tales estructuras pueden ser ácidos grasos insaturados de las membranas fosfolipídicas, proteínas y ácidos nucleicos, los cuales son fundamentales en el funcionamiento de toda célula (García & Adonis, 2002). Para el manejo de dichas problemáticas se ha considerado al reino vegetal como un gran banco de sustancias químicas potenciales y en su gran mayoría inexploradas.

Sambucus nigra es una planta arbustiva ampliamente utilizada en medicina tradicional por sus propiedades terapéuticas identificadas: diurética, antipirética, antiséptica, cicatrizante, antiinflamatoria y contra problemas respiratorios (Fonnegra & Jiménez, 2007; Grajales, Botero & Ramírez, 2015). Sin embargo, es necesario el aumento de contribuciones al conocimiento científico sobre esta planta, de esta manera se podrá obtener beneficios para el mantenimiento de la salud en animales y humanos. Por lo anterior, se tuvo como objetivo en el presente estudio determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* y además determinar su capacidad antioxidante.

MARCO TEÓRICO

Especie Vegetal A Estudiar

Clasificación taxonómica.

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Dipsacales
Familia	Adoxaceae
Genero	Sambucus
Epíteto específico	nigra
Autor	C. V. Linné

Generalidades.

Sambucus nigra o comúnmente conocido como sauco, es una planta originaria de terrenos húmedos de Europa central y meridional, África del norte y la parte occidental de Asia (Berdonces, 2009). Fue introducido por los españoles al nuevo mundo donde se encuentra aclimatado a varios países, está distribuido desde México y Costa Rica hasta Argentina; en Colombia se distribuye en los departamentos de Boyacá, Caldas, Putumayo, Quindío, Antioquia, Cauca, Cundinamarca, Valle del Cauca, Nariño, Amazonas y Huila en altitudes que varían entre 1.400 y 3000 m s.n.m. (Díaz, 2003; Alzate, Idarraga, Díaz & Rodríguez, 2013).

El nombre del género *Sambucus* proviene del griego sambuca, nombre dado antiguamente a un instrumento musical muy utilizado por los Romanos y fabricado con la madera de

Sambucus nigra. El epíteto *nigra* hace referencia al color negro de sus frutos maduros (Fonnegra & Jiménez, 2007).

Morfología.

El sauco es un arbusto de hoja perenne que puede llegar a medir de 4 a 6 m de altura, posee tronco irregular de color gris blanquecino, ramas opuestas, corteza rugosa y lenticelada, hojas opuestas, compuestas, e imparipinnadas, con cinco a siete folíolos ovado-lanceolados, con borde aserrado, ápice agudo y de color verde oscuro. Las flores son blanco amarillentas, con una corola de cinco pétalos obtusos agrupados en cimas voluminosas que despiden un aroma suave, pero no del todo agradable. Los frutos son drupas de color púrpura oscuro dispuestos en manojos colgantes con tres semillas y una pulpa jugosa comestible (Berdonces, 2009), son pequeños y esféricos, miden de 5 a 6 mm de diámetro (Sanjinés, Ollgaard & Balslev, 2006). Las semillas miden 2 mm de largo por 1 mm de ancho, son duras y amarillentas (Flórez et al., 2010).

Reproducción y fenología.

Sambucus nigra presenta hermafroditismo sexual y polinización entomófila (Grajales et al., 2015). Su reproducción puede ser sexual mediante semillas o asexual mediante propagación por estacas; la primera forma de reproducción es complicada por condiciones complejas de letargo de las cubiertas y del embrión (Sánchez et al., 2010). Por otro lado, la reproducción asexual, la cual se lleva a cabo con mayor facilidad es aquella que se realiza a partir de partes de una planta, utilizando los tejidos vegetales que conservan la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular para generar nuevos tallos y raíces a partir de

cúmulos celulares presentes en diversos órganos (Vázquez, Orozco, Rojas, Sánchez & Cervantes, 1997).

Los rebrotes de Sauco salen a los 20 o 30 días después de sembrada, necesita de mucho riego y luz solar, crece rápido y prefiere los suelos húmedos y semihúmedos, aunque soporta suelos arcillosos (Flórez et al., 2010), se adapta muy bien en zonas de bosques húmedos, resiste a heladas de 15 a 20°C y rangos de precipitación medios de 2000 a 4000 mm por año (Grajales et al., 2015).

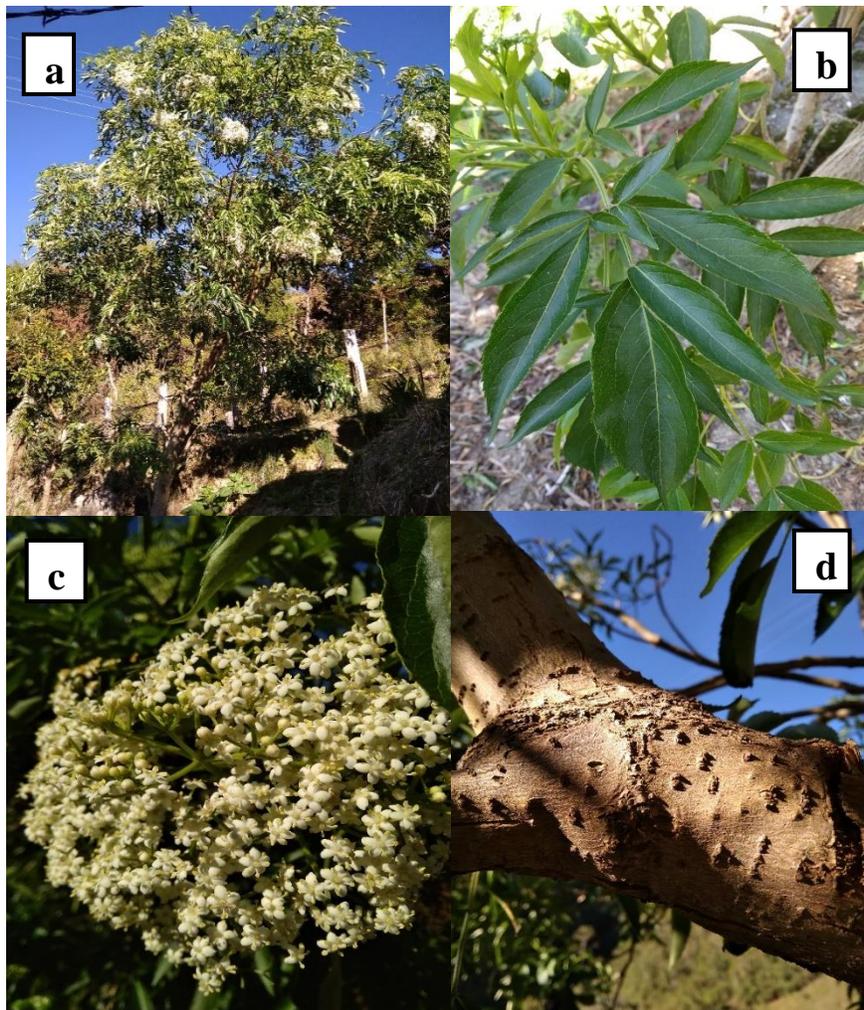


Figura 1. *Sambucus nigra*. (a) vista general, (b) detalles de las hojas, (c) detalles de la inflorescencia, (d) detalles de la corteza.

Etnobotánica.

El sauco se ha cultivado generalmente como planta alimenticia, ornamental y medicinal. Con las flores y los frutos frescos y maduros se elaboran mermeladas, jarabes, tés y vinos, además buñuelos y otros productos horneados (Mathé, 2013). Es importante saber que los frutos deben ser consumidos en estado de madurez avanzada, ya que estados previos o demasiado verdes originan toxicidad. Las semillas producen indigestión a pesar de la madurez del fruto, razón por la cual no se debe exagerar en el consumo directo del fruto fresco (Sánchez et al., 2010). Las hojas son insecticidas y frotadas sobre la piel repelen las moscas. Las formas de uso medicinal recomendadas son decocción e infusión. Se usa como diaforético, diurético, béquico, laxante, calmante, purgante, expectorante, antiinflamatorio, antiespasmódico, emoliente, emético entre otros. Además, para lavar hematomas, contusiones, torceduras, eczemas y otras alteraciones de la piel como heridas, quemaduras, escaldaduras, forúnculos y hemorroides (Fonnegra & Jiménez, 2007). También se usa para tratar el estreñimiento, la conjuntivitis, los resfriados, los nervios, ayuda a curar infecciones de la garganta y alivia el dolor de cabeza leve (Mathé, 2013; Fonnegra & Jiménez, 2007).

Composición Química.

Las flores de sauco contienen flavonoides (rutina, isoquercitrina, kaempferol), aceite esencial, mucílagos, ácidos fenilcarboxílicos (caféico, clorogénico, p-cumarínico), trazas de sambunigrina, ácidos terpénicos (ursólico, oleanólico) y fitosteroles. Los frutos tienen antocianósidos (sambucina, sambucianina), trazas de aceite esencial; flavonoides (rutina, isoquercitrina, hiperóxido), taninos, azúcares reductores, pectina, ácido cítrico, ácido málico y vitamina C. Las semillas contienen sambunigrina y prunasina (Fonnegra & Jiménez, 2007). Las hojas contienen alcaloides (sambucina), glucósidos cianogénicos

(sambunigrina), aldehídos glicólicos, caroteno y vitamina C. La corteza fresca contiene alcaloides (sambucina); triterpenos, colina, aceite esencial, ácido viburnico y sambunigrina (Berdonces, 2009).

Microorganismos Utilizados Para Determinar Actividad Antimicrobiana

Escherichia coli.

Es una bacteria gramnegativa, en forma de bacilo, con cápsula y flagelo, es anaerobia facultativa con un tipo de metabolismo que es tanto fermentativo como respiratorio. *E. coli* es un miembro de la familia Enterobacteriaceae (Torres, Arenas & Martínez, 2010), fisiológicamente es versátil y bien adaptada a las características de sus hábitats (Wiwanitkit, 2011). Puede crecer en presencia o ausencia de O₂; podrá crecer por medio de respiración anaeróbica o de fermentación, produciendo una mezcla de ácidos y gas como productos finales. La bacteria además, puede crecer en medios con glucosa como el único constituyente orgánico (Rivas, Mellor, Gobus & Fegan, 2015).

Las cepas de *E. coli* son un importante habitante del intestino grueso, son parte de la microbiota esencial que mantiene la fisiología del hospedador saludable. Se encuentran ampliamente distribuidas en el intestino de humanos, en una amplia variedad de animales e incluso en plantas (Donnenberg, 2013). Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no se consideran patógenas, pueden llegar a ser patógenos que causan infecciones en hospedadores inmunocomprometidos (Riveros & Ochoa, 2015; Rodríguez & Ángeles, 2002; Torres et al., 2010; Rivas et al., 2015).

Staphylococcus aureus.

Actualmente, el género *Staphylococcus* comprende más de 50 especies. Estas pequeñas y resistentes bacterias son habitantes normales de la piel y las membranas mucosas en muchas especies de animales incluyendo los humanos (Grace & Fetsch, 2018). Las bacterias de este género son cocos (bacterias de forma esférica) grampositivas de 0,5 a 1,5 µm de diámetro, que se agrupan de forma irregular, son inmóviles, anaerobias facultativas, no forman esporas y generalmente no poseen cápsula. La principal característica que diferencia a *S. aureus* de las demás especies del género es la producción de la enzima coagulasa que permite a la bacteria coagular el plasma. Se considera que *S. aureus* es la especie más importante de todo el género en patología infecciosa en humanos (De Cueto & Pascual, 2009).

Candida albicans.

Es una levadura grampositiva, sin cápsula, de paredes delgadas, de forma ovalada a redonda con un conjunto de cromosomas diploides. Se multiplica por gemación lateral, posee hifas septadas pero también puede aparecer en forma de levadura, esta capacidad del hongo se conoce como dimorfismo (Salomon, Felk & Schäfer, 2004).

Esta especie es la responsable del 70 al 80% de las candidiasis. Aparece como saprofito colonizando la orofaringe hasta en un 50% de la población y la mucosa vaginal hasta en un 25% de mujeres asintomáticas (Palacio, Mollet & Gracia-Patos, 2006). *C albicans* también se encuentra en al menos 58 especies de animales, incluyendo primates, mamíferos domésticos y silvestres y aves (Berger, 2018).

Los microorganismos anteriormente descritos se utilizaron en el presente estudio debido a que pueden representar implicaciones clínicamente severas en pacientes sanos e inmunocomprometidos (Rivas et al., 2015). Esto se ve favorecido debido a que son de fácil diseminación por encontrarse típicamente en la piel, en las uñas y las mucosas (boca, nariz) para el caso de *S. aureus* y *C. albicans* (Grace & Fetsch, 2018; Palacio et al., 2006) y en el tracto digestivo para el caso de *E. coli*. Dichos microorganismos pueden infectar órganos y causar enfermedad sistémica que puede concluir en la muerte (Del campo Castro, Chaidez, Carrasco & Valdez, 2004). Según Sánchez et al (2008) y Tacconelli & Magrini (2017) microorganismos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* son resistentes a varios tipos de antibióticos, razón por la cual es importante y necesaria la investigación con respecto a estos, puesto que se debe ejercer un control sobre ellos para el mantenimiento de la salud humana y en animales.

Metabolitos En Las Plantas

El metabolismo se constituye del conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células: aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos o también llamados en su conjunto metabolitos primarios, se encuentran siempre presentes y desempeñando las mismas funciones puesto que son necesarias para el funcionamiento celular y el de los organismos. Las plantas destinan también una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos vitales como la fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, transporte de solutos, síntesis de proteínas,

carbohidratos o lípidos y que se denominan metabolitos secundarios o productos naturales (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Los metabolitos secundarios difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todas esas moléculas se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos & Pérez-Urria, 2009, p. 119). La síntesis de estas sustancias químicas depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos solo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico (Sepúlveda, Porta, & Rocha, 2003). Algunos metabolitos secundarios tienen funciones ecológicas específicas, muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción debido a que atraen insectos polinizadores, o animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta manera a la dispersión de semillas. Otros intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, o confiriendo función protectora frente a predadores, proporcionando a la planta sabores amargos y haciéndolas venenosas (Ávalos & Pérez-Urria, 2009, p. 120).

Para clasificar los metabolitos secundarios se han utilizado criterios como la estructura química, el origen biogénico, la acción biológica y la actividad farmacológica. Según su estructura se agrupan en cuatro clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides.

Terpenos.

Los terpenos o terpenoides constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios, suelen ser insolubles en agua y derivan de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de carbono). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno que contienen en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos. La ruta biosintética (Fig 2) de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, entre otras (Ávalos & Pérez-Urria, 2009, p. 125).

Compuestos fenólicos.

Las plantas sintetizan una gran variedad de sustancias que reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, una estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como las quinonas fenólicas, cumarinas, lignanos, estilbenos, ligninas, taninos y flavonoides (Azcón & Talón, 2000).

Según Shahidi & Naczki, (2004) los fenoles tienen acción como antibióticos, pesticidas naturales, agentes protectores de rayos UV y aislantes en las paredes celulares. Este grupo

de sustancias químicas ha generado gran interés debido a sus propiedades antioxidantes, su participación en procesos sensoriales de los alimentos naturales y procesados, además de sus posibles aplicaciones benéficas para la salud humana, tales como el tratamiento y prevención del cancer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio (citado en Porras et al., 2009, p. 122).

Glicósidos.

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Las **saponinas** se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenoides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar, por ejemplo), en cuyo caso se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas. Los **glicósidos cardiacos** o cardenólidos son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glicósidos o de agliconas. Quizá el más conocido sea la digitoxina, o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como medicamento en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva. Los **glicósidos cianogénicos** son compuestos nitrogenados que tienen un papel protector en algunas especies frente a herbívoros. Estos no son tóxicos por sí mismos, pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando

sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN). El cianuro de hidrógeno es una toxina de acción rápida que inhibe metaloproteínas como la citocromo oxidasa, enzima clave en la respiración mitocondrial (Ávalos & Pérez-Urria, 2009, p. 137).

Alcaloides.

Los alcaloides son moléculas orgánicas de carácter básico más o menos complejas que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhiben actividad biológica. Se sintetizan de aminoácidos o de sus derivados inmediatos y son sustancias con cierta toxicidad, preferentemente activas sobre el sistema nervioso central (Azcón & Talón, 2000).

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos, por lo anterior, son de gran interés para la industria farmacológica (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

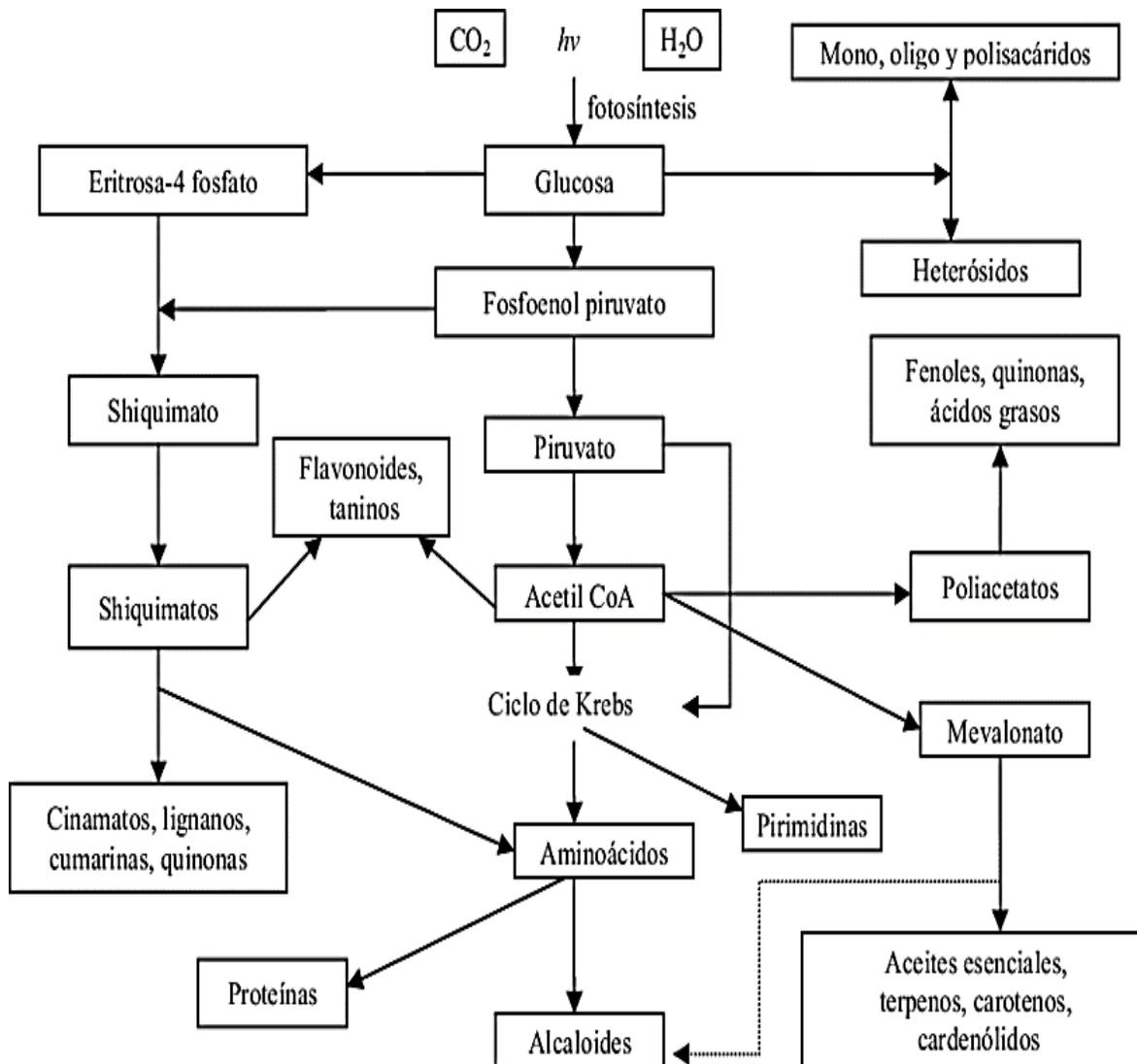


Figura 2. Esquema general de la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios en plantas. Tomado de (Leyva, Navarro-Tovar, Loredó & Santos-Díaz, 2011).

Determinación De La Capacidad Antioxidante

Los antioxidantes naturales presentes en las plantas han cobrado gran interés en las últimas dos décadas puesto que el estrés oxidativo (un desbalance entre las sustancias oxidantes y prooxidantes) está implicado en un gran número de afecciones de la salud. Se ha demostrado que el daño oxidativo causado por los radicales libres está relacionado con una

amplia gama de enfermedades y desordenes incluyendo: fallo cardíaco, inflamaciones, cataratas, entre otros (Youngson, 2003). Además, existe la hipótesis de que el daño oxidativo permanente está vinculado al proceso de envejecimiento. Por ello, el suministro de antioxidantes exógenos podría ser una alternativa importante en la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades (Montoya et al., 2003).

Por otro lado, un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones, los cuales son captados por los radicales libres, estos debilitan su acción y a la vez cumplen una función preventiva (Bacallao- García, Rojo, García & Sánchez, 2001).

Captación de radicales DPPH.

El compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta. En este ensayo el radical es reducido por antioxidantes/compuestos reductores a la correspondiente hidracina que es de color amarillo pálido (Magalhães, Costa, Galarda & Cogo, 2001). Dicho cambio de color hace posible el uso de este compuesto para realizar análisis por espectrofotometría en la región del visible. En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción se traduce en una disminución de la concentración de DPPH (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald & Robards, 2002).

Como control positivo para el ensayo de captación de radicales DPPH se utiliza Hidroxitolueno butilado (BHT). Este es un fenol alquilado que se utiliza como antioxidante en alimentos (National organic standards board technical advisory panel, 2002).

ANTECEDENTES

Avancini, Dall'Agnol, Wiest, Haas & Poser, (2008) analizaron el extracto acuoso de 17 especies de plantas, incluyendo *Sambucus nigra* (hojas) contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella choleraesuis*. La actividad antibacteriana fue evaluada mediante técnicas de dilución en serie, los resultados fueron expresados como “Dilución de la bacteria inhibida” y “Dilución de la bacteria inactiva”. Los autores encontraron que el extracto acuoso de *Sambucus nigra* fue efectivo contra ambos microorganismos, para unidades formadoras de colonias de *S. aureus* mostró inhibición de 3.1×10^8 e inactivación de 3.1×10^7 .

Mohammadsadegui, Malekpour, Zahedi, & Eskandari (2013) evaluaron el extracto metanólico de bayas de sauco mediante el método de dilución en agar, en bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas y una levadura. El material vegetal fue colectado en las llanuras y selvas de Malayer y Hamadan en Irán. Las cepas que utilizaron fueron: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Candida albicans*. Para probar la actividad antimicrobiana llevaron a cabo el método utilizado por Collins, Lyne & Grang (1995). Encontraron que el extracto crudo de sauco mostró efectos antimicrobianos en todos los organismos de prueba e inhibió el crecimiento de *B. subtilis*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Samonella typhi* y *Escherichia coli*, sin embargo, resultó más efectivo en la inhibición del crecimiento de *Candida albicans*.

Ramírez-Rueda, Mojica, & Espitia (2015) evaluaron la actividad antibacteriana de extractos metanólicos y diclorometánicos de plantas provenientes del área rural de Soracá Colombia

contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). Como metodología realizaron un estudio experimental en el cual aplicaron 16 tratamientos (extractos) provenientes de 7 plantas, incluyendo Sauco (hojas). *Sambucus nigra* presentó concentración mínima inhibitoria (CMI) sobre SARM de 1,25 mg/mL. Concluyeron que la diversidad de metabolitos en esta planta es suficientemente grande para seguir realizando estudios cuyo objeto sea hallar moléculas con actividad antibacteriana.

Rodríguez, Zarate & Sánchez (2017) analizaron la actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. Evaluaron los extractos crudos etanólicos de *Bauhinia sp*, *Sambucus nigra*, *Eichhornia crassipes* y *Taraxacum officinale* frente a *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* con presencia de KPC, *Providencia rettgeri* con presencia de ESBLs, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* β lisina y *Candida albicans*. Utilizaron el protocolo de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014)*. Los autores emplearon hojas, tallos, flores y bayas de *Sambucus nigra*, encontraron que *S. nigra* fue efectivo para inhibir el crecimiento de *Candida albicans* hasta una concentración de 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y que, dependiendo de la parte de la planta analizada, esta presentaba una inhibición diferente frente a cada patógeno.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Organización Mundial de la Salud (2001) establece que el aumento de la resistencia de microorganismos a tratamientos antibacterianos resulta un problema de salud pública que involucra a todos los países e impacta tanto en el costo de la atención de la salud, como en la pérdida de eficacia de ciertos tratamientos, aumenta el sufrimiento humano, contribuye a la pérdida de productividad y, a menudo, a la mortalidad.

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural. Cada vez que se ha puesto en uso un nuevo agente antimicrobiano en el ámbito clínico, el laboratorio ha detectado cepas de microorganismos resistentes al mismo, es decir, cepas que pueden reproducirse en presencia de concentraciones mayores del fármaco de las que se administra a las personas en dosis terapéuticas. Este tipo de resistencia puede resultar de una característica de toda la especie o presentarse entre cepas de especies que por lo general son sensibles, pero desarrollan resistencia por mutación o transferencia genética. Los genes resistentes codifican varios mecanismos por medio de los cuales los microorganismos pueden resistir los efectos inhibitorios de agentes antimicrobianos específicos. Tales mecanismos también generan resistencia a otros antimicrobianos de la misma clase y, a veces, a muchos compuestos de diferentes clases. La causa principal de la resistencia a antimicrobianos surge de la combinación del uso excesivo que se observa en muchas partes del mundo, especialmente en los casos de infecciones sin importancia, del uso incorrecto por falta de acceso a tratamiento apropiado y de la subutilización debido a la falta de recursos financieros para completar los tratamientos. Aunque es difícil calcular cuantitativamente el impacto total de la resistencia en la salud, hay datos de reciente publicación que señalan que la morbilidad y la mortalidad aumentan cuando se retrasa la

administración de tratamientos eficaces para las infecciones causadas por agentes patógenos resistentes. La prolongación de las enfermedades y la hospitalización de los pacientes con infecciones resistentes, sumados a otros procedimientos y medicamentos que podría ser necesario administrar, conllevan repercusiones económicas (OMS, 2001).

El desconocimiento sobre plantas con alto potencial de actividad biológica resulta en impedimento para la implementación de nuevos y efectivos medicamentos que ejerzan control sobre microorganismos patógenos y ayuden a mejoramiento de la salud humana. Es por ello, que la OMS (2016) ha planteado como estrategia mundial y plan de acción sobre salud pública para contener la resistencia a los antimicrobianos, estimular la investigación para mejorar la comprensión de la problemática, y para el propicio desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Atendiendo a dicha problemática, este estudio se basó en la siguiente pregunta de investigación ¿Posee actividad microbiológica el extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*?

JUSTIFICACIÓN

Desde la antigüedad nuestros antepasados descubrieron que las plantas medicinales representan un valioso recurso para tratar enfermedades (Muñoz, 2002; Russi, Hernandez & López, 2006). El sauco es una planta medicinal de amplia utilización principalmente en el uso tradicional que se le da (Arango, 2004; Grajales et al., 2015), sin embargo, la información de carácter científico sobre esta es aún incompleta. Por dicha razón, el presente estudio: *Análisis fitoquímico preliminar y actividad biológica del extracto etanólico de hojas de Sambucus nigra (sauco)* pretende contribuir al aumento de conocimiento respecto a la actividad antimicrobiana de la planta frente a microorganismos patógenos de importancia clínica como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, y además, aportar al conocimiento sobre la capacidad antioxidante que presenta dicha planta.

OBJETIVOS

General

- Determinar los principales metabolitos secundarios y la actividad biológica del extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra* (Sauco).

Específicos

- Caracterizar mediante el análisis fitoquímico preliminar los metabolitos secundarios del extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra*.
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra*.
- Evaluar la actividad biológica del extracto de *Sambucus nigra* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

METODOLOGÍA

Materiales

Material vegetal.

El material vegetal de hojas de *Sambucus nigra* fue colectado en la vereda Planadas ubicada en el municipio de Calarcá, Quindío, en coordenadas 4° 29' 13'' N y 75° 36' 16'' O, a los 2095 metros sobre el nivel del mar (m s.n.m). Según la Corporación autónoma del Quindío, CRQ (2006), el municipio de Calarcá está situado en el sector oriental del Departamento del Quindío, sobre el flanco occidental de la Cordillera Central con alturas sobre el nivel del mar que varían entre 1.000 m s.n.m. en la confluencia de los ríos Quindío y Barragán para la conformación del río La Vieja y 3.640 m s.n.m. en el Alto del Campanario perteneciente a la vereda El Tunel. El municipio limita al norte con Salento, Quindío, al oriente con Cajamarca, Tolima, al occidente con Armenia y La Tebaida, Quindío, y al sur con Córdoba, Buena Vista, Pijao y Caicedonia, Quindío y Valle.

Para la correcta identificación de la planta y su debido registro, se llevó al herbario de la Universidad del Quindío (HUQ), en donde quedó el montaje con su correspondiente código de ingreso (Anexo 1).

Material biológico.

Para realizar el bioensayo de actividad antimicrobiana se utilizaron los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* ATCC-25922 *Staphylococcus aureus* ATCC-29213 y *Candida albicans* ATCC-28516 proporcionados por el Grupo de Investigaciones en Ciencias Básicas y Educación (GICBE) de la Universidad del Quindío.

Métodos

Obtención del extracto.

Se tomó 100g de material vegetal seco y molido el cual fue sometido durante 72 horas a extracción mediante lixiviación con 500 mL de etanol al 96%. Posteriormente se realizó separación de clorofilas mediante precipitación con una disolución de etanol (96%) – agua destilada en la proporción 1:7 respectivamente, esta se agregó en igual volumen al extracto obtenido, luego se filtró al vacío para separar completamente las clorofilas. El extracto filtrado se concentró en un rotaevaporador a 36° y 70 r.p.m. Finalmente para conservarlo se procedió a secar en cajas de Petri en un horno a 37°C. Luego de estar completamente seco se almacenó en refrigerador.

Caracterización fitoquímica preliminar.

Los ensayos para caracterización fitoquímica se realizarón en el laboratorio de Bioquímica y Genética ubicado en el bloque de Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío. Para realizar la caracterización fitoquímica preliminar se siguió la metodología descrita por Bilbao-Rodríguez (1997). Se realizaron ensayos cualitativos al extracto etanólico crudo para los núcleos fitoquímicos expuestos en la tabla 2. Cada prueba se realizó por triplicado.

Los resultados se expresaron utilizando el Sistema no paramétrico de cruces.

Tabla 1. *Parámetros cualitativos para la evaluación de los metabolitos secundarios.*

INTENSIDAD	SIGNIFICADO
+++	Abundancia del metabolito
++	Presencia del metabolito
+	Escasez del metabolito
-	Ausencia del metabolito

Tabla 2. Pruebas colorimétricas utilizadas para caracterización fitoquímica preliminar.

NÚCLEO FITOQUÍMICO	PRUEBA	RESULTADO POSITIVO
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado marrón
Fenoles	Tricloruro férrico 2%	Verde
Flavonoides	Shinoda	Naranja, rojo, rojo azulado, violeta
Glucósidos	Molish	Anillo violeta
Saponinas	Reacción de la espuma	Abundante espuma que se mantiene
Taninos	Tricloruro férrico al 1%	Azúl, verde
Terpenos-esteroides	Liebermann- Burchard	Azúl, verde azulado, rojo, rosa o violeta

Para caracterización fitoquímica mediante cromatografía en capa fina se utilizó el extracto crudo, como fase estacionaria Silica gel (60HF254) Merck, los eluyentes, reveladores y patrones utilizados se muestran en la tabla 3 y 4 respectivamente. A las bandas obtenidas se les calculó el correspondiente factor de retención (Rf) a través de la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente.}}$$

Tabla 3. *Eluyentes usados para caracterización fitoquímica mediante cromatografía en capa fina.*

NÚCLEO FITOQUÍMICO	ELUYENTE	COMPOSICIÓN (% en volumen)	REFERENCIA
Alcaloides	Cloroformo-metanol	80:20	(Wagner y Bladt S, 2001)
Flavonoides	Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético- Agua	100:11:11:26	(Wagner y Bladt S, 2001)
Terpenoides	Éter isopropílico- Acetona	19:1	(Rodríguez- Bilbao, 1997)
Fenoles	Butanol-Ácido acético- agua	4:1:5	(Dueñas, Naranjo y Araujo, 2009)
Esteroides	Benceno-Cloroformo	9:1	(Rodríguez- Bilbao, 1997)

Tabla 4. *Patrones y reveladores utilizados en cromatografía en capa fina para detección de metabolitos secundarios.*

NÚCLEO FITOQUÍMICO	REVELADOR	PATRÓN
Alcaloides	R. Dragendorff	Quinina
Flavonoides	R. Tricloruro férrico	Catequina
Terpenoides	R. Vainillina ácido ortofosfórico	Alcanfor
Fenoles	R. Tricloruro férrico	Ácido tánico
Esteroides	R. Liebermann Burchard	Colesterol

Determinación de la capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante del extracto fue determinada mediante captación del radical libre estable 2,2- difenil-1-picrilhidracil (DPPH) aplicando la metodología descrita por Gunjan et al, (2009). Para este ensayo se prepararon las concentraciones: 100µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL y 1,56 µg/mL de extracto crudo en metanol. A 1 mL de estas soluciones se adicionó 0,5ml de DPPH al 0,2mM en metanol y se mezclaron. La mezcla se incubó a 25°C durante 40 minutos en oscuridad y se procedió a leer la absorbancia a 517nm. Como blanco se utilizó metanol y como control positivo Hidroxitolueno butilado (BHT) en metanol a las mismas concentraciones del extracto. El control negativo fue 0,5 mL de solución DPPH más 1mL de metanol. El ensayo se realizó por triplicado.

Los resultados se analizaron de acuerdo al porcentaje de captación de radicales DPPH, este se calculó con base en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de captación de radicales DPPH} = \frac{(A_c - A)}{A_c} \times 100$$

Donde:

A_c: es la absorbancia del control negativo

A: es la absorbancia de la muestra (con extracto o con BHT)

Actividad antimicrobiana.

El bioensayo se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biomédicas “Manuel Elkin Patarroyo” de la Universidad del Quindío.

Para la activación de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se utilizó Agar Nutritivo, y para *Candida albicans* Sabouraud Dextrosa. Posteriormente se sembraron en Caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI) se dejaron incubando a 37°C en agitación constante durante 12 h. Las diluciones del extracto crudo (500 µg/mL, 125 µg/mL y 31,25 µg/mL) y los antibióticos ketoconazol y cloranfenicol (500 µg/mL) se prepararon con Dimetil sulfóxido (DMSO) al 50% diluido en agua destilada. Para el ensayo se utilizó el método de microdilución en placa basado en la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se utilizó BHI como blanco, cultivo de cada uno de los microorganismos como control negativo, cultivo con antibiótico como control positivo para inhibición y resazurina como agente REDOX que permitió realizar el seguimiento de los microorganismos metabólicamente activos. El ensayo se realizó por triplicado. Finalmente se leyó a 600nm en Epoch cada 20 minutos.

Los resultados se procesaron en el programa Statgraphics centurion mediante un análisis de varianza multifactorial para relacionar la variable dependiente (comportamiento del microorganismo) con dos o mas factores, en este caso tiempo y concentración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Fitoquímico

Los núcleos fitoquímicos encontrados en el extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra* mediante caracterización fitoquímica preliminar basada en pruebas colorimétricas se presentan en la tabla 5. Así mismo, los núcleos detectados en cromatografía en capa fina con sus respectivos factor de retención (Rf) se pueden visualizar en la tabla 6.

Tabla 5. Metabolitos secundarios detectados en el extracto etanólico de *Sambucus nigra* mediante caracterización fitoquímica preliminar.

NÚCLEO FITOQUÍMICO	RESULTADO	REACCIÓN
Glucósidos	+++	Formación anillo violeta
Terpenos-esteroides	-	No se presentó reacción
Fenoles	+++	Coloración verde
Flavonoides	++	Coloración naranja
Taninos	++	Coloración verdosa
Saponinas	-	Ausencia de espuma abundante
Alcaloides	++	Precipitado marrón

Convenciones: (+++) abundante; (++) presente; (+) escaso; (-) ausente.

En orden abundante se hallaron glucósidos y fenoles, también se encontraron presentes flavonoides, taninos y alcaloides y como núcleos ausentes saponinas y esteroides.

Tabla 6. Metabolitos secundarios detectados en el extracto etanólico de *Sambucus nigra* mediante cromatografía en capa fina.

NÚCLEO FITOQUÍMICO	RESULTADO	Rf
Alcaloides	++	0.03 - 0.98
Flavonoides	++	0.4
Fenoles	++	0.83
Terpenoides	-	Np
Esteroides	-	Np

Convenciones: (+++) abundante; (++) presente; (+) escaso; (-) ausente. Np (no presenta)

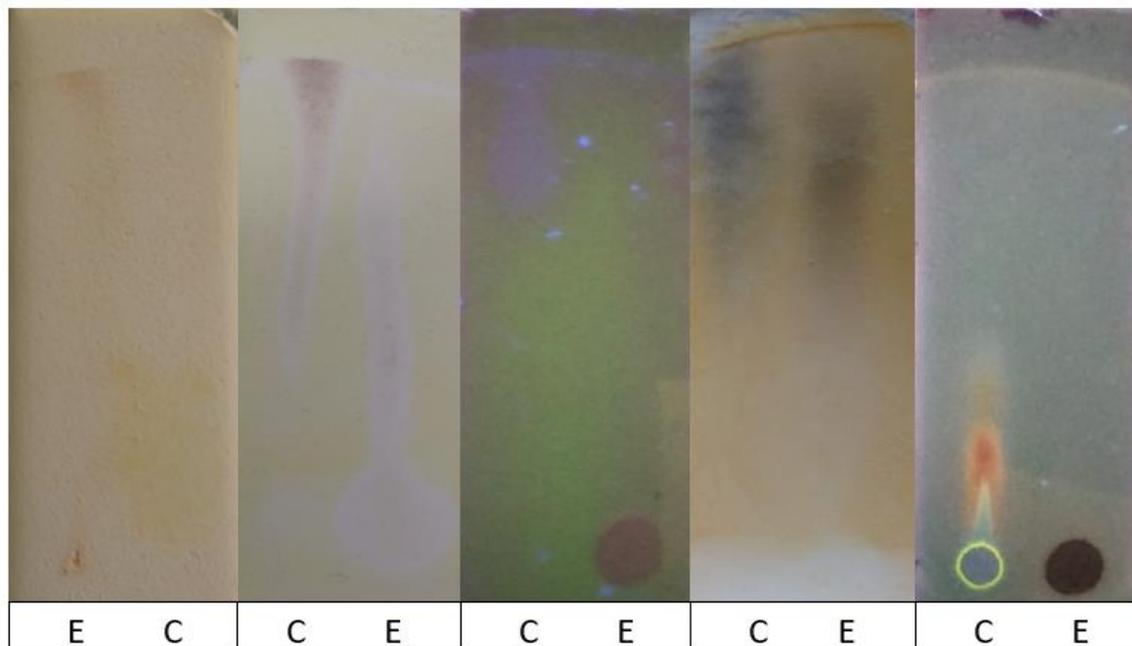


Figura 3. Placas cromatográficas. De izquierda a derecha: Alcaloides, Flavonoides, Terpenoides, Fenoles y Esteroides; (E) extracto, (C) control.

Como se observa en la figura 3, luego de revelar la placa para alcaloides se destacaron 2 puntos con Rf 0,03 y 0,97 de abajo hacia arriba respectivamente. Lo anterior sugiere que el extracto puede contener alcaloides con distinta polaridad. En el revelado para flavonoides se observó una banda que posee un Rf de 0,4. Así mismo, en la placa para fenoles se evidenció una banda cerca del control con un Rf de 0,83. Finalmente, luego del respectivo revelado para terpenoides y esteroides, se observó que la muestra quedó en el punto de aplicación, sugiriendo la ausencia de este tipo de compuestos en el extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra*.

Los estudios reportados en la literatura sobre composición química para las hojas de sauco son pocos, sin embargo, los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Rodríguez et al, (2017) en la detección de compuestos como flavonoides y alcaloides para

la misma parte de la planta y el mismo tipo de extracto, sin embargo, difieren en la detección de saponinas y fenoles. Respecto a lo anterior, es importante recordar que la composición, concentración y localización de los metabolitos en las plantas, puede verse influenciada por las condiciones ambientales que les rodean. Según Root (1967) estas variaciones pueden actuar confiriendo un alto grado de protección contra factores adversos, como son las temperaturas extremas, la sequia, los parasitos y los hervivoros (citado en Valares, 2011).

Según DellaGreca, Fiorentino, Monaco, Previtiera, & Simonet (2000) el sauco contiene glicósidos cianogénicos como sambunigrina, esta sustancia se encuentra en mayor cantidad en sus hojas. Senica, Stampar, Veberic y Mikulic-Petkovsek (2016) hallaron que el contenido de sambunigrina en el sauco cambia dependiendo de la altitud creciente. El mayor contenido de sambunigrina fue grabado en una colina (1048 y 1077 m s.n.m.) que tenía menor temperatura y presentaba mayor radiación solar en comparación con otras altitudes.

Otras sustancias halladas en las hojas de *Sambucus nigra* según Basas-Jaumandreu & De las Heras, (2019) son Mandelonitrilo como el aleloquímico mas abundante, ésteres metílicos de ácidos grasos, ésteres n-alquilo de ácido valérico, ésteres fenil metil, ésteres fenil etil y benzoatos n- alquil, sustancias no descritas previamente para esta planta.

Capacidad Antioxidante

Según los porcentajes arrojados (Tabla 7) el extracto etanolico de hojas de *Sambucus nigra* a una concentración de 100 µg/mL presenta un 64,8% de capacidad para captar el radical

DPPH con respecto al control positivo y teniendo este como la máxima capacidad de captación manejada en este ensayo. Este resultado se considera significativo puesto que el porcentaje de captación que presentó la planta supera el 50%.

Tabla 7. Porcentaje de captación de radicales 2,2 difenil-1-picrílhidrazil (DPPH) del extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra*

CONCENTRACIÓN (µg/ml)	EXTRACTO (%)	CONTROL POSITIVO (%)
100	61,6	95,1
50	45,7	93,6
25	36,7	89,5
12,25	21,2	82,8
6,25	13,4	23,3
1,56	5,4	8,9

Akhtar, Haq & Mirza (2015) después de evaluar la actividad antioxidante de 61 especies de plantas medicinales concluyeron que dentro de las plantas que demuestran actividades antioxidantes notablemente altas se encuentra *Sambucus nigra* (hojas), las cuales recomiendan para la extracción de compuestos antioxidantes para uso medicinal y comercial.

Los compuestos fenólicos, específicamente los ácidos fenólicos y flavonoides son reconocidos como poseedores de actividad antioxidante (Sepúlveda et al., 2003); por lo tanto, es probable que estos metabolitos sean los que contribuyan a las propiedades antioxidantes del extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra*.

Actividad Biológica

Staphylococcus aureus.

Al analizar la representación gráfica (Fig 4) se observó que todas las concentraciones del extracto influyen en el crecimiento del microorganismo debido a que se encuentran por

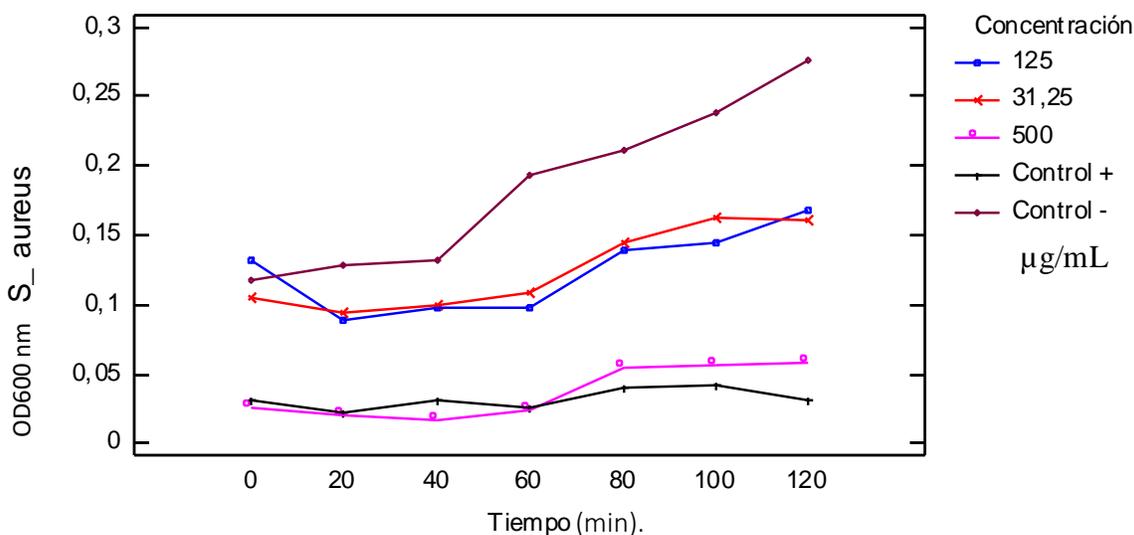


Figura 4. Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* sometido a tres concentraciones del extracto etanólico de *Sambucus nigra*, cloranfenicol a 500 µg/mL (control +) y sin estos (control -).

debajo de la absorbancia marcada para el control negativo (crecimiento normal de la bacteria). Sin embargo, se observó que las concentraciones 31,25 µg/mL y 125 µg/mL tienen menor influencia que la concentración 500 µg/mL, la cual se comporta a la par del control positivo el cual presentaba la misma concentración. La concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Sambucus nigra* contra *Staphylococcus aureus* no se determinó en este trabajo puesto que, al finalizar el tiempo establecido para el ensayo, el comportamiento del microorganismo se percibió estable.

En el análisis de varianza (Anexo 2) los factores concentración y tiempo arrojaron resultados estadísticamente significativos, esto debido a sus valores $P= 0,00001$ para

ambos. A nivel de interacción entre el comportamiento de *Staphylococcus aureus* y los factores tiempo y concentración el resultado también fué estadísticamente significativo, presentando un valor $P= 0,0013$. Esto se traduce en que el crecimiento del microorganismo se vió influenciado por el tiempo que duró el ensayo, y las concentraciones del extracto a las que fué sometido.

Al comparar los resultados con los reportados por (Ramírez-Rueda et al., 2015) los cuales obtuvieron dos tipos de extracto de hojas de *Sambucus nigra* (metanólico, y diclorometánico) y a los cuales evaluaron la actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* mediante el método de microdilución se encontró que el extracto metanólico no generó inhibición en la bacteria, por su parte el extracto diclorometanico inhibió el crecimiento del microorganismo en las concentraciones de 10mg/ml, 5mg/ml, 2,5 mg/ml y 1,25 mg/mL, las cuales representan concentraciones demasiado altas en contraste con las utilizadas en este trabajo.

Para estudiar mejor el comportamiento de *Staphylococcus aureus* frente al extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra* se sugiere evaluar por mas tiempo/concentración dicho ensayo, debido a los resultados arrojados con la mayor concentración durante los últimos 40 minutos.

Escherichia coli.

Al analizar la representación gráfica (Fig 5) se observó que todas las concentraciones del extracto influyen en el crecimiento del microorganismo debido a que se encuentran por debajo de la absorbancia marcada para el control negativo (crecimiento normal de la bacteria). Sin embargo, la concentración 31,25 $\mu\text{g/mL}$ no muestra un efecto considerable a

diferencia de la concentración 500 $\mu\text{g/mL}$ que se comporta de manera similar al control positivo. La concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Sambucus nigra* contra *Escherichia coli* no se determinó en este trabajo puesto que, al finalizar el tiempo establecido para el ensayo, el crecimiento del microorganismo sometido a la mayor concentración tiende a aumentar.

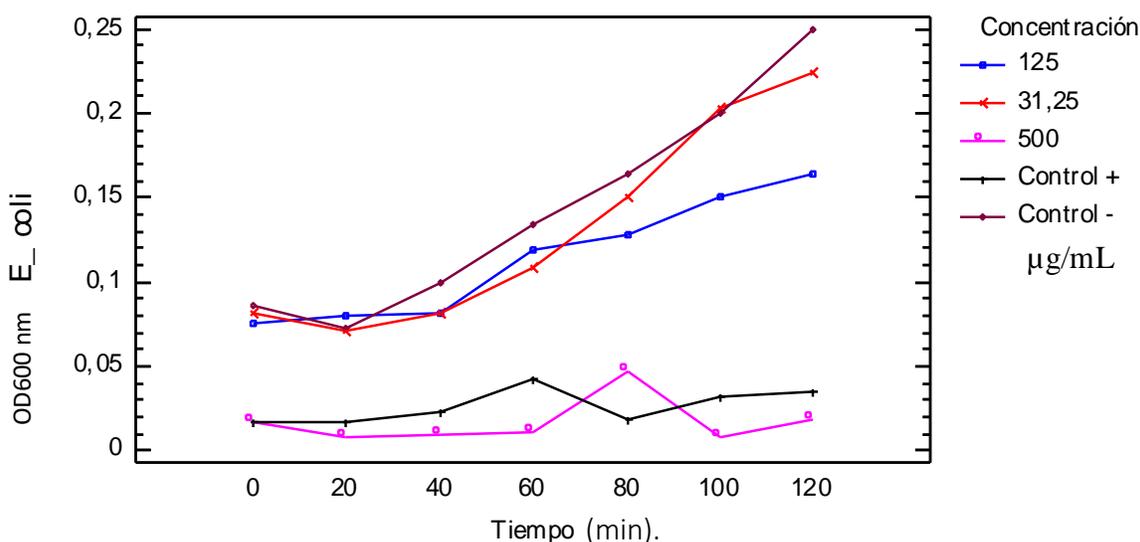


Figura 5. Curva de crecimiento de *Escherichia coli* sometido a tres concentraciones del extracto etanólico de *Sambucus nigra*, cloranfenicol a 500 $\mu\text{g/mL}$ (control +) y sin estos (control -).

En el análisis de varianza (Anexo 2) los factores tiempo y concentración y la interacción entre el comportamiento de *Escherichia coli* y los factores ya mencionados arrojaron resultados estadísticamente significativos, esto debido a sus valores $P= 0,00001$ para los tres. De igual manera que en el anterior microorganismo, las concentraciones del extracto etanólico de *Sambucus nigra* y el tiempo que abarcó el ensayo influyeron en el crecimiento de *Escherichia coli*.

Los resultados hallados para *E. coli*, son similares a los reportados por Rodríguez et al., (2017) puesto que el extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra* que evaluaron no fue

efectivo contra la bacteria debido a que presentó un halo de inhibición de 9 mm a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (la mas alta evaluada). Para estudiar mejor el comportamiento de *E. coli*, frente al extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra*, se recomienda realizar el ensayo por mas tiempo del determinado en este trabajo, y además evaluar la actividad a una concetración mayor.

Candida albicans.

Al analizar la representación gráfica (Fig 6) se observó que todas las concentraciones del extracto influyen en el crecimiento del microorganismo debido a que se encuentran por debajo de la absorbancia marcada para el control negativo (crecimiento normal de la bacteria). Sin embargo, la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tiene una fuerte influencia en el crecimiento del microorganismo con respecto al control positivo. La concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Sambucus nigra* contra *Candida albicans* se determinó en este trabajo, debido a que a la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuye drásticamente el crecimiento del microorganismo.

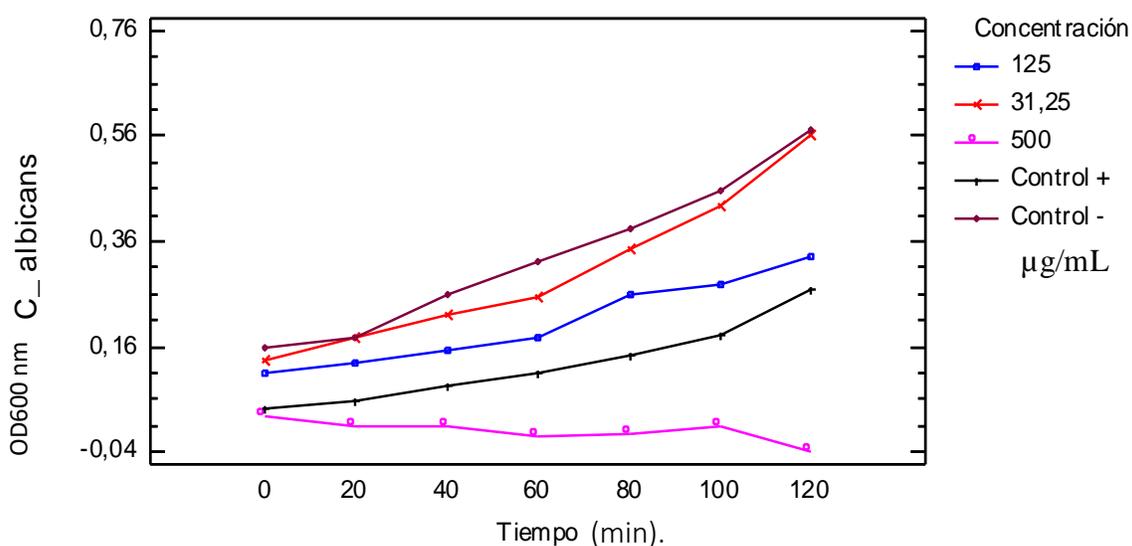


Figura 6. Curva de crecimiento de *Candida albicans* sometido a tres concentraciones del extracto etanólico de *Sambucus nigra*, ketoconazol a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (control +) y sin estos (control -).

En el análisis de varianza (Anexo 2) los factores tiempo y concentración y la interacción entre el comportamiento de *Candida albicans* y los factores ya mencionados, los resultados fueron estadísticamente significativos, presentando al igual que en *Escherichia coli* valores $P= 0,00001$ para los tres. De igual forma que en los dos microorganismos anteriores, el crecimiento de *C. albicans* se vió influenciado por los factores trabajados.

Estudios realizados demuestran que metabolitos tales como terpenoides, alcaloides, flavonoides, taninos, y otros compuestos de naturaleza fenólica son responsables de las actividades antimicrobianas en plantas superiores (Pandey, 2007; Mahomoodally, Gurib-Fakim & Subratty, 2005).

Los flavonoides por tener en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo penetran fácilmente a través de la membrana celular, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos (Puupponen et al., 2001). Estos flavonoides provocan la muerte bacteriana al inhibir la síntesis de ADN o ARN, debido a que tienen una estructura plana similar a la de las bases púricas y pirimídicas; por lo tanto, se pueden intercalar formando puentes de hidrógeno con las bases de la doble hélice y de esta forma las flavonas alteran la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos, impidiendo su adecuada síntesis; además, de provocar errores de lectura durante la transcripción (Cushnie & Lamb, 2005). Así mismo, los taninos incluyen, la posible inhibición de las enzimas microbianas extracelulares (Akiyama, 2001).

CONCLUSIONES

El extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra* contiene metabolitos secundarios como glicósidos, fenoles, flavonoides, taninos y alcaloides.

Los componentes encontrados en las hojas de *Sambucus nigra* poseen una significativa capacidad captadora de radicales DPPH.

Los resultados de actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Sambucus nigra* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* fueron estadísticamente significativos, lo cual se traduce en que el tiempo establecido para el ensayo y las concentraciones a las cuales fueron sometidos los microorganismos influyó en el comportamiento de los mismos.

El extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra* presenta actividad antifúngica similar a la de un antibiótico genérico a una concentración de 500 µg/mL.

RECOMENDACIONES

Realizar al extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra* el debido fraccionamiento para discernir sobre la presencia de otros metabolitos secundarios.

Evaluar la actividad citotóxica del extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra*, debido a la posible presencia del compuesto sambunigrina.

Encaminar investigaciones dirigidas a la búsqueda del compuesto activo para inhibición de *Candida albicans* para posibles usos en la medicina.

BIBLIOGRAFÍA

- Akhtar, N., Haq, I., & Mirza, B. (2015). Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Akiyama, H., Fuji, K., Yamasaki, O., Oono, T. & Iwatsuki, K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (4): 487-491.
- Alzate, F., Idarraga, A., Díaz, O. & Rodríguez, W. (2013). *Flora de los bosques montanos de Medellín*. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., McDonald, S. & Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*. 127: 183 – 198.
- Arango, S. (2004). *Guía de plantas medicinales de uso común en Salento, Colombia*. Missouri Botanicall Garden Press. U.S.A.
- Ávalos, A. & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*. Serie fisiología vegetal. Vol. 2 (3): 119-145.
- Avancini, C., Wiest, J., Dall' Agnol, R., Schulte, J., & Poser, G. (2008). Antimicrobial Activity of Plants Used in the Prevention and Control of Bovine Mastitis in Southern Brazil. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(6), 894-9.
- Azcón, J. & Talón, M. (2000). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Buenos Aires, Argentina: Editorial McGraw Bogotá.

- Bacallao - García, L., Rojo, D., García, L. & Sánchez E. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista Cubana Investigación Biomédica*. 20: 231-235.
- Basas-Jaumandreu, J., & De las Heras, F. X. (2019). Allelochemicals and esters from leaves and inflorescences of *Sambucus nigra* L. *ELSELVIER*. 107-115.
- Berdonces, J. (2009). *Gran diccionario ilustrado de las plantas medicinales: descripción y aplicaciones*. Barcelona, España: Océano.
- Berger, S. (2018). *Candidiasis: Global Status*. Los ángeles: Gideón Informatics , INC ,USA.
- Bilbao-Rodríguez, M. (1997). Análisis fitoquímico preliminar: química de productos naturales. Universidad del Quindío. Armenia, Colombia.
- Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI). (2014). Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth. Information Supplement, p. 230.
- Collins, C. H., Lyne, P. M. & Grang, J. M. (1995). *Microbiological Methods*. UK: Butterworth,Heinemann.
- Corporación Autónoma Regional del Quindío (CRQ). (2006). La agenda ambiental municipal de calarca, Quindío.
- Cushnie, T. P. & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob Agents*. 26 (5): 343-56.
- De Cueto, M. & Pascual, A. (2009). Microbiología y patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. En A. Pahissa, B. Almirante, J. Arribas, E.

- Cernado, J. Cobo, M. De Cueto, ... Ulldemolins. *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus* (pp. 15-32). Barcelona, España: MARGE BOOKS.
- Del Campo Castro, N., Chaidez, C., Carrasco, W., & Valdez, J. (2004). Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. *Rev Cubana Salud Pública*. (30) 1.
- DellaGreca, M., Fiorentina, A., Monaco, P., Previtera, L. & Simonet, A. M. (2000). Cyanogenic glycosides from *Sambucus nigra*. *Natural Product Letters*, 14, 175-182.
- Díaz, J. A. Informe técnico. Instituto Alexander Von Humboldt (2003). *Caracterización del mercado colombiano de plantas medicinales y aromáticas*. Recuperado de http://repository.humboldt.org.co/bitstream/handle/20.500.11761/32544/informe_tecnico_medicinales.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Donnenberg, M. (Ed.), (2013). *Escherichia coli: pathotypes and principles of pathogenesis* (2 ed.). China: Academic Press.
- Dueñas, J., Naranjo, B. & Araujo, P. (2009). Extracción y caracterización de los principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas a partir de residuos del procesamiento de alcachofas. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/877>
- Flórez, G., Nuñez, O. L., Ramírez, L. F. & Zusunaga, J. A., Núñez, M. M. & Ramírez, M. (2010). *100 plantas útiles del páramo Rabanal: guía para comunidades rurales*. IAVH.

- Fonegra, R., & Jimenez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Colombia: Universidad de Antioquia.
- García, Z. & Adonis, E. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. Vol.21 (3), 178-85.
- Grace, D. & Fetsch, A. (2018). A foodborne pathogen: Epidemiology, Detection, Characterization, Prevention and Control: an overview. En A. Fetsch (Ed.), *Staphylococcus aureus* (pp. 3-8). Academics Press, ELSELVIER.
- Grajales, B., Botero, M. & Ramírez, J. (2015). Características, manejo, usos y beneficios del sauco (*sambucus nigra* L.) con énfasis en su implementación en sistemas silvopastoriles del trópico alto. *Revista de investigación agraria y ambiental*, Vol. 6 (1).
- Gunjan, G., Rajkumar, V., Kumar, R. A. & Mathew, L. (2009). Therapeutic Potential of Polar and Non-Polar Extracts of *Cyanthillium cinereum* In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: 1-11.
- Leyva, E., Navarro-Tovar, G., Loredó, S. & Santos-Díaz, M. (2011). Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides. *Boletín de la Sociedad Química de México*. 78210, 35-43.
- Magalhães, M., Costa, M., Galarda, I. & Cogo I. (2001). Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoaria* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “*in vitro*”. *Revista Visão Acadêmica*. 2: 31-38.

- Mahomoodally, M., Gurib-Fakim, A., Subratty, A. (2005). Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius. *Pharmaceutical Biology*. 43(3): 237-242.
- Mathé, Á. (2013). The versatile elderberry: Research, production and utilization. En A. L. Thomas, D. Charlebois, C. M. Greenlief, P. L. Vincent, K. L. Fritsche, & K. Kaack (Eds.), *The First International Symposium on Elderberry*. Columbia, Missouri, EE UU.: University of Missouri center for Agroforestry.
- Mohammadsadeghi, S., Malekpour, A., Zahedi, S. & Eskandari, F. (2013). The antimicrobial Activity of Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Extrac Against Gram Positive Bacteria, Gram Negative Bacteria and Yeast. *Research Journal of Applied Sciences*, 8(4), 240-243.
- Montoya, B., Lemeshko, V., Lopez, J., Pareja, A., Urrego, R. & Torrez, R. (2003). Actividad antioxidante de algunos extractos vegetales. *Vitae*. 10: 72-79.
- Muñoz, F. (2002). *Plantas medicinales: estudio, cultivo y procesado*. Madrid, España: Ediciones Mundi Prensa.
- Muñoz, O., Montes, M. & Wilkomirsky, T. (2001). Plantas medicinales de uso en Chile: Química y farmacología. Recuperado de https://books.google.com.co/books?id=cuviT1SKao8C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- National organic standards board technical advisory panel. (2002). Butylated Hydroxytoluene (BHT) Crops. Recuperado de

<https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Butylated%20Hydroxytoluene%20TR.pdf>

Newman, D. J., & Cragg G. M. (2012). Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. Maryland, United States. *Journal of Natural Products*, 75: 311–335.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2001). *Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos*. Ginebra, Suiza.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). *Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos*. Recuperado de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf;jsessionid=1E4BAEF2C79174B394F7C261C3333816?sequence=1>

Palacio, L., Mollet, J. & García-Patos, V. (2006). Candidiasis de mucosas. Candidiasis en inmunodeprimidos. En J. Vilata , *Micosis cutáneas*. Buenos aires, Madrid: Editorial Médica Panamericana.

Pandey, A. (2007). Anti-staphylococcal activity of a pan-tropical aggressive and obnoxious weed *Parihenium hysterophorus*: an *in vitro* study. *National Academy Science Letters*. 30(11-12): 383-386.

Porras, A. & López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, Vol. 3 (1), 121-124.

Puupponen, P. R.; Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia,, A. & Oksman-Caldentey, K. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*. 90 (4): 494-507.

- Ramírez-Rueda, R. Y., Mojica, D. N. & Espitia, M. (2015). Actividad antibacteriana de extractos de plantas provenientes del área rural de Soracá contra *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM). *Ciencia y Salud Virtual*, 7(1), 4-12.
- Rivas, L., Mellor, G. E., Gobus, K. & Fegan, N. (2015). *Detection and typing strategies for pathogenic Escherichia coli: Springer briefs in food, health, and nutrition*. Springer.
- Riveros, M. & Ochoa, T. (2015). Enteropatógenos de importancia en salud pública. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*, Vol. 32 (1), 157- 64.
- Rodríguez, C. N., Zarate, A. G. & Sánchez, L. C. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *NOVA*, 15(27), 119-129.
- Rodríguez, G. & Angeles, M. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, Vol. 44 (5), 464-475.
- Root, R. B. (1967). The niche exploitation pattern of the blue-grey gnatcatcher. *Ecological Monographs*, 37: 317-350.
- Russi, G., Hernández, N., & López, R. (2006). Manual uso y manejo de plantas aromáticas y medicinales en diferentes procesos productivos (Tesis especialización). Instituto Técnico Agrícola Guadalajara de Buga.
- Salamon, I. & Grulova, D. (2015). Elderberry (*Sambucus nigra*): from natural medicine in ancient times to protection against witches in the middle age –A brief historical overview. *Act Hort*. DOI: 1087.17660/ActaHortic.2015.1061.2

- Salomon, S., Felk, A. & Schäfer, W. (2004). Genomics of *Candida albicans*. En D. Arora, & G. Khachatourians (Eds.), *Fungal genomics: Applied Micology and Biotechnology* (Vol. 4). Elsevier.
- Sánchez, J. M., Guillán, C., Fuster, C., López, R., González, M., Raya, C., & García, J. (2008). Evolución de la resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* en muestras de orina procedentes de la comunidad. *Arch. Esp. Urol.*, 61, 7. 776-780.
- Sánchez, L., Amado, G., Criollo, P., Carvajal, T., Roa, J., Cuesta, A., Conde, A., Umana, A., Bernal, L. & Barreto, L. (2010). El Sauco (*Sambucus nigra* L) como alternativa silvopastoril en el manejo sostenible de praderas en el trópico alto colombiano. Colombia. CORPOICA.
- Sanjinés, A., Ollgaard, B., & Balslev, H. (2006). Frutos comestibles. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 329-346.
- Senica, M., Stampar, F., Veberic, R. & Mikulic- Petkovsek, M. (2016). The higher the better? Differences in phenolics and cyanogenic glycosides in *Sambucus nigra* leaves, flowers and berries from different altitudes. *Journal of the science of food and agriculture*. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8085>
- Sepúlveda, G., Porta, H. & Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21: 355-363
- Shahidi, F. & Naczki, M. (2004). Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press. Londres. 1-16.

- Tacconelli, E., & Magrini, N. (2017). Mundial priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: World Health Organization; 1-7.
- Torres, A., Arenas, M. & Martínez, Y. (2010). Overview of *Escherichia coli*. En A. Torres (Ed.), *Pathogenic Escherichia coli in Latin America* (pp. 1-7). Bentham Science Publishers.
- Valares, C. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debido al genotipo y al ambiente*. (tesis doctoral). Universidad de Extremadura.
- Vázquez, C., Orozco, A., Rojas, M., Sánchez, M. E., Cervantes, V. (1997). La propagación vegetativa. En Fondo de cultura económica. La reproducción de las plantas: semillas y meristemos. México.
- Wagner, H. & Bladt, S. (2001). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2 ed. Springer.
- Waller, G. R., Meow- Chang, F. & Fujii, Y. (2001). Análisis bioquímico de los metabolitos secundarios de plantas, microorganismos y suelo. En Anaya, A. L., Espinosa-Gracia, F., Cruz-Ortega, R. (eds.), *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. (pp. 163- 230). México: Plaza y Valdéz.
- Wiwanitkit, V. (2011). *Escherichia coli infections*. Recuperado de https://books.google.com.co/books?id=1gd5746uaDAC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Youngson R. (2003). *Antioxidantes y Radicales Libres*. Editorial Edaf, S.A. Madrid. España, 171.

ANEXOS

Anexo 1. Carta confirmación de depósito de material vegetal al Herbario de la Universidad del Quindío (HUQ).



Armenia, 23 de septiembre de 2019

Doctora
Nelsy Loango Chamorro
Universidad del Quindío
Armenia

ASUNTO: Depósito de Material Vegetal

Cordial Saludo,

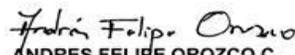
Comedidamente me permito informarle que se depositó en el Herbario Universidad del Quindío (HUQ), la muestra vegetal que se relaciona a continuación producto de la investigación titulada Análisis fitoquímico y actividad biológica del extracto etanólico de hojas de *Sambucus nigra* (sauco), la cual ingreso a la colección bajo la siguiente información:

Nombre científico:	<i>Sambucus nigra</i>
Familia:	Adoxaceae
Código Ingreso HUQ:	038726
Código Barras:	032443
No.	002

Agradezco su atención.

Atentamente,


GERMÁN DARIO GÓMEZ MARÍN
Director
Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad (CIBUQ).


ANDRÉS FELIPE OROZCO C.
Curador Herbario HUQ.

PERTINENTE CREATIVA INTEGRADORA
Carrera 13 Calle 12 Norte Tel: (57) 6 7 35 9300 Armenia, Quindío - Colombia

www.uniquindio.edu.co

Anexo 2. Análisis de varianza multifactorial (ANOVA)

Análisis de varianza para *Staphylococcus aureus*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>Valor P</i>
PRINCIPALES EFECTOS					
A:Concentración	0,360153	4	0,0900383	142,00	0,00001
B:Tiempo	0,0679009	6	0,0113168	17,85	0,00001
INTERACCIONES					
AB	0,038705	24	0,00161271	2,54	0,0013
RESIDUAL	0,044384	70	0,000634057		
TOTAL (CORREGIDO)	0,511143	104			

Análisis de varianza para *Escherichia coli*

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Tiempo	0,104775	6	0,0174625	84,88	0,00001
B:Concentración	0,305097	4	0,0762742	370,76	0,00001
INTERACTIONS					
AB	0,0681157	24	0,00283816	13,80	0,00001
RESIDUAL	0,0144007	70	0,000205724		
TOTAL (CORRECTED)	0,492388	104			

Análisis de varianza para *Candida albicans*

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A: Tiempo	0,717909	6	0,119652	196,29	0,00001
B: Concentración	1,52765	4	0,381912	626,55	0,00001
INTERACTIONS					
AB	0,350992	24	0,0146247	23,99	0,00001
RESIDUAL	0,0426687	70	0,000609552		
TOTAL (CORRECTED)	2,63922	104			