

Caracterización fitoquímica de las hojas de *Phytolacca americana* y determinación de su potencial antifúngico

Phytochemical characterization of *phytolacca americana* leaves and determination of their antifungal potential

Edith Tipaz-Tipaz¹
Cindy Restrepo-Burgos²
Paola Solarte-Niquinas³
Natali Mena-Guerrero⁴

¹ Servicio Nacional de Aprendizaje SENA (Colombia). Correo electrónico: etipaz@sena.edu.co; orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8848-7671>

² Servicio Nacional de Aprendizaje SENA (Colombia). Correo electrónico: vanechemistry@gmail.com; orcid: <https://orcid.org/0000-0002-9221-2080>

³ Universidad del Valle (Colombia). Correo electrónico: nathiasolarte@gmail.com; orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1950-1430>

⁴ Universidad del Valle (Colombia). Correo electrónico: natali.mena@correounivalle.edu.co; orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8429-4613>

Recibido: 21-09- 2018 Aceptado: 27-06-2019

Cómo citar: Tipaz-Tipaz, Edith; Restrepo-Burgos, Cindy; Solarte-Niquinas, Paola; Mena-Guerrero, Natali; (2019). Caracterización fitoquímica de las hojas de *Phytolacca americana* y determinación de su potencial antifúngico. *Informador Técnico*, 84(1), 18-34.

<https://doi.org/10.23850/22565035.1804>

Resumen

La *Phytolacca americana* es una especie de planta de la familia *Phytolaccaceae* nativa del Norte de América utilizada como tratamiento autóctono en enfermedades comunes y controversiales como el cáncer, debido a sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antimicóticas. El objeto de este estudio fue caracterizar a nivel fitoquímico los compuestos presentes en las hojas de esta planta y determinar su potencial antifúngico. Para ello, se evaluaron tres condiciones de secado: temperatura ambiente ($12 \pm 2^\circ\text{C}$), 22°C y 40°C ; técnica de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y espectrofotometría UV / VIS donde se evidenció que las condiciones de secado no influyeron en la estabilidad de los grupos biosintéticos. Además, se identificaron metabolitos secundarios mediante *screening* fitoquímico como flavonoides, saponinas, cumarinas y taninos en extractos etanólicos que se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con bombardeo electrónico, en donde se reconocieron ácidos esenciales con fines comerciales como el ácido oleico. Finalmente, se evaluó el potencial antifúngico de los extractos etanólicos con concentraciones de 60 a 300 mg/mL, en cuatro tipos de cepas: *F. solani*, *A. brasiliensis*, *S. kudriavzevii* y *C. albicans*, los resultados mostraron mayores diámetros de inhibición de 18 y 19 mm contra las cepas *F. solani* y *C. albicans*, respectivamente.

Palabras clave: *screening* fitoquímico; metabolitos secundarios; actividad antifúngica; ácido oleico.

Abstract

Phytolacca americana is a species of the *Phytolaccaceae* family native to North America. *P. americana* is used as a folk medicine to treat inflammation, fungal infections, rashes and breast problems; moreover, recent publications support possible anti-cancer properties. The purpose of this study was to characterize and compare the phytochemical constituents of the leaves of *P. americana*, and determine their antifungal potential. For this, three temperatures were evaluated to dry the leaves: ambient temperature ($12 \pm 2^\circ\text{C}$), 22°C and 40°C , then extracts of the leaves were obtained by ethanol extraction. FTIR and UV / VIS

spectroscopy analysis of the extracts shows that the drying temperatures do not affect the stability of the biosynthetic groups. Main secondary metabolites such as flavonoids, saponins, coumarins and tannins were determined by phytochemical screening. Furthermore, extracts were analyzed by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), essential acids such as octadecanoic and some alcohols were identified. Finally, the antifungal potential of ethanolic extracts with concentrations of 60 to 300 mg/mL was evaluated in four types of strains: *F. solani* (ATCC 36031), *A. brasiliensis*, *S. kudriavzevii* and *C. albicans*. Results shows inhibition diameters of 18 and 19 mm for *F. solani* and *C. albicans* strains respectively.

Keywords: phytochemical characterization; antifungal potential; *Phytolacca americana*; oleic acid.

1. Introducción

La *P. americana* es una especie de planta de la familia *Phytolaccaceae* nativa del Norte de América, cultivada ampliamente en China y actualmente se encuentra fácilmente en la región andina de Colombia, específicamente en la zona sur del departamento de Nariño. Aunque es una planta altamente tóxica para el ganado y los seres humanos, en 1820 la farmacopea de los EE.UU. declaró esta como un analgésico y antiinflamatorio (Lady Bird Johnson Wildflower Center, citado el 11 de julio de 2017; Natural Remedies citado el 14 de junio de 2017), pues algunas partes de la *P. americana* se usan como medicamento si se preparan correctamente (Irvin, 1975; Iwakiri *et al.*, 2013; Taylor, citado el 4 de agosto de 2017).

Los americanos nativos usaron el té de las bayas de la *P. americana* para curar el reumatismo, artritis, disentería y pechos doloridos, la raíz para el reumatismo, los dolores neurálgicos y los moretones (Hernández-Niño, 2010). En todas las partes de la planta, en especial en la raíz, se ha determinado la presencia de *phytolaccatoxin* relacionado con la presencia de *Saponinas triterpenoides*, *alcaloides Phytolaccin*, *histaminas* y una proteína enzimática denominada *Phytolaccaina G*. Los extractos de proteínas obtenidos de las raíces de esta planta, han sido comparados con la actividad mitogénica comercial del pokeweedTM; así mismo, tienen una potente actividad citotóxica una vez ingresa al citoplasma de una célula (Yang; Wiczorck; Allen; Nett, 2003).

La población del municipio de Túquerres, departamento de Nariño, Colombia, tradicionalmente ha dependido de las plantas medicinales para sus curaciones. Sin embargo, desconoce muchas propiedades que estas plantas pueden ofrecer en el tratamiento de enfermedades. Por eso, este trabajo involucra el estudio de los metabolitos secundarios de plantas como la *P. americana* que se encuentra fácilmente en la zona rural de este municipio, con el propósito de contribuir a la determinación taxonómica y la actividad biológica de esta planta. Por ejemplo, las saponinas triterpénicas denominadas *Phytolacca-saponinas*, aisladas de la raíz de la *P. americana* fueron incluidas en procesos de investigación contra el cáncer de ovario y otros tumores adiposos o con propósitos de adelgazamiento (Hernández-Niño, 2010; Rojas-Quintero, 2011; Sanabria, 1983). Es decir, se puede contribuir a la producción de fármacos con potenciales clínicos a partir de extractos vegetales.

Con respecto a la actividad antifúngica, actualmente existen fármacos comerciales para tratar diferentes tipos de micosis, como anfotericina B, ketoconazol, fluconazol, entre otros; sin embargo, por su alta toxicidad pueden producir daños en las células hospedadoras de los humanos, de ahí el interés por los productos naturales y sus posibles aplicaciones en la industria farmacéutica (Treviño *et al.*, 2012). Aunque existen estudios con relación a la actividad antimicrobiana de extractos de plantas vegetales (Navarro-García *et al.*, 2003; Kim; Chom; Han, 2013; Davicino *et al.*, 2007); en la *P. americana* son mínimas las evidencias de la actividad contra microorganismos, pues solo se encontró una información preliminar sobre que por sus características hidrofóbicas en la superficie de las hojas, se pueden encontrar proteínas antimicrobianas, lo que proporcionó una pista para realizar una determinación del potencial antifúngico de esta planta (Peng *et al.*, 2005). Por otro lado, para garantizar los beneficios de las propiedades curativas de estas plantas, se hace necesario determinar ciertos parámetros físicos como la temperatura, que no alteren las estructuras internas de los componentes, en especial los compuestos volátiles. En este sentido, se debe evaluar las condiciones de secado del material vegetal, debido a las posibles pérdidas de aceite esencial, sustancias volátiles, degradación de sustancias termolábiles o para el aislamiento de sustancias naturales puras. Por lo anterior, Sharapin (2000), sugiere

secar a temperaturas inferiores a los 40 °C, donde se garantice una buena circulación de aire. En este orden de ideas, en este trabajo se evaluaron tres condiciones de secado adecuadas para la conservación de las moléculas de interés presentes en las hojas de *P. americana*.

Además, se determinó la presencia de metabolitos secundarios mediante *screening* fitoquímico y se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplado a masas con bombardeo electrónico para identificar cualitativamente algunos ácidos esenciales. Finalmente, se evaluó la actividad antifúngica en cuatro tipos de cepas tales como *F. Solani* y *A. Brasiliensis*, *S. kudriavzevii* y *C. albicans*, con el objeto de contribuir al conocimiento de las propiedades de plantas nativas en vía de extinción como lo es la *P. americana* y promover el uso de las mismas en el campo terapéutico, en la agricultura y en las industrias farmacéuticas y alimenticias.

2. Metodología

2.1. Colección del material vegetal

Las hojas frescas de *P. americana* se recolectaron en época de invierno, entre mayo y julio, en el corregimiento de Pinzón, Sabana de Túquerres, Nariño (Colombia). Esta planta fue identificada botánicamente en el Herbario - CUVC Luis Sigifredo Espinal-Tascón de la Universidad del Valle. Las hojas se lavaron cuidadosamente con agua destilada hasta posterior análisis.

2.2. Preparación de extractos vegetales

Las hojas lavadas con agua destilada se sometieron a proceso de secado en un horno de convección forzada BINDER FD 53- UL, en donde se evaluaron dos condiciones de temperatura 22 °C y 40 °C (Martínez, 2006), y una tercera condición de secado a temperatura ambiente promedio de la sabana de Túquerres, Nariño (12 ± 2 °C). Con referencia a la extracción, se siguió la metodología expuesta por Sanabria (1983), se maceró durante 12 a 15 horas 50 g del material vegetal seco usando 600 mL de etanol (Merck) al 95 % y n-hexano (Merck), respectivamente. Posteriormente, se colocó a reflujo durante 1 hora, luego se filtró al vacío y el residuo se lavó con 100 mL del solvente, también evaluado en el momento. Las disoluciones procedentes se filtraron y luego se concentraron al vacío en un rotaevaporador a 40 °C. Los extractos obtenidos se conservaron en frascos de tipo ámbar hasta su posterior análisis.

2.3. Evaluación de las condiciones de secado

Los extractos etanólicos obtenidos de las tres condiciones de secado (22 °C, 40 °C y temperatura ambiente), se caracterizaron por la técnica espectroscópica, los métodos aplicados fueron: infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) en un rango de 600 a 4000 cm^{-1} y UV/VIS en todo el rango de longitud de onda (250–900 nm) (Skoog, 1998).

2.4. Screening fitoquímico

Los extractos de etanol y hexano obtenidos a una temperatura de secado de 40 °C de las hojas de *P. americana*, fueron sometidos a diferentes test, con el propósito de determinar la presencia de taninos, saponinas, cumarinas, flavonoides, fenoles y alcaloides siguiendo la siguiente metodología con algunas modificaciones:

Test de taninos: el extracto se agitó separadamente con agua destilada (10 mL), luego se filtró y se adicionó cinco gotas de FeCl_3 al 5 %. La coloración negra o azul-verde o precipitado indicó la presencia de taninos (Andriani *et al.*, 2015).

Test de saponinas: en un tubo de ensayo se tomó 0,5 g de extracto, se adicionó 10 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente. La formación de 2 cm de capa de espuma que persistió en el calentamiento en un baño de agua durante 5 min, mostró la presencia de saponinas (Andriani *et al.*, 2015; Khanam; Wen; Bhat, 2015).

Test de cumarinas: a partir de los extractos se realizó una dilución siguiendo la proporción 9:1, extracto: agua, de la cual se tomaron 2 mL en un tubo de vidrio con tapa, con una tira de papel filtro dentro del tubo previamente empapado de una solución alcalina de NaOH (0,06 g/mL). Sin tocar el extracto dentro del tubo, se tapó y se calentó en un mechero Bunsen hasta desprendimiento de vapor, luego se llevó el papel filtro a una lámpara UV (UVP, UVLS-26), se observaron puntos fluorescentes (amarillos verdosos) sobre el papel, por lo tanto, la muestra se consideró positiva para cumarinas (Hinojosa- Dávalos *et al.*, 2013).

Test de flavonoides: a 1 mL de cada extracto en tubos de ensayo se agregaron 0,5 g de magnesio en polvo y cinco gotas de ácido clorhídrico al 10 % hasta el desprendimiento de hidrógeno. Los colores rosados, anaranjado o fresa indicaron prueba positiva; la prueba es conocida como reacción de shinoda (Khanam *et al.*, 2015; Rondón *et al.*, 2018).

Test de fenoles: a 50 mg de extracto se adicionaron 5 mL de agua destilada y unas pocas gotas de FeCl₃ al 5 %. El color negro azulado indicó la presencia de compuestos fenólicos (Andriani *et al.*, 2015).

Test de alcaloides: a 15 mg de cada extracto se agregaron 6 mL de HCl al 1 %, la mezcla se dejó en un baño de agua por 5 min y se filtró. El filtrado se dividió en tres partes iguales (0,5 mL aproximadamente); al primero se adicionó cinco gotas del reactivo de Drangerdorff, si presentaba color rojo naranja, indicaba la presencia de alcaloides; al segundo se adicionó 1 mL de reactivo de Mayer, la formación de un precipitado color crema indicó prueba positiva; y al último filtrado se agregó cinco gotas de la solución de reactivo de Wagner, la formación de un precipitado de color marrón indicó la presencia de alcaloides (Iqbal; Salim; Lim, 2015).

2.5. Análisis cromatográfico

El uso de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. Por lo tanto, se realizó una identificación de posibles componentes presentes en los extractos en etanol y hexano de las hojas de *P. americana* y se realizó por medio de un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas Shimadzu CG-EM QP-2010, equipado con un autoinyector AOC-20i, automuestreador AOC-20s, inyección Split/splitless, modo de ionización EI/SCI/NCI y sonda de inserción directa controlada por el software CGMS-solution, la columna utilizada fue una columna DB-5MS.

El método cromatográfico y espectrométrico utilizado, corresponde a una temperatura de horno de 200 °C, temperatura de inyección de 300 °C, modo de inyección split que varía de 10:1 a 30:1 dependiendo de la concentración de las especies, modo de control de flujo velocidad lineal, flujo de la columna de 0,60 mL/min, velocidad lineal de 30 cm/s, gas de arrastre helio, temperatura de la fuente de iones de 230 °C y temperatura de la interfase de 280 °C. El intervalo de confianza del método fue del 95 %. El equipo tiene acoplada la biblioteca Nist Research Librar.

2.6. Evaluación de la actividad antifúngica

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó por el método de difusión de pozos en agar. A partir del cultivo de cada cepa con micelio, se tomaron con un asa las esporas de estos y se diluyeron en un tubo de ensayo con caldo peptona de harina de soja de la casa Merck KGaA previamente esterilizado. Posteriormente, se mezclaron por agitación en un agitador mecánico de tubos (Vortex Mixer, Modelo: VM-300P). Luego, el inóculo se sembró por estriado en las placas de 9,1 cm de diámetro con agar potato dextrosa y sabourand dextrosa al 4 % (de acuerdo con el tipo de cepa) previamente solidificado, en cada placa se realizaron perforaciones distribuidas en forma adecuada, según las concentraciones de los extractos. Enseguida, se incorporaron 20 µL de cada una de las concentraciones del extracto diluido a los pozos de 6 mm de diámetro (Sanabria; Mantilla, 1986; Quiroga; Sampietro; Vattuone, 2001). Como control positivo, en uno de los pozos se adicionó tiabendazol y como control negativo en otro pozo se usó etanol al 96 %.

Posteriormente, las placas *S. kudriavzevii* y *C. albicans* se incubaron aeróbicamente a 30 °C y las placas *F. solani* y *A. brasiliensis* a 25 °C, de acuerdo con sus fichas técnicas. De esta forma, se realizaron tres repeticiones para cada

concentración de extracto (60, 120, 180, 240 y 300 mg/mL). Con relación al diámetro de inhibición de los micelios, en todas las placas se verificó luego de 72 h después de incubación lo requerido para un crecimiento visible (Navarro-García *et al.*, 2003; Parveen; Ghalib; Khanam; Mehdi; Ali, 2010). Los resultados fueron medidos y expresados en milímetros en términos de diámetro de inhibición de crecimiento alrededor de cada disco, donde se determinaron diferentes condiciones relacionadas a la actividad: sin actividad (1-6 mm), actividad moderada (7-10 mm), actividad alta (11-15 mm), actividad muy alta (16-20 mm) (Parveen *et al.*, 2010).

El índice antimicrobiano se calculó usando la ecuación 1.

$$\text{Índice antimicrobiano} = (1 - D_a/D_b) * 100 \quad (1)$$

Donde D_a es el diámetro de crecimiento del hongo en el extracto, y D_b es el diámetro de crecimiento del hongo en el control positivo.

2.7. Análisis estadístico

Se analizaron los resultados por medio del programa STATGRAPHICS Centurión XVI Versión 16.1.15, en donde se calculó un ANOVA, con lo cual se evaluaron medias y, además, se identificó si hubo diferencias significativas en las concentraciones del extracto evaluadas para cada cepa.

3. Resultados y discusión

3.1. Condiciones de secado

Las plantas con usos medicinales contienen compuestos volátiles de interés farmacéutico. Estos compuestos se producen por rutas biosintéticas de metabolitos secundarios no volátiles, lo que explica su diversidad. Los terpenos son uno de estos compuestos y son los más relevantes por su actividad biológica, seguidos de los derivados de ácidos grasos (hidrocarburos saturados e insaturados), bencenoides y fenilpropanoides; aunque también se han reportado sustancias azufradas y nitrogenadas en plantas medicinales (Dudareva *et al.*, 2005).

En los resultados de los FTIR de las muestras que fueron procesadas en cada una de las temperaturas que se evaluaron, se observaron bandas cercanas a los 3000 cm^{-1} correspondientes a la presencia de grupos instaurados $=\text{CH}-$, picos comunes correspondientes al $-\text{OH}$ entre los 2300 y 3700 cm^{-1} (usuales en estas plantas, representan grupos correspondientes a alcohol), ácidos carboxílicos y fenólicos que demuestra que se mantienen compuestos volátiles de bajo peso molecular. Por otra parte, se evidenciaron picos entre los 1053 - 1062 cm^{-1} correspondientes a grupos alquilo. Con relación al enlace CO de ácidos carboxílicos no iónicos, se observó cercano en 1735 - 1738 y 1244 - 1248 cm^{-1} , junto con la vibración asimétrica de grupos carboxilato iónicos en 1618 - 1645 y 1375 - 1385 cm^{-1} . Es decir, que los resultados cualitativos indicaron que la temperatura no influyó en proceso de extracción, asimismo, los análisis de FTIR evidenciaron picos similares independientes de la temperatura de secado (ver Figura 1).

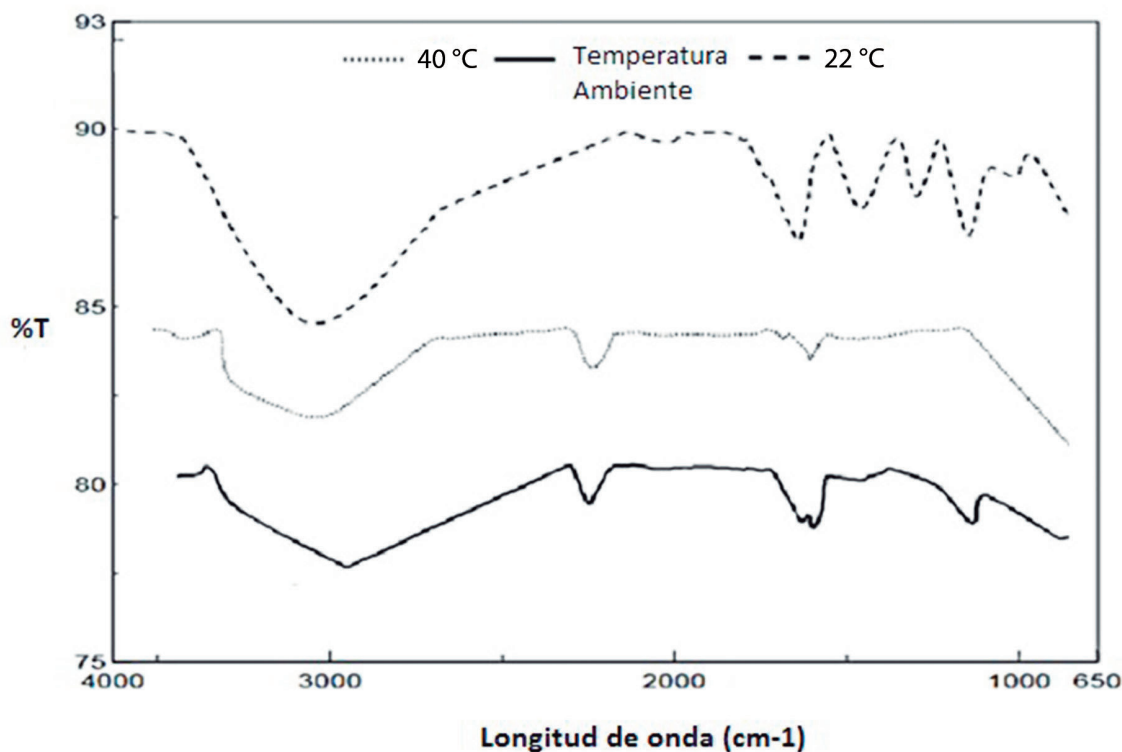


Figura 1. Espectros FTIR de muestras secas a 22 °C, 40 °C y temperatura ambiente
Fuente: elaboración propia.

Con referencia a los espectros UV/VIS, se evidenciaron máximos de absorción en el rango ultravioleta: 260 a 365 nm para los tres extractos etanólicos obtenidos a 22 °C, 40 °C y temperatura ambiente de secado de las hojas de *P. americana*. Por su parte, en la región del espectro visible solamente aparecieron pequeños picos a los 663 y 664 nm para los extractos etanólicos obtenidos a temperatura de 22 °C y 40 °C. De acuerdo con el análisis ultravioleta visible de los extractos, se observaron bandas de absorción máxima entre 200 y 300 nm, correspondientes a la banda benzoi o banda II característica para el anillo aromático A de flavonoides.

Por otra parte, el desplazamiento de las últimas bandas a longitud de onda mayor a 500 nm es característica para flavonoides del grupo de las antocianinas, en ese sentido, se comprobó la presencia de antocianinas además de otras sustancias fenólicas en la muestra; asimismo, los picos cercanos a los 663 nm pueden corresponder a compuestos de tipo cianina $(CH_3)_2N-(CH=CH)_n-CH=N^+(CH_3)_2$, que es un nombre no sistemático de una familia sintética de colorantes perteneciente al grupo polimetina. En cambio, los picos cercanos a 365 nm corresponden en alta probabilidad a merocianinas, lo que se pudo evidenciar en el extracto obtenido de las muestras con una temperatura de secado a 40 °C de las hojas *P. americana* (ver Figura 2) (Ren; Tian, 2007; Martínez-Cruz *et al.*, 2011).

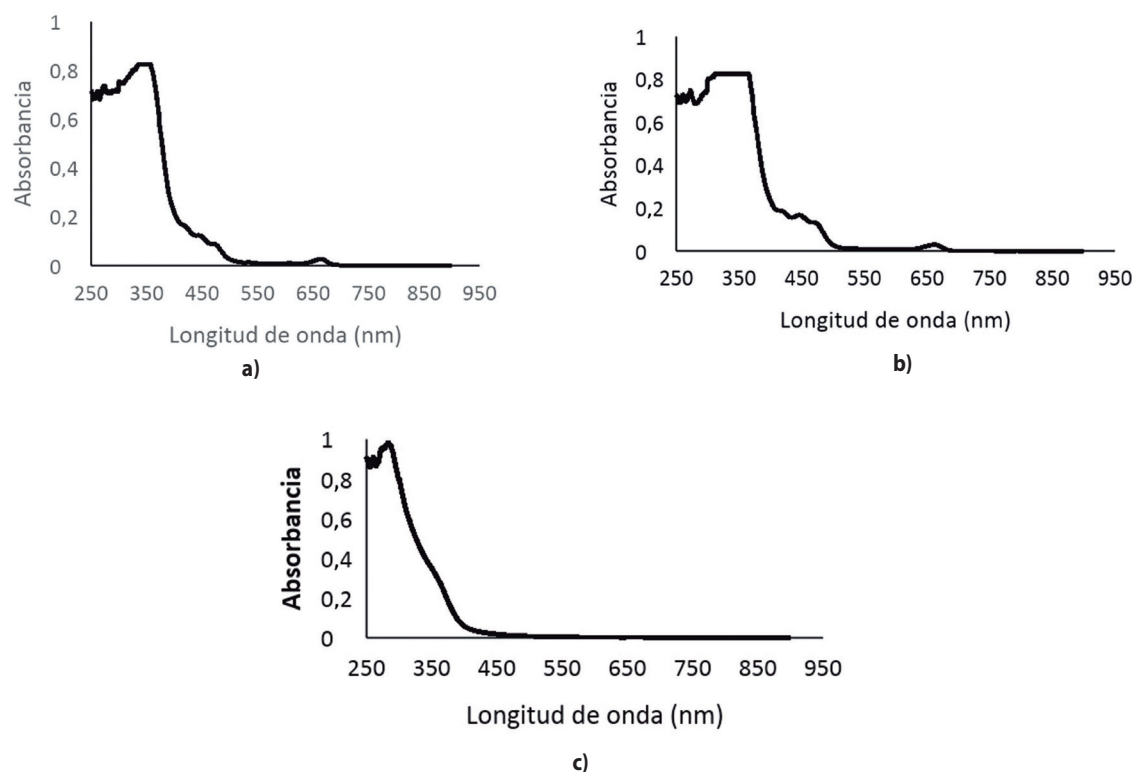


Figura 2. Espectros de absorción de extractos etanólicos obtenidos a diferentes temperaturas de secado de las hojas de *P. americana*:

a) 22 °C

b) 40 °C

c) Temperatura ambiente

Fuente: elaboración propia.

3.2. Screening fitoquímico

En los resultados obtenidos del *screening* fitoquímico se evidenció la presencia de flavonoides, saponinas, cumarinas y taninos; en cambio, en los extractos en hexano no se evidenció la presencia de metabolitos secundarios. Comparando con otros estudios de hojas de *Phytolacca dodecandra* perteneciente a la familia de *Phytolaccaceae*, estos revelaron la presencia de compuestos fenólicos, aunque en bajas concentraciones. Asimismo, evidenciaron la presencia de alcaloides y terpenoides; este último se mostró en altas concentraciones (ver Tabla 1) (Ogutu; Lilechi; Mutai; Bii, 2012).

Tabla 1.

Análisis fitoquímico de las hojas de *Phytolacca americana*

Componente/prueba/solvente	Prueba	Extracto etanol	Extracto en hexano
Fenoles	Prueba de Cloruro férrico	-	-
Flavonoides	Shinoda	+	-
Saponinas	Espuma	+	-
Cumarinas	Reacción de Fluorescencia	+	-
Alcaloides	Reactivo de Mayer, Drangerdorft y Wagner	-	-
Taninos	Prueba con ferrocianuro de potasio	+	-

Nota: +, indica la presencia de metabolitos; -, indica la ausencia de metabolitos

Fuente: elaboración propia (Bitácora de laboratorio).

Respecto a los flavonoides evidenciados en los extractos etanólicos, estos pertenecen al grupo de los compuestos polifenólicos y son típicamente conocidos por promover la salud a causa de sus propiedades antioxidantes, antialérgicas, antiinflamatorias, antimicrobianas y anticancerosas; existen ampliamente en el reino vegetal y muestran una correlación positiva entre el aumento del consumo de flavonoides y reducción del riesgo cardiovascular y cáncer (Khanam *et al.*, 2015; Miranda- Da Gama; Guimarães; de Abreu; Armando-Junior, 2014; Qadir; Paul; Ganesh, 2015; Chigayo; Mojaelo; Mnyakeni-Moleele; Misihairabgwi, 2016). Asimismo, los taninos son flavonoides oligoméricos y poliméricos ampliamente distribuidos en vegetales y frutas, se le atribuyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y en la prevención de aterosclerosis (Mamet; Ge; Zhang; Li, 2018). En cuanto a las saponinas, estas tienen en su estructura química, aglicona triterpeno o esteroide; es por eso que el consumo de saponinas incrementa la protección contra el riesgo de cáncer, disminuye el nivel de colesterol y glucosa en la sangre, además, se le atribuye propiedades antiinflamatorias, hipocolesterolémicas e inmunestimulantes. (Augustin; Kuzina; Andersen; Bak, 2011). Respecto a las cumarinas presentes en las hojas de *P. americana*, estas dan aroma a las plantas y tienen propiedades vitamínicas, disminuyen la permeabilidad capilar y aumentan la resistencia de las paredes de capilares (protegen la fragilidad capilar y actúan como tónico venoso), también se le atribuyen propiedades antibacteriales (Singh; Singh; Singh; Kaur, 2017).

Otros estudios realizados identificaron los siguientes compuestos en las hojas de *P. americana*: kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside, kaempferol 3-O-β-D-xylopyranosyl (1→2)- β-D-glucopyranoside, kaempferol 3-O-α-l-rhamnopyranosyl (1→2)- β-D-glucopyranoside, kaempferol 3-O-diglucoside y quercetina 3-O-glucosido (Bylka; Matlawska, 2001); esto puede ser como consecuencia de las diferentes ubicaciones geográficas en las que los minerales del suelo y los factores ambientales tienen una gran influencia sobre los contenidos fitoquímicos de la planta (Borokini; Ayodele, 2012).

3.3. Cromatografía de gases

Los compuestos volátiles de origen vegetal son producidos principalmente por diferentes rutas biosintéticas, entre las que se destaca la vía de los ácidos grasos/lipooxigenasa (Paré y Tumlinson, 1999), donde estos son sintetizados a partir del ácido linoleico y octadecanoico (identificados por cromatografía de masas). Por esta razón, es importante garantizar que la temperatura de secado no altere la naturaleza de estos compuestos garantizando su presencia en los extractos finales.

En la Tabla 2 se relacionan los compuestos identificados por la base de datos Nist-05 en los extractos en hexano de *P. americana*, el análisis cromatográfico realizado a los extractos etanólicos no arrojó resultados con tiempos de retención superiores a los 0.5 min que pudieran ser considerados como relevantes.

Tabla 2.
Posibles compuestos encontrados en el extracto en hexano de *P. americana*

Factor de identificación %	Nombre	Tiempo de retención (min)
8,46	9,9-dimetoxibicyclo[3.3.1]non ane-2,4-diona	2,44
3,88	9-Ácido octadecenoico (Z)-	1,529
83,40	9-Ácido octadecenoico (Z)-	0,740
4,64	10-metoxi-nb-alfa-metilcorynanteol (C ₂₁ H ₂₉ N ₂ O ₂)	4,508
0,39	Eritro-9,10-Dibromopentacosane (C ₂₅ H ₅₀ Br ₂)	4,891

Fuente: base de datos. The National Institute of Standards and Technology (NIST), licencia adquirida por la Universidad del Valle (2018).

Los ácidos grasos, como el ácido 9-ácido octadecenoico (Z) o ácido oleico son ácidos grasos monoinsaturados de la serie omega 9, su nombre IUPAC es ácido cis-9- octadecenoico, este compuesto se evidenció en los extractos en hexano de *P. americana* y su cromatograma (ver Figura 3).

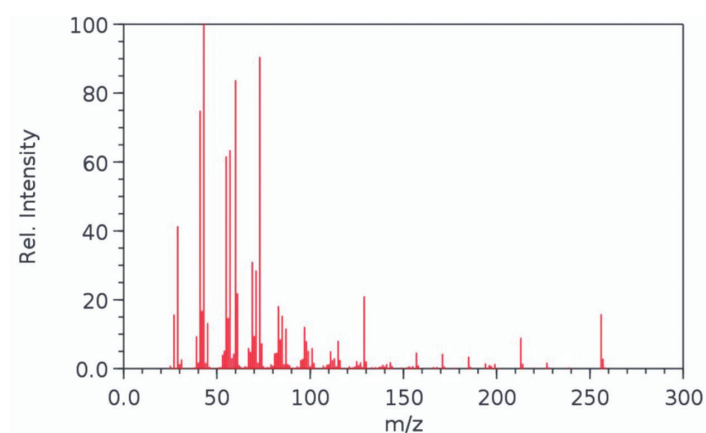


Figura 3. Espectro de masas para el ácido oleico
Fuente: elaboración propia.

En la Figura 4 se evidenció que el compuesto identificado presenta un grupo carboxilo en su estructura, este ácido se usa principalmente en la industria alimenticia por sus diversos beneficios a la salud.

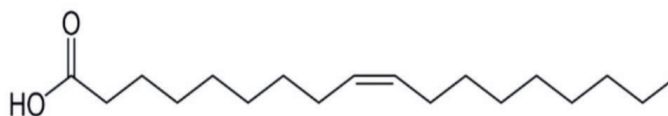


Figura 4. Estructura del ácido oleico
Fuente: elaboración propia.

Por otra parte, se contempló la fragmentación en espectro de masas de algunos grupos funcionales que hacen parte de la composición y estructura molecular de los extractos, en donde se observaron iones moleculares con relaciones de carga masa (m/z) que no han sido aún publicados en la literatura. Algunas moléculas presentan arreglo McLafferty (ver Figuras 5, 6, 7, 8 y 9).

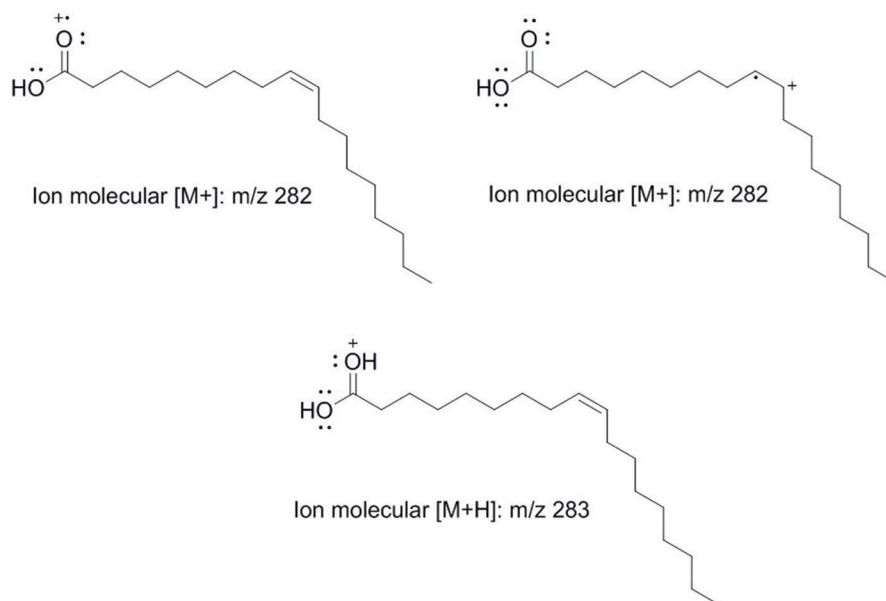


Figura 5. Posibles iones moleculares en el espectro de masas
Fuente: elaboración propia.

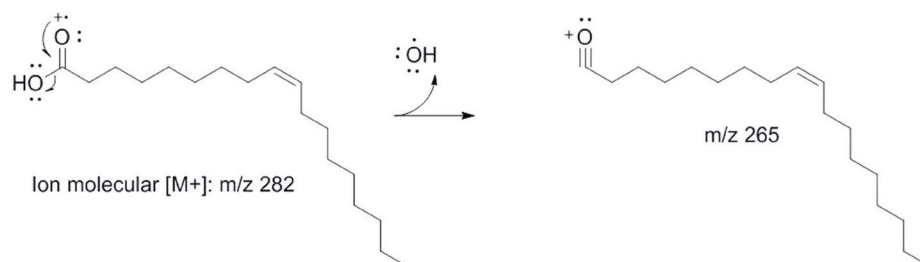


Figura 6. Pérdida de $\cdot\text{OH}$:
Fuente: elaboración propia.

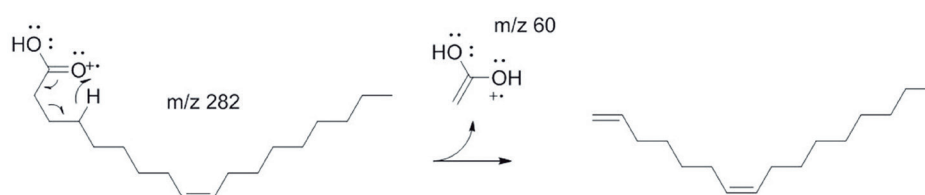


Figura 7. Arreglo de McLafferty
Fuente: elaboración propia.

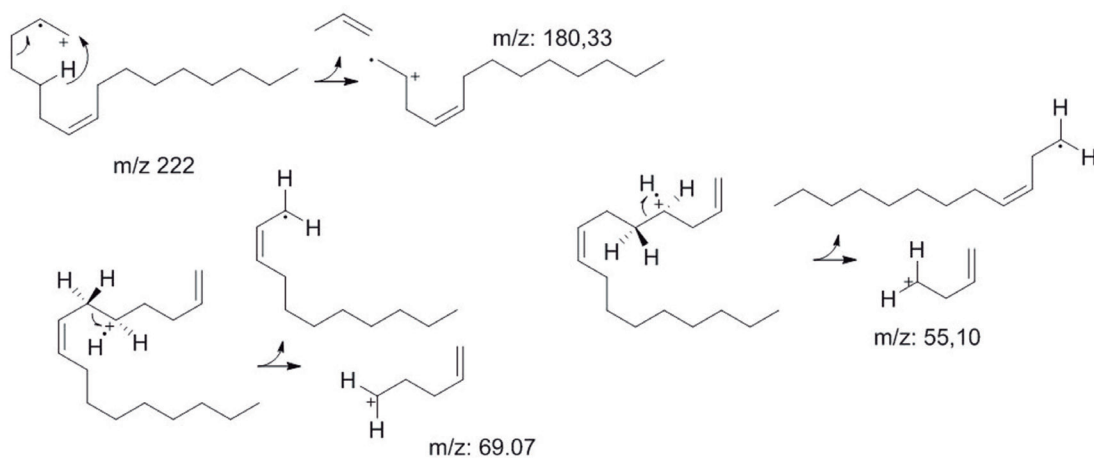


Figura 8. Generación de nuevos iones moleculares y rupturas en dobles enlaces
Fuente: elaboración propia.

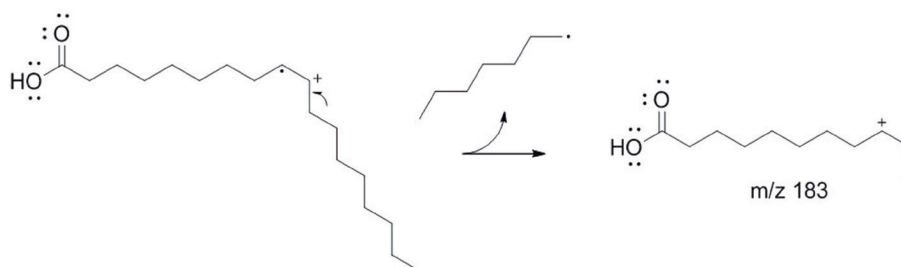


Figura 9. Ruptura en doble enlace
Fuente: elaboración propia.

Por consiguiente, el compuesto identificado con un grupo carboxilo en su estructura en los extractos de *P. americana* es de importancia agroindustrial, debido a que la mayoría de los ácidos grasos insaturados de origen biológico se derivan del ácido oleico, ácido linoleico y del ácido linolénico; estos ácidos son encontrados en biomasa y extractos naturales con características oleaginosas. Encontrarlos en estas especies se debe a que las plantas acumulan lípidos cuando el crecimiento se ve limitado, debido a la falta de nitrógeno o de otro tipo de nutrientes. Los compuestos derivados de los ácidos grasos como el colesterol, ergosterol y otros, son comunes encontrarlos en las células vegetativas y son catalogados como metabolitos, secundarios (Samson; de Boer, 1995).

De hecho, el ácido oleico participa en la síntesis de las rostaglandinas, en la generación de membrana, así como en otros procesos biológicos relacionados con la regeneración celular; el suplemento de ácidos grasos puede curar esos síntomas en la piel y estimular la epitelización (Salari; Bakhshi; Sharififar; Naseri; Almani, 2016). De igual forma, el consumo de ácido oleico promueve un buen funcionamiento del sistema nervioso y visual del ser humano (Teichmann; Dutta; Staffas; Jägerstad, 2007; Horst, 2012; Nouripour-Sisakht *et al.*, 2015; Cerqueira-Sales; Barcellos-Costa; Machado-Bueno; Aires-Ventura; Dummer Meira, 2016). Por consiguiente, es importante la identificación de estos compuestos con fines de explotación, ya que daría un valor agregado a la oferta de plantas como la *P. Americana*, abundantes en regiones campesinas dedicadas al agro como el departamento de Nariño.

3.4. Actividad antifúngica

Los ensayos antifúngicos preliminares se realizaron con cinco concentraciones (60, 120, 180, 240 y 300 mg/mL) de los extractos etanólicos de las hojas de *P. americana*, con ello se evidenciaron los diámetros de inhibición promedio con los que se pudo observar que respecto a la cepa *Aspergillus brasiliensis*, no hubo actividad antifúngica por parte de los extractos de *P. americana* hacia esta cepa comparado con el control positivo (47 mm), la *Aspergillus brasiliensis* es un hongo de la familia *Aspergillus* causante de una amplia gama de enfermedades en el ser humano, como aspergilosis invasiva o alérgica, aspergiloma, sinusitis, otomicosis, onicomicosis y queratitis (Nouripour-Sisakht *et al.*, 2015), por lo que se hubiese querido lograr un efecto de inhibición por parte de la planta de estudio.

Por otra parte, se evidenció que hay una mayor inhibición con respecto a las cepas *F. solani* y *C. albicans* a unas concentraciones de extracto de 240 y 300 mg/mL, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Peng *et al.*, (2005) en el hongo *F. Solani*, donde obtuvo un gran efecto de inhibición contra esta cepa y menciona que la acción antimicrobiana de las hojas de *P. americana* se debe posiblemente a la superficie hidrofóbica de estas y a la membrana plasmática que contiene la bicapa lipídica, con proteínas antimicrobianas que también se encuentran en la semilla y raíz de la planta.

Con respecto a la cepa *S. kudriavzevii*, familia de la *Saccharomyces cerevisiae*, que es un colonizador común de mucosas y que produce infecciones tanto superficiales como viscerales invasivas (Davicino *et al.*, 2007), también se observó un alto efecto de inhibición (13 ± 7 mm) a las más altas concentraciones del extracto de la planta evaluadas (ver Tabla 3).

Los resultados mencionados concuerdan con el estudio realizado por Shao *et al.*, (1999) que menciona que los mecanismos de defensa de las plantas como la *P. americana* se debe a la presencia de una amplia gama de péptidos o proteínas antimicrobianas y el interés particular es aislar estos componentes con fines terapéuticos; por ello aisló un péptido altamente básico con 38 residuos (aminoácidos) y tres puentes disulfuro denominado PAFP-s, a partir de las semillas de esta planta y comprobó a partir de este, un amplio espectro significativo de actividad antifúngica contra varios hongos, excepto hacia la *Escherichia coli*.

Tabla 3.
Actividad antifúngica de las hojas de *Phytolacca americana*

CEPA/Concentración mínima inhibitoria MIC (mg/mL)	Diámetro de inhibición (mm)						Control positivo tiabendazol (500 mg/mL)
	60	120	180	240	300	Control negativo Etanol al 95%	
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC 16404)	6 (N/A)	6 (N/A)	6 (N/A)	6 (N/A)	7 (N/A)	6 (N/A)	47
<i>Fusarium Solani</i> (ATCC 36031)	13	16	12	18	16	6 (N/A)	18
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	9 ±	7	18	16	19	6 (N/A)	21
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i> (ATCC 260)	7	9	12	13	13	6 (N/A)	21

N/A: No actividad

Fuente: elaboración propia (Bitácora de laboratorio).

Por lo anterior, se puede afirmar que, comparado a otros estudios (bajas concentraciones de extractos), se debe tener en cuenta que se trabajó con extractos crudos que contienen metabolitos o impurezas sin actividad antifúngica. Con respecto al índice antimicrobiano, se evidenció un bajo índice, debido a la alta susceptibilidad de los hongos con respecto al control positivo, esto se corroboró con los valores de diámetros de inhibición de concentraciones de los extractos, como los valores de la cepa *F. Solani* cercanos con el control positivo (18 mm). En cuanto al control negativo en el que se encontraban los extractos crudos de la planta, se evidenció que el etanol no es el responsable del efecto inhibitorio contra las cepas evaluadas, pues no se obtuvieron diámetros de inhibición, por ello se le atribuye el efecto de inhibición directamente a los extractos (Pérez; Rojas; Chamorro; Pérez, 2011).

La actividad antifúngica de la planta se debe a la presencia de metabolitos secundarios como los flavonoides, tal como se comprobó tanto en la caracterización por UV/VIS como por el *screening* fitoquímico. La evaluación de la actividad antifúngica de la *P. americana* evidenció la presencia de flavonoides comparado con otros estudios relacionados con la especie de *Phytolaccaceae* que también obtuvieron resultados favorables con respecto a la actividad antimicrobiana de otras especies, lo que indica que la planta de estudio tiene potenciales agentes microbianos que sería muy importante aislarlos (Ogutu *et al.*, 2012). Además, se corroboró con la presencia de taninos que son metabolitos secundarios producidos naturalmente en hierbas medicinales y tradicionales, ricas en polifenoles, así mismo, esta actividad antifúngica puede derivarse de la expresión de sustancias con características polares, como las saponinas y bioflavonoides promotores de la acción anti-radicales libres sinérgica a la actividad biológica, que es impulsada por la maceración de la extracción etanólica de la planta (Cerqueira-Sales *et al.*, 2016).

Con respecto al análisis de varianza, este fue realizado para varias muestras, con la cepa *C. albicans*, el valor P de la prueba-F fue menor que 0,05 ($p \leq 0,0242$), lo que evidenció que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las cinco concentraciones evaluadas del extracto, el nivel de confianza alcanzado fue del 95 % por lo que se puede concluir que el extracto etanólico de las hojas de *P. americana* fue más efectivo en esta cepa, comparado con las demás cepas evaluadas. Esta especie como es la *Candida*, son hongos patógenos humanos que causan infecciones sistémicas y mucosas que pueden convertirse en graves infecciones que amenazan la vida con una mayor mortalidad entre pacientes inmunocomprometidos. En cuanto a la actividad antifúngica de la *P. americana* hacia *F. solani*, que es un hongo filamentoso que causa la eliminación de muchos cultivos en campos e invernaderos y, además, produce infecciones en los seres humanos como la peritonitis fúngica (Wang; Zheng; Xiang; Li; Yang, 2016; Mayr; Rasch; Schmid; Huber; Lahmer, 2017) sería una alternativa efectiva y sostenible a los fungicidas sintéticos en el control de hongos patógenos.

Los resultados del presente trabajo indicaron que la *P. americana* tiene propiedades antifúngicas. Esto explica el uso de esta planta en la medicina popular para el tratamiento de enfermedades cuyos síntomas pueden involucrar hongos, infecciones, entre otras, y subrayan la importancia de la fitoquímica en el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos para identificar los principios activos responsables de los efectos antifúngicos, con los beneficios adicionales de un medio ambiente seguro. Además, una contribución al rescate de esta planta en vía de extinción dándole aplicaciones en sectores farmacéuticos y agrícolas.

4. Conclusiones

Se evidencia la presencia de fitoquímicos tales como flavonoides, saponinas, cumarinas y taninos en los extractos etanólicos de las hojas de *P. americana*, esta información puede servir como fuente potencial en el uso de fármacos útiles en un futuro. En cuanto al análisis cromatográfico, se identificó la presencia de ácidos grasos esenciales de alto valor agregado como el ácido oleico, 9,9 – dimetoxibicyclo [3.3.1]non ane-2,4-diona, 10-metoxi-nb-alfa-metilcorynanteol ($C_{21}H_{29}N_2O_2$), eritro-9,10- Dibromopentacosane ($C_{25}H_{50}Br_2$) entre otros, con bajos tiempos de retención, con porcentajes inferiores al 1 %. Se determinó un mayor potencial antifúngico a partir de los extractos etanólicos contra las cepas *F. solani* y *C. albicans*, lo que impulsaría el uso de esta planta en el sector agrícola y farmacéutico. Se recomienda realizar pruebas experimentales con otro tipo de especies bacterianas y fúngicas para determinar una mayor eficacia microbiana de los extractos de la *P. americana*.

5. Referencias

- Andriani, Yosie; Ramli, Nadiah; Syamsumir, Desy; Kassim, Murni; Jaafar, Jasmin; Aziz, Nur; Marlina, Leni; Musa, Noor; Mohamad, Habsah (2015). Phytochemical analysis, antioxidant, antibacterial and cytotoxicity properties of keys and cores part of *Pandanus tectorius* fruits. *Arabian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.003>
- Augustin, Jörg; Kuzina, Vera; Andersen, Sven; Bak, Søren (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72(6), 435-457. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.015>
- Borokini, Israel; Ayodele, Abiodun (2012). Phytochemical screening of *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze collected from four geographical locations in Nigeria. *International Journal of Modern Botany*, 2(4), 97-102.
- Bylka, Wiesława; Matlawska, Irena (2001). Flawonoids and free phenolic acids from *Phytolacca americana* L. leaves. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 58(1), 69-72.
- Cerqueira-Sales, Maria; Barcellos-Costa, Helber; Machado-Bueno, Patrícia; Aires-Ventura, José; Dummer Meira, Debora (2016). Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.026>
- Chigayo, Kayini; Mojaelo, Paul; Mnyakeni-Moleele, Simon; Misihairabgwi, Jane (2016). Phytochemical and antioxidant properties of different solvent extracts of *Kirkia wilmsii* tubers. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(12), 1037-1043. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.10.004>
- Davicino, Roberto; Mattar, María; Casali, Yolanda; Correa, Silvia; Pettenati, Elisa; Micalizzi, Blas (2007). Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 247-252. <https://doi.org/10.15381/rpb.v14i2.1784>

- Dudareva, N.; Negre, F. (2005). Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(1), 113-118.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.11.007>
- Hernández-Niño, Renné. (2010). *Exploración del efecto de altas diluciones sucusionadas (medicamento homeopático) de Phytolacca americana sobre linfocitos humanos. Fase 2* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/3083/>
- Hinojosa-Dávalos, Joel; Gutiérrez-Lomelí, Melesio; Siller-López, Fernando; Rodríguez-Sahagún, Araceli; Morales-Del Río, Juan; Guerrero-Medina, Pedro; Del Toro Sánchez, Carmen (2013). Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. *Biotechnia*, 15(2), 53-60.
<https://doi.org/10.18633/bt.v15i2.150>
- Horst, Heros (2012). *Investigação fitoquímica e biológica da espécie: Esenbeckia leiocarpa Engl* (tesis doctoral). Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil. Recuperado de <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/100572>
- Iqbal, Erum; Salim, Kamariah; Lim, Linda (2015). Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University-Science*, 27(3), 224-232.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2015.02.003>
- Irvin, James (1975). Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 169(2), 522-528.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(75\)90195-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(75)90195-2)
- Iwakiri, Tomoya; Mase, Shogo; Murakami, Tomonori; Matsumoto, Masahiro; Hamada, Hiroki; Nakayama, Toru; Ozaki, Shin-ichi (2013). Glucosylation of hydroxyflavones by glucosyltransferases from *Phytolacca americana*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 61-65.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.016>
- Khanam, Zakia; Wen, Chew; Bhat, Irshad (2015). Phytochemical screening and antimicrobial activity of root and stem extracts of wild *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali). *Journal of King Saud University-Science*, 27(1), 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.04.006>
- Kim, Sung-Jin; Cho, Ah; Han, Jaejoon (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control*, 29(1), 112-120.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.060>
- Lady Bird Johnson Wildflower Center (Citado el 11 de jul 2017). *Phytolacca americana*. Recuperado de http://www.wildflower.org/plants/result.php?id_plant=PHAM4.
- Mamet, Torkun; Ge, Zhen-zhen; Zhang, Ying; Li, Chun-mei (2018). Interactions between highly galloylated persimmon tannins and pectins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 410-417.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.039>
- Martínez, Guillermo (2006). *Formulation pharmaceutique d'herbes medicinales a base d'extraits de phytolacca americana, alnus acuminata et goudron de houille pour le traitement et la guerison du psoriasis*. Patente No. WO2006014100, México.
- Martínez-Cruz, Nieves; Arévalo-Niño, Katiushka; Verde-Star, María; Rivas-Morales, Catalina; Oranday-Cárdenas, Azucena; Núñez-González, María; Morales-Rubio, María (2011). Antocianinas y actividad

- anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 42(4), 66-71.
- Mayr, U.; Rasch, S.; Schmid, R. M.; Huber, W.; Lahmer, T. (2017). First description of spontaneous fungal peritonitis caused by *Fusarium solani* in a critically ill patient with liver cirrhosis. *New microbes and new infections*, 20, 16-17. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.08.003>
- Miranda- Da Gama, Robson; Guimarães, Marcelo; de Abreu, Luiz; Armando-Junior, José (2014). Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanol extract of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray dry flowers. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(9), 740-742. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0055>
- Natural Remedies (citado el 14 junio de 2017). *Pokeweed's Humble Beginnings*. Recuperado de <https://www.naturalremedies.org/pokeweed/>
- Navarro-García, V.; Gonzalez, A.; Fuentes, M.; Aviles, M.; Rios, M. Y.; Zepeda, G.; Rojas, M. G. (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(1), 85-88. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00114-4)
- Nouripour-Sisakht, S.; Mirhendi, H.; Shidfar, M. R.; Ahmadi, B.; Rezaei-Matehkolaei, A.; Geramishoar, M.; Zarei, F.; Jalalizand, N. (2015). *Aspergillus* species as emerging causative agents of onychomycosis. *Journal de Mycologie Medicale*, 25(2), 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.12.001>
- Ogut, A. I.; Lilechi, D. B.; Mutai, C.; Bii, C. (2012). Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Phytolacca dodecandra*, *Cucumis aculeatus* and *Erythrina excelsa*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(2), 692-704. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v6i2.13>
- Paré, P.; Tumlinson, J. (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*, 121(2), 325-332. <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.325>
- Parveen, Mehtab; Ghalib, Raza; Khanam, Zakia; Mehdi, Sayed; Ali, Mohammed (2010). A novel antimicrobial agent from the leaves of *Peltophorum vogelianum* (Benth.). *Natural Product Research*, 24(13), 1268-1273. <https://doi.org/10.1080/14786410903387688>
- Pérez, Alexander; Rojas, Johanna; Chamorro, Leonardo; Pérez, Katy (2011). Evaluación de la actividad antifúngica de *Melia azederach* sobre aislados de *Colletotrichum* spp. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 3(2), 309-320. <https://doi.org/10.24188/recia.v3.n2.2011.400>
- Peng, C.; Dong, C.; Hou, Q.; Xu, C.; Zhao, J. (2005). The hydrophobic surface of PaAMP from pokeweed seeds is essential to its interaction with fungal membrane lipids and the antifungal activity. *FEBS letters*, 579(11), 2445-2450. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.046>
- Qadir, Umer; Paul, V. I.; Ganesh, P. (2015). Preliminary phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of *Anamirta cocculus* (Linn.) seeds. *Journal of King Saud University-Science*, 27(2), 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.04.004>
- Quiroga, Emma; Sampietro, Antonio; Vattuone, Marta (2001). Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(1), 89-96.

- Ren, Jiaqiang; Tian, He (2007). Thermally stable merocyanine form of photochromic spiropyran with aluminum ion as a reversible photo-driven sensor in aqueous solution. *Sensors*, 7(12), 3166-3178. <https://doi.org/10.3390/s7123166>
- Rojas-Quintero, Juan (2011). *Exploración del efecto de altas diluciones sucusionadas (medicamento homeopático) de Phytolacca americana sobre linfocitos humanos. Fase III* (tesis de maestría). Universidad Nacional, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/5316/>
- Rondón, María; Moncayo, Shirley; Cornejo, Xavier; Santos, Jaime; Villalta, David; Siguencia, Rosa; Duche, Jodiea (2018). Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University-Science*, 30(4), 500-505. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.03.009>
- Salari, S.; Bakhshi, T.; Sharififar, F.; Naseri, A.; Almani, P. (2016). Evaluation of antifungal activity of standardized extract of *Salvia rhytidea* Benth. (Lamiaceae) against various *Candida* isolates. *Journal de Mycologie Medicale*, 26(4), 323-330. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.06.003>
- Samson, Robert; de Boer, Enne (1995). *Introduction to Food-borne Fungi*. Wageningen, Netherlands: Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures. (pp. 33-112).
- Sanabria, A. (1983). *Análisis Fitoquímico Preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae*. Bogotá, D.C: Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia.
- Sanabria, Antonio; Mantilla, José (1986). Actividad antifúngica de plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 15(1), 16-22.
- Shao, F.; Hu, Z.; Xiong, Y.; Huang, Q.; Wang, C.; Zhu, R.; H.; Wang, D. (1999). A new antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*: characterization, amino acid sequence and cDNA cloning. *Biochimica Biophysica Acta* (1430(2), 262-268. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00013-8)
- Sharapin, Nikolai (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogotá, Colombia: Convenio Andrés Bello. Subprograma X CYTED.
- Singh, Balwinder; Singh, Jatinder; Singh, Narpinder; Kaur, Amritpal (2017). Saponins in pulses and their health promoting activities: a review. *Food Chemistry*, 233, 540-549. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.161>
- Skoog, Douglas Arvid (1998). *Principios de análisis instrumental*, 5º ed.; Madrid, España: Ed. McGraw-Hill, 409- 461.
- Teichmann, Anja; Dutta, Paresh; Staffas, Anders; Jägerstad, Margaretha (2007). Sterol and vitamin D2 concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: effects of UV irradiation. *LWT-Food Science and Technology*, 40(5), 815-822. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.04.003>
- Treviño, J.; Rodríguez, R.; Verde, M.; Morales, M.; Garza, R.; Rivas, C.; Oranday, A (2012). Actividad antifúngica de *Stenocereus pruinosus* y *Echinocereus stramineus*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(1), 42-48.
- Taylor; David (citado el 4 de agosto de 2017). *USDA Forest Service (United States Department of Agriculture Forest Service): Plant of the Week. American Pokeweed (Phytolacca americana L.)*. Recuperado de https://www.fs.fed.us/wildflowers/plant-of-the-week/phytolacca_americana.shtml

- Wang, Shuzhen; Zheng, Yongliang; Xiang, Fu; Li, Shiming; Yang, Guliang (2016). Antifungal activity of Momordica charantia seed extracts toward the pathogenic fungus *Fusarium solani* L. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(4), 881-887. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.03.006>
- Yang, Wei-Hsiung; Wiczorck, Maciej; Allen, Matt; Nett, Terry (2003). Cytotoxic activity of gonadotropin- releasing hormone (GnRH)-pokeweed antiviral protein conjugates in cell lines expressing GnRH receptors. *Endocrinology*, 144(4), 1456-1463. Recuperado de <https://doi.org/10.1210/en.2002-220917>