



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

**“PERFIL ANTIOXIDANTE DE FLORES COMESTIBLES ENDÉMICAS DE
MÉXICO Y SU USO EN LA FORMULACIÓN DE TINTURAS”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

P R E S E N T A

MÉDICO CIRUJANO ISIS LÓPEZ AGAMA

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Margarita de Lorena Ramos García

CODIRECTORA

Dra. Rosa Isela Ventura Aguilar

COMITÉ TUTORAL

Dra. Silvia Baños Bautista

Dra. Azucena Salazar Piña

CUERNAVACA MORELOS OCTUBRE DE 2019

AGRADECIMIENTOS

Cada vez que agradezco a Dios y a la vida, esta me da nuevos motivos para decir gracias.

A las doctoras Silvia, Margarita y Rosa Isela, por el apoyo, paciencia y constancia en este proceso de intenso aprendizaje para mí, en una rama ajena a mi formación profesional y que con sus enseñanzas lograron que me apasionara.

Dra. Rosa Isela por las clases en el cubículo, sus múltiples enseñanzas, las bromas, la exigencia al mil, por la dedicación, apoyo y amistad.

Dra. Margarita por introducirme en otra faceta del conocimiento del cual no tenía idea que fuese tan amplio, me dejó una grata experiencia.

Dr. Zamilpa por su empeño y apoyo al colaborar en este proyecto que nos permitió tener las pláticas que me aportaron tanto.

A mis maestros de la facultad de nutrición, a los compañeros de clase y del laboratorio que me apoyaron Mta. Mónica, Mta. María Luisa, Jona, Artur, Ixchel por su cariño y ánimo.

DEDICATORIAS

A mi esposo:

Gracias por compartir conmigo tu tiempo y espacio, pero sobre todo por tu presencia, por los buenos ratos y también por los malos. Eres el mejor compañero de vida que pude haber elegido y ha valido la pena todo este tiempo juntos. Mil gracias Alcantar por los ánimos cuando sentía no lograrlo, por los no te preocupes todo está bien.

A mis hijos:

Octavio y Sebastian por apoyarme de manera incondicional, en mi crecimiento personal y profesional, son mi fortaleza, mi razón de estar y seguir en esta vida.

A mis padres y hermano:

Edith y Octavio, la palabra gracias se queda corta para expresar mi agradecimiento por haberme ayudado a ser quien soy hoy día, el amor que les tengo está siempre presente.

A mi hermano Octavio / Tavote por insistir en la realización de este proyecto el cual finalmente está concretándose.

RESUMEN

Las flores comestibles de calabaza, cempasúchil y colorín contienen vitaminas, minerales y antioxidantes, por lo que pueden ser usadas en el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas. Estas se consumen en fresco y se deterioran (sensorial, nutricional y funcional) rápidamente por las condiciones climáticas y microorganismos. El objetivo fue evaluar el perfil antioxidante de pétalos de flor de calabaza, cempasúchil y colorín no tratadas térmicamente (NTT) y deshidratadas, y la estabilidad de estos compuestos en tinturas. Se cuantificó el contenido de agua, fenoles, flavonoides totales y la capacidad antioxidante en pétalos de flores. Se elaboraron tinturas con las flores y alcohol de caña, y se evaluó la estabilidad de sus compuestos antioxidantes durante 270 d. Además se identificó y cuantificó por HPLC los flavonoides en tinturas de pétalos de flores NTT. Los datos se analizaron con un ANOVA y comparación de medias de Tukey. Los resultados mostraron que la flor de calabaza tuvo el mayor contenido de humedad (95.5%). Las flores de calabaza y colorín NTT presentaron el mayor contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante y un comportamiento opuesto se observó en la de cempasúchil, en la cual las muestra deshidratadas presentaron las mejores características. Por otra parte, en las tinturas los compuestos antioxidantes se comportaron distinto. El mayor contenido de fenoles totales se cuantificó alrededor de los primeros 60 d de almacenamiento ($8-85.5\mu\text{g}^{-1}$ EAG) y posterior a este periodo hubo una reducción considerable de estos ($0.3-0.9\mu\text{g}^{-1}$ EAG). El contenido de flavonoides y capacidad antioxidante fue similar durante su almacenamiento. Las tinturas de cempasúchil tuvieron de 3 a 5 veces más flavonoides y hasta 70 % más capacidad antioxidante. En conclusión los compuestos antioxidantes de las flores se conservaron a través de las tinturas, siendo la de cempasúchil la más estable por 270 d.

ABSTRACT

Edible flowers of zucchini, Mexican marigold and colorin contain vitamins, minerals and antioxidants, so they can be used in the treatment of chronic degenerative diseases. These are consumed in fresh and are quickly spoilage (sensory, nutritional and functional) by weather conditions and microorganisms. The objective was to evaluate the antioxidant profile of zucchini flower petals, Mexican marigolds and colorin non-thermally treated (NTT) and dehydrates, and the stability of these compounds in tinctures. The water content, phenols, total flavonoids and antioxidant capacity in flowers petals were quantified. Tinctures were elaborated using flowers petals and cane alcohol, and the stability of their antioxidant compounds were evaluated during 270 d. In addition, flavonoids by HPLC in tinctures of flower petals NTT were identified and quantified. Data were analyzed through an ANOVA, and Tukey mean comparison. The results showed that zucchini flower had the highest humidity content (95.5%). Zucchini and colorin flowers NTT presented the highest content of total phenols, flavonoids and antioxidant capacity. Conversely behavior was observed in Mexican marigolds flowers; in which dehydrated samples presented the best features. On the other hand, antioxidant compounds of tinctures behaved differently. The highest content of total phenols was quantified around 60 d of storage ($8-85.5 \mu\text{g}^{-1}$ EAG) and after this period there was a reduction considerable of theme ($0.3-0.9 \mu\text{g}^{-1}$ EAG). Flavonoids and antioxidant capacity content were similar during storage. Tinctures of Mexican marigolds had from three to five times more flavonoids and up to 70% more antioxidant capacity. In conclusion, antioxidant compounds of the flowers were preserved through tinctures, being Mexican marigolds the most stable for 270 d.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	X
ABREVIATURAS.....	XI
SIMBOLOGIAS	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades de las flores comestibles	3
2.2 Características botánicas, nutricionales y generalidades de la flor de calabaza, cempasúchil y colorín	4
2.2.1 Flor de Calabaza	4
2.2.2 Flor de cempasúchil	6
2.2.3 Flor de colorín o zompante	8
2.3 Importancia socioeconómica y propiedades medicinales de las flores de calabaza, cempasúchil y colorín	10

2.4 Compuestos antioxidantes en flores comestibles	11
2.4.1 Fenoles totales	18
2.4.2 Flavonoides totales	20
2.4.2.1 Características de los flavonoles como flavonoides mayoritarios en flores de calabaza, cempasúchil y colorín.....	24
2.4.2.2 Cromatografía de líquidos como técnica para la identificación de flavonoides.....	24
2.5 Métodos para medir la capacidad antioxidante.....	25
2.6 Las tinturas como método de conservación de compuestos antioxidantes de las flores comestibles	28
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. OBJETIVOS	30
4.1 General	30
4.2 Específicos	30
5. HIPÓTESIS	31
6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	31
6.1 Manejo del experimento.....	31
6.2 Contenido de agua en flores de calabaza, cempasúchil y colorín	32
6.3 Compuestos antioxidantes en los pétalos de la flor de calabaza, cempasúchil y colorín	32

6.3.1 Fenoles totales	32
6.3.2 Flavonoides totales	33
6.3.3 Capacidad antioxidante.....	33
6.4 Elaboración de tinturas	34
6.5 Evaluación del contenido de compuestos antioxidantes en las tinturas.....	34
6.5.1 Fenoles totales.....	34
6.5.2 Flavonoides totales	34
6.5.3 Capacidad antioxidante.....	35
6.6 Aislamiento y caracterización por cromatografía en capa fina de flavonoides mayoritarios en tinturas de los pétalos de flor NTT de calabaza, cempasúchil y colorín	35
6.6.1 Cuantificación de los flavonoides identificados por HPLC.....	37
6.6.2 Curvas de calibración para cuantificación de flavonoides por HPLC	37
6.6.3 Análisis Estadístico	38
7. RESULTADOS	38
7.1 Cuantificación del contenido de agua en pétalos de flores NTT y deshidratadas	38
7.2 Caracterización de flores NTT y deshidratadas	39
7.3 Caracterización de las tinturas.....	40
7.3.1 Fenoles totales.....	40
7.3.2 Flavonoides totales	42

7.3.3 Capacidad antioxidante.....	44
7.3.3.1 Separación e identificación química de los flavonoides mayoritarios.....	46
7.3.3.2. Análisis cuantitativo de los flavonoides identificados.....	50
8. DISCUSIÓN	51
9. CONCLUSIONES	54
10. ANEXOS	56
10.1 Selección de los pétalos de las flores de calabaza, cempasúchil y colorín.....	56
10.2 Curvas estándar de glucósido de quercetina, rutina, lucenina, miricetina y glucósido de miricetina.....	56
11. REFERENCIAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor masculina y femenina de calabaza.	6
Figura 2. Flor de cempasúchil con diferentes pigmentaciones.....	7
Figura 3. Morfología de las lígulas de <i>Tagetes erecta</i>	7
Figura 4. <i>Erythrina americana</i> Mill.....	9
Figura 5. Estructura de algunos carotenoides cíclicos y acíclicos presentes en flores de cempasúchil	15
Figura 6. Participación de los carotenoides como precursores de la vitamina A	17
Figura 7. Erythroidina alcaloide no aromático	18
Figura 8. Estructura básica y tipos de flavonoides	22
Figura 9. Estructura del DPPH	27
Figura 10. Contenido de fenoles totales en tinturas	41
Figura 11. Contenido de flavonoides totales en tinturas.....	43
Figura 12. Porcentaje de inhibición en tinturas.....	45
Figura 13. Placas cromatográficas de las tinturas.....	47
Figura 14. Flavonoides encontrados en la tintura de flor de calabaza	48
Figura 15. Flavonoides encontrados en la tintura de flor de cempasúchil fresca	49
Figura 16. Estructura de la lucenina identificado en la tintura preparada con flor de colorín fresca.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antioxidantes producidos por los seres humanos	14
Tabla 2. Pigmentos predominantes en la flor de cempasúchil	16
Tabla 3. Fuentes dietéticas de flavonoides	21
Tabla 4. Peso del material vegetal	38
Tabla 5. Caracterización de flores comestibles NTT y deshidratadas.....	39
Tabla 6. Concentración de flavonoides en tinturas elaboradas con flor de calabaza, cempasúchil y colorín	50

ABREVIATURAS

ABTS ^{•+}	Acido 2, 2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AlCl ₃	Tricloruro de aluminio
ARN	Ácido ribonucleico
CAT	Catalasa
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EROS	Especies reactivas de oxígeno
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (por sus siglas en inglés)
FRAP	Poder antioxidante reductor del hierro
GPx	Glutación peroxidasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés)
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
O ₂	Oxígeno
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
SAGARPA	Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural
SARH	Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos
SOD	Superóxido dismutasa
TPTZ	Trotripiriltriazina
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

UV Ultravioleta

SIMBOLOGIAS

%	porcentaje
μl	microlitros
μg	microgramos
g	gramos
mL	mililitros
cm	centímetros
d	días
dl	decilitros
EAG	unidades expresadas en ácido gálico
h	horas
ha	hectárea
$\text{Kcal}\cdot\text{g}^{-1}$	kilocaloría por gramo
m	metros
$\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$	miligramos por decilitro
$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	miligramos por kilogramo
min	minutos
nm	nanómetros
ppm	partes por millón

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el consumo de flores es reducido a pesar de que su ingesta data desde hace miles de años¹. Las clases sociales más importantes en la cultura romana, griega y persa las incluían en su alimentación, ya que se pensaba que las flores otorgaban a los platos una inmensa gama de sabores, olores y colores². Las flores más utilizadas eran las rosas, caléndulas y claveles, para preparar salsas y bebidas refrescantes. Por otra parte, las culturas de Mesoamérica domesticaron, cultivaron, clasificaron y asignaron nombres a diversas hojas, flores, frutos, así como gomas y resinas que consumían en diversos productos³. Estas se utilizaban con frecuencia como elementos ornamentales, en ceremonias y festividades, o como elemento decorativo en vestidos, pinturas, grabados, etc.

Dentro de las flores que más se utilizaban en la antigüedad y algunas otras que actualmente se emplean para los usos antes mencionados y como alimento, destaca la flor de calabaza (*Cucúrbita pepo*), cempasúchil (*Tagetes erecta*), colorín (*Erythrina americana*), maguey (*Agave leprelliana*) y manzanilla (*Matricaria recutita*), entre otras⁴. Su consumo como alimento se debe a que se ha reportado que poseen minerales (calcio, fósforo, potasio, magnesio, azufre, etc.), proteínas, ácido fólico, vitaminas, ácidos oleico y linoléico, entre otros⁵.

Además, son fuente de antioxidantes naturales, ya que contienen sustancias biológicamente activas como los ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y aceites esenciales¹ los cuales actúan como antioxidantes. Los antioxidantes son moléculas que previenen o retardan la acción de los agentes oxidantes (rayos UV, contaminación ambiental, sustancias tóxicas producidas por el metabolismo). A pesar de su efecto protector, no los produce el organismo en cantidades suficientes para protegerlo, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos⁶. En este sentido es importante destacar que las flores

son una fuente de antioxidantes tal como lo reportó Meneses-Reyes (2008)⁷ en lígulas de manzanilla. Al respecto, Buitrago (2016)⁸ también informó sobre los efectos antiúlcerosos, antipiréticos y cardiotónicos de la vismia (*Vismia hypericaceae*) asociados con sus propiedades antioxidantes.

El consumo de antioxidantes confiere beneficios a nivel cardiovascular y en el sistema inmunológico, entre otros. Por ejemplo, la administración de vitamina C ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) reduce el peso corporal, la grasa visceral, niveles plasmáticos de glucosa, insulina, ácidos grasos libres, el colesterol oxidado y los niveles de leptina en adultos. Asimismo, Nagao et al. (2007)⁹ reportaron que después de consumir $583 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ de té verde durante tres meses se observó una disminución del peso corporal y en las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Además, Sergent (2012)¹⁰ utilizó té verde (*Camelia sinensis*), uva (*Vitis vinífera*) y roble (*Quercus robur*) para inhibir la lipasa pancreática y con ello prevenir la obesidad por la gran cantidad de polifenoles y flavonoides que estas flores poseen. Por último, Cetkovuc (2004)¹¹ reportó el uso de cempasúchil (*Tagetes erecta*) como antiinflamatorio y antiviral.

A pesar de sus múltiples propiedades, las flores tienen el inconveniente de no estar disponibles durante todo el año y son altamente perecederas. De manera que, el desarrollo de productos como las tinturas utilizadas en el área médica representa una alternativa para el aprovechamiento de las flores por tiempos prolongados. Las tinturas se definen como la extracción alcohólica de los principios activos de vegetales para la obtención de una solución estable¹². Bermejo de Zaa (2014)¹³ reportó la diversidad de metabolitos secundarios en la flor de cinamomo (*Melia azedarach*) y la estabilidad de sus tinturas (en soluciones hidroalcohólicas) después de 6 meses de almacenamiento. Además, Vizoso, (2002)¹⁴ demostró que los extractos etanólicos de pasiflora (*Passiflora incarnata*) no causan genotoxicidad. En coincidencia con lo antes mencionado, la presente investigación sugiere el desarrollo de tinturas de pétalos de flor de calabaza,

cempasúchil y colorín, y la evaluación de su contenido de compuestos antioxidantes.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de las flores comestibles

En las culturas precolombinas las flores eran consideradas como un símbolo ligado a las artes.¹⁵ Además, eran consumidas tanto por sus propiedades medicinales como por su aporte culinario. Los indígenas, consumían principalmente la flor de calabaza, de maguey, de nopal, del tule, de frijol y la flor de colorín⁹⁴, las cuales son importantes por su contenido de antioxidantes y carotenoides, así como por sus propiedades sedantes y la presencia de alcaloides^{17,18}. También, consumían el tule, frijol, amaranto, biznaga, flor de calabaza y cempasúchil, las cuales contienen flavonoides según lo reportado por Navarro-González et al. (2015)¹⁹ y la flor de chipilín, por mencionar algunas. No obstante, existe un amplio número de flores que aún no han sido estudiadas y en consecuencia no son aprovechadas como alimento o por sus propiedades medicinales.

Es importante mencionar que a pesar de que las flores pueden ser una alternativa alimenticia para quienes buscan una dieta saludable, por su alto contenido de agua (superior al 80%) y su bajo nivel calórico, no todas se pueden consumir. Esto se debe a que en algunas flores están presentes compuestos tóxicos, que pueden provocar diarrea, vómitos, alergias, convulsiones, parálisis e incluso la muerte. Además, es necesario indicar que para que una flor pueda ser comestible requiere haberse producido de manera orgánica, libre de pesticidas, herbicidas y fertilizantes orgánicos, libre de metabolitos tóxicos producidos de manera natural y

ser inocuas¹. Se calcula que alrededor del mundo existen más de 250 especies de flores comestibles; sin embargo no todas se consumen debido a que se desconocen sus propiedades funcionales, en consecuencia solamente un pequeño grupo está disponible en el mercado para su comercialización y consumo. Dentro de los compuestos de mayor interés presentes en las flores, se encuentran los antioxidantes, cuya ingesta contribuye a la prevención de enfermedades cardiovasculares²⁰. Además, Wanga (2016)²¹ indicó que los antioxidantes suprimen o reducen el estrés oxidativo al aumentar la actividad de la enzima superóxido dismutasa sérica, glutatión peroxidasa y reducir la concentración de malonaldehído, comportamiento que se observó al evaluar extractos acuosos de flores comestibles de madreselva (*Lonicera japónica*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), magnolia (*Magnolia officinalis*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*).

2.2 Características botánicas, nutricionales y generalidades de la flor de calabaza, cempasúchil y colorín

2.2.1 Flor de Calabaza

El nombre de la flor de calabaza proviene del náhuatl “ayoxóchilt“(calabazas indias) y su consumo en México data desde la época prehispánica. Es una planta mesoamericana por excelencia de 6.27 ± 2.07 m de largo. La producción de flor de calabaza es estacional, comienza a finales de la primavera y termina a principios de otoño²². Las raíces son de tipo fibroso, de tallo rígido, herbáceo, redondo y cubierto de pequeñas espinas; las hojas son anchas y ovaladas de 20 a 30 cm de largo con o sin manchas blancas o plateadas. Las flores son monopétalas, actinomorfas, unisexuales (flores femeninas y masculinas en la misma planta), de un llamativo color amarillo, siendo las últimas de interés en la cocina mexicana.

Las flores masculinas se desarrollan sobre pedicelos de 6 a 25 cm de largo y el color varía de naranja a amarillo siendo los carotenos como la zeaxantina, flavoxantina y la criptoxantina, los responsables de su coloración²³. Mientras que, las flores femeninas se desarrollan en pedicelos robustos de 2 a 5 cm de largo y nacen en la misma axila que las flores masculinas²⁴ (Figura 1).

Las hojas, tallos y flores de calabaza se consume como legumbres^{4,25} y pueden utilizarse en una amplia gama de platillos como ensaladas, aderezos, sopas, quesadillas con tortillas de maíz o de trigo rellenas con queso derretido²⁶, en la preparación de crepas en la cocina francesa y en pasta en la cocina italiana. Además el color amarillo brillante, la textura suave y el sabor delicado, ligeramente dulce de las flores de calabaza las han convertido en un ingrediente favorito de platillos exóticos en países como Estados Unidos, Europa y Asia²⁷.

Desde el punto de vista de su composición, la flor de calabaza contiene minerales, vitaminas como la B1 y B2, ácido fólico y aminoácidos esenciales y compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico, polifenoles y carotenoides^{28,26,29}. De acuerdo con Alfonso (2004)³⁰, 100 g de flor de calabaza aportan 90% de agua, 24.26% de proteína, 15.42% de fibra, 47g de calcio, 86mg de fósforo y 67µg de retinol, composición que permite explicar sus propiedades diuréticas. Además, se encontró que los compuestos fenólicos de la flor de calabaza ($334.6\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) fueron mucho más altos que el contenido reportado para vegetales como el repollo ($25\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$), el perejil ($20\text{-}40\text{ mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) y el apio ($94\text{ mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$)³¹. Los compuestos fenólicos presentes en la flor de calabaza tienen la desventaja de que se pierden en un 21% después de una semana de almacenamiento a temperatura ambiente, asociado a la ausencia de una cutícula que los proteja de las condiciones ambientales.

La mayoría de las flores comestibles utilizadas en México se recolectan y consumen localmente durante el período de floración y solo la flor de calabaza

tiene una gran demanda durante todo el año. Su corta vida útil es el factor principal que limita su comercialización, debido a su tasa respiratoria alta²³.



Figura1. Flor masculina (A) y femenina (B) de calabaza. (Santos, 2012)³²

2.2.2 Flor de cempasúchil

La palabra cempasúchil proviene del vocablo náhuatl “cempoalxóchitl” que significa flor de las cuatrocientas vidas. Esta flor pertenece a la familia Asteráceas y es originaria de México, en donde dependiendo la región de origen, es conocida como apátsicua, cempaxúchil, cempazúchil, cempasúchitl, cimpual, zempoalxóchil, flor de muerto, x’pujuc. Asimismo, esta flor pertenece al género *Tagetes* que está formado por aproximadamente 60 especies, de las cuales 30 se encuentran en diversas regiones de México en donde se le da un uso ceremonial, ornamental y medicinal. Esta es una planta anual, que puede llegar a medir hasta 1.6 m de altura, es aromática, de tallos estriados y pubescentes hojas de hasta 20 cm de largo (Figura 2). Además, presenta inflorescencias, las cuales contienen flores individuales liguladas. Delgado (1997) ,³³ la describió como una planta ramificada y sus hojas presentan nervaduras con bordes. Se cultiva en Michoacán, Valle de México, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz y Morelos y las variedades más utilizados son la criolla, la Hawái y la Chilena. Esta planta se caracteriza por

poseer inflorescencias de tonos naranjas, amarillos y rojos (Figura 2), las cuales tienen capítulos con numerosas flores individuales (60-400) y pueden o no tener lígulas o pétalos. Los pétalos pueden ser lisos o rugosos como lo describe Quintanilla (2015)³⁴ (Figura 3).



Figura 2. Flor de cempasúchil con diferentes pigmentaciones (del Villar-Martínez., 2007)³⁵.

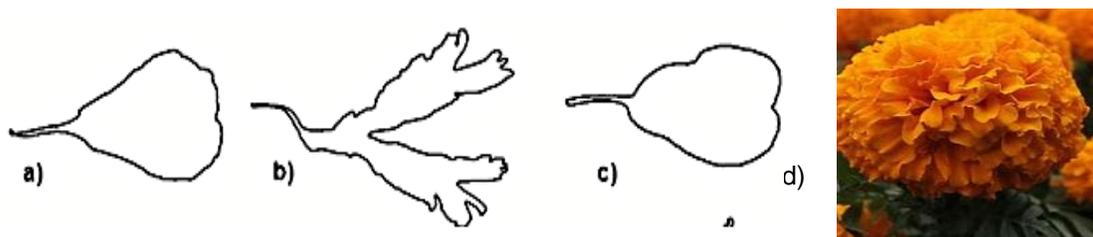


Figura 3. Morfología de las lígulas de la flor de cempasúchil: A) pétalo simple lis B) pétalo doble rugoso; C) pétalo simple liso y D) flor de cempasúchil (Quintanilla et al., 2015)³⁴.

Según lo reportado por Navarro-González, (2015)¹⁹, desde el punto de vista nutricional, esta flor contiene $28.02\text{kcal}\cdot\text{g}^{-1}$ de flor, 83.39% de agua, 4.15% de carbohidratos, 1.32% de proteínas, 0.32% de grasas y minerales como sodio, cobre, potasio, magnesio, hierro calcio y zinc. Dentro de sus usos, la flor de

cepasúchil es ampliamente utilizada para la obtención de colorantes vegetales para el desarrollo de alimentos para consumo humano, tales como, la obtención de huevos con yema amarilla, coloración de sopas de pasta, piel y grasa amarilla de aves y reses, y para medicamentos.

En la industria médica se han desarrollado cápsulas de luteína, que es el carotenoide más abundante en la flor de ceapasúchil y al cual se le ha asociado con la prevención de enfermedades oculares como las cataratas y la degeneración macular. Esto se debe a que la luteína y la zeaxantina son los componentes principales de los pigmentos maculares y su aumento de estos compuestos limita la cantidad de oxígeno que penetra por las membranas y con ello se reduce el daño oxidativo³⁶. De igual manera, diversos autores han encontrado una relación directa entre la ingesta de xantófilas que son otro de los carotenoides más abundantes y la reducción en el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, particularmente el mamario y el pulmonar³⁵. Las propiedades biológicas de la planta afectan a diversos organismos al provocar una reducción en la producción de esclerocios, piretrinas y tiofenos, que son las sustancias vegetales responsables de los efectos contra insectos, gusanos, bacterias, virus, hongos, nematodos, ácaros e insectos, inclusive otras especies de plantas³⁷.

2.2.3 Flor de colorín o zompantle

El árbol de colorín debe su nombre al vocablo náhuatl "Tzonpanquáhuit" que significa planta de corales. Esta pertenece a la subfamilia Fabácea y comprende 115 especies distribuidas a través de las regiones tropicales del mundo; 25 de ellas se encuentran en México. El árbol puede medir de 4 a 5 m de altura, presenta una corona ramificada y sus ramas y tronco tienen espinas, y corteza de color café claro y lisa. Las hojas son alternas y trifoliadas, con tres folíolos puntiagudos y romboidales de 7 cm de ancho y 22 cm de largo. Las flores son

erectas, vistosas y cónicas, de color carmín y ligeramente onduladas; situadas en espigas terminales^{38,39,18} (Figura 4). De acuerdo con los reportes de García-Mateos (2001) ,⁴⁰ las flores aparecen a comienzos de la primavera. El nombre *Erythrina* como se denominó el género de esta planta, alude al color predominante de las flores, y se deriva del griego *erythros* que significa rojo. Este se utiliza como árbol ornamental, o de sombra en cultivos de café y cacao, como soporte de otros cultivos, como abono y como alimento para consumo humano. Bernardino-Nicanor et al. (2016)¹⁸ reportaron que la flor presenta un contenido de agua de 87.2%, 24.7% de proteínas, 57.5% de carbohidratos, 5.2 % de grasas, 9.8 % de fibra y 2.5 % de cenizas. Las flores son comestibles y a partir de ellas se preparan infusiones, a las cuales se atribuyen propiedades sedativas.



Figura 4. Flor de colorín (Soto-Hernández et al., 2012)³⁹.

2.3 Importancia socioeconómica y propiedades medicinales de las flores de calabaza, cempasúchil y colorín

México es uno de los principales consumidores y exportadores de flores de calabaza y cempasúchil. En el caso de la flor de calabaza y los calabacines es difícil obtener datos de su superficie sembrada y volumen de producción de manera independiente, ya que los clasifican dentro de una misma categoría. Además, aunque su cultivo está extendido por todo el mundo, su producción es en pequeñas parcelas y se destina para autoconsumo o mercados locales. De acuerdo con la FAO durante el período de 1995-1998 hubo una producción mundial de calabaza de 13.53 mil toneladas anuales y los países con mayor producción de calabaza son la India con 3 mil 300 toneladas, seguido por China y México que ocupa el séptimo lugar a nivel mundial con 325 mil toneladas (SARH, 1998).

Por otra parte, la flor de cempasúchil es ampliamente utilizada en la industria avícola, textil y farmacológica⁴¹. Esta flor tiene un amplio valor comercial debido a que es una fuente natural de xantofilas (Figura 5) pertenecientes al grupo de los carotenoides. Además debido a su gran contenido en carotenoides, sus extractos son utilizados como aditivo para el alimento de los pollos, como antioxidantes en células humanas, como aromatizantes en la industria de la perfumería, en la obtención de resinas, con fines ornamentales, e incluso se han realizado modificaciones genéticas de la planta para control de la maleza, como insecticida, nematocida, larvicida, atrayente o repelente de insectos^{42,43}. Con relación a su volumen de producción, SAGARPA reportó en el año 2015 una producción de 12 mil toneladas de cempasúchil, 421 mil 775 manojos y más de un millón 735 mil plantas. También es importante mencionar que se destinan aproximadamente 607 ha para este cultivo cuyo valor económico se estima en más de 68 millones de

pesos. Debido a su importancia económica y nutricional, se ha modificado genéticamente a fin de otorgarle mayor densidad de pétalos y darle una elevada concentración de pigmentos.

Respecto a la flor de colorín, esta se encuentra en los estados de Veracruz, Hidalgo Morelos, Guerrero, Puebla y Oaxaca, y es muy utilizada como árbol de sombra, alimento para animales y como ornamental. También se consume como alimento y como infusión, debido a sus propiedades antioxidantes ya que retardan el proceso de oxidación de lípidos y su actividad antimicrobiana¹⁸. En la medicina tradicional se emplea como laxante, diurético, expectorante, antiasmático y anti-malario. Los nativos de América del Sur utilizan extractos concentrados de estas especies como venenos de flecha, como antídoto contra la estrocnina o como un hipnótico, antiepiléptico y sedante⁵⁷. También, se ha observado que cuando el extracto alcohólico de semillas del colorín se suministró a perros en diferentes dosis se presenta un efecto similar que el de la tubocurarina. Adicionalmente, se han reportado que los alcaloides presentes en esta flor y sus compuestos fenólicos han sido usados como analgésicos y antiinflamatorios, que se pueden emplear en la prevención o tratamiento del cáncer, osteoporosis, diabetes mellitus, desordenes neurodegenerativos y cardiovasculares^{45,46}.

2.4 Compuestos antioxidantes en flores comestibles

En la actualidad causa impacto entre los consumidores el denominado “mercado de la salud” que cada día se expande en el mundo⁴⁷. Los consumidores de este grupo demandan alimentos funcionales, los cuales, se pueden describir como productos alimenticios naturales o industrializados que forman parte de la dieta y que además, aportan nutrientes y otros componentes bioactivos al ser humano⁴⁹. Los compuestos más utilizados para funcionalizar a un alimento son la fibra, las

vitaminas, los antioxidantes y los minerales. La incorporación de antioxidantes en un alimento o la conservación de los que posee se han convertido en un tema de interés, debido a que los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas, evitando la propagación de la reacción de oxidación⁶¹. Al respecto, Patthamakanokporn (2008)⁵⁰ definió un antioxidante dietético como una sustancia que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano y que puede prevenir los efectos adversos de las EROS sobre las funciones fisiológicas normales de los seres humanos. Esto explica porque los antioxidantes se han utilizado principalmente para retardar la longevidad, la cual parece aumentar proporcionalmente con los niveles de antioxidantes de la dieta y con una reducción calórica, lo cual provoca una menor degradación de las mitocondrias, del metabolismo celular y del consumo de oxígeno.

Como parte del metabolismo de los seres humanos, el organismo dispone de una serie de sistemas de defensa para protegerse de una excesiva producción de radicales libres. Estas defensas engloban tanto sistemas endógenos que incluyen compuestos y enzimas como glutatión oxidasa y reductasa, catalasa y superóxido dismutasa (SOD), así como, los exógenos entre ellos la vitamina C, E y el β caroteno (Tabla 1). También participan minerales como el selenio, zinc, cobre y manganeso y los fitoquímicos como el ácido lipídico, resveratrol, catequinas y compuestos fenólicos; que a través de diferentes reacciones transforman las EROS o radicales libres, en moléculas menos perjudiciales⁵¹.

Los radicales oxidantes mejor conocidos como radicales libres son moléculas inestables de alta energía con electrones desapareados en sus órbitas exteriores, que tienden a reaccionar con otros compuestos, en especial con los ácidos grasos poliinsaturados, esto, debido a que las moléculas estables tienen electrones en parejas. Los radicales libres pueden encontrarse en el interior o en el exterior de las células o incluso diseminados por todo el organismo, dañando principalmente el tejido conjuntivo, proteínas, enzimas, lípidos, membranas celulares, fibras de

colágeno, ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), entre otros. Adicionalmente, estos compuestos también pueden ejercer daño sobre los leucocitos, favoreciendo con ello su activación anómala. Nuestro organismo bajo el curso normal de su metabolismo, produce radicales libres y aunque pueden ser utilizados como armas para destruir virus y bacterias, lamentablemente cuando son generados en cantidades excesivas, su energía extremadamente alta puede dañar los tejidos normales⁵².

La mayor parte de las enfermedades que se presentan en la población a nivel mundial, tienen una gran relación con deficiencias nutricionales y la acción de las sustancias oxidantes en su patogénesis. De acuerdo con Núñez (2011)⁵³ se han estudiado alrededor de 100 enfermedades y su relación con el desbalance del sistema oxidativo, entre ellas las enfermedades cardiovasculares, gástricas, respiratorias, neurológicas, del sistema endocrino y el cáncer. Dentro de estas enfermedades, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el colesterol parecen representar la principal causa de la aterosclerosis, ya que pueden ser citotóxicas a las células endoteliales y bajar la motilidad del tejido macrófago. Sin embargo, esta patología puede ser retardada o disminuida a través del consumo de vitamina E que es transportada por las LDL y el colesterol. En el caso de la diabetes los posibles mecanismos de los antioxidantes se relacionan con la inhibición de la digestión de los carbohidratos en el intestino, principalmente la glucosa, de la cual también se modula su liberación por el hígado. Los antioxidantes podrían también estimular la secreción de insulina en el páncreas y activar los receptores de la misma y de alguna manera activar la recaptura de glucosa en el tejido blanco para la hormona.

Respecto al cáncer se ha reportado que los radicales libres afectan el ADN ocasionando mutaciones, que en su momento se transforman en células cancerosas. En el caso del cáncer de mama, aumenta la evidencia de que esta enfermedad se asocia con los genotipos humanos más susceptibles al daño por el

estrés oxidativo, sin embargo, su incidencia y severidad puede modificarse a través del consumo de frutas, vegetales y flores comestibles como una alternativa. De igual manera en algunas zonas del cerebro ocurre la disminución de metales de transición ($\text{Fe}^{+2} \rightarrow \text{Fe}^{+3}$) propias del efecto oxidativo, así como el metabolismo de la ruta del glutatión, lo cual agrava las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, Alzheimer u otras del sistema neurológico y los antioxidantes pueden neutralizar el exceso de radicales libres durante la actividad oxidativa del organismo, reduciendo con ello la severidad de estos padecimientos⁵⁴.

Tabla 1. Antioxidantes endógenos y exógenos producidos por los seres humanos.

Origen	Antioxidante	Acción
Exógenos		
	Vitamina E	Neutraliza al oxígeno singlete Captura radicales libres hidróxilo
	Vitamina C	Neutraliza peróxidos
	Beta-carotenos	Neutraliza el oxígeno singlete
	Flavonoides	Captura O_2
	Licopenos	Regenera a la forma oxidada de la vitamina E
Endógenos		
	Enzimáticos	Cofactor
	Superóxido dismutasa (SOD)	Cobre,sodio,manganeso
	Catalasa (CAT)	Hierro
	Glutatión peroxidasa (GPx)	Selenio
	No enzimáticos	
	Glutatión	Barrera fisiológica
	Coenzima Q	Transportadores de metales
	Ácido Tióctico	(Transferrina y Ceruloplasmina)

Fuente: Venéreo (2002)⁶.

La flor de calabaza es una fuente de carotenoides como fue demostrado por Seroczynska (2006) ⁵⁵ quien reportó un contenido de 18.8 mg·100g⁻¹ y de 13.4 mg·100 g⁻¹ para el β-caroteno en flores de flor de calabaza (*Cucúrbita máxima*), el cual fue superior al que se cuantificó en la pulpa de la calabaza (8.9 y 6.1 mg 100g⁻¹ para carotenoides totales y β -caroteno, respectivamente).

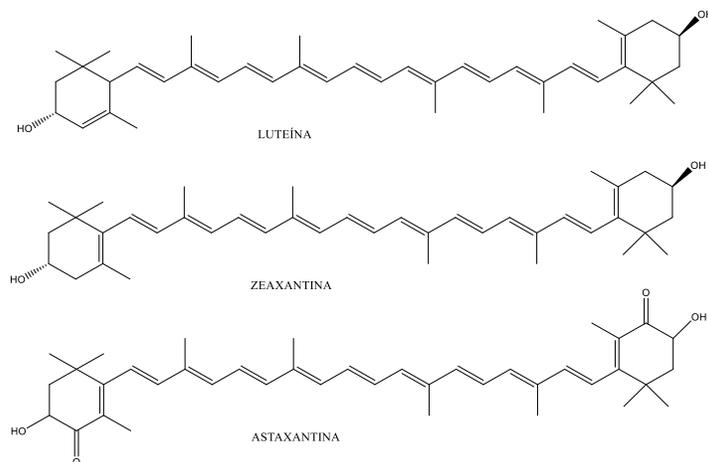


Figura 5. Estructura de algunos carotenoides cíclicos y acíclicos presentes en flores de cempasúchil (Del Villar-Martínez, 2007)³⁵.

Una composición diferente de antioxidantes se observó en la flor de cempasúchil. Sobre el tema, Rivera (2011)⁵⁶ reportó que los principales pigmentos (xantofilas) de la flor de cempasúchil eran la luteína (64.1%), anteraxantina (31.1%) y criptoxantina (3.5%) y los carotenos (0.4%) como el α-caroteno y β-caroteno (Tabla 2). A nivel comercial, estos pigmentos se extraen con disolventes orgánicos, los cuales forman oleorresinas que al ser saponificadas pueden liberar xantofilas^{57,42}.

Tabla 2. Pigmentos antioxidantes predominantes en la flor de cempasúchil

Pigmentos	Contenido (%)
Luteína	64.1
Anteróxantina	31.1
Criptoxantina	3.5
Carotenos β y α	0.4

Fuente: Rivera (2011)⁵⁶.

Adicionalmente, estos pigmentos antioxidantes se utilizan en el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas. Por ejemplo, la luteína se le ha asociado con la prevención de enfermedades oculares que se presentan a medida que avanza la edad de las personas, como son las cataratas. Igualmente, Pettersson (1995)⁵⁸ reportó que la luteína también participa en el transporte de tiroxina y retinol al combinarse con la proteína transtiretina. Otro de los antioxidantes que destaca en la flor de cempasúchil son los carotenoides (Figura 6), los cuales actúan como precursores de la vitamina A, siendo más activos los que tienen una configuración *trans* respecto a la configuración *cis*⁵⁹.

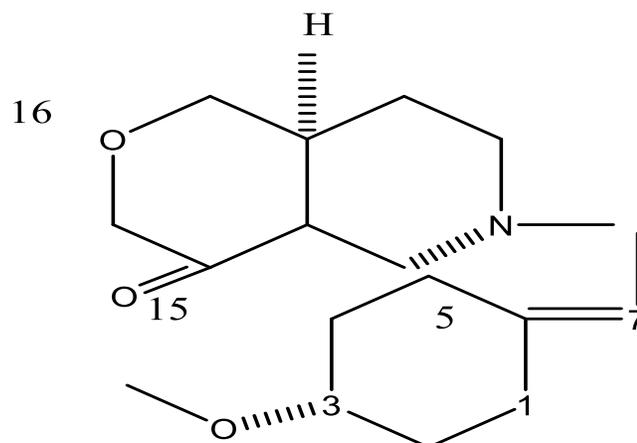


Figura 7. Erythroidina alcaloide no aromático (Soto-Hernández et al., 2012)³⁹.

Además de los compuestos antes mencionados, las flores comestibles contienen compuestos fenólicos, los cuales se detallarán en el siguiente apartado. Martínez-Valverde et al. (2000)⁴⁹ mencionaron que los compuestos fenólicos son considerados metabolitos secundarios de las plantas y existen más de 8000 compuestos distintos que están relacionados con la calidad sensorial y pigmentación de los alimentos de origen vegetal. Además, actúan como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes

2.4.1 Fenoles totales

Los compuestos fenólicos tienen un anillo de benceno con uno o más grupos hidroxilo y sus propiedades antioxidantes se deben a que estos pueden unirse a polímeros biológicos, tales como enzimas transportadores de hormonas y ADN, además, son capaces de quelar iones metálicos (Fe^{2-} , Cu^{2-} , Zn^{2-}), catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres⁴⁹. Estas propiedades le han conferido a los fenólicos, efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, ulcera estomacal y duodenal, posee acciones

antivirales y antialérgicas, así como propiedades anti-trombóticas y anti-inflamatorias⁶². Es importante mencionar que los seres humanos no pueden producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben asimilarlas a partir de la ingesta de alimentos⁵².

Los compuestos fenólicos se clasifican en 5 grupos: 1) ácidos fenólicos y ácidos fenil acéticos tales como el gálico y vainillíco, que son abundantes en las plantas superiores y los helechos, 2) ácidos cinámicos, como el cafeico y ferúlico, los cuales se encuentran presentes en forma de derivados; por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el ácido quínico y cumarinas e isocumarinas que se encuentran generalmente en forma de glucósidos, 3) lignanos y neolignanos que son metabolitos de bajo peso molecular formados por el acoplamiento oxidativo de unidades de hidroxifenilpropano, los cuales se unen mediante puentes de hidrógeno, 4) flavonoides, que son moléculas que comparten el esqueleto de los difenilpiranos formado por dos anillos benceno unidos a través de un anillo pirona, siendo esta estructura básica la que permite una multitud de sustituciones y variaciones dando lugar a flavonoles, flavona, flavononas, flavonoles (Figura 8), isoflavonas, catequinas y chalconas, y 5) taninos hidrolizables y no hidrolizables y esterificados de forma parcial o total con el ácido gálico o con el ácido hexahidroxidifenico formando galatoninas y elagitaninos⁶².

A pesar de la amplia clasificación de los compuestos fenólicos, destaca el grupo de los flavonoides. Esto se debe no solo a que son uno de los compuestos presentes en las flores de calabaza, cempasúchil y colorín, sino porque son importantes por su contribución en la salud y por su efecto protector en el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas^{49,1}.

2.4.2 Flavonoides totales

Los flavonoides son pigmentos naturales de color amarillo al rojo y se localizan en cloroplastos y cromoplastos, por lo que participan en el proceso de fotosíntesis, durante el cual catalizan el transporte de electrones. Además, estos compuestos controlan los niveles de auxinas, que son hormonas que regulan el crecimiento y la diferenciación celular de las plantas. Poseen actividad anti fúngica y bactericida, y al conferir coloración a las plantas, pueden contribuir a los fenómenos de polinización.

Los flavonoides se sintetizan a partir de los aminoácidos fenilalanina y tirosina y están ampliamente distribuidos en las plantas, frutas, flores y alimentos procesados⁶³ como se muestra en la Tabla 3. Estos son compuestos de bajo peso molecular que pertenecen al grupo más importante dentro de los fenólicos. Su estructura química incluye un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) y sus propiedades antioxidantes dependen de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química^{62,64}. Por sus características estructurales se clasifican en flavanos, flavonas, flavonoles y antocianinas (Figura 9), los cuales se unen a azúcares como la D- galactosa.

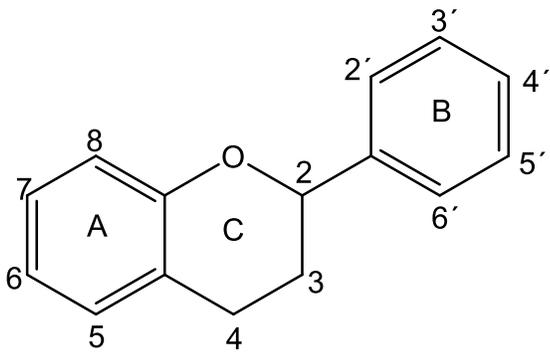
De acuerdo con Martínez-Valverde et al. (2000)⁴⁹ se recomienda una ingesta de 1 g de compuestos fenólicos de los cuales 100 mg deben corresponder a flavonas, flavonoles y agliconas, de acuerdo a un estudio realizado con consumidores estadounidenses. Así mismo, en el Reino Unido se sugirió el consumo de té como una de las principales fuentes de flavonoides en los adultos.

Tabla 3. Flavonoides que se obtienen de la dieta

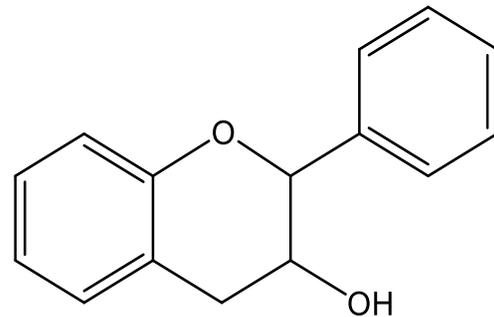
Compuestos	Alimentos
Flavonoides	Vegetales, vino, frutas, té
Ácidos cinámicos y sus derivados	Café, frutas, té, cereza
Cumarinas	Aceite de oliva, avena, especias
Chalconas	Frutas, vegetales coloreados, té, aceites comestibles
Taninos hidrolizables	Té, café vino

Fuente: Martínez-Valverde et al., (2000)⁴⁹.

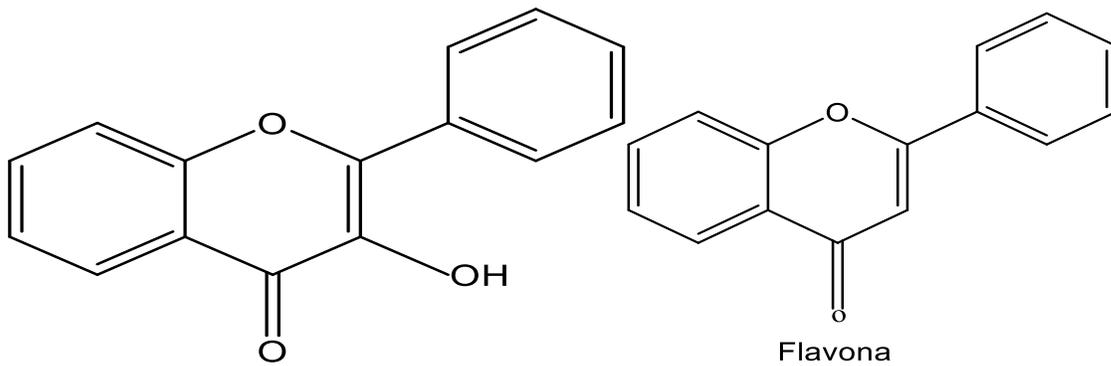
Además, los flavonoides poseen efectos protectores en patologías como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías y procesos inflamatorios regulados por la interleucina-8, mediador del piruvato mitocondrial uno y moléculas de adhesión intracelular, al prevenir la sobrerregulación de estos mediadores a través de la citocina, factor de necrosis tumoral α ^{65,62}. En estudios *in vitro* se ha demostrado que los flavonoides poseen efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos, esto ocurre por la presencia de quercetina que es capaz de inhibir la activación de las células estrelladas así como la producción de óxido nítrico, alterando las vías de expresión de proteínas celulares como la óxido nítrico sintetasa. Además, se ha comprobado su potente capacidad de inhibir la oxidación de LDL y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas. Martínez-Flórez et al. (2002)⁶² reportaron que específicamente el flavonoide quercetina que es uno de los más abundantes en la naturaleza y con mayor actividad biológica, actúa como antineoplásicos, cardiotónicos y antiulcéricos. Además, inhibe las células cancerígenas en colon, glándula mamaria, ovario y en la región gastrointestinal.



Flavonoide

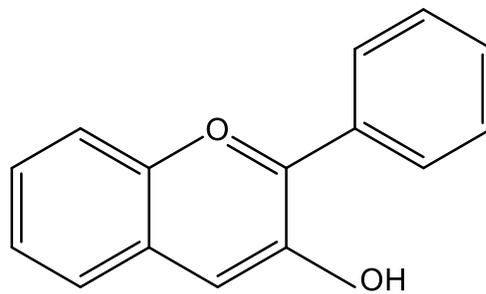


Flavanol



Flavonol

Flavona



Antocianidina

Figura 8. Estructura básica y tipos de flavonoides (Martínez-Flórez et al., 2002)⁶²

2.4.2.1 Características de los flavonoles como flavonoides mayoritarios en flores de calabaza, cempasúchil y colorín

Existen tres características principales que van a determinar la función antioxidante de los flavonoides. La primera, es la presencia de la estructura catecol u orto-hidroxi en el anillo B, la segunda, es la presencia de un enlace doble en la posición 2,3 y por último la presencia de grupos hidróxilo en la posición 3 y 5²⁰.

Por otra parte, los flavonoles se caracterizan por tener el grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C, en esta categoría se encuentra la quercetina, miricetina, rutina y lucenina que están presentes en diferentes flores, frutas, verduras y semillas. Estos flavonoides actúan como antineoplásicos según lo reportado por Vicente-Vicente (2013)⁶⁶. Particularmente, la miricetina posee propiedades antiinflamatorias y acción neuroprotectora en ensayos *in vitro* e *in vivo*⁵¹. Además la miricetina y el glucósido de miricetina tienen la propiedad de disminuir las LDL permitiendo que los macrófagos tengan una mejor absorción. De acuerdo con estas propiedades, Estrada-Reyes et al. (2012)⁶⁴ informaron que el consumo de miricetina se puede asociar con menores tasas de cáncer de próstata de acuerdo con un estudio realizado con población de Finlandia.

El efecto benéfico del consumo de flavonoides a partir de flores ya ha sido reportado por autores como Yi-Zhong (2005)⁶⁷ quien identificó quercetina en extractos de rosa (*Rosa chinensis*). La presencia de este compuesto permitió explicar las propiedades de este extracto como un potente inhibidor de α -prostaglandina, anti-inflamatorio y hemostático. Del mismo modo, Li et al. (2011)⁶⁸ reportaron que para pasiflora (*Passiflora edulis*) se han identificado varios flavonoides, de manera que el extracto de esta planta posee un efecto sedante o

bien un efecto ansiolítico en un modelo murino, administrando una dosis de 300 a 400 mg·kg⁻¹.

2.4.2.2 Cromatografía de líquidos como técnica para la identificación de flavonoides

Las técnicas cromatográficas en papel, en capa fina y de alta resolución (HPLC), entre otras han permitido la separación aislamiento, purificación e identificación de compuestos fenólicos y otros metabolitos no volátiles en los alimentos y productos hortofrutícolas^{69,70}.

La primera técnica cromatográfica fue ideada por el botánico ruso Mikhail Tswett en 1906, quien utilizó alúmina para separar los pigmentos coloreados de las hojas de las plantas. Se han propuesto muchas teorías con complejos modelos matemáticos para explicar el comportamiento de los solutos en las columnas cromatográficas.

Desde el primer cromatógrafo de Tswett hasta los cromatógrafos actuales se siguen utilizando los mismos fundamentos de la técnica, que consisten en una columna cromatográfica formada por un tubo de metal o vidrio que se llena con un sólido activo (adsorbente). Después la mezcla a separar es inyectada y posteriormente eluida con un disolvente o revelador. La serie de resultados obtenidos se denomina cromatograma o bien cuando el agente a detectar se trata con un agente químico para formar un color, se dice que la placa cromatográfica está siendo revelada. La combinación del disolvente, la muestra de interés y el adsorbente son llamados sistemas cromatográficos. Cada sistema cromatográfico está compuesto por una fase móvil (solvente) y una fase estacionaria (la columna). Si los componentes de la mezcla son analizados cuantitativamente, recibe el nombre de evaluación o cuantificación. Si el soluto es separado del adsorbente por lavado antes del análisis, entonces se le llama elución y al agente a ser

analizado se le llama eluyente, al líquido que sale de la columna se le nombra efluente.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido ampliamente utilizada para la separación de flavonoides según lo reportado por Navarro-González (2012)¹⁹ quienes determinaron la presencia de galotaninos, hexósido de miricetina y miricetina en la flor de cempasúchil. Del mismo modo Soto-Hernández (2012)³⁹ en la flor de colorín, hojas, semillas y raíces, detectaron alcaloides, flavonoides e isoflavonas como la erpogenina con propiedades antimicóticas y antibacterianas. También Alfaro et al. (2018)⁷¹ mediante cromatografía en capa fina encontraron los flavonoides rutina y quercetina en la flor de manzanilla (*Matricaria Chamomilla*).

2.5 Métodos para medir la capacidad antioxidante

Los métodos para determinar la actividad antioxidante de un alimento se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable en presencia de un antioxidante. La inhibición del daño oxidativo es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra⁷². Los distintos métodos difieren en el la cuantificación del agente oxidante, en el sustrato empleado, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción. Algunas de las técnicas utilizadas para cuantificar la actividad antioxidante son la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), el poder antioxidante reductor del hierro (FRAP) y la actividad antioxidante total utilizando el radical ABTS^{•+} (Acido2, 2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) o por el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), entre otras⁷³.

El ORAC es un método basado en la capacidad de captación de radicales peróxilo (ensayo de la deoxiribosa) y en la capacidad de absorción de radicales de oxígeno. Esta técnica usa como diana a una proteína llamada ficoeritrina, que por su sensibilidad permite evaluar las etapas iniciales de un proceso de oxidación. Este método consiste en medir la pérdida de fluorescencia de la muestra por efecto de la oxidación del radical peróxilo, ya que la presencia de antioxidantes retrasa el descenso de la fluorescencia, con lo cual es posible calcular la capacidad antioxidante de la muestra⁶¹.

FRAP se basa en la capacidad de reducción férrica, esta metodología consiste en medir el incremento en la absorbancia de una muestra a 593 nm cuando el complejo TPTZ-Fe⁺³ (Trotripiridiltriazina) se reduce a TPTZ-Fe⁺², observándose una coloración azul⁷⁴. De esta forma, la capacidad antioxidante que presentan los extractos de diferentes frutas, flores y vegetales se mide como la capacidad reductora del extracto. A través de esta técnica es posible evaluar la actividad antioxidante en muestras que contienen ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), ácido úrico, bilirrubina y compuestos polifenólicos como catequinas y otros flavonoides.

El radical ABTS^{•+} (Acido 2, 2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico)) se basa en la captación de distintos radicales libres generados a partir de ciertas moléculas orgánicas. La generación del radical ABTS^{•+} constituye la base de uno de los métodos espectrofométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El ensayo original de ABTS^{•+} se basa en la activación de la metil-mioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical cationico. Cuando este radical libre se encuentra en presencia de un antioxidante, ocurre una reducción del radical ferril-mioglobina, observándose una decoloración de la solución que contiene el radical libre. Para la cuantificación del contenido antioxidante de una muestra se utiliza una curva de calibración de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-

tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), el cual es un análogo de la vitamina E y es soluble en agua y la capacidad antioxidante es expresada como equivalentes al Trolox^{75,76}.

El método que utiliza el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) fue propuesto por Blois (1958), quien demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH• para aceptar un átomo de hidrógeno (H•) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula (DPPH•) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado (lo cual intensifica el color violeta típico del radical) sobre la molécula completa, por lo cual la molécula radical no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante, se neutraliza su propiedad de radical libre (Figura 10) y el color violeta se desvanece pasando a un color amarillo^{77,78}. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente a 517 nm después de 20 a 30 minutos de incubación⁷⁹. Una inhibición de por lo menos 50 % de la concentración de DPPH representa una buena actividad antioxidante en una muestra.

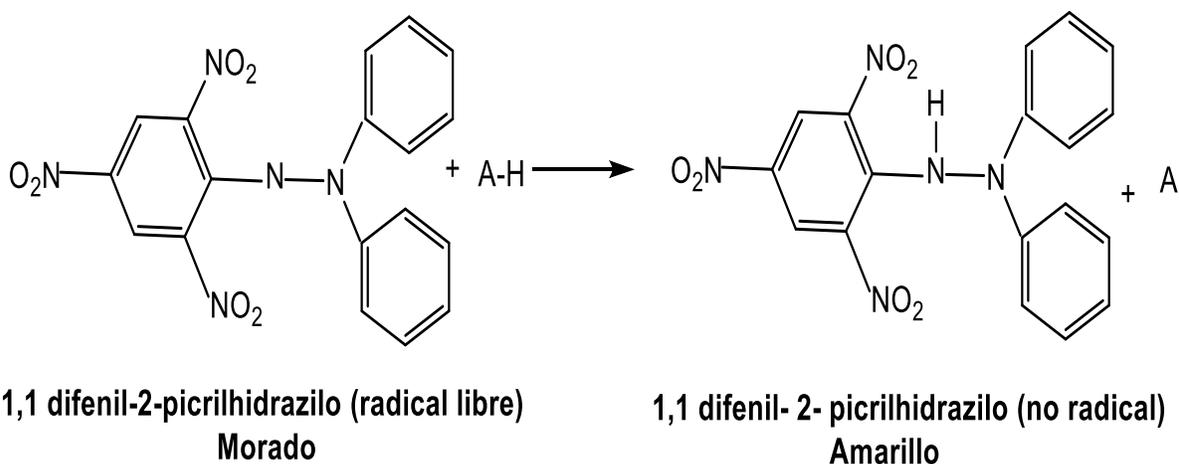


Figura 9 . Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam et al., 2012)⁷⁵.

Wanga et al. (2016)²¹ usaron el radical ABTS⁺ y la técnica de ORAC para evaluar la actividad antioxidante de extractos acuosos de flores comestibles. Adicionalmente, estos autores evaluaron los efectos antioxidantes en las células endoteliales microvasculares cardíacas de rata tratadas con hipoxia-reoxigenación e hiperlipidemia inducidas por una dieta alta en grasas. Estos hallazgos brindaron apoyo científico para seleccionar flores comestibles como fuente de antioxidantes naturales y tratamientos preventivos para enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Del mismo modo Mosbah et al. (2018)⁸⁰ evaluaron la capacidad antioxidante de la flor comestible *Rhaponticum acaule* por ABTS⁺ y con ello explicaron la reducción de los niveles de ácido úrico, glucosa y absorción de las grasas, en consecuencia se previene la obesidad. También Araiza (2017)⁸¹ determinó las características bioquímicas, fitoquímicas y antioxidantes de los cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) los cuales han sido utilizados para reducir la hipertensión arterial y el colesterol.

2.6 Las tinturas como método de conservación de compuestos antioxidantes de las flores comestibles

La medicina verde, que consiste en el empleo de las plantas medicinales para el tratamiento de numerosas enfermedades, a pesar de ser muy antigua y de transmitirse de generación en generación, no sobresale por su uso. No obstante, esta constituye no solo el rescate de un rico acervo cultural, sino también una alternativa para el tratamiento de enfermedades, motivo por el cual, en la actualidad esta alternativa médica es objeto de investigación científica, para garantizar la eficacia terapéutica e inocuidad de las mismas^{82,13}.

Al respecto, la Organización Mundial de la Salud está interesada en fomentar el uso apropiado, seguro y eficaz de la medicina tradicional y complementaria. En

este sentido las tinturas que se definen como un conjunto de sistemas terapéuticos, los cuales se preparan a partir de compuestos de tipo mineral, vegetal, animal, o productos de síntesis química y exudados biológicos con fines curativos o benéficos a la salud, representan una alternativa para la conservación de los compuestos bioactivos procedentes de las plantas¹².

Las tinturas se pueden extraer a través de diversas técnicas según lo reportado por autores como Azuola (2007)⁸³ y Bermejo (2014)¹³ quienes emplearon una extracción asistida por ultrasonido, con el fin de extraer el compuesto de interés en un material vegetal. Esto es posible debido a que las partículas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica. De acuerdo con los autores, este método permite la obtención de tinturas con buenos rendimientos y su composición fitoquímica es muy similar a la obtenida por los métodos tradicionales, tales como la maceración y percolación. Además, los autores reportaron que durante 6 meses se mantuvo la composición inicial de la tintura, lo cual constituye una garantía para su empleo terapéutico y como formulación farmacéutica¹³. Del mismo modo, Muñoz (2015)⁸⁴ reportó que los extractos hidroalcohólicos de caléndula se pueden consumir de manera segura y poseen quercetina, que es un flavonoide importante por sus efectos benéficos en la salud.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad es reducida la información sobre la composición de las tinturas obtenidas a partir de flores comestibles, sobre todo de aquellas que son endémicas del país. Lo cual resulta importante, ya que las enfermedades crónico degenerativas en los últimos años han afectado a gran parte de la población y su incidencia incrementa con el paso del tiempo. Diversas investigaciones han demostrado que el consumo de antioxidantes, contribuye en el tratamiento y prevención de estas enfermedades. En este sentido las flores comestibles por su

composición de antioxidantes, representan una alternativa de bajo costo para el tratamiento de estas.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar el perfil antioxidante de los pétalos de la flor de calabaza, cempasúchil y colorín no tratadas térmicamente y deshidratadas, así como, la estabilidad de estos compuestos en las tinturas elaboradas a partir de estas flores.

4.2 Específicos

- Cuantificar el contenido de agua en pétalos de flores no tratadas térmicamente y deshidratadas.
- Caracterizar el contenido de fenoles y flavonoides totales y la capacidad antioxidante de los pétalos de la flor de calabaza, cempasúchil y colorín no tratadas térmicamente y deshidratadas.
- Elaborar y evaluar la estabilidad de los compuestos antioxidantes de las tinturas obtenidas de los pétalos de flores de calabaza, cempasúchil y colorín no tratadas térmicamente y deshidratadas.
- Identificar y cuantificar por HPLC los flavonoides mayoritarios presentes en tinturas elaboradas con los pétalos de flor de calabaza, cempasúchil y colorín no tratadas térmicamente.

5. HIPÓTESIS

Los pétalos de las flores de calabaza, cempasúchil y colorín presentarán altas concentraciones de compuestos antioxidantes y las tinturas elaboradas a partir de estas conservarán su capacidad antioxidante durante su almacenamiento.

6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 Manejo del experimento

Las flores se cultivaron de manera orgánica en Yautepec, Morelos (18°53' N de latitud, 99°04' O de longitud, 1210 msnm). La flor de calabaza y cempasúchil se recolectaron a mediados del mes de Octubre del 2017, mientras que, la flor de colorín se recolectó en el mes de Marzo del 2018. Las flores se trasladaron al laboratorio de Tecnología Postcosecha de Productos Agrícolas, ubicado en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional y se separaron los pétalos de las flores. Estos se lavaron y desinfectaron utilizando una solución de agua clorada a 200 ppm por 3 min (Anexo 1). Se obtuvieron tres lotes, uno por cada flor y se almacenaron a -60 °C. Cada lote contenía 150 g de pétalos, de los cuales 75 g se deshidrataron a 28°C y los otros 75g se analizaron como pétalos de flores NTT. De cada 75 g se obtuvieron 3 unidades experimentales que representan las repeticiones, con 25 g cada una de ellas.

6.2 Contenido de agua en flores de calabaza, cempasúchil y colorín

Con el objetivo de utilizar la misma cantidad de pétalos de flores NTT y deshidratadas, se cuantificó el contenido de agua de las muestras como una diferencia entre el peso inicial y el peso alcanzado después de secar el material a 28 °C en un horno de convección (Olg-Científica, México) de acuerdo con el método propuesto por Coba (2010)²³.

6.3 Compuestos antioxidantes en los pétalos de la flor de calabaza, cempasúchil y colorín

6.3.1 Fenoles totales

2 g de pétalos de flor de calabaza, cempasúchil y colorín, NTT y deshidratada, se maceraron con 5 mL de una solución de metanol al 80%. El homogeneizado se centrifugó (Labnet 24 D, USA) a 8000 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante como fuente de compuestos fenólicos. La reacción consistió en colocar 20 µL del sobrenadante, 250 µL del reactivo de Folin- Ciocalteau (Hycel., México), 750 µL de carbonato de sodio al 20 % y 3980 µL de agua destilada hasta obtener un volumen final de 5 mL⁹¹. La mezcla se dejó en reposo durante 2 h en obscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia a 760 nm con un espectrofotómetro Genesys 10S (Thermo scientific, USA). El contenido de fenoles totales se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico (10-1000 µL de EAG).

6.3.2 Flavonoides totales

2 g de los pétalos de la flor (calabaza, cempasúchil y colorín) NTT y deshidratada, se maceraron con 5 mL de una solución de metanol al 80%. El homogeneizado se centrifugó a 8000 rpm durante 12 min. Posteriormente, se utilizaron 1.5 mL de sobrenadante que reaccionaron con 1.5 mL de AlCl_3 y después de 30 min se leyó la absorbancia de la muestra a 430 nm con un espectrofotómetro Genesys 10S (Thermo scientific, USA). El contenido de flavonoides se cuantificó utilizando una curva estándar de quercetina (20-110 μg quercetina) de acuerdo con la metodología de Chougui et al. (2013)⁸⁵.

6.3.3 Capacidad antioxidante

Se llevó a cabo siguiendo la metodología de Sánchez-Moreno (1998). Para ello, previamente se preparó la solución stock de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl a 133 μM (DPPH, Sigma-Aldrich, USA)⁸⁶. Mientras que la preparación de la muestra consistió en pesar 1 g de pétalos de flor NTT y deshidratada, los cuales se utilizaron en diferentes cantidades, siendo 0.109 g para los pétalos de flor de calabaza, 0.0175 g para la de cempasúchil y 1.148 g para la de colorín. Las muestras se maceraron con 5 mL de metanol y la mezcla resultante se centrifugó (Labnet 24 D, USA) durante 10 minutos a 8000 rpm. De cada muestra se utilizaron 250 μL de sobrenadante que se mezclaron con 750 μL de DPPH. La mezcla se dejó incubar por 30 min en la oscuridad. El porcentaje de reducción de DPPH, se determinó espectrofotométricamente a 517 nm (Thermo Scientific, USA) a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de reducción de DPPH} = \frac{(\text{Absorbancia del blanco}) - (\text{Absorbancia de la muestra})}{(\text{Absorbancia del blanco})} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

6.4 Elaboración de tinturas

Se pesaron 25 g de pétalos de flor de calabaza, cempasúchil o colorín NTT y 1.359 g de pétalos de flor de calabaza, 0.8829 g de pétalos de flor de cempasúchil y 0.755 g de pétalos de flor de colorín como materiales deshidratados. Los pétalos de la flor de calabaza y colorín (4-5 mm) se colocaron en frascos de 250 mL que contenían 125 mL de alcohol de caña o etanol potable (Milab, México). Mientras que para los pétalos de flor de cempasúchil, se utilizaron 300 mL de etanol potable. Las flores permanecieron dentro del etanol potable por una semana y posteriormente se filtraron para retirar el material vegetal obteniéndose la tintura, la cual se pasteurizó a 65°C por 20 min. Posteriormente, las tinturas se almacenaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y su contenido de antioxidantes se evaluó a los 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 135, 150, 165, 180, 210, 240 y 270 días de almacenamiento.

6.5 Evaluación del contenido de compuestos antioxidantes en las tinturas

6.5.1 Fenoles totales

150 μL de la tintura de los pétalos de flor de calabaza, cempasúchil o colorín se mezclaron con 3.85 mL de agua destilada, 250 μL Folin- Ciocalteau (Hycel, México) y 750 μL de carbonato de sodio al 20%. La mezcla se dejó reaccionar durante 2 h en obscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 760 nm con un espectrofotómetro Genesys 10S (Thermo scientific, USA). La concentración de los compuestos fenólicos se expresó en mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)⁸⁷, de acuerdo con la curva estándar reportada en el apartado 5.3.1.

6.5.2 Flavonoides totales

1.5 mL de tinturas se tomaron y se adicionaron a 1.5 mL de solución de AlCl_3 , dejándose reposar la mezcla durante 30 min y se leyó a una absorbancia de 430 nm. El contenido de flavonoides se cuantificó utilizando la curva estándar reportada en el apartado 5.3.2.

6.5.3 Capacidad antioxidante

La cuantificación de la capacidad antioxidante se llevó a cabo en acuerdo con lo descrito en la sección 5.3.3, para ello se tomaron 250 μL de las tinturas ajustadas a una concentración de 33.125 ppm y se agregaron a 750 μL de DPPH, dejándose reposar la mezcla por 30 minutos en la obscuridad y posteriormente se midió la muestra a 517 nm.

6.6 Aislamiento y caracterización por cromatografía en capa fina de flavonoides mayoritarios en tinturas de los pétalos de flor NTT de calabaza, cempasúchil y colorín

Para llevar a cabo la purificación y cuantificación de flavonoides por cromatografía en las tinturas se utilizaron las mismas proporciones de muestra/etanol del ensayo descrito en el apartado 5.4. Las tinturas se elaboraron únicamente con pétalos de flores NTT de la siguiente manera: a) tintura de flor de calabaza, 75 g de pétalos de flor + 0.375 L de etanol potable, b) tintura de flor de cempasúchil, 0.5 kg de pétalos + 6 L de etanol potable y c) tintura de flor de colorín NTT, 15.7 g de pétalos + 0.0785 L de etanol potable. Posteriormente, la mezcla se filtró y se

recuperó el extracto líquido y el disolvente se eliminó mediante un proceso de destilación a presión reducida en un rotaevaporador (Büchi R 300) a 40 °C generando 4.4 g a partir del extracto etanólico de la flor de calabaza, 11.624 g para flor de cempasúchil y 4.4 g para la flor de colorín.

2 g de cada extracto se separaron mediante un proceso de cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílica de fase reversa (C-18) como fase estacionaria y un sistema de gradiente agua/acetonitrilo como fase móvil. Se utilizó una columna de vidrio (400x22 mm) que fue empacada con sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, sílica gel 60 RP-18 F₂₅₄ S) (Merck, USA) que se estabilizó con metanol (50 mL) hasta obtener una columna homogénea. Posteriormente, la columna se estabilizó con agua (100 mL) y se adicionó la muestra previamente adsorbida en una mezcla de sílica gel 60 F₂₅₄ y sílica de fase reversa (2 g). La separación se inició eluyendo las muestras con 25 mL del disolvente más polar (agua) con cambios de polaridad descendente (cada 5 fracciones se incrementó la concentración de acetonitrilo); del 5 al 50%.

Todas las fracciones recuperadas se analizaron por cromatografía en capa fina y HPLC. Las placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ (10x5cm), se eluyeron con una fase móvil de agua: acetonitrilo (70:30) y se revelaron con el reactivo de productos naturales conocido como polietilenglicol. Las muestras que presentaron flavonoides mostraron un color amarillo-naranja en la placa. Por otra parte las fracciones que contenían flavonoides (cromatografía en placa) se evaluaron en un HPLC, utilizando estándares comerciales de rutina, miricetina, glucósido de quercetina, quercetina, kampferol y lucenina (Sigma-Aldrich, USA), para su identificación y cuantificación (Wagner et al., 1996)⁸⁸.

6.6.1 Cuantificación de los flavonoides identificados por HPLC

Las fracciones que se identificaron con presencia de flavonoides se inyectaron en un HPLC para su identificación y cuantificación. La extracción se realizó siguiendo el método propuesto por Hertog et al (1992)⁸⁹. El análisis cromatográfico se realizó en un sistema de módulo de separación Waters 2695 equipado con un detector de matriz de fotodiodos 996 de Waters y un software de empoderamiento Pro (Waters Corporation, USA). La separación química se logró utilizando una columna LC-F Supelcosil de 4,6 mm x 250 mm de diámetro interno, 5 µm de tamaño de partícula (Sigma-Aldrich, USA). La fase móvil consistió en 0.5 % de solución acuosa de ácido trifluoroacético como disolvente A, (Sigma Aldrich, USA) y acetonitrilo como disolvente B (BDH chemicals, USA). El sistema de gradiente fue el siguiente: 0-1 min, 0 % B; 2-4 min, 10 % B, 5-7 min, 20 % B; 8-14 min, 30 % B; 15-18 min, 40 % B; 19-22 min, 80 % B; 23-26 min, 100 % B; 27-28 min, 0 % B. Las condiciones iniciales de flujo (0 % B, 0,9 mL/min) se mantuvieron durante 29-30 min. El volumen de la inyección fue de 10 µL.

6.6.2 Curvas de calibración para cuantificación de flavonoides por HPLC

Para la cuantificación de los flavonoides se realizaron curvas de calibración de cada uno de los compuestos. Para ello se adquirieron estándares comerciales y se utilizó el área bajo la curva de cada pico para calcular la concentración del analito de interés. Los compuestos evaluados fueron: a) rutina y glucósido de quercetina en concentraciones de 6.25-100 µg·mL⁻¹, b) miricetina y glucósido de miricetina a concentraciones 15.625-400 µg·mL⁻¹, y c) lucenina de 6.25-400 µg·mL⁻¹ (Anexo 2).

6.6.3 Análisis Estadístico

Los datos se analizaron por triplicado a través de un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico Infostat, 2018.

7. RESULTADOS

7.1 Cuantificación del contenido de agua en pétalos de flores no tratadas térmicamente y deshidratadas

El contenido de agua de los pétalos las flores analizadas osciló en un rango de 91-96%, siendo la de colorín la que mostró un menor contenido de agua. En consecuencia, su contenido de materia seca fue alto comparado con las flores restantes (Tabla 4).

Tabla 4. Contenido de agua de pétalos de flor de calabaza, cempasúchil y colorín NTT y deshidratada.

Material vegetal	Pétalos de flor NTT (g)	Pétalos de flor deshidratada (g)	Contenido de agua %
Flor de calabaza	25 ±0 ^A	1.1 ±0.1 ^A	95.5±0.44 ^A
Flor de cempasúchil	25±0 ^A	1.5±0.2 ^A	92.9±0.94 ^A
Flor de colorín	25±0 ^A	2.1±0.9 ^A	91.5±3.4 ^A

NTT= No tratadas térmicamente. Letras mayúsculas iguales no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre flores (columnas).

7.2 Caracterización de flores NTT y deshidratadas

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), en el contenido de antioxidantes de cada flor y por el manejo del producto (NTT o deshidratado). Las flores deshidratadas en la mayoría de los casos mostraron un menor contenido de fenoles y flavonoides totales, así como capacidad antioxidante, respecto a las NTT. Respecto a la flor de calabaza se cuantificó el doble de fenoles totales y 1.2 veces más capacidad antioxidante en las flores no tratadas térmicamente en comparación con las deshidratadas (Tabla 5). Por el contrario en la flor de colorín los compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante mostraron significativamente mayores ($p \leq 0.05$) concentraciones en la flor NTT respecto a la deshidratada.

Tabla 5. Contenido de compuestos antioxidantes en flores comestibles NTT y deshidratadas

	Calabaza		Cempasúchil		Colorín	
	NTT	Deshidratada	NTT	Deshidratada	NTT	Deshidratada
Fenoles totales (μg EAG)	7.3 \pm 0.5 ^A	3 \pm 0.5 ^B	40 \pm 2.1 ^A	71.7 \pm 2.1 ^B	73 \pm 14 ^A	8.3 \pm 2.5 ^B
Flavonoides totales (μg quercetina)	16.3 \pm 6 ^A	17 \pm 5 ^A	24 \pm 1.7 ^A	64.7 \pm 3.1 ^B	28.7 \pm 5 ^B	11 \pm 1.7 ^A
DPPH (%)	63.7 \pm 4 ^B	51.7 \pm 3.5 ^A	76.7 \pm 0.6 ^A	89.7 \pm 0.6 ^B	79 \pm 13.5 ^A	80.5 \pm 1.1 ^A

NTT= No tratadas térmicamente. *Letras mayúsculas iguales no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre filas para cada flor.

7.3 Caracterización de las tinturas

7.3.1 Fenoles totales

Las tinturas elaboradas con pétalos de flor de calabaza, cempasúchil y colorín NTT y deshidratadas mostraron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido fenólico y durante el almacenamiento (Figura 11). Las tinturas elaboradas con pétalos de flor de calabaza NTT tuvieron la mayor cantidad de fenoles totales durante los primeros 60 días de almacenamiento ($13.67-88.21 \mu\text{g}^{-1}$ EAG); cuantificándose el doble de fenoles totales en comparación con las deshidratadas. En las muestras deshidratadas, se mantuvo el contenido fenólico sin cambios significativos ($2.32-5.25 \mu\text{g}^{-1}$ EAG) durante todo su almacenamiento. Por otra parte, en las tinturas elaboradas con pétalos de flor de cempasúchil NTT se cuantificó un mayor contenido fenólico, destacando los días 60 y 75 (54.93 y $63.02 \mu\text{g}^{-1}$ EAG, respectivamente); mientras que en la tintura con la flor deshidratada no se observaron cambios durante los 270 días de almacenamiento. A diferencia de las dos flores antes descritas, la tintura de la flor de colorín NTT desde el día inicial de almacenamiento al día 30, presentó valores de compuestos fenólicos superiores a las otras dos flores evaluadas ($80.42-70. \mu\text{g}^{-1}$ EAG).

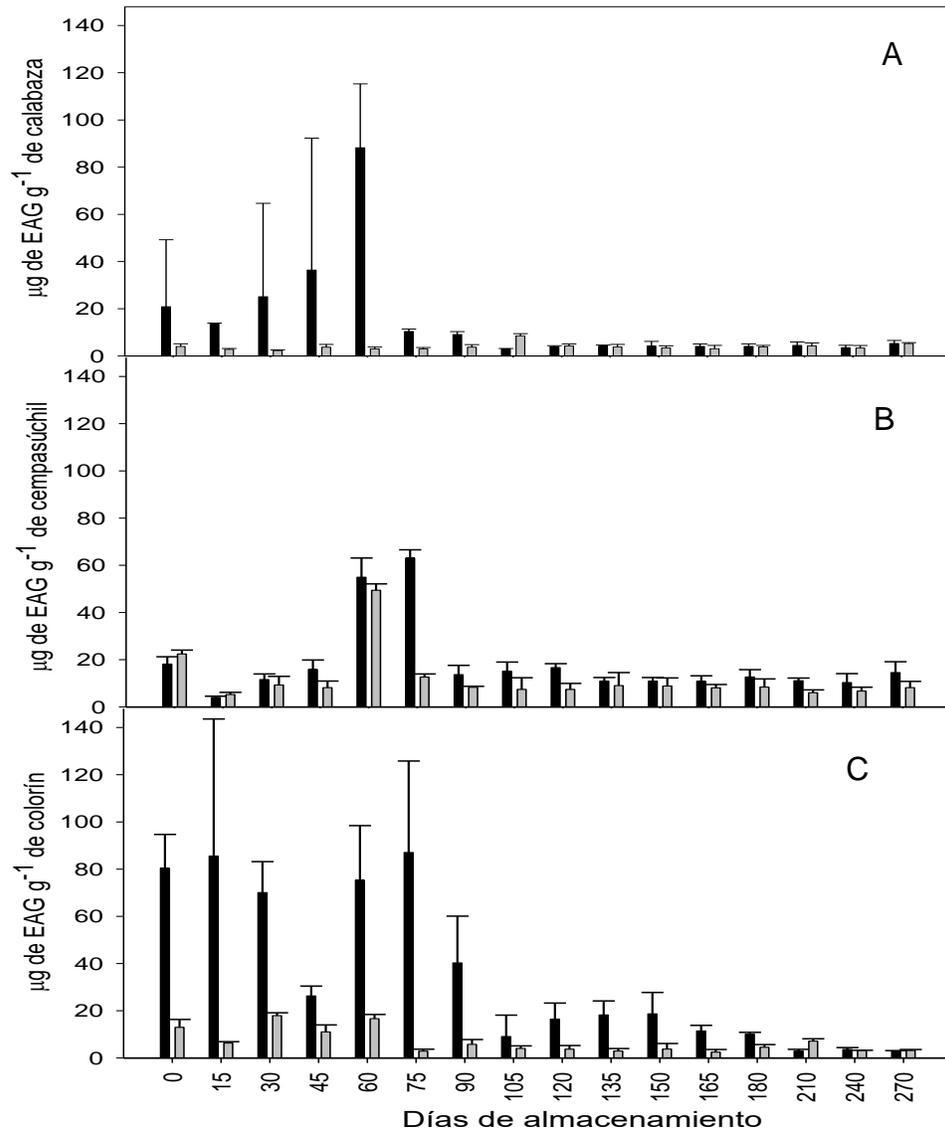


Figura 10. Contenido de fenoles totales en tinturas elaboradas con pétalos de flor NTT ■ y deshidratada ◻; (A) calabaza, (B) cempasúchil y (C) colorín.

7.3.2 Flavonoides totales

Las tinturas elaboradas con pétalos de flor de calabaza, cempasúchil y colorín presentaron concentraciones de flavonoides diferentes al utilizar para su elaboración flores NTT y las deshidratadas, así como durante su almacenamiento (Figura 11). De manera general, se observó que la tintura de flor de cempasúchil NTT fue la que exhibió la mayor concentración de flavonoides, seguida por la de colorín y calabaza, sin considerar el manejo de la muestra (NTT o deshidratada). Por otra parte, al comparar los flavonoides de muestras NTT y deshidratadas se observó que en la tintura de flor de calabaza, cempasúchil y colorín NTT se cuantificó la mayor cantidad de flavonoides (34.-6.-61.25 μg de quercetina g^{-1} , 954.54-1365.15 μg de quercetina g^{-1} y 140.6-88.61 μg de quercetina g^{-1} , respectivamente), respecto a la deshidratada (22.09-54.59 μg de quercetina g^{-1} y 67.31-428.98 μg de quercetina g^{-1} y 121.38-104.25 μg de quercetina g^{-1} , respectivamente).

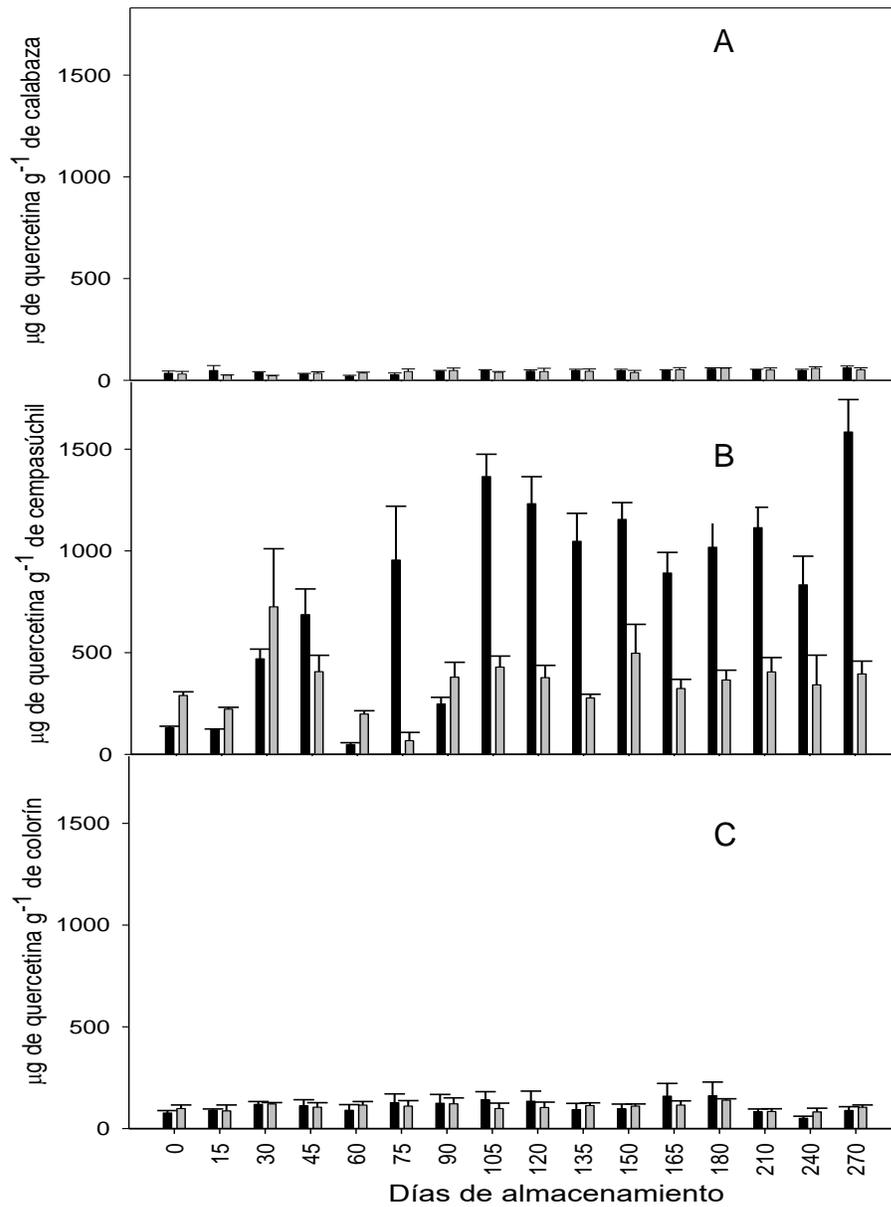


Figura 11. Contenido de flavonoides totales en tinturas elaboradas con pétalos de flor NTT y deshidratada ; (A) calabaza, (B) cempasúchil y (C) colorín.

7.3.3 Capacidad antioxidante

Los resultados indicaron que la mayor capacidad antioxidante en las tinturas se alcanzó durante el período de 75 a 180 días de almacenamiento y destaca la flor de cempasúchil comparada con la de calabaza y colorín. Al analizar el comportamiento de las tinturas elaboradas se encontró que en las de flor de calabaza NTT (0-15-3.9% de reducción del DPPH) y en la que se utilizó flor deshidratada (0.14-1.53 % de reducción del DPPH) no hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) durante su almacenamiento. Respecto a la tintura de los pétalos de flor de cempasúchil se observó una reducción del DPPH con el material NTT (0.06- 76.30%) y deshidratado (0.09-63.9%), destacando el día 105 de almacenamiento con un porcentaje de reducción del DPPH de 76.3 en los pétalos NTT. Por último, la tintura elaborada con pétalos de flor de colorín NTT (9.83 % de reducción del DPPH), presentó la mayor capacidad antioxidante durante los primeros 75 días de almacenamiento, mientras que en el material deshidratado la mayor capacidad antioxidante se presentó posterior a este periodo (Figura 12).

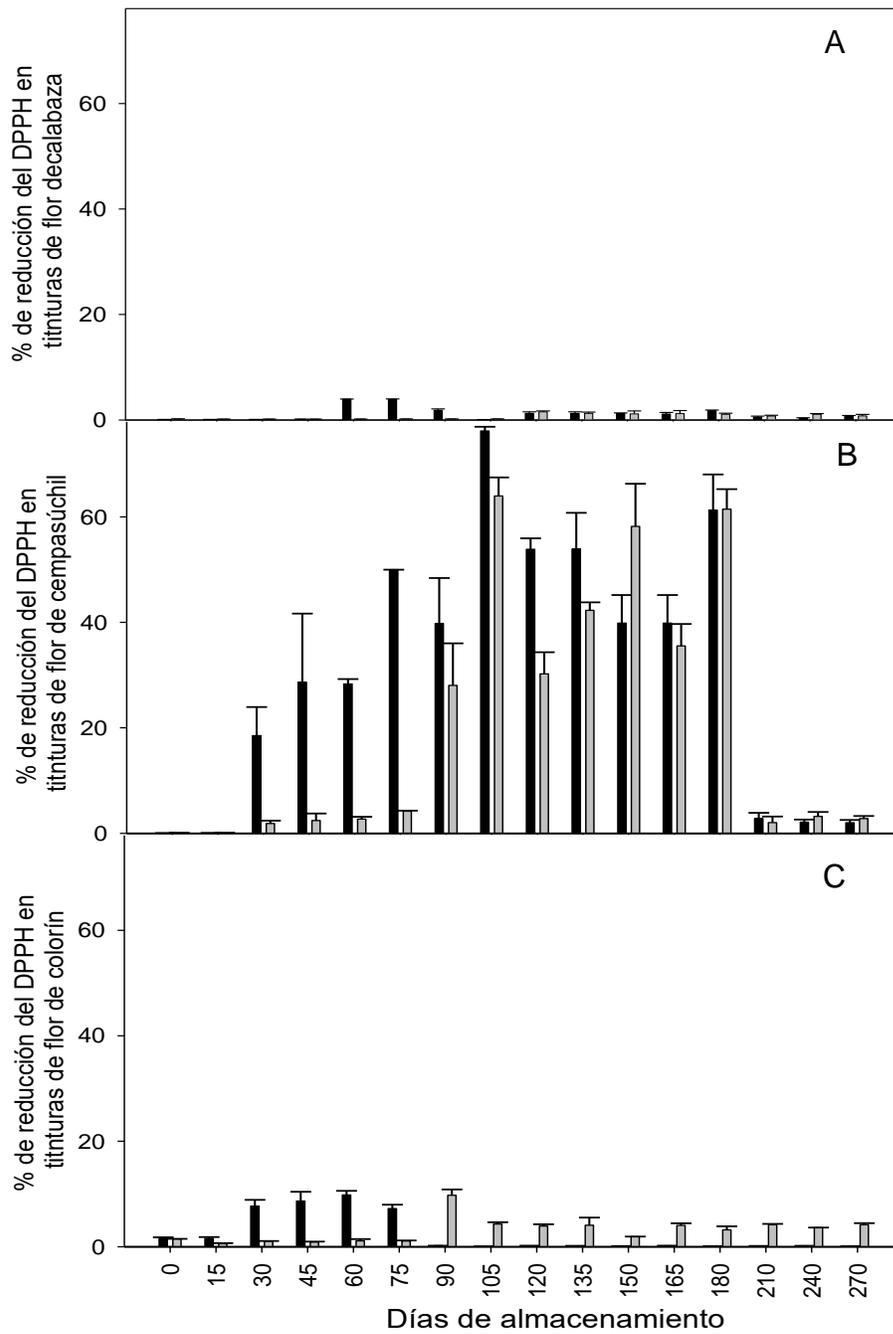


Figura 12. Porcentaje de inhibición en tinturas elaboradas con pétalos de flor NTT y deshidratada de calabaza (A), cempasúchil (B) y colorín (C).

7.3.3.1 Separación e identificación química de los flavonoides mayoritarios en tinturas elaboradas con flor NTT de calabaza, cempasúchil y colorín

Al colocar las tinturas en las placas cromatográficas (Figura 13) se observó una coloración amarillo-naranja asociada con la presencia de flavonoides. Para cada tintura (calabaza, cempasúchil y colorín) se obtuvo un número diferente de fracciones, por ejemplo en las tinturas obtenidas de los pétalos de flor de calabaza NTT hubo 30 fracciones de las cuales la fracción 19 y 32 mostraron un contenido importante de flavonoides que se confirmó al revelar la placa con luz UV y observar la presencia de fluorescencia. Por otra parte, las tinturas elaboradas con los pétalos de flor de cempasúchil NNT presentaron 47 fracciones, siendo activas las fracciones 21, 25 y 32, por su presencia de flavonoides. Mientras que de las 42 fracciones obtenidas de la tintura de colorín NTT, los flavonoides mayoritarios fueron encontrados en las fracciones 22 a la 26. Cada fracción se liofilizó por separado y se analizó por HPLC.

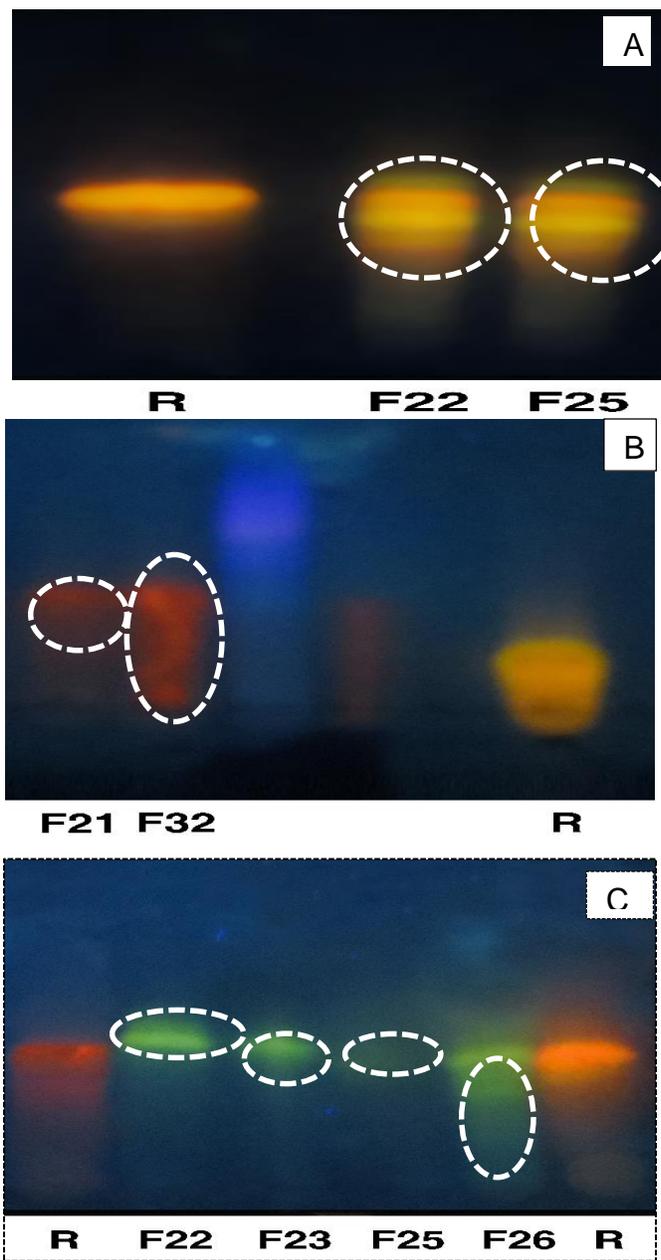


Figura 13. Placas cromatográficas de las tinturas elaboradas con pétalos de flores NTT A) calabaza, B) cempasúchil, C) colorín.

(R) Control positivo (quercetina).Fracciones que contienen flavonoides: F22 y F25 en las tinturas de flor de calabaza; F21 y F32 en las tinturas de flor de cempasúchil y F22, F23, F25 y F26 en las tinturas de flor de colorín.

7.3.3.2 Análisis cuantitativo de los flavonoides identificados

Para cuantificar el contenido de flavonoides de las tinturas elaboradas con flores NTT de calabaza, cempasúchil y colorín se prepararon soluciones con estándares comerciales (quercetina, miricetina, lucenina) a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Este análisis nos permitió identificar para la tintura de la flor de calabaza NTT el flavonoide rutina (T.R =8.947 min) (Figura 14 A) y glucósido de quercetina (TR =9.326 min (Figura 14 B) como flavonoides mayoritarios; mientras que, para la tintura de la flor de cempasúchil NTT se identificó la presencia de miricetina (T. R = 11.976 min) y glucósido de miricetina (T. R = 9.256 min) (Figura 16). Por último, para la tintura con flor de colorín fresca se identificó el flavonoide lucenina como mayoritario (T. R =8.563 min) (Figura 17).

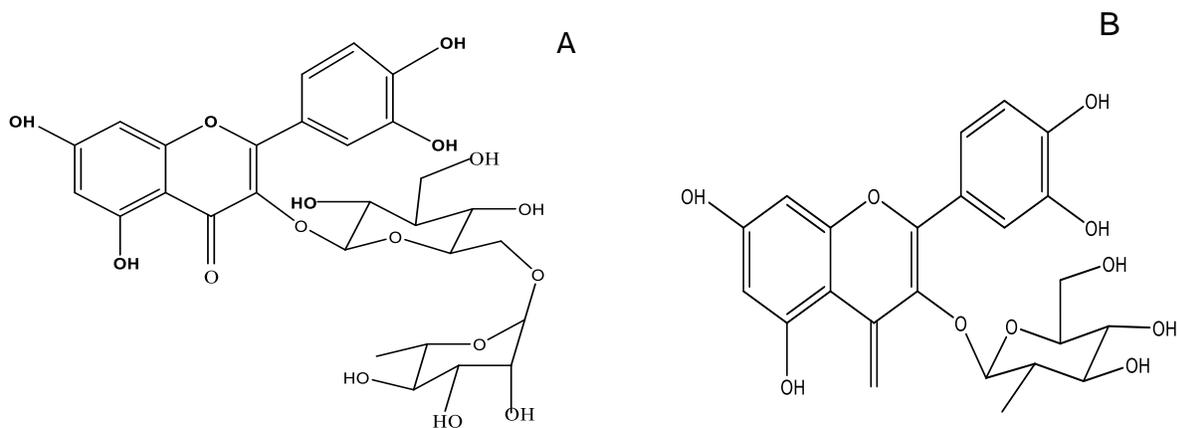


Figura 14. Flavonoides aislados en la tintura elaborada a partir de flor de calabaza NTT; (A) rutina y (B) glucósido de quercetina.

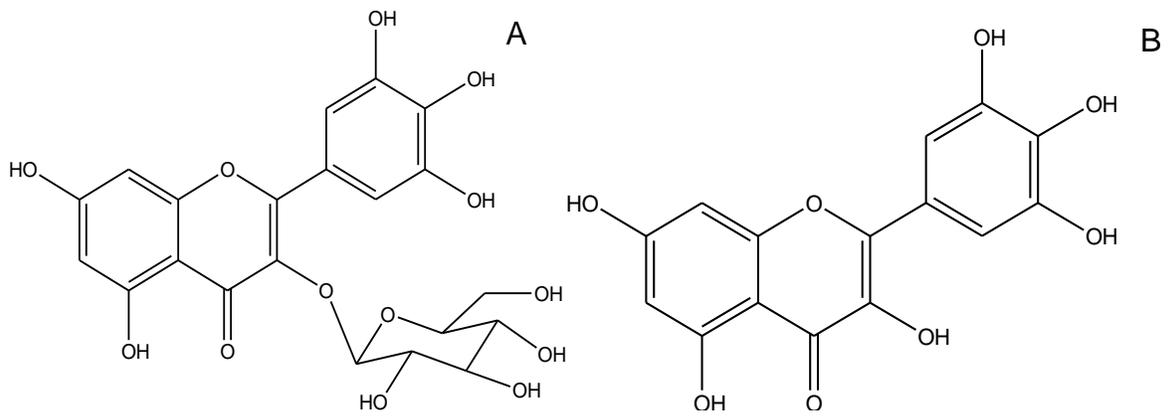


Figura 15. Flavonoides aislados en la tintura de pétalos de flor de cempasúchil NTT;(A) glucósido de miricetina y (B) miricetina.

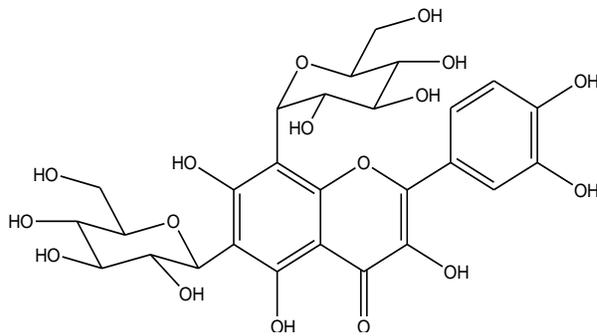


Figura 16. Estructura de la lucenina identificado en la tintura preparada con los pétalos de flor de colorín NTT.

Las fracciones que se identificaron por comparación con estándares comerciales, se utilizaron para generar un método de análisis cuantitativo por HPLC. Para ello se prepararon soluciones stock a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada del estándar y se obtuvo el área bajo la curva de cada pico, a partir de esta información se llevó a cabo la cuantificación (Tabla 6). De las tinturas de los pétalos de flor de calabaza, el flavonoide rutina se encontró en una concentración de $7.28 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de tintura y el glucósido de quercetina $6.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de tintura. La tintura de los pétalos de flor de cempasúchil presentó las flavonas miricetina y glucósido de miricetina con una concentración de 71.17 y $4.64 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de tintura, respectivamente. Respecto a la tintura de pétalos de flor de colorín se encontró lucenina en una concentración de $0.11 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de tintura.

Tabla 6. Concentración de flavonoides en las tinturas elaboradas con pétalos de flores de calabaza, cempasúchil y colorín NTT.

Flavonoides	Tiempo de retención	de Ecuación de la curva estándar	Área bajo la curva	la mg de flavonoide $\cdot\text{mL}^{-1}$ de tintura
Tintura de flor de calabaza				
Rutina	8.947	X=26698/8290.1	247425.333	7.28
Glucósido de quercetina	9.326	X= 61310/16214	289756.667	6.2
Tintura de flor de cempasúchil				
Miricetina	8.559	X=56325/4233.2	2094048	71.17
Glucósido de miricetina	9.131	X= 83075/11745	2494302.67	4.61
Tintura de flor de colorín				
Lucenina	8.559	X=15315/3755.7	2094048	0.1142

Donde "x" representa la concentración del flavonoide de interés.

8. DISCUSIÓN

Un contenido de humedad similar se encontró en todas las flores evaluadas (89.3 y 95.8%). Esto se debe a que el alto contenido de agua en las flores es responsable de la translocación de los nutrientes así como de la naturaleza perecedera y de su susceptibilidad al crecimiento microbiano^{91,92}. Adicionalmente se ha reportado que el contenido de agua en las plantas puede variar con la especie y órgano (hojas, tallos, flores o frutos) de la misma. Por lo que las similitudes en el contenido de agua cuantificada en la presente investigación podrían deberse a que en todos los casos se utilizaron pétalos de flores. Los valores obtenidos concuerdan con lo reportado por Martínez (2015)⁹⁰. El autor determinó la humedad de pétalos de la flor de Dahlia y obtuvo un porcentaje del 91.8%. Así mismo, Sotelo et al. (2007)²⁶ reportaron un contenido de agua de 86.6 a 93.2 % en pétalos de flores Mexicanas tales como la sávil (Aloe vera), maguey, flor de calabaza, madroño (Arbutus xalapensis), colorín, (Erythrina caribaea), chichimecapatli (Euphorbia radians) e izote (Yucca filifera).

Posteriormente al llevar a cabo la caracterización de los pétalos de flores en términos de su contenido de fenoles y flavonoides totales, así como su capacidad antioxidante, se observó que los pétalos de la flor de colorín y calabaza NTT conservaron una mayor cantidad de compuestos fenólicos (73 y 7.3µg EAG, respectivamente) y flavonoides totales (28.7 y 16.3µg quercetina, respectivamente) así como capacidad antioxidante (79 y 63.7% reducción del DPPH, respectivamente). Sin embargo, al compararlo lo con los pétalos deshidratados los valores de fenoles totales (8.3 y 3µg EAG, respectivamente), flavonoides (11 y 17µg quercetina, respectivamente) y capacidad antioxidante (80.5 y 51.7% reducción del DPPH) redujeron drásticamente. Del mismo modo, Aquino-Bolaños et al., (2013)²³ observaron una pérdida del 65% de los polifenoles (de 713 a 334.6 mg/100mg) en flor de calabaza al ser sometida a temperaturas

elevadas (30°C). También se ha reportado que en distintas flores comestibles, durante su cocción se disminuye la concentración de polifenoles y antocianinas en comparación con el tejido fresco.⁹³ Blessington et al. (2010)⁹⁴ mencionaron que las temperaturas mayores a 25°C disminuyen los polifenoles presentes en vegetales y flores frescas. Bernardino-Nicanor et al. (2016)¹⁸ reportaron una pérdida del 54% en fenoles totales, en flor de colorín fresca respecto a la deshidratada (362-167 mg·mL⁻¹). Esto podría deberse a que los compuestos presentes en los pétalos de las flores son termosensibles y esto ocasiona la pérdida de más de la mitad de los compuestos por efecto de la temperatura^{95,96}.

Un comportamiento opuesto se observó en los pétalos de la flor de cempasúchil deshidratados, los cuales mostraron una mayor cantidad de fenoles, flavonoides totales y capacidad antioxidante (71.7µg EAG, 64.7µg quercetina, 89.7% reducción del DPPH), comparado con los pétalos NTT. Esto podría deberse a que los pétalos de la flor de cempasúchil contienen una gran cantidad de aceites que son hidrofóbicos, los cuales protegen a los compuestos fenólicos presentes en la flor, evitando que el calor los degrade⁹⁹. Por su parte, Dulf (2013)¹⁰⁰ demostró que las hojas de caléndula, poseen una gran cantidad de grasas como ácidos linoléicos y triacilgliceroles, lo cual conserva los antioxidantes de la flor al someterlo a un proceso de deshidratación. Esta información confirma que dependiendo de la interacción de los compuestos presentes en los pétalos de las flores será el comportamiento observado en la conservación o degradación de los antioxidantes¹⁰¹.

Las tinturas elaboradas con pétalos de flores NNT, mostraron un mayor contenido de antioxidantes. Este comportamiento también se presentó en muestras de flores. Adicionalmente, en las tinturas se observó una conservación de los compuestos fenólicos en el extracto etanólico de calabaza por 60 días, cempasúchil 75 días y colorín hasta por 30 días. Esto podría deberse a que la adición de alcohol en los productos vegetales permitió que los compuestos antioxidantes se conserven por

un tiempo prolongado. Contreras (2012)¹⁰² encontró en los compuestos etanólicos de la flor de calabaza fresca mayor cantidad de taninos, sesquiterpenos y compuestos fenólicos, al compararlo con extractos acuosos y lo atribuyó a la presencia de alcohol como disolvente, ya que este evita la fermentación o formación de mohos^{103,104}, y permite la extracción selectiva de los metabolitos secundarios de las flores. Otros autores también han demostrado que los extractos etanólicos contribuyen a una mejor conservación de compuestos fenólicos, tales como aldehídos, terpenoides, furanos y alcaloides.^{105,99}. Además los pétalos de flores de cempasúchil NTT, tuvieron mayor cantidad de flavonoides después del día 105 de almacenamiento (1365.1µg de quercetina g⁻¹). Esta información concuerda con lo reportado por Camacho-Campos et al., (2018)¹⁰⁶, quienes obtuvieron mayores concentraciones de metabolitos secundarios en los extractos etanólicos de la flor NTT de cempasúchil (flavonoides, terpenoides, taninos y cumarinas) al realizar los análisis bioquímicos y cualitativos de este extracto. Por último la mayor capacidad antioxidante en las tinturas de los pétalos de las tres flores se alcanzó durante los 75 y 180 días de almacenamiento. La flor de cempasúchil NTT mostró la mayor capacidad antioxidante (76.30% de reducción del DPPH). Kazibwe et al., (2017)¹⁰⁷ reportaron que al caracterizar extractos acuosos de pétalos de cempasúchil deshidratados a 40°C, estos mostraron mayor capacidad antioxidante (145 equivalentes Trolox umol/g) con respecto a las raíces, tallos y hojas (35, 20,10 equivalentes Trolox umol/g), respectivamente. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por García et al., (2003)¹⁰⁸ quienes identificaron fenoles, flavonoides y alcaloides en tinturas de la planta Pasiflora, durante un periodo de un año y se comprobó la presencia de los compuestos durante su almacenamiento. Se observó, que el extracto conservó en forma óptima sus compuestos, además, el conteo microbiano de las tinturas se mantuvo por debajo de los niveles permisibles durante todo el experimento.

Los resultados obtenidos por HPLC mostraron la presencia de flavonoles en las tinturas de los pétalos de las tres flores. Específicamente en la tintura de pétalos

de flor de calabaza NTT, se observó la presencia de quercetina y rutina, lo que concuerda con lo reportado por Mohamed et al., (2009)¹⁰⁹ quienes en los extractos metanólicos de la flor de calabaza por cromatografía fraccionada encontraron 3-rutinosido, 4`-rhamnosido y quercetina 4'-O-β-D-glucopiranosido, compuestos ampliamente descritos y estudiados por sus propiedades antiinflamatorias, antineoplásicos, antibacterianas y cardiotónicas^{110,111}.

En la tintura de los pétalos de la flor de cempasúchil NTT, se identificaron los compuestos miricetina y glucósido de miricetina, esto concuerda con lo reportado por Navarro-González et al., (2015)¹⁹, quienes en la flor de cempasúchil observaron compuestos similares a los encontrados en este estudio (miricetina, hexósido de miricetina, laricitrina y ácido elágico) entre otros, con la finalidad de demostrar los efectos beneficiosos que estos compuestos aportan a la salud en estudios posteriores. Finalmente en las tinturas de los pétalos de la flor de colorín, se obtuvo el flavonol lucenina. Barrón-Yáñez et al., (2011)¹¹² encontraron un alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides glicósilados como la quercetina, isoramnetina, kaemferol y lucenina en extractos etanólicos de hojas de burrita roja (*Calia secundiflora*) lo cual concuerda con uno de los flavonoles encontrados en la flor de colorín. Ong et al., 1997¹¹³ sugieren que la coloración roja-azul que presenta esta flor así como en bayas, té y vino tinto es un indicador de altos niveles de polifenoles y antocianinas.

9. CONCLUSIONES

1. Las tres flores evaluadas presentaron un contenido de agua similar que osciló entre 91-95 %.
2. El proceso térmico al que se sometieron los pétalos de flor de calabaza y colorín disminuyó el contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante, por lo

que se recomienda su consumo como un producto NTT. Un comportamiento opuesto se presentó en los pétalos de flor de cempasúchil.

3. La flor de cempasúchil presentó la mejor composición antioxidante, la cual se conservó a través de la elaboración de tinturas.

4. En todas las tinturas evaluadas su contenido de flavonoides y capacidad antioxidante se mantuvo sin cambios por 270 días y 180 días, respectivamente. Sin embargo, los fenoles totales solo se conservaron por 60-75 días utilizando flores NTT para su elaboración.

5. La tintura obtenida con flor de cempasúchil NTT mostró el mayor contenido de flavonoides y capacidad antioxidante durante todo su almacenamiento, en comparación con el resto de las tinturas evaluadas.

6. Ninguna de las tinturas evaluadas presentó el mismo tipo y cantidad de flavonoides. En la tintura de flor de calabaza se identificaron los compuestos rutina y glucósido de quercetina, en la tintura de cempasúchil miricetina y glucósido de miricetina, mientras que en la tintura de colorín solo se identificó lucenina.

10. ANEXOS

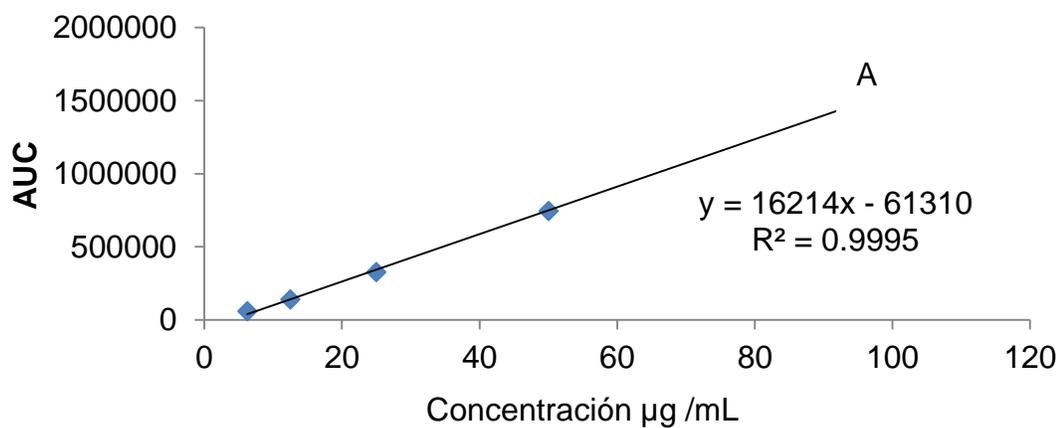
ANEXO 1

10.1. Selección de los pétalos de las flores (calabaza, cempasúchil y colorín) secado y desinfección del material vegetal.

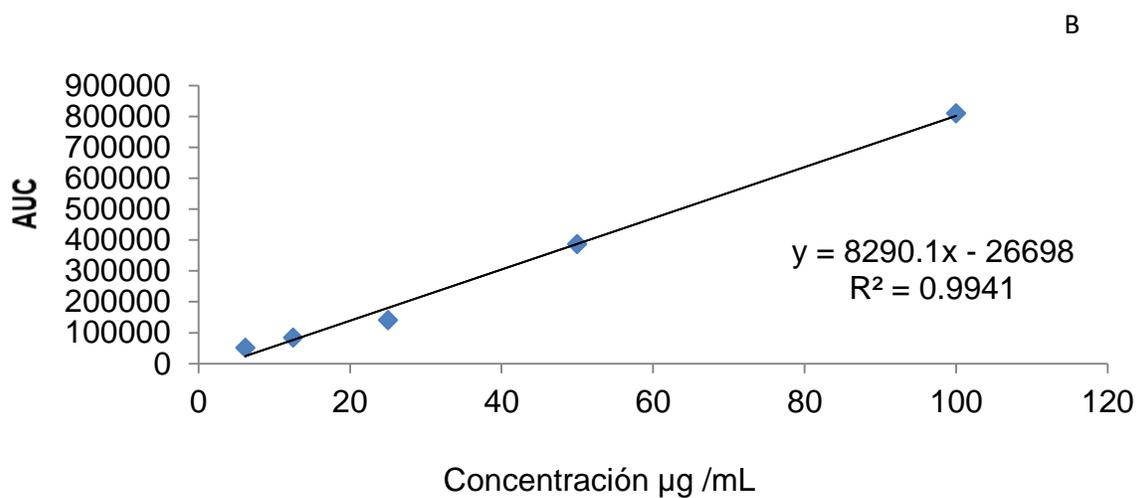


ANEXO 2

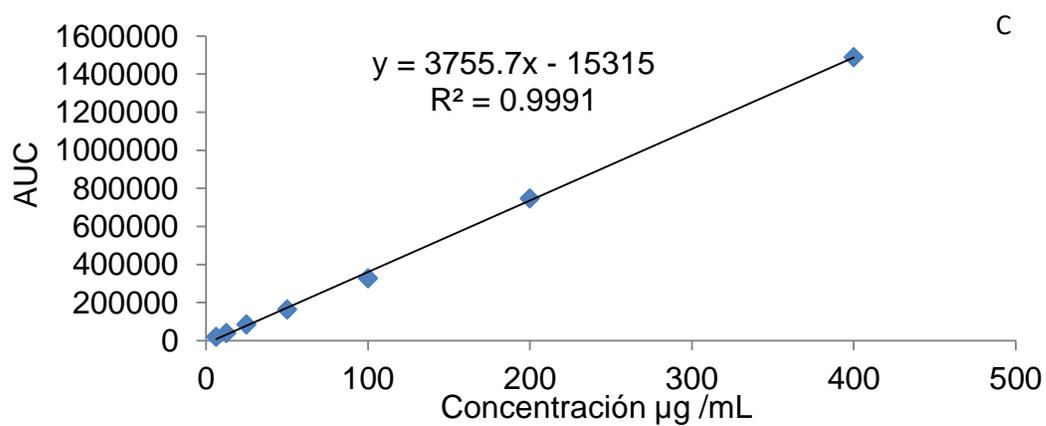
10.2. Curvas estándar de: A) glucósido de quercetina (0-100 μ L), B) rutina (0-100 μ L), C) lucenina (0-500 μ L), D) miricetina (0-250 μ L), E) glucósido de miricetina (0-250 μ L).



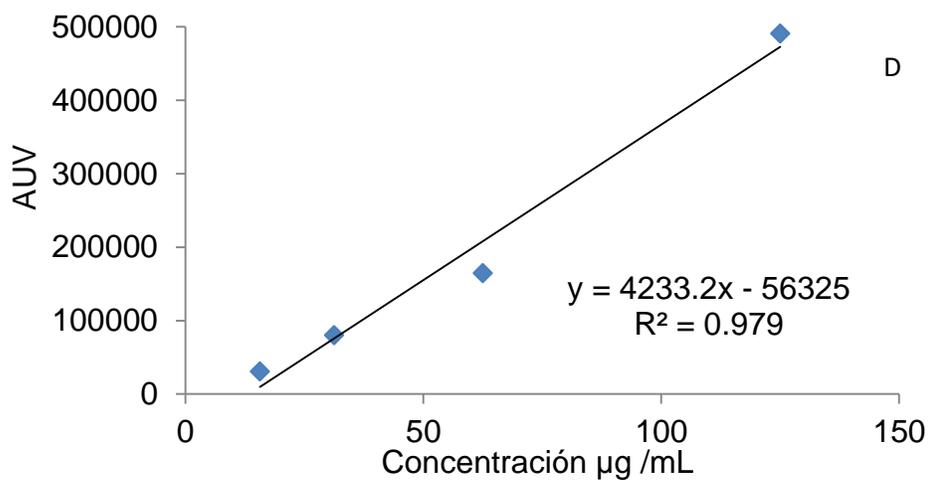
A. Curva estándar de glucósido de quercetina (0-100 μ L).



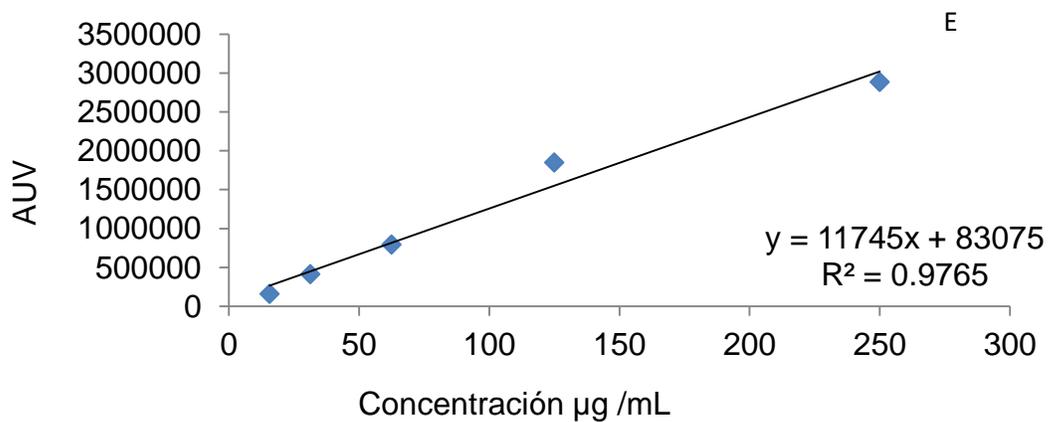
B. Curva estándar de rutina (0-100 μ L).



C. Curva estándar de lucenina (0-500 μ L).



D. Curva estándar de miricetina (0-250 µL)



E. Curva estándar de glucósido de miricetina. (0-250 µL)

REFERENCIAS

1. Lara-Cortés, E., Martín-Belloso, O., Osorio-Díaz, P., Barrera-Necha, L.L., Sánchez-López, J.A., Bautista-Baños, S. "Contenido nutricional, propiedades funcionales y conservación de flores comestibles de Dalia". Revista Chapingo Serie Horticultura. 2013; 20 (1): 101-116.
<https://doi10.5154/r.rchsh.2013.07.024>
2. Treviño, G., Mera, O.L.M., Bye, B.R., Mejía, M.J.M., Laguna., C.A. Historia de la *Dalia (Acocoxóchitl)* la flor Nacional de México. Ed. Servicio Nacional de inspección y Certificación de Semillas de México, D. F. 2007; 27.
3. Pérez G., M., Márquez S. F., & Peña L, A. Mejoramiento Genético de Hortalizas. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 1997; 380.
https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article
4. Ordóñez, M.J., Pardo, E. Estudio etnobotánico de tres especies de flores comestibles en la ciudad de Xalapa, Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, 1982. 7: No 2.
<https://www.researchgate.net/publication/304581760>
5. Loizzo, M.R., Pugliese, A., Bonesi, M., Tenuta., M.C., Menichini, F., Xiao, J., Tundis, R. Edible flowers rich source of phytochemicals with antioxidant and hypoglycemic properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2016; 64(12): 2467-2474. <https://doi.10.1021/acs.jafc.5b03092>
6. Venéreo, J. "Daño oxidativo radicales libres y antioxidantes". Revista cubana de Medicina Militar. 2002;31(2):126-133
7. Meneses-Reyes, J.C., Soto-Hernández, M., Espinosa-Solares, T., & Ramírez-Guzmán, M.E. Optimization of process of flavonoid extraction from chamomile (*Matricaria recutita* L). Agrociencia. 2008; 42:425-433
8. Buitrago D., A, Rojas-Vera, J, Peñaloza, Y. *In vitro* antioxidant activity and qualitative phytochemical analysis of two *Vismia (Hypericaceae)* species collected in Los Andes, Venezuela. Revista de Biología Tropical. 2016;

- 64(4):1431-1439.<https://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v6n4/0034-7744-rbt-64-04-01431.pdf>
9. Nagao, T., Hase, T, Tokimitsu, I.). A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity* Silver Spring. 2007;15:1473-83.<https://doi:10.1038/oby.2007.176.17557985>
 10. Sergent, T., Vandesrstraeten, J., Winand, J., Beguin, P., Schneider, J.Y Phenolic compounds and plant extracts as potencial natural anti-obesity substances. *Food Chemistry*. 2012; 135: 68-73
 11. Cetkovuk, G.M.S., Djilas, S.M., Canadanovich, J.M., Tumbas, V.T. Antioxidant properties of maringol extracts. *Food Research International*. 2004; 237:643-650.
 12. Aguilar-Andrade. J. La cientificidad de la homeopatía. *Medicina naturista*. 2016; 10 (2):106-112. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5591362.pdf>
 13. Bermejo de Zaa, A., Pereira, S., Cintra, M., Morales, G. Determination of parameters chemist physical of the dyes to 20% obtained of the leaves, shafts and fruits of *Melia azedarach* L (Pursiana). *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2014; 13 (5); 670-680. <https://scielo.sld.cu>
 14. Vizoso, P.A., Ramos, R.A., Villaescusa, G.A., Betancourt, B.I.J., García, L.A.,Piloto, F.J., Décalo, M.M. *Passiflora incarnata* L y *Senna alata* (L). Roxo. Estudio toxicogénico que emplea 2 sistemas de ensayos a corto plazo. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2002; 7 (1): 27-31. <https://scielo.sld.cu/scielo.php?script>
 15. Kelley, K.M., Behe. B.K., Biernbaum, J., Poff, L. Consuman and profesional Chef percepcions of three edible flower Species. *HortScience*, 2001; 36(1):162-166
 16. Soto, I V. Flores e insectos en la dieta prehispánica y actual. 2003
 17. Ventura-Aguilar, R.I., Rivera, C.F., Méndez-Iturbide, D., Pelayo-Zaldivar, C., Bosqu ez-Molina, E. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems of minimally processed cactus stems (*Opuntia ficus-indica* Mill.) packaged under

- modified atmospheres. *International Journal of Food Science and Technology*. 2013; 48; 2603-2612
18. Bernardino-Nicanor, A., Montañez-Soto, J.L., Vivar-Vera, M.A., Juárez-Goiz, J.M., Acosta-García, G., González-Cruz, L. Effect of drying on antioxidant capacity and concentration of phenolic compounds in different parts of *Erythrina Americana* tree. *BioResources*. 2016; 11(4): 9741-9755. <https://doi:10.15376/biores.11.4.9741-9755>
 19. Navarro-González, I., González-Barrio, R., García-Valverde, V., Bautista-Ortín, A.B., Periago, M.G. Nutritional composition and antioxidant capacity in edible flowers: characterisation of phenolic compounds by HPLC-DAD-ESI/MSN. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16: 805-822. <http://www.mdpi.com/journal/ijms>
 20. Escamilla, C.I., Cuevas, E.Y., & Guevara, J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Medigraphic Artemisa. Revista Facultad Medicina*. 2009; 52 (2):73-75
 21. Wanga, F., Miaoa, B., Xiaa, H., Li-Gang, Y., Shao-Kang, W., Gui-ju, W. Antioxidant activities of aqueous extracts from 12 Chinese edible flowers *in vitro* and *in vivo*. *Food & Nutrition Research*. 2016; 61:1. <https://doi:10.1080/16546628>
 22. Martínez, M.A & García, M. Descripción agronómica y morfológica de colectas de calabaza (*Cucurbita pepo*, *C. moschata*, *C. angyrosperma*) criollos. Tesis profesional de Licenciatura. Depto. Fitotecnia. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. D.F. 1998; 5-8.
 23. Aquino-Bolaños, E.N., Urrutia-Hernández, T.A., Castillo-Lozano, M., Chávez-Servia, J.L., Verdalet-Guzmán, I. Physicochemical parameters and antioxidant compounds in edible squash (*Cucurbita pepo*) flowers stored under controlled atmospheres. *Journal Food Quality*. 2013; 36: 302-308. <https://doi.org/10.1111/jfq.12053>
 24. López, O. Manejo postcosecha de flor de calabaza a diferentes condiciones de almacenamiento. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial.

- Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 2007; 3-5.
<https://es.scribd.com/document/340389832>
25. Franco. M.A.L., Marriescurrana, B.D., Pérez, H.A. Delicias culinarias de la floricultura. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. 1998; 7.
26. Sotelo ,A., López, G.S. & Basurto, P.F. Content of nutrient and antinutrient in edible flowers of wild plants in México. *Plant Foods Human Nutrition*, 2007; 62:133-138. <https://doi:10.1007/s11130-007-0053-9>
27. Tarhan, L., Kayall, H.A & Urek, R.O. In vivo antioxidant properties of *Cucurbita pepo* L male and female flowers extracts. *Plant Foods Human Nutrition*. 2007; 64:49-51. <https://doi:10.1007/s11130-006-0038-0>
28. Talavera, H. El Poder Curativo de las flores Mexicanas, Selector, México. 1999; 27-29.
29. Urrutia-Hernández, M., Aquino-Bolaños, E.N., López del Castillo-Lozano, J.L., Chavéz-Servia, T.A., & Verdelet-Guzmán, I. Physicochemical Parameters and Antioxidant Compounds in Edible Squash (*Cucurbita pepo*) flower stored under controlled atmospheres. *Journal of Food Quality*. 2011; 36:302-308. <https://10.1111/jfq.12053>
30. Alfonso A. Caracterización química y sensorial de los pétalos de flores de Cucurbita. Tesis de Licenciatura Universidad Nacional de Cuyo Argentina. 2004; 2-8. <https://slideplayer.es/slider/2542089>
31. Bravo. L. Polyphenols Chemistry dietary sources metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 1998; 56; 317-333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670>.
32. Santos, O.A., Contreras, N. Determinación del análisis bromatológico proximal y fitoquímico preliminar de los extractos acuosos y atánolicos de influencia de *Calathea allouia* (aubl.) lindl (chufle), frutos de *Bromelia Karatas* (piñuela) y flor de *Cucurbita pepo* L (flor de ayote). Tesis para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de el Salvador. 2012; 45-47.

33. Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. Effects of enzymatic treatments of carotenoid extraction from marigold flower (*Tagetes erecta*). *Food Chemistry*. 1997; 58(3): 255-258.
34. Quintanilla, M.X., Arenas, M.L., Campos, M.R., Hildeliza, B., Díaz, A., Jiménez, R. Morphometric characterization of floral structures *Tagetes erecta* L and *Tagetes pátula* L (Asteraceae) using digital image analysis and fractal dimension. *Gayana Botánica*. 2015; 72(1); 137-144.
35. del Villar-Martínez, A.M., Serrato-Cruz, M.A., Solano-Navarro, A., Arenas-Ocampo, L.M., Quintero-Gutiérrez, A.G., Sánchez-Millán, J.L., Evangelista-Lozano, S., Jiménez-Aparicio, A., García-Jiménez, F.A., Vanegas-Espinoza, P.A. Carotenoides en *Tagetes erecta* L. La modificación genética como alternativa. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2007; 30 (2) 109-118. [https://www.academia.edu/6608073/Revista Fitotecnia Mexicana](https://www.academia.edu/6608073/Revista_Fitotecnia_Mexicana)
36. Young, A.J & Lowe, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2001; 385: pp. 20-27. <https://doi:10.1006/abbi.2000.2149.11361018>
37. Barajas-Pérez, J.S., Montes-Belmont, R., Castrejón Ayala, F., Flores-Moctezuma, H.E., Serrato Cruz, M.A. Antifungal properties in *Tagetes* species. *Revista Mexicana de Micología*. 2011; 34:83-88 <https://www.redalyc.org/articulo.a0?id=8832133900>
38. Lozano, E.C & Zapater, M.A. El género *Erythrina* (Leguminosae) en Argentina Darwiniana nuevaserie. 2010; 48(2):179-200.
39. Soto-Hernández, R., García-Mateos, R., San Miguel-Chávez, R., Kite, G., Martínez-Vázquez, M., & Ramos-Valdivia, A.C. *Erythrina* a Potencial Source of Chemicals from the Neotropics Bioactive Compounds in Phytomedicine.2012. [https:// doi:www.intechopen.com](https://doi:www.intechopen.com)
40. García-Mateos, M.R., Soto-Hernández., M., & Vibrans, H. *Erythrina americana* Miller ("Colorín", Fabaceae) a versatile resource from Mexico a review. *Economic Botany*. 2001; 55:391-400. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02866562>

41. García, G & Quintero, L. *Biotecnología alimentaria* Editorial Limusa. México, D.F. 1999.
42. Navarrete-Bolaños, J.L., Rangel-Cruz, C.L., Jiménez-Islas, H., Botello-Álvarez, E., Rico-Martínez, R. Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. *Food Research International*. 2005; 38:159-165. <https://doi.org/10.1016/foodres.2004.09.007>
43. Serrato, M.A. *Cempoalxochitl*. Diversidad biológica y usos. Ciencia y desarrollo en Internet. 2004. 5:204-206
44. Lozoya, X., & Lozoya, M. Flora medicinal de México in plantas indígenas del Seguro Social, México D.F. 1982; 174
45. Sumbul, S., Ahmad, M.A., Mohd, A. "Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview". *Journal of pharmacy and Bioallied Science*. 2011; 3(3): 361-367. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.84437>.
46. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S, Phenolic Compounds in plants and agri-industrial by products Antioxidant activity occurrence and potencial uses. *Food Chemistry*. 2006; 99(1):191-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
47. Vega, S *Innovaciones alimentarias al inicio del siglo XXI. El caso de los llamados alimentos y sustancias funcionales. Innovación tecnológica en el futuro de los profesionales en áreas biológicas. Un texto para estudiantes Universitarios*. México, D.F. 2003; UAM-X, 223-59.
48. Drago, M., López, M., Saíenz, T. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana Ciencias Farmacéuticas*. 2006; 37 (4):58-68
49. Martínez-Valverde, I., Periago, M., Ros, G. "Significado Nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta ". *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 2000; 50 (1):5-14. <https://www.researchgate.net/publication/262551532>.
50. Patthamakanokporn, O., Puwastein, P., Nitithamyong, A., Sirichakwal, P. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of

- selected fruits. *Journal Food Composition Analysis*. 2008; 21:241-8.
<https://www.elsevier.com/locate/jfca>
51. Valdecantos, M. P., Pérez-Matute, P., Martínez, J.A. Obesidad y estrés oxidante papel de la suplementación con antioxidantes de la dieta. *Revista de Investigación Clínica*. 2009; 61 (2): 127-139
52. Zamora, S. Antioxidantes micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*. 2007; 34(1):17-26.
53. Núñez, A. Terapia antioxidante estrés oxidativo y productos antioxidantes retos y oportunidades. *Revista Cubana de Salud Pública*. 2011; 37: 644-650
54. Coronado, H.M., vega, L., Gutierrez, L.R., Vázquez, M., Radilla, C. Antioxidantes perspectiva para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*. 2015. 42(2): 206-212. <https://doi:10.4067/S0717-75182015000200014>
55. Seroczynska, A. Relationship between carotenoids content and flower or fruit fresh color of Winter squash (*Cucurbita máxima* Duch). *Horticulture*. 2006;83:3
56. Rivera, Y. Efecto citotóxico *in vitro* de extractos de *Tagetes erecta* en células HeLLa. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional Secretaria de Investigación y Posgrado Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. 2011; 4-8.
57. Mares-Perlman, J.A., Millen, E.M., Ficek, L., Hankinson, S.E. The body of Evidence to Support a Protective Role for Lutein and Zeoxanthin in Delaying Chronic Disease, *Journal of Nutrition*. 2002; 132:518-524.
<https://doi.org/10.1093/jn/132.3.518S>
58. Pettersson, T., Emstrom, U., Griffiths, W., Sjoval, J., Bergman, T., Sjoval, J., & Jiimball, H. Lutein associated with a transthyretin indicates carotenoid derivation and novel multiplicity of transthyretin ligands. *Febs. Len* 1995; 365:23-26. <https://www.researchgate.net/publication/2223777623>
59. Delgado-Vargas, F., Jiménez. A.R., Paredes-Lopez. O. Natural pigments carotenoids, anthocyanins and betalains characteristics, biosynthesis processing and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2000; 40:173-289.

60. Evans, R.D. Flowers as food Small Farm Today.1993; 10(2):18-21.
61. García, E., Fernández, I. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu ETSIAMN. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos. 2011. <http://hdl.handle.net/10251/52056>
62. Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J. M., Culebras-Tuñón, M. J. “Los flavonoides propiedades y acciones antioxidantes”. Nutrición Hospitalaria, 2002; (17): 271-278. <https://www.researchgate.net/publication/109618>
63. Mínguez, M. I., Pérez, A., Hornero, D. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples “colorantes” naturales. Agroscic. 2005; 2-7. <http://www.researchgate.net/publication/39389862>
64. Estrada-Reyes, R., Ubaldo-Suárez, D., Araujo-Escalona, A. G. Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. Salud Mental. 2012; Vol. 35, No. 5.
65. Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., Kondo, K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. Internal Medicine I, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan. Journal Nutritional Science Vitaminology. 2001; 47:357-362 <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2145-5>
66. Vicente-Vicente, L., Prieto, M., Morales, Al. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. Revista de Toxicología. 2013; (2): 171-181. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91931189008>
67. Yi-Zhong, C., Jie-Xing., Mei-Sun., Zhao-Qi, Z., Corke, H. Phenolic Antioxidants (Hydrolyzable Tannins, Flavonols, and Anthocyanins) Identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from *Rosa chinensis* Flowers. Journal Agricultural. Food Chemistry. 2005; 53 (26): 9940-9948. <https://doi10.1021/jf052137k>
68. Li, H., Zhou, P., Yang, Q. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* ‘*edulis*’ and *Passiflora edulis* ‘*flavicarpa*’. Journal Ethnopharmacology. 2011; 133(3): 85-90. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=passionflower+anxiety>

69. Jackman, L. R., Yada, R. Y., Tung, M. A. A review: Separation and chemical properties of anthocyanins using for their qualitative and quantitative analysis. *Food Biochemistry*. 1987; 11: 279-292.
70. Karchesy, J., Bae, Y., Chalker-Sct, L., Helm, R. F., Foo, L. Y., Karcsy, J.J. Chromatography of proanthocyanidins. In Hemingway Eds *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press New York. 1989; 139-161.
71. Alfaro, C. R., Condori, R. P., García, M. J., Pinto Coronel, M. C., Sucupuca Palma, A. Identificación de Flavonoides, Compuestos Fenólicos, Taninos y Lactonas Sesquiterpénicas en extractos orgánicos de *Matricaria Chamomilla* (Manzanilla). Laboratorio de Farmacognosia II, E.P. Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas; Campus Universidad Católica Santa María, Arequipa, Peru. *Revista Perspectiva*. 2018; 17 (3): 314-325.
72. Coba, P., Mayacu, L., Vidari, G. Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*. *Revista de Ciencias de la Vida*. 2010; 11 (1): 22-30.
73. Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. 2007. <http://www.horticom.com/pd/imagenes/71/429/1429.pdf>
74. Benzie, I.F.F., Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996; 239: 70-76 http://www.radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Manuals/Techniques/FRAP-original_AnalytBiochem_1996-v239-p70.pdf
75. Alam, N., Bristi, J.N., Rafiqzaman. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical Journal*. 2012; 21:143-152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
76. Tovar del Rio, J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. 2013; 13-26.

77. Brand-Williams, B., Berset, W. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH-free radical method. *LWT – Food Science and Technology*. 1997; 30, 609-615. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>
78. Naik, G. H., Pryadarsini, K. L., Satav, J. G., Banavalika; M., Sohoni, M., Biyani, D.P. M. K., Mohan, H. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochemistry*. 2003; 63:97-104. <http://www.elsevier.com/locate/phytochem/a4.3d>
79. Ojha, H., Mishra, K., Chaudhury, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*. 2012; 130: 1036-1043 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>
80. Mosbah, H., Chahdoura, H., Kammoun, H., Besbes, H. M., Hanen, M., Louati, H., Hammami, S., Flamini, G., Achour, L., Selm, B. *Rhaponticum acaule* (L) DC essential oil: chemical composition, *in vitro* antioxidant and enzyme inhibition properties. *Bio Med Central Complementary and Alternative Medicine*. 2018; 18-79. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2145-5>
81. Ariza, R., Serrano, V., Casimiro, A., Barrios, A., Otero, M. A., Avendaño, C.H., Noriega, D. H. Características bioquímicas y calidad nutracéutica de cinco variedades de jamaica cultivada en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2017; 8(2): 269-280. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263150548002>
82. Ochoa, P. A., Marín, M. J., Rivero, B. D., Aguilera, S. E. Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 2013; 44(1): 52-59. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v44n1/v44n1a7.pdf>
83. Azuola, R., Vargas, P. Extracción de sustancias asistida (EAU) por ultrasonido. *Revista Tecnología en Marcha*. 2007; 20(4): 30-40.
84. Muñoz, J. A., Morgan, J. E., Trujillo, M. Validation of an HPLC method for quantification of total quercetin in *Caléndula officinalis* extracts. *Revista Cubana de Farmacia*. 2015; 49(1):91-10 <http://scielo.sld.cu>

85. Choungui, N., Tamendjari, A., Hamidj, W., Hallal, S., Barras, A., Richard, T., Larbat, R. Oil Composition and characterization of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* sedes. Food Chemistry. (2013). 139: 796-803 <https://doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.054>.
86. Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. A., Ponce-Pardo, J., Zarzoza-Norabuena, E. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. Horizon Medic. 2015; 15 (1):57-60 <http://www.horizontemedicina.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/manager/setup>
87. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folinciocalteu reagent. Methods in Enzymology. 1992; 299: 152-178. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
88. Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M. Plant drug analysis. Athin layer chromatography atlas, Springer-Verlag.1996, 384.
89. Hertog, M., Hollman, P., Venema, D. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavanoids in vegetables and fruits. Journal of Agricultural Food Chemistry. 1992; 40:1591-1598 <https://doi:10.1021/jf00021a023>
90. Martínez R., Galaviz J. V., Cervantes, B. A., Arroyo, S. A. Deshidratación de Flor de *Dahlia* con Deshidratador Solar De Cama Plana. Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. 2015; 3-10:8-15
91. Hassan, L. G., Usman, B. B., Kamba, A. S., Hassan, S. W. Nutritional composition of vegetable spaghetti (Hasta la pasta). Nigerian Food Journal, 2009; 27: 41-49. <https://doi:10.4314/nifoj.v27i2.47471>
92. Taiz, L., Zeiger, E. Plant Physiology, 5th ed., Sinauer Associates Inc, Sunderland. 2010; 782. [https://www.scrip.org/\(S\(35jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1273207](https://www.scrip.org/(S(35jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1273207)

93. Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y. S. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*. 2005; 93(4):713-718.
94. Blessington, T., Nzaramba, M. N., Scheuring, D. C., Hale, A. L., Reddivari, L., Miller, J. C. Cooking methods and storage treatments of potato: Effects on carotenoids, antioxidant activity, and phenolics. *American Journal of Potato Research*. 2010; 87 (6): 479-491. https://www.academia.edu/24219079/Cooking_Methods_and_Storage_Treatments_of_Potato_Effects_on_Carotenoids_Antioxidant_Activity_and_Phenolics
95. Murador, D.C., da Cunha, D.T., de Rosso, V. V. Effects of cooking techniques on vegetable pigments: A meta-analytic approach to carotenoid and anthocyanin levels. *Food Research International*. 2014; 65: 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.037>
96. Murador, D. C., Mercadante, A. Z., de Rosso, V. V. Cooking techniques improve the levels of bioactive compounds and antioxidant activity in kale and red cabbage. *Food Chemistry*. 2016; 196: 1101-1107. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.037>
97. Loubet A. Efecto sobre diferentes métodos de cocción sobre el contenido y capacidad antioxidante de la flor de calabaza (*Curcubita pepo* L.). Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. 2010; 5-8 <https://ri.uaq.mx/xmlui/handle/123456789/6460>
98. Ahmed, F. A., Ali, R. F. M. . Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh and processed white cauliflower. *American Journal and Food and Nutrition*. 2015; 5:125-130 <https://doi10.12691/ajfn-3-5-3>
99. Barajas-Pérez, J.S., Montes-Belmont, R., Castrejón Ayala, F., Flores-Moctezuma, H.E., Serrato Cruz, M.A. Antifungal properties in *Tagetes* species. *Revista Mexicana de Micología*. 2011; 34:83-88 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88321339008>

100. Dulf, F.V., Pamfil, D., D Baiu, A., Pintea A. Fatty acid composition of lipids in pot marigold (*Calendula Officinalis* L.) seed genotypes. Chemistry Central Journal. 2013; 2: 7-8. <http://journal.chemistrycentral.com/content/7/1/8>
101. Ocampo, R.A., & Valverde, R. Manual cultivo y conservación de plantas medicinales. Tomo 1: 2010; 27. <https://issuu.com/scduag/docs/manualdecu1/27>
102. Contreras, N.E., Santos, O.A. Determinación del análisis bromatológico proximal y fitoquímico preliminar de los extractos acuosos y etanólicos de inflorescencia de *Calathea allouia* (aubl.) lindl. (chufle), frutos de *Bromelia karatas* (piñuela) y flor de *Cucurbita pepo* L. (flor de ayote). Tesis de Licenciatura para obtener el título en Química y Farmacia. San Salvador, el Salvador, Centro América. 2012; 75-96.
103. Lock de Ugaz, O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2da ed. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994; 1-7.
104. Silva, N. C. C. y Fernández, J. A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases. 2010; 16(3): 402-413. <https://doi:10.1590/S1678-1992010000300006>
105. Bruneton, J. Farmacognosia: fitoquímica plantas medicinales 2ª edición. Editorial Acribia S.A. España. 2001; 216-218 <https://latam.casadellibro.com/libro-farmacognosia-fitoquimica-plantas-medicinales-2-ed/9788420009568/799374>
106. Camacho-Campos, C., Pérez- Hernández, V., Valdivia-Ávila, A., Ramírez-Pérez, HL., Gómez-Brisuelo, L. P. Phytochemical and antibacterial properties of extracts of *Tagetes erecta* L. (*Asteráceae*). Centro de Estudios Biotecnológicos. 2018; Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.
107. Kazibwe, Z., Kim, D. H., Chun, S., Gopal, J. Ultrasonication assisted ultrafast extraction of *Tagetes erecta* in water: characterizing antimicrobial, antioxidant components. Journal of Molecular Liquids. 2017; 229: 453-458.

108. Garcia, D., Crespo, M., Rodriguez, C.A. Obtención y control de calidad de la tintura homeopática de *Passiflora incarnata* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2003; 8(3). <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=S1028-47962003000300002&lng=es&tlng=es>
109. Muhammad, G.A., Ibrahimand, S.R.M., & Sayed, H. M. Phenolic Constituents of *Cucurbita pepo* L. c v `Eskandrani` (Summer Squash) Flowers. Bullutin Pharmaceutical Sciences, Assiut University. 2009; 32(2): 311-319.
110. García, L., García, L.V., Rojo Domínguez, D.M., Sánchez, E. Plantas con propiedades medicinales. Revista Cubana Investigaciones Biomedicas. 2001; 20(3): 231-235. https://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0864...
111. Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A. « Flavonoid intake and risk of chronic diseases». American Journal Clinical Nutrition. 2002; 76 (3): 560–8 <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.3.560>
112. Barrón-Yáñez, M.R., García-Mateos, M.R., Soto-Hernández, M.R., Colinas-León, T., Rey, G. Flavonoids and antioxidant activity of *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. Revista Fitotecnia Mexicana. 2011; 34(3):151-157. <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/34-3/1a.pdf>
113. Ong, K.C, Khoo, H.E. "Biological Effects of Myricetin". General Pharmacology.1997; 29 (2): 121–126. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.3.560>



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

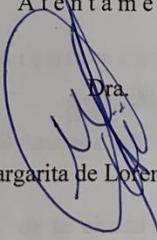
**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la c. Isis López Agama, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10010407, y que lleva por título "**PERFIL ANTIOXIDANTE DE FLORES COMESTIBLES ENDÉMICAS DE MÉXICO Y SU USO EN LA FORMULACIÓN DE TINTURAS**" ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente



Dra.

Sinodal Margarita de Lorena Ramos García.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 13 días del mes de Agosto de 2019.



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

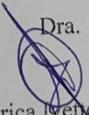
Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la c. Isis López Agama, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10010407, y que lleva por título **“PERFIL ANTIOXIDANTE DE FLORES COMESTIBLES ENDÉMICAS DE MÉXICO Y SU USO EN LA FORMULACIÓN DE TINTURAS”** ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dra.

Sinodal América  Vette Barrera Molina.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 13 días del mes de Agosto de 2019.



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la c. Isis López Agama, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10010407, y que lleva por título **“PERFIL ANTIOXIDANTE DE FLORES COMESTIBLES ENDÉMICAS DE MÉXICO Y SU USO EN LA FORMULACIÓN DE TINTURAS”** ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dr.



Sinodal Juan José Acevedo Fenández.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 13 días del mes de Agosto de 2019.



**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Formato. Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

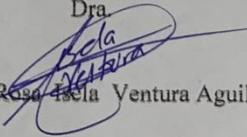
Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la c. Isis López Agama, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10010407, y que lleva por título "**PERFIL ANTIOXIDANTE DE FLORES COMESTIBLES ENDÉMICAS DE MÉXICO Y SU USO EN LA FORMULACIÓN DE TINTURAS**" ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dra


Sinodal Rosa Isela Ventura Aguilar.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 13 días del mes de Agosto de 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD
DE NUTRICIÓN

FACULTAD DE NUTRICIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

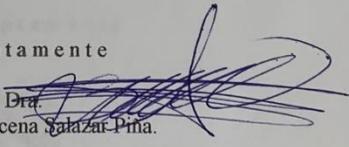
**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la c Isis López Agama, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10010407, y que lleva por título "PERFIL ANTIOXIDANTE DE FLORES COMESTIBLES ENDEMICAS DE MÉXICO Y SU USO EN LA FORMULACIÓN DE TINTURAS" ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dra. 
Sinodal Azucena Galazar Pina.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 13 días del mes de agosto de 2019.

