



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

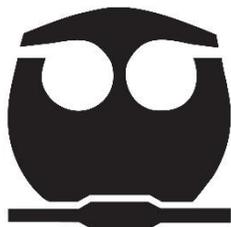
**COMPUESTOS BIOACTIVOS FENÓLICOS Y TERPÉNICOS
EN FLORES COMESTIBLES MEXICANAS; *Anoda cristata*
(L.) Schltdl COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE
FITOQUÍMICOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A

ANA CECILIA LUNA ROMERO



MÉXICO, CDMX.

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO

VOCAL: DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA

SECRETARIO: M. EN C. TANIA GÓMEZ SIERRA

1er. SUPLENTE: Q.A. MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ VALDEPEÑA

2do. SUPLENTE: M. EN C. ANTONIO HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

L-321, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E.

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. ANDREA TORRES ALCALÁ

SUSTENTANTE:

ANA CECILIA LUNA ROMERO

Contenido

	Pág.
1. Resumen.....	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes.....	4
3.1 Flores comestibles originarias de México	4
3.2 Compuestos bioactivos presentes en flores comestibles	6
3.2.1 Compuestos fenólicos	6
3.2.1.1 Ácidos fenólicos.....	7
3.2.1.2 Flavonoides	8
3.2.1.3 Antocianinas.....	10
3.2.2 Compuestos terpénicos.....	12
3.2.2.1 Triterpenos	13
3.2.2.2 Carotenoides.....	14
3.3 Flores comestibles de estudio	15
3.4 Alache (<i>Anoda cristata</i> (L.) Schltdl)	20
3.5 Biocolorantes	22
3.5.1 Antocianinas como colorante	24
3.5.2 Estabilidad y copigmentación de antocianinas	24
4. Hipótesis.....	27
5. Justificación.....	27
6. Objetivos	28
6.1 Objetivo general.....	28
6.2 Objetivos particulares	28
7. Metodología	29
7.1 Reactivos y equipo	29
7.2 Estrategia experimental.....	30
7.3 Procedimientos.....	31
7.3.1 <i>Primera etapa: Estudio de flores comestibles mexicanas</i>	31
7.3.1.1 Cuantificación de compuestos bioactivos totales	31

7.3.1.2	Análisis cualitativo de compuestos bioactivos por CCF.....	33
7.3.2	<i>Segunda etapa: Estudio de la flor de alache Anoda cristata (L.)</i>	34
7.3.2.1	Tratamiento de muestra y cuantificación de compuestos bioactivos totales ..	34
7.3.2.2	Identificación del perfil fitoquímico por CCF de las partes de la planta	35
7.3.2.3	Caracterización y cuantificación de antocianinas en flores y hojas de <i>Anoda cristata</i>	35
7.3.2.3.1	Identificación y caracterización del perfil de antocianinas.....	35
7.3.2.3.2	Separación y cuantificación de las antocianinas en flores y hojas.....	36
7.3.2.4	Aplicación de antocianinas de <i>Anoda cristata</i> como biocolorante.....	37
7.3.2.4.1	Pruebas de color.....	37
7.3.2.4.2	Ensayos de copigmentación.....	37
7.3.2.4.3	Caramelo duro.....	38
8.	Resultados y discusión	39
8.1	<i>Primera etapa: Estudio de flores comestibles mexicanas</i>	39
8.1.1	Cuantificación de compuestos bioactivos totales	39
8.1.1.1	Fenoles totales.....	39
8.1.1.2	Flavonoides totales.....	41
8.1.1.3	Antocianinas totales	43
8.1.1.4	Carotenos totales.....	45
8.1.2	Análisis cualitativo de compuestos bioactivos por CCF.....	47
8.1.2.1	Ácidos fenólicos.....	47
8.1.2.2	Flavonoides.....	49
8.1.2.3	Antocianinas	51
8.1.2.4	Carotenos	53
8.1.2.5	Triterpenos	55
8.2	<i>Segunda etapa: Estudio de Anoda cristata (L.) Schltl.</i>	57
8.2.1	Cuantificación de compuestos bioactivos totales	57
8.2.2	Identificación del perfil fitoquímico por CCF	62
8.2.3	Identificación y caracterización de antocianinas en flores y hojas por HPLC-EM	68

8.2.4	Cuantificación de antocianinas en flores y hojas por HPLC	73
8.2.5	Aplicación de las antocianinas de <i>Anoda cristata</i> como biocolorante	75
8.2.5.1	Ensayos de color y copigmentación.....	75
8.2.5.2	Aplicación de color en un alimento (caramelo duro).....	79
9.	Conclusiones	82
10.	Bibliografía	84
11.	Anexo.....	95
Anexo I.	Curva patrón de fenoles	95
Anexo II.	Curva patrón de flavonoides	95
Anexo III.	Espectros de masas para antocianinas de flores y hojas de alache	96
Anexo IV.	Curva patrón delphinidina-3-rutinósido.....	98
Anexo V.	Curva patrón cianidina-3-rutinósido	98

1. Resumen

Durante el paso de los años, en México han existido culturas y tradiciones en las que se incluyen el consumo de diversas flores, esto con el objetivo de usarlas como un remedio medicinal o como decoración en platillos típicos mexicanos. De igual forma, se ha encontrado que las plantas poseen propiedades benéficas para la salud del ser humano debido a sus metabolitos secundarios [Vélez-Terranova *et al.*, 2014].

El objetivo de este trabajo fue identificar y cuantificar los principales compuestos bioactivos fenólicos y terpénicos presentes en diez flores características de México; posteriormente, seleccionar una fuente floral poco explotada rica en dichos compuestos, e identificar y caracterizar aquellos que no han sido descritos y pueden ser adecuados para su uso en el área de los alimentos.

Para ello el estudio fue dividido en dos partes o ejes principales; en la *primera etapa* se cuantificaron fenoles, flavonoides, antocianinas y carotenos totales en todas las muestras florales y posteriormente se realizó una identificación cualitativa de los mismos compuestos por cromatografía en capa fina (CCF). Todas las flores evidenciaron tener un perfil fitoquímico diferente tanto de fenoles como de terpenos, siendo las flores de capuchina, colorín, noche buena, pata de vaca, manita y alache quienes además presentaron dentro de sus compuestos fenólicos, una o más antocianinas.

La fuente floral seleccionada para estudiar en la *segunda etapa* fue el alache (*Anoda cristata*), se usaron tres métodos diferentes de secado (estufa, microondas y liofilizado) y se encontró que el secado por estufa es el más factible; por lo que las partes de la planta (flores, hojas verdes y rojas, fruto, botones, tallos y raíz) se sometieron a este tratamiento.

Del mismo modo, se cuantificaron los compuestos bioactivos totales en las partes de la planta y se encontró que las hojas rojas de *Anoda cristata* son las que poseen mayor contenido de fenoles (78.94 ± 3.90 mg fen.totales/g mtra. seca) y flavonoides (66.99 ± 0.39 mg flav.totales/g mtra. seca) con respecto a las demás partes. Las flores, aunque poseen menos compuestos fenólicos que las

hojas (39.49 ± 0.53 mg fen.totales/g mtra. seca), tienen un contenido de flavonoides (35.29 ± 1.90 mg flav.totales/g mtra. seca) que representa cerca del 90% de los fenoles totales presentes.

Así mismo, se encontró por cromatografía en capa fina que todas las partes representativas de *Anoda cristata* presentan compuestos fenólicos y terpénicos; particularmente, se evidenció la presencia de antocianinas en toda la planta, siendo las flores y hojas rojas de alache quienes las poseen en mayor concentración.

Se identificó una antocianina en la flor y cinco en las hojas rojas; las antocianinas mayoritarias en dichos órganos fueron identificadas como delfinidina-3-rutinósido y cianidina-3-rutinósido respectivamente; estas fueron confirmadas por HPLC-EM y ambas se cuantificaron tanto en las flores (0.934 mg delfinidina-3-rutinósido/g mtra. seca) como en las hojas rojas (0.794 mg cianidina-3-rutinósido/g mtra. seca).

Mediante un ensayo rápido de copigmentación con ácido rosmarínico se evaluó la permanencia del color debido a la termo resistencia de las antocianinas en las flores de alache; sin embargo, se encontró que el copigmento no ejerce un efecto de protección para estas debido a una posible competencia entre este y otros compuestos fenólicos presentes en el extracto, impurezas o falta de ajustes de experimentación; mientras que, en el caso de un extracto acuoso sin copigmento, no se observó una disminución clara de antocianinas después del tratamiento térmico.

Finalmente, un extracto acuoso comestible de flores de alache se empleó como biocolorante en la realización de un producto de confitería (caramelo duro) y se observó la permanencia del color dadas las temperaturas del punto de quiebre del confite (134°C), esto debido a una posible copigmentación intermolecular de las antocianinas con otros compuestos propios de la flor como flavonoides, los cuáles le aportan cierto grado de termorresistencia.

2. Introducción

La alimentación es parte fundamental de la subsistencia de las poblaciones humanas; sin embargo, en la actualidad se ha visto que hay un incremento de enfermedades relacionadas con la alimentación generando principalmente problemas de obesidad, sobrepeso, enfermedades coronarias y reducción de la calidad de vida en general. Es por ello, por lo que hay una tendencia e interés mundial por consumir alimentos de origen vegetal como plantas y flores comestibles, debido a los componentes medicinales y nutraceuticos que muchos de estos alimentos poseen.

La mayoría de los alimentos y productos naturales o de origen vegetal poseen compuestos bioactivos, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza principalmente como compuestos fenólicos y terpénicos; estos se han catalogado como biológicamente activos ya que presentan propiedades benéficas para el humano como anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes [Quiñones *et al.*, 2012].

En el caso de las flores, éstas han sido consideradas como elementos decorativos principalmente, sin embargo, también suelen ser usadas en platillos típicos y se consumen en diferentes regiones de México. Además, las flores se caracterizan por tener colores vibrantes y agradables a la vista gracias a los pigmentos que presentan, los cuales, también han sido ampliamente estudiados como parte de los metabolitos secundarios que producen las plantas y recientemente en la industria alimentaria existe un fuerte interés en encontrar nuevas fuentes de estos que sustituyan a los colorantes artificiales por los naturales.

Aunque el consumo de flores se remonta a los tiempos de nuestros antepasados con las diversas culturas que existieron, muchas de éstas no son conocidas en su totalidad como comestibles y por ello no han sido del todo estudiadas ni se sabe con exactitud los beneficios a la salud que podría tener su consumo gracias al contenido de compuestos bioactivos presentes en las mismas, o las aplicaciones biotecnológicas que se pudieran efectuar en alimentos; de ahí la importancia en conocer y profundizar en su estudio.

3. Antecedentes

3.1. Flores comestibles originarias de México

Mesoamérica es una región que abarca la mitad meridional de México; actualmente, la alimentación de los mexicanos es resultado de la unión de diversos ingredientes y sabores, muchos de los cuales son de origen prehispánico.

La florifagia se define como el consumo de flores; estas han sido durante años una alternativa de consumo en diferentes regiones de México, no sólo como alimento en sí, sino también como remedio medicinal, algunas de ellas son empleadas porque se sabe que pueden disminuir malestares generales del cuerpo, sin embargo, es de suma importancia su estudio ya que esto permitiría además de conocer sus beneficios, delimitar su uso considerando factores tóxicos o anti nutritivos, de manera que puedan ser consumidas de una forma adecuada tanto en platillos típicos como en productos alimenticios procesados.

Estas flores provienen de las plantas de muchos frutos, oleaginosas o vegetales en general, normalmente su uso se remontaba a decoración debido a los colores característicos que presentan, sin embargo, en la actualidad se emplean en la cocina de vanguardia como una práctica importante para aportar nuevos beneficios no sólo en el aspecto visual, sino también en texturas, sabores y aromas que estimulan los sentidos del consumidor [Sarmiento 2012].

Con respecto a su composición química, el principal componente es el agua, la cual constituye más del 80%, lo que las hace ser alimentos hipo energéticos; así mismo, algunas flores pueden aportar vitaminas como A y C, riboflavina, niacina, y minerales como calcio, fósforo, hierro y potasio [Lara, *et al.*, 2013].

Una de las razones por la que las flores podrían considerarse alimentos funcionales es que contienen algunos compuestos biológicamente activos además de los mencionados anteriormente, como los compuestos fenólicos y terpenicos, dentro de los que destacan ácidos fenólicos, antocianinas, flavonoides, carotenos y algunos esteroides [Petrova *et al.*, 2016].

De acuerdo con estudios del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos de Morelos del Instituto Politécnico Nacional en 2018, se ha reportado que existen alrededor de 70 flores que pueden ser aptas para consumo humano, de las cuales podemos encontrar entre 30 y 50 en nuestro país, muchas de éstas originarias y/o endémicas.

En la figura 1 se observan las principales flores que son comestibles y originarias de México como la flor de mastuerzo (*Tropaeolum majus*), los colorines (*Erythrina americana*), las flores de dalia (*Dahlia* spp.), flor de calabaza (*Curcubita pepo*) o los gualumbos o flores de maguey, por mencionar las más conocidas.



Figura 1. Algunas flores comestibles en México. *a*: flor de mastuerzo, *b*: flor de calabaza, *c*: flor de colorín, *d*: flor de maguey. Fuente: Enciclopedia de CONABIO

3.2. Compuestos bioactivos presentes en flores comestibles

Las plantas, además de realizar funciones como la fotosíntesis también destinan una cantidad significativa del carbono y energía asimilada para la síntesis de moléculas orgánicas que no tienen una función directa en procesos de respiración o de asimilación de nutrientes; estas se denominan metabolitos secundarios [Ávalos, *et al.*, 2009].

Dichos metabolitos, se agrupan en cuatro clases principales [Kozikowski, *et al.*, 2003]:

- Compuestos fenólicos (Ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas).
- Terpenos (Hormonas, pigmentos o aceites esenciales).
- Glucósidos (Saponinas, glicósidos, glicosinolatos).
- Alcaloides

Los compuestos fenólicos y terpénicos son los de mayor importancia y estudio debido a que se ha encontrado que pueden actuar como compuestos biológicamente activos [Quideau, *et al.*, 2011] y proveer de beneficios a la salud si se consumen de manera adecuada como parte de la dieta del ser humano.

3.2.1. Compuestos fenólicos

La estructura química de estos compuestos parte de la molécula básica del fenol, el cual se compone de un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo (Figura 2). El anillo aromático tiene un papel importante en las propiedades antioxidantes de dichos compuestos [Peñarrieta, *et al.*, 2014]. Los fenoles se pueden clasificar de acuerdo con su diversidad estructural (Figura 3), encontrándose principalmente dos grupos: flavonoides y no flavonoides (también llamados ácidos fenólicos).

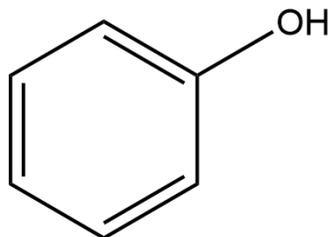


Figura 2. Estructura química de la molécula de fenol [Peñarrieta, *et al.*, 2014]

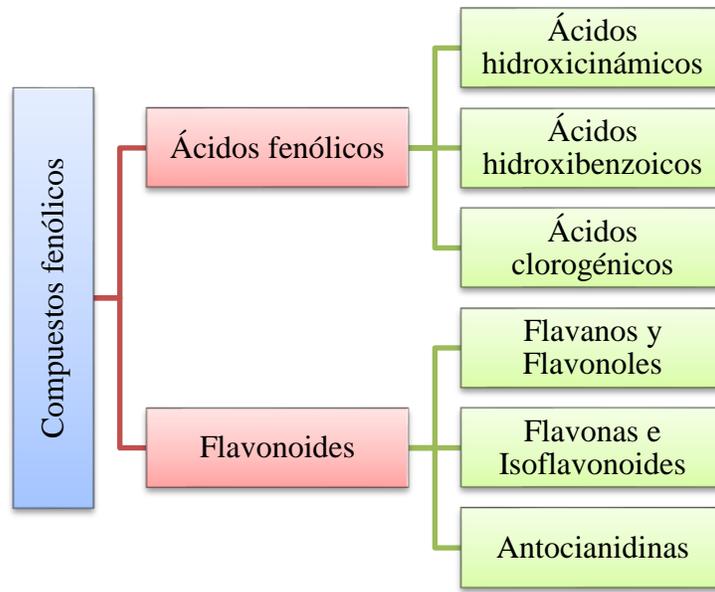


Figura 3. Clasificación general de los compuestos fenólicos [Gimeno, 2004].

Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en las frutas como en las flores, así como en raíces y algunos cereales [Gimeno, 2004]. Así mismo, participan en funciones específicas en las plantas como protección contra patógenos y/o depredadores; y de igual forma son responsables del color y las características sensoriales de los frutos y diversos alimentos [Peñarrieta *et al.*, 2014].

3.2.1.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos están compuestos químicamente por un anillo fenólico y un grupo orgánico de ácido carboxílico, estos se pueden encontrar en forma libre o conjugada, y de acuerdo con su estructura química se pueden clasificar como dos tipos de ácidos fenólicos:

- **Ácidos hidroxicinámicos:** Están formados por un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo, siendo los más comunes el ácido cafeico, ferúlico, cumárico, sinápico y clorogénico.
- **Ácidos hidroxibenzoicos:** Son compuestos que presentan un grupo carboxílico (grupo ácido) y grupos hidroxilo (uno o más) en un anillo aromático. Dentro de los principales se encuentra el ácido gálico, p-hidroxibenzoico y ácido vainillínico.

En frutas y hortalizas se encuentran principalmente en forma libre [Naczki y Shahidi, 2004] (Figura 4), y en algunos cereales predominan en forma conjugada o ligada [De la Parra, *et al.*, 2007]. Este tipo de compuestos presentan propiedades benéficas para el humano como anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes [Gómez y Martínez, 2012].

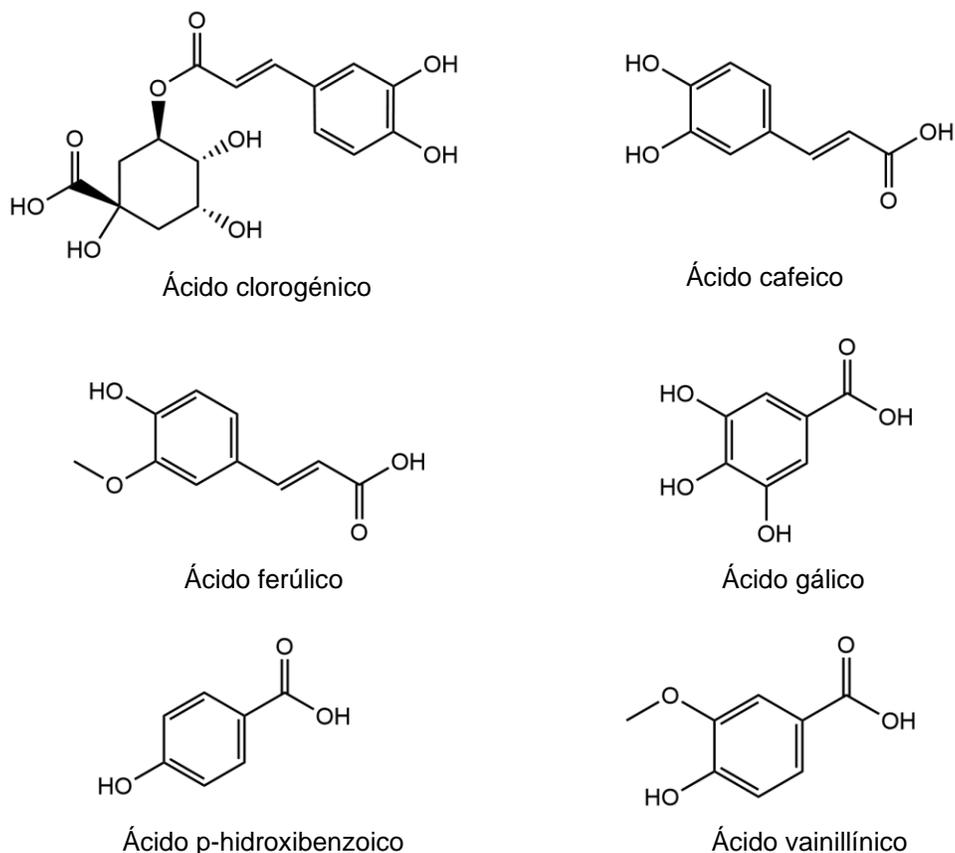


Figura 4. Ácidos fenólicos más comunes en frutas, hortalizas y flores [Naczki y Shahidi, 2004]

3.2.1.2. Flavonoides

Los flavonoides se componen por un esqueleto compartido de difenilpirano ($C_6-C_3-C_6$), es decir, poseen dos anillos aromáticos de fenilo (A y B) que se encuentran unidos a través de un heterociclo de pirano (anillo C) [Martínez, *et al.*, 2002] (Figura 5). A estos se les unen moléculas normalmente en la posición 3 del anillo C, de manera que estos pueden encontrarse de forma unida a azúcares o como aglicón [Martínez, *et al.*, 2002].

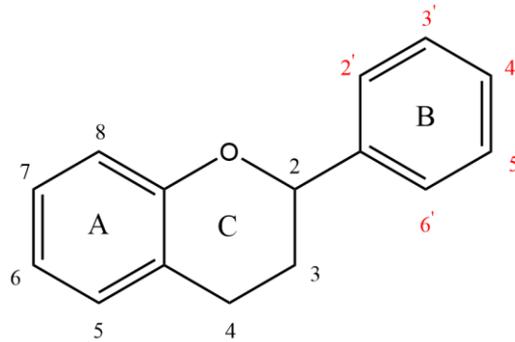


Figura 5. Estructura base de un flavonoide [Martínez, *et al.*, 2002]

Debido a las variaciones del pirano y la posición del anillo B, los flavonoides se pueden clasificar en diferentes grupos [Cartaya & Reynaldo, 2001]:

- **Flavanos:** Tienen un grupo -OH en la posición 3 del anillo C. Las catequinas son el tipo más común de flavanos.
- **Flavonoles:** Además del grupo carbonilo en la posición 4 tienen un grupo -OH en la posición 3 del anillo C. La quercetina y el kaempferol son los compuestos más comunes.
- **Flavonas:** Tienen grupo carbonilo en posición 4 del anillo C, y carecen del grupo hidroxilo en posición C3. Dentro de las principales se encuentran la apigenina y la diosmetina.
- **Antocianidinas:** Tienen la presencia de un catión, además de un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo (B). Las principales son cianidina, pelargonidina, peonidina, delphinidina, petunidina y la malvidina.

El cuerpo humano es incapaz de producir estos flavonoides por lo que se deben incluir estos en la dieta para obtener sus beneficios; estos se encuentran presentes en diversas plantas, y son los compuestos responsables del color de las flores y frutas. Algunas flavonas y flavonoles (Figura 6) se encuentran en la tila, pasiflora y en hojas de algunas especies de eucalipto [López, 2002].

Se ha comprobado que tienen una amplia actividad farmacológica, pueden unirse a enzimas y transportadores de hormonas, así como quelar iones metálicos y eliminar radicales libres [Escamilla, *et al.*, 2009], de tal forma que proveen de efectos protectores contra ciertas enfermedades como cardiopatías, diabetes y poseer acciones antiinflamatorias y antitrombóticas [Martínez, *et al.*, 2002].

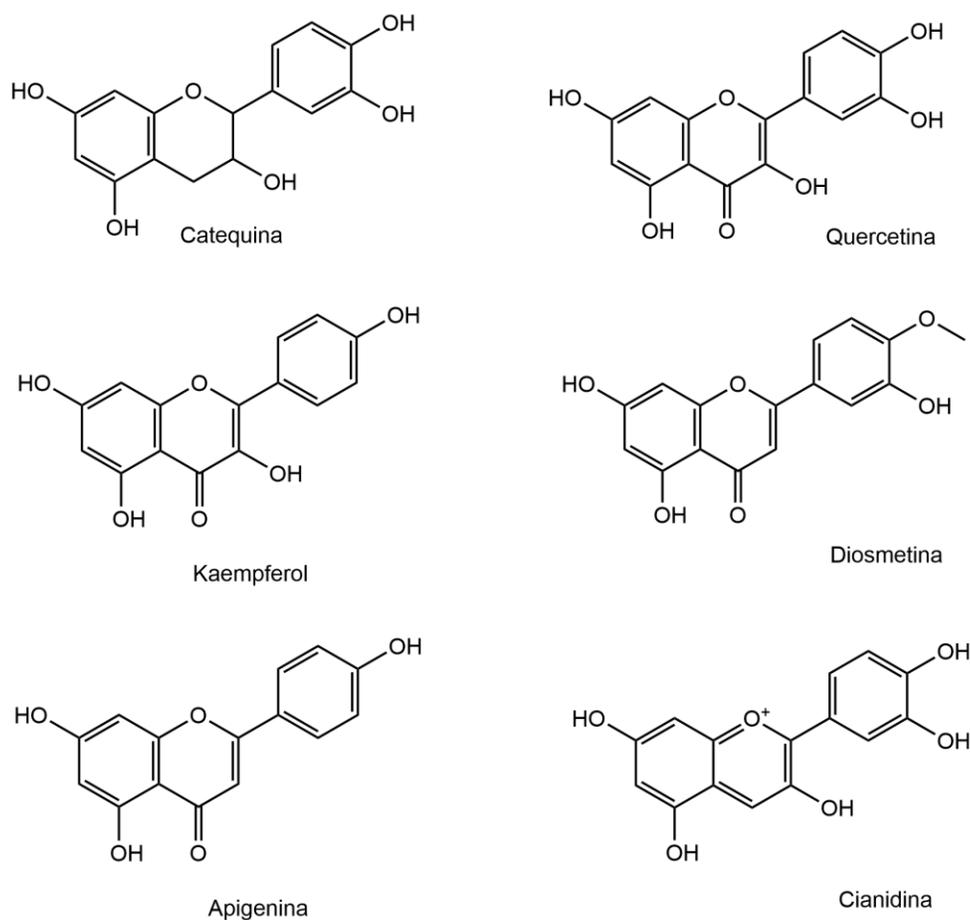


Figura 6. Flavonoides más comunes en alimentos vegetales [López, 2002].

3.2.1.3. Antocianinas

Las antocianinas forman parte del grupo de los flavonoides, como se muestra en la figura 7, están constituidas químicamente por una antocianidina o aglucón [Rodríguez et al., 2001], a la que se le une un azúcar mediante un enlace β -glucosídico; el glucósido casi siempre está presente en la posición 3-hidroxilo del anillo. Los tipos de azúcares presentes pueden ser: monosacáridos, disacáridos o trisacáridos; y a veces estos se encuentran acilados por ácidos fenólicos como el cafeico, cumárico, ferúlico, etc., en el caso de las flores normalmente se encuentran no acilados [Aguilera *et al.*, 2011]. De todas las antocianidinas que actualmente se conocen, las más

importantes son la pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina; normalmente se encuentran en la naturaleza en forma glicosilada (antocianinas).

Aglucón	Sustitución	
	R1	R2
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH3	H
Petunidina	OCH3	OH
Malvidina	OCH3	OCH3

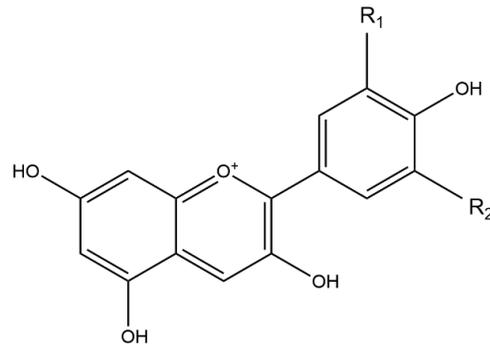


Figura 7. Estructura y sustituyentes químicos de las antocianinas [Rodríguez *et al.*, 2001].

Las antocianinas están presentes en diferentes órganos de las plantas, como frutas y flores [Wu y Prior 2005] principalmente (Figura 8). Existe evidencia científica de que las antocianinas pueden contribuir a la mejora de la agudeza visual, así como a la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidante [Peñarrieta y Tejeda, 2014].

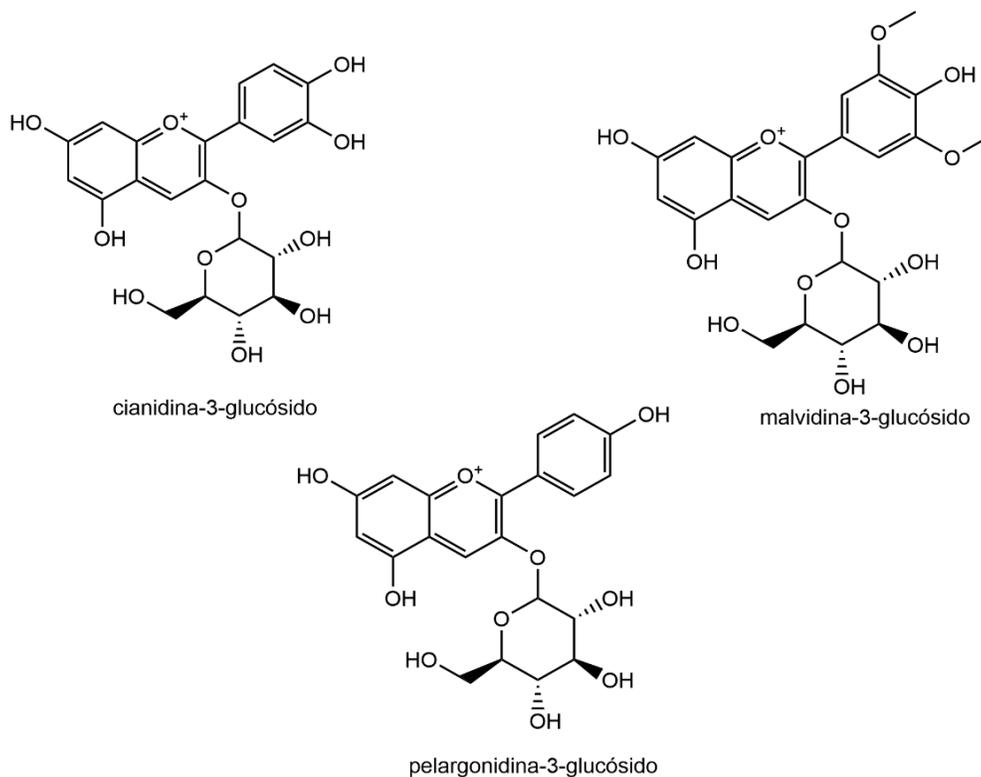


Figura 8. Antocianinas más comunes en alimentos vegetales [Wu y Prior 2005].

3.2.2. Compuestos terpénicos

Los terpenos son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que parten de la conjugación de moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 9); y pueden ser lineales o cíclicos [López-Carreras 2012].

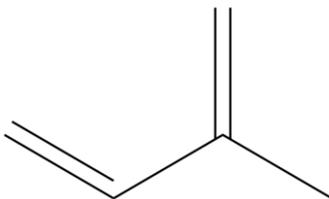


Figura 9. Molécula de isopreno (unidad base de los terpenos) [López-Carreras 2012].

Estos se pueden clasificar de acuerdo con el número de dímeros de isopreno (Figura 10) que forman su estructura, teniendo así moléculas más pequeñas (dos unidades isopreno) y moléculas más grandes (unión de dos o más isoprenos) [Castaños 2015].

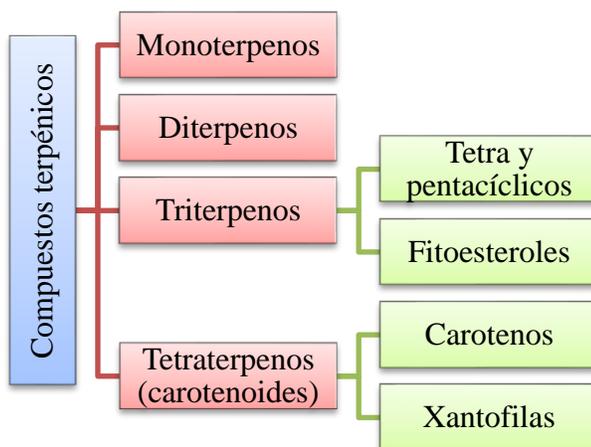


Figura 10. Clasificación general de los compuestos terpénicos [Castaños 2015].

Los terpenos se encuentran principalmente en vegetales y alimentos de color verde, en productos derivados de la soja y en algunos cereales [Castro 2012]. Estos dan las características organolépticas de aroma y sabor en las plantas por lo que se obtienen en forma de aceites esenciales mediante destilación con vapor de agua [López-Carreras 2012]. En las plantas, los terpenos ejercen distintas funciones, principalmente de protección frente a los insectos y temperaturas elevadas, sin embargo, también poseen actividad anticancerígena, propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, hipoglucemiantes, hipolipemiantes y hepatoprotectoras [Reyes 2007].

3.2.2.1. Triterpenos

Están compuestos químicamente de tres unidades de terpenos, es decir, se conforman por seis unidades de isopreno y tienen la fórmula molecular $C_{30}H_{48}$. Existe una diversidad química muy extensa; se han reportado hasta 20,000 moléculas aisladas como fitoesteroles y algunas fitoalexinas [Michaudel 2013], sin embargo, una clasificación general de aquellos de mayor importancia y estudio corresponde a dos grupos:

- **Triterpenos pentacíclicos:** Conformados por 30 unidades de carbono, provienen de la ciclación del escualeno formando cinco anillos. Dentro de los principales que se encuentran en las plantas son los ácidos oleanólico y ursólico, α y β -amirina, lupeol y betulina [Fernández 2014].
- **Fitoesteroles:** Se asemejan a la estructura química del colesterol. Sin embargo, difieren por la presencia de sustituyentes de tipo metilo o etilo en la cadena lateral de dicha molécula. El β -sitoesterol (C29), el campesterol (C28) y el stigmasterol (C29) son los más abundantes en extractos vegetales (Valenzuela *et al.*, 2004).

Tanto los triterpenos pentacíclicos como los fitoesteroles (Figura 11) se encuentran en frutos, semillas, hojas y tallos de casi todas las plantas y vegetales conocidos en la dieta [Fernández 2014]. Los fitoesteroles contribuyen a la disminución del colesterol total plasmático [Valenzuela y Ronco 2004], en tanto, los triterpenos pentacíclicos poseen propiedades antiinflamatorias, antiparasitarias, y modulan el metabolismo glucídico [Herrera *et al.*, 2006].; por lo que su uso se fomenta para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares

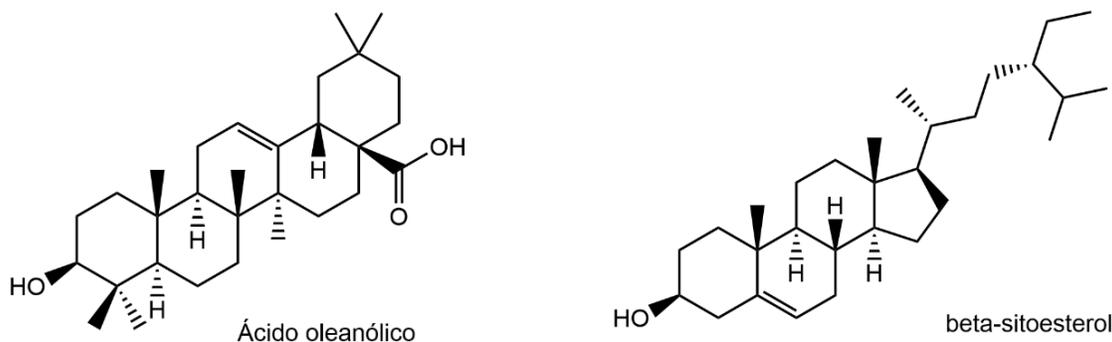


Figura 11. Ejemplos de triterpenos pentacíclicos (ácido oleanólico) y fitoesteroles (beta-sitoesterol) [Fernández 2014].

3.2.2.2. Carotenoides

Los carotenoides son tetraterpenos, es decir, poseen 40 átomos carbono, los mismos que forman cadenas conjugadas que resultan en anillos de ciclohexano sustituidos e insaturados en cada uno de sus extremos [Meléndez-Martínez 2007]. De acuerdo con la estructura química, los carotenoides se suelen clasificar en dos grupos importantes [Meléndez-Martínez 2007]:

- **Carotenos:** Poseen una cadena hidrocarbonada poliinsaturada, que no contiene oxígeno en sus anillos terminales. Los carotenos más importantes y de mayor estudio corresponden al β -caroteno, α -caroteno, y licopeno.
- **Xantofilas:** También poseen una cadena hidrocarbonada poliinsaturada, sin embargo, estas contienen átomos de oxígeno dentro de su estructura química. Las xantofilas más importantes son la luteína, zeaxantina, astaxantina y violaxantina.

Tanto los carotenos como las xantofilas se encuentran presentes en una gran cantidad de alimentos, todos de origen vegetal (Figura 12), debido a que el hombre no es capaz de sintetizarlos estos se obtienen mediante la dieta, fundamentalmente a partir de frutas y hortalizas, en pequeña proporción [Dias 2017].

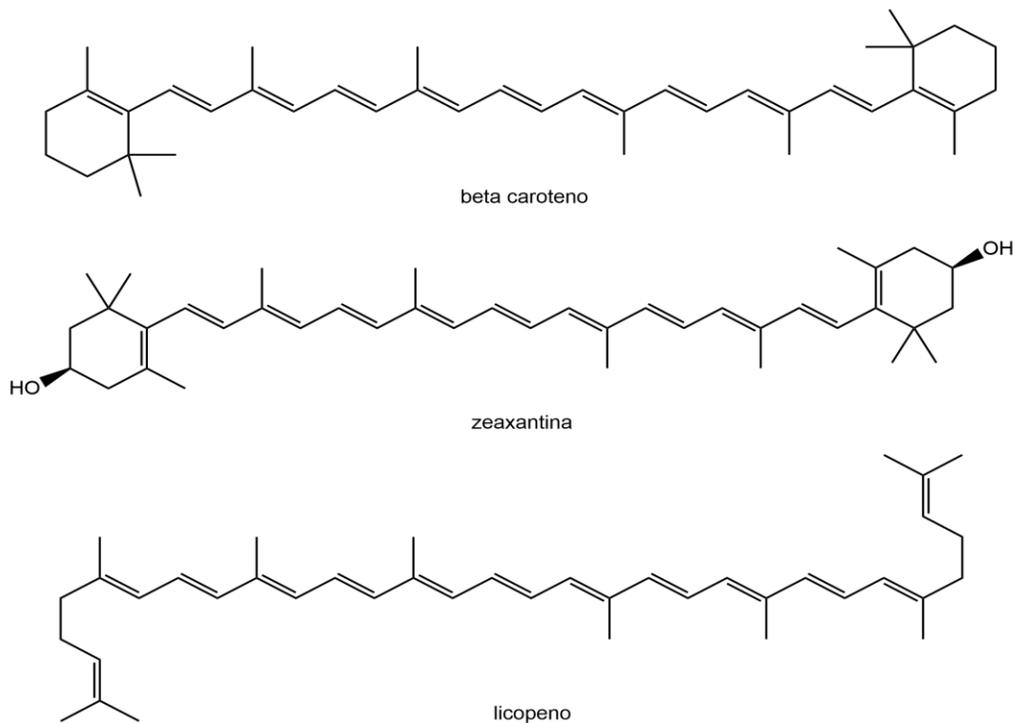


Figura 12. Carotenoides más comunes en alimentos vegetales [Dias 2017].

En las plantas la principal función biológica de los carotenoides es la de servir como pigmentos para la recolección de la luz durante el proceso fotosintético, sin embargo, aportan grandes beneficios al organismo humano; ya que pueden reducir en nuestro cuerpo el efecto negativo de los radicales libres del oxígeno o del estrés oxidante; de igual forma, los carotenos poseen actividad provitamina A, la cual actúa a nivel de la retina para así optimizar el funcionamiento de los receptores oculares [Beltrán *et al.*, 2012].

Las xantofilas a su vez, además de tener efecto protector de la retina, permiten mejorar el rendimiento cognitivo, ya que se ha estudiado que niveles elevados en plasma de luteína y zeaxantina se asocian a un mejor rendimiento mental [Ferney *et al.*, 2017].

3.3. Flores comestibles en estudio

Flor de Mastuerzo (*Tropaeolum majus*)

Mastuerzo, capuchina, pelonchili, curutziti

Poseen pétalos amarillos, naranjas y rojos, y crece durante todo el año principalmente en épocas de lluvias en todo el territorio mexicano.

Usos culinarios y medicinales: Las flores y hojas frescas se consumen mayoritariamente en ensaladas o como infusión. De manera medicinal es utilizada como analgésico, antiescorbútico, cicatrizante, diurético, aperitivo y tónico estomacal; además, se ha comprobado que posee actividad antioxidante, y antiinflamatoria [Bazyko *et al.*, 2013].

Fitoquímicos reportados: ácido clorogénico, pelargonidina-3-soforósido, quercetina-3-soforósido y kaempferol 3-soforósido [Navarro *et al.*, 2015], así como carotenos y xantofilas [Niizu y Rodríguez-Amaya 2005].



Figura 13: Flor de Mastuerzo. Enciclopedia de CONABIO.

Colorines (*Erythrina coralloides*)

Chompantle, chocolin, colorin, equimite, pichoco, quimite.

Son flores cónicas, alargadas y de color rojo; que crecen en racimos [Martínez 2019]. Se encuentra en todo el territorio nacional, sin embargo, éste suele ser usado para dar sombra a cultivos de cacao en tierras cálidas desde Tabasco hasta Venezuela.

Usos culinarios y medicinales: Se suelen cocinar fritas o hervidas, aunque también es muy común prepararlas capeadas, acompañadas de diferentes salsas. Sus infusiones se emplean como antipirético, anti varicoso, hipnótico y sedante [Martínez 2019].

Fitoquímicos reportados: catequina, epicatequina [Li *et al.*, 2014] 6-prenilapigenina, luteolina, y diosmetina-6-glucósido [Fahmy 2018], así como algunos alcaloides [Brito 2016].



Figura 14: Colorines. Enciclovida de CONABIO.

Noche buena (*Euphorbia pulcherrima*)

Nochebuena, flor de Navidad, flor de pascua, pastora, poinsetia.

Posee hojas modificadas, llamadas brácteas, estas últimas pueden ser de colores diversos rojo, amarillo o blanco. Es nativa del sur de México y se cultiva a lo largo de todo el territorio nacional, las poblaciones silvestres más grandes se encuentran en Guerrero, Oaxaca, Michoacán y Chiapas [Trejo-Hernández *et al.*, 2015].

Usos culinarios y medicinales: El látex (savia lechosa) se utilizaba para curar fiebres [Sosa s/f]. Además, se ha empleado como galactógeno en las mujeres, esto mediante infusiones de las brácteas.

Información fitoquímica: Se ha reportado que las hojas rojas contienen resinas, pigmentos flavonoides, almidón, glucosa, sacarosa, sales, aceites esenciales, ácido tartárico y ácido gálico [Fernández 2013].



Figura 15: Flor de Noche Buena. Enciclovida de CONABIO.

Pata de vaca (*Bauhinia purpurea*)

Rape púrpura, casco de venado, orquídea de palo, pata de vaca.

Sus hojas son lobuladas, con flores púrpuras. Aunque el género *Bauhinia* se considera endémico de India, *Bauhinia purpurea* también surge en las regiones tropicales de América; y se halla ampliamente distribuida México y Colombia [CONABIO 2020].

Usos culinarios y medicinales: Las flores suelen utilizarse de manera ornamental, sin embargo, esta planta también es comestible; sus hojas son preparadas como infusiones diuréticas; las cuales tienen actividad antidiabética, y antioxidantes [Abhishek *et al.*, 2019].

Fitoquímicos reportados: Glucósidos de quercetina y kaempferol son los componentes principales, así mismo, se ha encontrado que esta planta además de flavanonas, contiene lectinas [Ferrerres *et al.*, 2012].



Figura 16: Pata de vaca. Galería Naturalista.

Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)

Manita, mano de dragón, mano de león, palo de mecate.

La flor de la manita es de color rojo vistoso, muy parecida a una mano extendida y los frutos tienen forma capsular. Es silvestre y originaria de los estados de Guerrero, Oaxaca, Puebla y Chiapas [Kung 2007].

Usos culinarios y medicinales: Se prepara como una infusión y es consumida para tratar úlceras, dolor de dientes, hemorroides, problemas de epilepsia, insomnio, disenterías y como tranquilizante del sistema nervioso [Kung 2007].

Fitoquímicos reportados: Flavonoides como isoquercetina, catequina y epicatequina, se ha comprobado que estos tienen actividad anti secretoria, lo que ha respaldado el uso de esta planta para los problemas de disenterías [Velázquez *et al.*, 2009].



Figura 17: Flor de Manita. Enciclopedia de CONABIO.

Flor de mayo (*Plumeria rubra*)

Flor de Mayo, sak-nikté, cacaloxóchitlque, flor del cuervo.

Sus flores son bisexuales y pueden ser blancas, rojas o amarillas, estas crecen en racimos [CONABIO s/f]. Es de origen mesoamericano, se distribuye por México hasta, Belice, Colombia, Bolivia y Brasil.

Usos culinarios y medicinales: Se prepara molida con maíz azul para hacer tamales y tortillas. También se come cocida con azúcar. El jugo de la flor se utiliza para curar heridas y como remedio efectivo contra la erisipela (infección bacteriana de las capas externas de la piel), para combatir tos, tosferina y el asma [Sánchez 2019].

Fitoquímicos reportados: Flavononas glicosiladas, nor-terpenoides e iridoides [Akhtar *et al.*, 2013]. Antocianinas como cianidina-3-O- β -(2''-glucopyranosyl-O- β -galactopiranosido) y cianidina-3-O- β -galactopiranosido. [Byamukama *et al.*, 2011].



Figura 18: Flor de Mayo. Más MÉXICO

Flor de calabaza (*Cucurbita pepo*)

Calabazas, flor de calabacín, calabazas de castilla, ayotli.

Las flores pueden ser masculinas o femeninas, el color proviene de los abundantes pigmentos carotenoides [Vela 2010]. Es de origen mesoamericano, y es común en áreas de climas templados [Lira 2009].

Usos culinarios y medicinales: Las flores se hacen en forma de tamales, tortitas, quesadillas, sopas y cremas. Son recomendadas para personas que padecen osteoporosis debido a que son ricas en calcio y fósforo; su consumo fomenta la formación de glóbulos blancos y estimula la producción de enzimas reparadoras, además se usa como protección contra las cataratas y la retinopatía diabética.

Fitoquímicos reportados: Flavonoides de rutinósido, así como ácido cumárico [Servia *et al.*, 2013] y carotenoides como β -caroteno y luteína [Martínez-Valdivieso *et al.*, 2015].



Figura 19: Flor de calabaza. Enciclopedia de CONABIO.

Flor de mostaza (*Sinapis alba*)

Mostaza blanca, mostaza amarilla, ajenabo, mostacilla pilosa

Es de color amarillo claro y tiene cuatro pétalos; es de origen probablemente mediterráneo, sin embargo, en México es considerada una flor comestible silvestre [Vibrans 2003].

Usos culinarios y medicinales: Se usan en ensalada o como acompañamiento para carnes y/o productos del mar. Así mismo, las infusiones de las hojas y flores se han utilizado como remedio medicinal para tratar artritis, dolores de espalda, afecciones bronquiales, dolores de cabeza y resfriados [Ruíz 2012].

Fitoquímicos reportados: Terpenoides, principalmente diterpenos [Saunier *et al.*, 2019], isorhamnetina y kaempferol [Onyilagha *et al.*, 2003], así como glucosinolatos [Mejía-Garibay *et al.*, 2011].



Figura 20: Flor de mostaza. Enciclopedia de CONABIO.

Flor de maguey blanco (*Agave gypsicola*)

Flor de maguey, gualumbos, cacayas, patas de gallina de cerro.

Las flores se localizan en ramas ubicadas en la mitad superior del quiote del agave, y suelen ser de colores vistosos amarillos y verdes [Martínez 2019]. Particularmente, la especie *Agave gypsicola* conocida como maguey blanco es endémica de Tlaxiaco, Oaxaca [García 2019].

Usos culinarios y medicinales: Se preparan rellenas con queso, capeadas o a la mexicana, además de que son el acompañamiento de diferentes tipos de carnes. Estas flores también se han usado como un dulce medicinal para curar problemas de próstata, de riñón y como tratamiento para diabetes [Castaños 2018].

Fitoquímicos reportados: Glucósidos de triterpenos [Sidana *et al.*, 2016] y flavonoides glicosilados de kaempferol y quercetina [Puente-Garza *et al.*, 2017].



Figura 21: Flor de maguey. Enciclopedia de CONABIO.

3.4. Alache (*Anoda cristata* (L.) Schltl)

Malva, *malva cimarrona*, *panelita*, *quesitos*, *amapolita azul*, *amapola silvestre*, *malva abrisca*, *malvavisco*, *violeta de monte*, *malvilla*.

La planta de alache (Figura 22) es una hierba de hasta 1m de alto, sus tallos pueden ser de colores verdes hasta rojos, al igual que sus hojas; estas son de formas variables que pueden ser ovadas, lanceoladas o hastadas (en forma de flecha). Sus flores son pedúnculos largos, axilares, de color lila o morados, y sus frutos poseen espinas radiales en forma de estrella, en el interior se hallan las semillas que son blancas cuando están tiernas y negras cuando están secas [Rendón *et al.*, 2001].

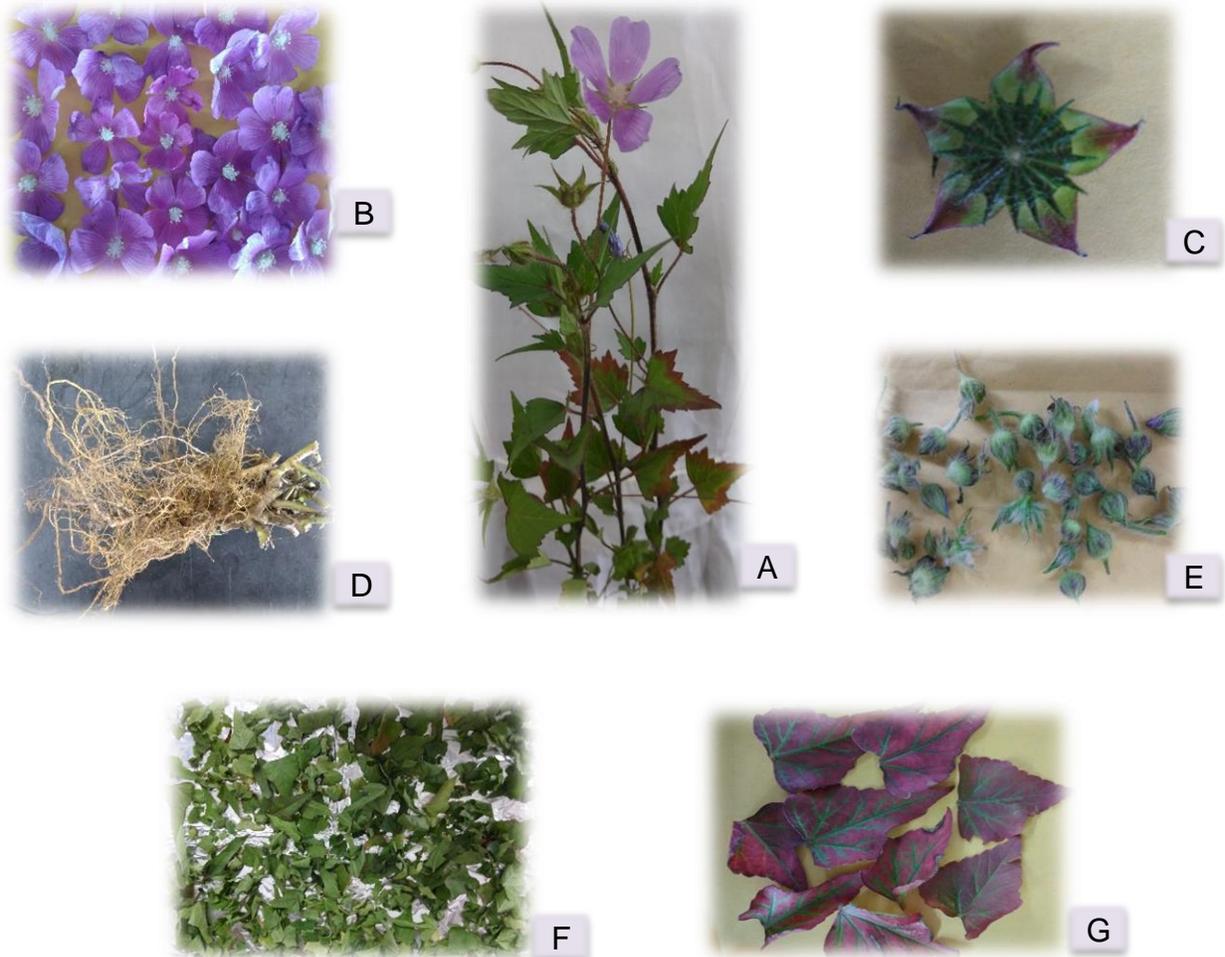


Figura 22. *Anoda cristata*. A: planta de alache; B: flores; C: fruto; D: raíz; E: botones; F: hoja verde; G: hojas rojas. Fuente: elaboración y fotografías propias.

Alache en México

El género de *Anoda* perteneciente a la familia de las malvas se considera endémico de México y se encuentra ampliamente distribuido en todo el país. Es una planta anual que comienza a crecer a mediados de la primavera; florece y fructifica desde el verano hasta fines de otoño; y se desarrolla en climas cálidos, semisecos y templados; es más abundante su crecimiento con las lluvias en diferentes tipos de sembradíos y a la orilla de los arroyos [Juárez 2016].

Se encuentra ampliamente distribuida en el país; los estados en los que esta planta predomina son el Estado de México, Campeche, Baja California sur, Chiapas, Oaxaca, Nuevo León, Chihuahua, Coahuila, Michoacán, Morelos, Nayarit, Querétaro, Sinaloa, San Luis Potosí, Puebla, Tabasco y Ciudad de México [Bautista-Cruz *et al.*, 2011].

El alache, aunque suele ser consumido por ciertas poblaciones, es considerada como maleza debido a que crece de forma ruderal en áreas muy variadas, puede crecer tanto en sembradíos específicos como a las orillas de los arroyos y carreteras. Suele encontrarse en cultivos de maíz, lo que no representa un problema grande en la agricultura campesina y maicera, sin embargo, sí es un problema sustancial en la agricultura de cultivos como el algodón, ya que es de la misma familia botánica. En México se considera una especie olvidada o no tan conocida, ya que la mayoría de esta, normalmente se desecha una vez que muere o se seca en los diferentes lugares en donde se desarrolla, y solo una parte es consumida, sin embargo, su difusión con fines culinarios o medicinales también es escasa.

Usos culinarios

El alache se considera un quelite (hierba comestible), por lo que las hojas y los tallos tiernos suelen prepararse en diversas recetas desde infusiones hasta sopas o caldos. Las flores suelen ser mezcladas junto con el quelite (hojas) para preparar guisados, o en algunos casos, se emplean secas para preparar infusiones [Linares *et al.*, 2017]. Con respecto a su composición nutricional se sabe que es rica en proteínas y polisacáridos ya que posee mucílagos [Bautista-Cruz *et al.*, 2011].

Usos medicinales

De manera empírica, las partes de la planta de alache se han utilizado en diferentes poblados del país, principalmente para tratar problemas respiratorios. Las hojas suelen combinarse con otro tipo de plantas como el sauco o lima para preparar fomentos con el objetivo de tratar enfermedades respiratorias o para el tratamiento de la bilis [Rendón et al., 2001]. De igual forma, las flores se deshidratan y se cuecen para combatir la tos y la mezcla de estas con las hojas y plantas como gordolobo o tejocote son empleadas contra el padecimiento de tosferina. Otros malestares para los que esta planta es utilizada son la fiebre, problemas de riñón y hemorroides [Rendón et al., 2001].

Aunque esta planta no ha sido ampliamente estudiada con respecto a su perfil fitoquímico, se ha descrito anteriormente que *Anoda cristata* tiene propiedades hipoglucemiantes en pruebas realizadas con ratas hiperglucémicas [Brindis 2011]. Fue en 2015 cuando se confirmó que los extractos de las partes aéreas (quelite) poseen además propiedades anti hiperglucémicas; esto debido a la presencia de las flavonas diosmetina y acacetina, las cuales actúan como secretagogos de insulina [Juárez-Reyes et al., 2015]; de tal forma que, se ha respaldado el uso de esta planta en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II.

3.5. Biocolorantes

Los colorantes naturales (biocolorantes) son aquellos pigmentos provenientes de fuentes naturales como plantas o animales, los cuales tienen la capacidad de proporcionar color. Antiguamente, estos pigmentos fueron empleados como una herramienta pionera en la expresión artística; en la actualidad, son utilizados también en alimentos, cosméticos, industria textil, etc. [Moldován 2016].

Las principales fuentes de obtención de biocolorantes son las plantas, hongos, algunas algas y/o animales como insectos, de tal forma que estos se pueden clasificar en dos grandes grupos (Figura 23) con respecto a su origen orgánico: biocolorantes vegetales y biocolorantes animales; también existen biocolorantes inorgánicos los cuales son de origen mineral [Moldován 2016].

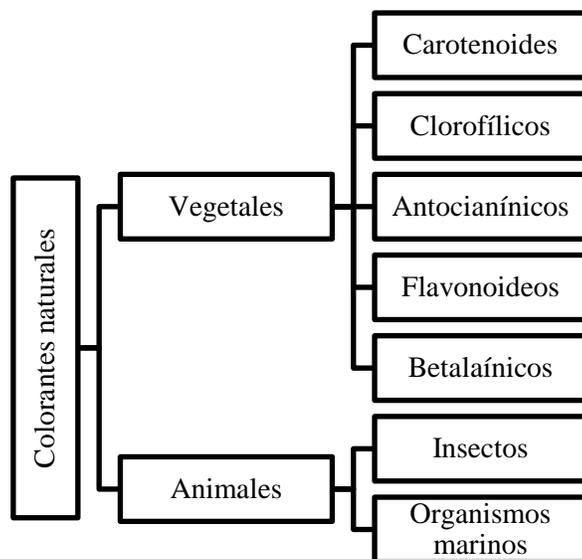


Figura 23. Clasificación de los colorantes naturales. Adaptado de Moldován 2016.

En el caso de las flores, estos compuestos coloridos forman parte de los metabolitos secundarios generados por las plantas, su principal función es guiar a los insectos a las flores para realizar la polinización o como factor de atracción entre géneros para la reproducción [Martín-Peñasco 2019].

Normalmente, los colorantes naturales conllevan un limitado proceso químico para posteriormente ser sometidos a pruebas de identidad y pureza que les permita ser utilizados en alimentos. Los métodos de extracción de biocolorantes se basan principalmente en la solubilidad de dichos compuestos [Nilton 2019], por lo que también se pueden clasificar de acuerdo con esta propiedad (Figura 24).

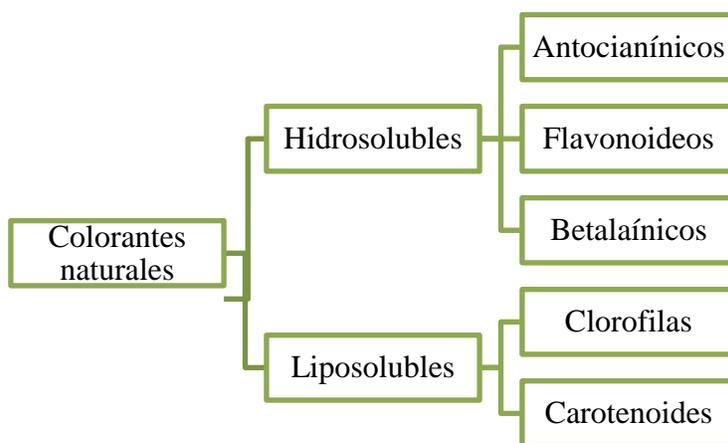


Figura 24. Clasificación de colorantes naturales por su solubilidad [Nilton 2019].

3.5.1. Antocianinas como biocolorante

Las antocianinas son consideradas como el grupo más importante de pigmentos naturales hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano. En la gama de colores abarcan desde el rojo hasta el azul en varios productos naturales como frutas, vegetales y cereales, y estos se encuentran acumulados en las vacuolas de la célula [Aguilera *et al.*, 2011].

El interés creciente por usar este tipo de pigmentos se debe a que actualmente es conocido que algunos de los colorantes sintéticos empleados para la industria alimentaria tienen un nivel de toxicidad que ha limitado su uso en diversos países; particularmente los rojos artificiales como el 2G, 9, 40 y 3 [Belmonte *et al.*, 2016]; en cambio, los pigmentos como las antocianinas, además de provenir de una fuente natural, han sido considerados como compuestos de valor agregado ya que una dieta rica en antioxidantes que las incluya, puede repercutir en la disminución del riesgo de padecer enfermedades como cáncer, diabetes y problemas coronarios [Shipp y Abdel-Aal, 2010].

3.5.2. Estabilidad y copigmentación de antocianinas

Como se describió anteriormente, las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides. Como se describe en la tabla 1, de acuerdo con los sustituyentes en su estructura química es que se derivan los colores de estas; cuando hay un incremento en la hidroxilación predominan las tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas [Garzón 2008].

Tabla 1. Coloración de las antocianinas

Antocianina	λ_{\max} (nm) espectro visible	
Pelargonidina	494	naranja
Cianidina	506	naranja-rojo
Delfinidina	508	azul-rojo
Peonidina	506	naranja-rojo
Petunidina	508	azul-rojo
Malvidina	510	azul-rojo

Fuente: Durst y Wrolstad, 2001.

A pesar del poder tintorial que ofrecen las antocianinas y sus propiedades benéficas, su incorporación en los productos alimenticios aún es limitada debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento [Cevallos-Casals *et al.*, 2004]. Estos compuestos se ven afectados por diversos factores entre los que destacan los siguientes:

pH

El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas [Ballesteros y Díaz 2017]:

- (pH < 2) tiene un efecto protector sobre la molécula ya que se presenta como catión flavilio que es la forma más estable del pigmento en soluciones acuosas; y predominan las tonalidades rojas.
- (2 < pH < 7) existe un equilibrio entre las formas hemiacetal y chalcona de la antocianina debido a la pérdida del protón, estas además de ser incoloras son muy inestables.
- (pH > 7) se presentan la forma quinoidal, en este caso la coloración tiende a tonalidades azules o púrpuras, sin embargo, este tipo de compuestos son muy susceptibles a la oxidación.

Temperatura

El tratamiento térmico también afecta la estructura química de las antocianinas, ya que se provoca una hidrólisis de esta, lo que resulta en la pérdida de los azúcares glicosilantes, ya sea en la posición 3 o 5 de la molécula. Conforme la temperatura aumenta también se puede dar la apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas inestables, por lo que se ve una pérdida de color [Aguilera *et al.*, 2011].

Efecto de agentes oxidantes

Tanto el oxígeno como el ácido ascórbico ejercen un efecto de deterioro sobre las antocianinas. Se sabe que existe una reacción de condensación entre el pigmento y el ácido ascórbico, lo que provoca una aceleración en la descomposición de las antocianinas [Garzón 2008]. En el caso del oxígeno, este actúa de forma en que los compuestos oxidados del medio en el que se encuentre la molécula reaccionan directamente con la antocianina para dar lugar a compuestos incoloros o de color café [Alamilla *et al.*, 2016].

A pesar de que la estabilidad de las antocianinas se ve influenciada por diversos factores, también existen moléculas con características específicas, las cuáles presentan una resistencia mayor al deterioro debido a que desarrollan mecanismos diversos como asociaciones intramoleculares (acilación), asociaciones intermoleculares (copigmentación), reacciones de polimerización o interacciones con otros compuestos químicos [Jiménez *et al.*, 2011].

Fenómeno de copigmentación

La copigmentación es un fenómeno químico que hace que el color de las antocianinas sea más intenso, brillante y estable; esto se debe a la interacción que hay entre las antocianinas con otras moléculas orgánicas, de tal forma que se ejerce un efecto protector contra la degradación por luz, calor o pH [Kopjar *et al.*, 2012].

Normalmente se habla de tres tipos de copigmentación principales [Rein 2005]:

- Auto asociación: Se da cuando las antocianinas mismas, pueden actuar como copigmentos y agruparse mediante interacciones intermoleculares.
- Copigmentación intermolecular: Suele darse con copigmentos exógenos (incolores) como flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, y aminoácidos, esto sucede por un mecanismo análogo a la auto asociación en soluciones ácidas.
- Copigmentación intramolecular: Esta se da por el acomplejamiento molecular de las antocianinas con otros compuestos como ácidos fenólicos, lo cual es más eficiente cuando el pigmento y el copigmento se encuentran unidos a través de un intermediario, de tal forma que las glicosilaciones de las antocianinas se encuentran aciladas.

Para que se efectúe la reacción de copigmentación, debe existir una reacción molecular entre la estructura colorida de la antocianina y el copigmento; la formación de estos complejos en condiciones ácidas mejora las cualidades visuales y la estabilidad del color en las flores y/o frutos que los contienen [Suárez *et al.*, 2018].

Además, es sabido desde hace tiempo que los flavonoides están comúnmente asociados con las antocianinas en las plantas, por lo que se ha sugerido el uso de algunos de estos compuestos para mejorar la estabilidad de pigmentos como las antocianinas en alimentos [Suárez y Narváez 2016].

4. Hipótesis

Se ha descrito que diversas flores comestibles son ricas en compuestos bioactivos; al buscar la presencia y su contenido en diversas flores de México, estas podrían ser consideradas para la posterior obtención de sustancias de interés. En el caso de *Anoda cristata*, al ser una planta poco conocida, la presencia de fitoquímicos importantes como fenoles y terpenos puede dar pauta a su aprovechamiento en aplicaciones biotecnológicas en alimentos.

5. Justificación

El uso de las flores como alimento ha existido desde tiempos ancestrales y a lo largo de la historia se han reportado algunas de sus propiedades nutrimentales, de ahí la importancia de estudiar el perfil de compuestos químicos que también pueden ser empleados en aplicaciones biotecnológicas diversas. En este estudio, además de evidenciar fuentes florales ricas en compuestos bioactivos, también se destaca que son plantas presentes en el territorio mexicano consumidas por algunas poblaciones pero que no son del todo conocidas; como es el caso de la planta de Alache, la cual es muy abundante en el país, sin embargo, al ser considerada maleza por invadir otro tipo de cultivos, se asemeja más como un residuo y por ende no ha sido explotado su uso como alimento. Esta además se caracteriza porque presenta coloraciones intensas que son debidas a las antocianinas existentes en las flores y hojas, las cuales hasta la fecha no han sido identificadas; de ahí el interés de caracterizarlas y proponer su uso en alimentos como colorante natural, satisfaciendo por una parte la creciente tendencia en la industria alimentaria por la búsqueda de nuevas fuentes de biocolorantes que sustituyan a los artificiales, a la vez que puede aprovecharse buena parte del residuo generado por esta planta y explotar su consumo tradicional como una flor endémica mexicana.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Identificar y cuantificar los principales compuestos bioactivos fenólicos y terpénicos presentes en diez flores características de México; posteriormente, seleccionar una fuente floral poco conocida (*Anoda cristata* (L.) Schldl) de tal forma que se dé a conocer el perfil fitoquímico de las partes más representativas de dicha planta para su posterior aplicación biotecnológica en alimentos.

6.2. Objetivos particulares

- Determinar el contenido de compuestos bioactivos totales: fenoles, flavonoides, antocianinas y carotenos de las flores en estudio mediante métodos espectrofotométricos.
- Determinar por cromatografía en capa fina con estándares conocidos la presencia de cinco grupos de compuestos bioactivos: antocianinas, carotenos, flavonoides, ácidos fenólicos y fitoesteroles, en las diferentes flores.
- Cuantificar mediante métodos espectrofotométricos el contenido de compuestos bioactivos en las diferentes partes de la planta de *Anoda cristata*: flores, hojas (rojas y verdes), tallos, semillas, botones y raíz.
- Determinar el perfil de fitoquímicos presentes en la planta de *Anoda cristata* mediante cromatografía en capa fina con estándares conocidos de los grupos de compuestos: antocianinas, carotenos, flavonoides, ácidos fenólicos y fitoesteroles.
- Identificar mediante HPLC el perfil de antocianinas presente en flores y hojas rojas de *Anoda cristata*.
- Caracterizar mediante HPLC-EM las antocianinas presentes tanto en flores como en hojas rojas de *Anoda cristata*.
- Elaborar un producto alimenticio empleando las antocianinas de *Anoda cristata* como biocolorante realizando ensayos rápidos de resistencia a la temperatura y de copigmentación con ácido rosmarínico.

7. Metodología

7.1. Reactivos y equipo

Reactivos:

Metanol, acetona, etanol, n-hexano, acetato de etilo, tolueno, cloroformo, isopropanol, diclorometano (Sigma-Aldrich). Agua destilada, agua desionizada. Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), acetonitrilo grado HPLC (JT Baker), ácido fórmico grado HPLC (JT Baker). Ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, ácido acético, ácido clorhídrico, acetato de sodio, cloruro de potasio (Sigma-Aldrich), sacarosa comercial, glucosa (Karo), saborizante artificial de fresa (Deiman).

Disoluciones:

Hidróxido de sodio 1M, carbonato de sodio al 2%, buffer de acetatos 0.4 M (pH 4.5), buffer de cloruros 0.025 M (pH 1), nitrito de sodio al 5%, tricloruro de aluminio al 10%, ácido fórmico al 80%, cloruro férrico al 2% en MeOH, anisaldehído al 1%.

Equipo:

Molino para café KRUPS GX 4100, placas de sílice de 2 mm, lámpara UV, liofilizadora Labconco 7522900, ultracongelador -80°C Revco Harris, espectrómetro GBC-CINTRAL 10, sonicador Cole Palmer 8892, balanza analítica OHAUS AP1105, cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC Waters), rotavapor (Buchi) R-215 con baño de calentamiento B-491 y bomba de vacío V-700.

7.2. Estrategia experimental

Para el desarrollo de este trabajo se diseñaron dos etapas o ejes principales (Figura 25):

- **Primera etapa:** Corresponde a la búsqueda de compuestos bioactivos en flores comestibles mexicanas.
- **Segunda etapa:** Corresponde al estudio de la planta de alache (*Anoda cristata*), y la posterior aplicación de antocianinas como biocolorante.

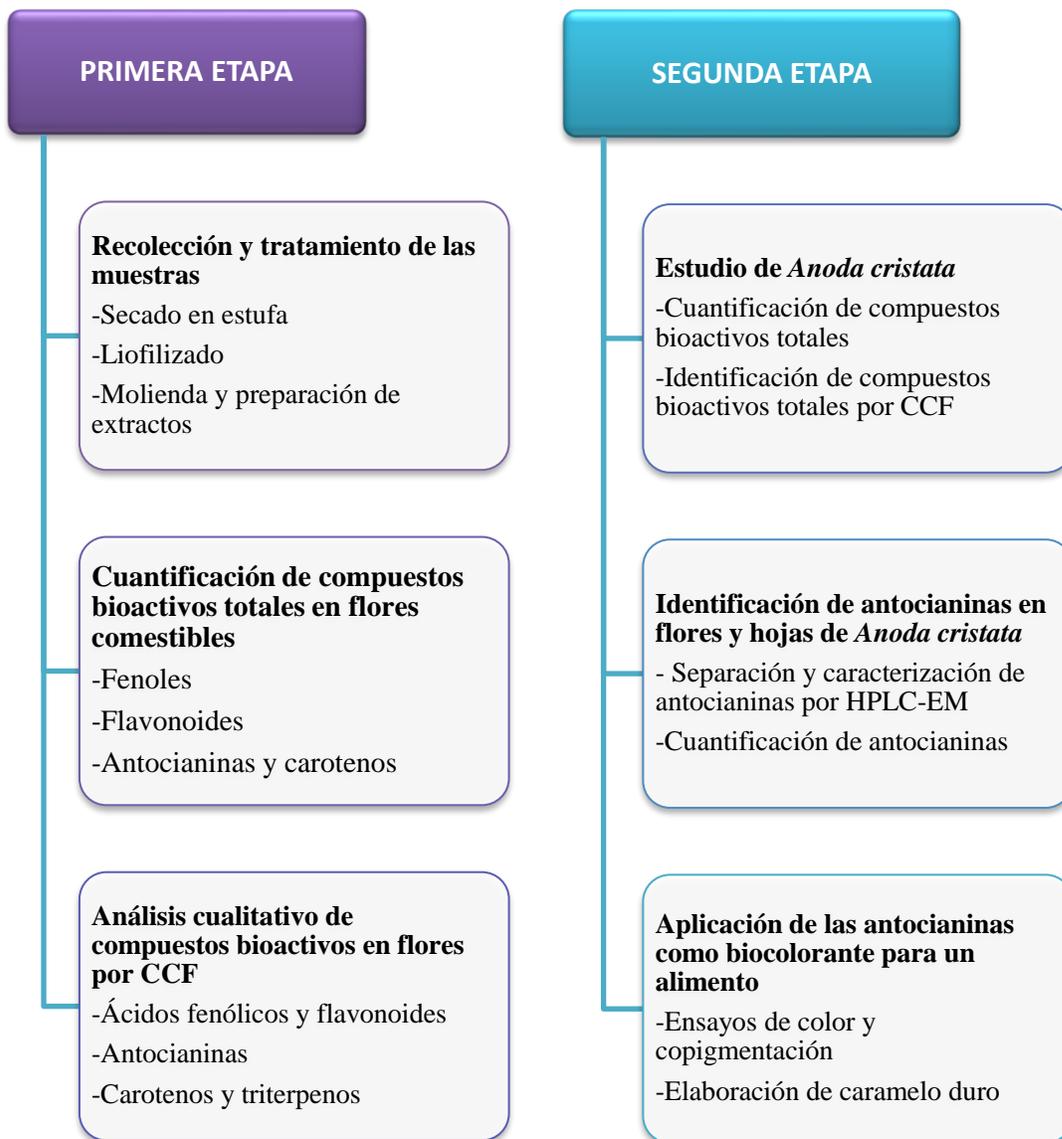


Figura 25. Diagrama general de estrategia experimental

7.3. Procedimientos

7.3.1. Primera etapa: Estudio de flores comestibles mexicanas

Las muestras de flores (Tabla 2) fueron recolectadas en diferentes municipios dentro del Estado de México, Oaxaca y la CDMX en la temporada que comprende los meses de febrero a mayo del 2019. La flor de alache (*Anoda cristata*) fue recolectada en los meses desde agosto a octubre de 2019 debido a que ésta se da en abundancia en el tiempo posterior a la temporada de lluvia. Las flores secas y molidas se almacenaron a temperatura ambiente en frascos ámbar en un lugar fresco.

Tabla 2. Flores estudiadas y tratamiento de secado.

Flor	Secado	Nombre científico	Lugar de procedencia
Capuchina	Estufa 45°C	<i>Tropaeolum majus</i>	Reserva Ecológica Pedregal San Ángel
Colorín	Liofilizado	<i>Erythrina americana</i>	Los Reyes, La Paz, Estado de México
Noche buena	Estufa 45°C	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Reserva Ecológica Pedregal San Ángel
Pata de vaca	Estufa 45°C	<i>Bahuhinia variegata</i>	Reserva Ecológica Pedregal San Ángel
Flor de alache	Liofilizado	<i>Anoda cristata</i>	Ozumba de Alzate, Estado de México.
Flor de manita	Estufa 45°C	<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	Instituto de Biología, UNAM.
Flor de mayo	Estufa 45°C	<i>Plumeria rubra</i>	San Mateo Peñasco, Tlaxiaco Oaxaca
Flor de calabaza	Ambiente	<i>Curcubita pepo</i>	San Mateo Peñasco, Tlaxiaco Oaxaca
Flor de mostaza	Ambiente	<i>Sinapis alba</i>	San José Yotantoyo, Tlaxiaco Oaxaca
Gualumbos	Estufa 45°C	<i>Agave americana</i>	San Juan Teita, Tlaxiaco Oaxaca

7.3.1.1. Cuantificación de compuestos bioactivos totales

Para la cuantificación de fenoles, flavonoides y antocianinas totales se elaboró un extracto metanólico, mientras que para carotenos totales se utilizó un extracto a partir de hexano.

Extracto metanólico: Se pesaron 0.5 ± 0.05 g de muestra seca en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se adicionaron 10 mL de una solución de metanol: agua: ácido acético [80:20:1%], posteriormente se sometió a proceso de sonicación durante 30 minutos a temperatura ambiente y se filtró al vacío para obtener un extracto colorido.

Extracto de hexano: Se pesaron 0.5 ± 0.05 g de muestra seca en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se adicionaron 10 mL de una solución de hexano: acetona: etanol [50:25:25], después de esto, se sometió a proceso de sonicación durante 30 minutos a temperatura ambiente y se filtró al vacío.

Fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu [García y Fernández, 2011]. Se tomaron 100 µL del extracto metanólico en un tubo de ensaye y se agregaron 2 mL de NaCO₃ al 2%, después de dos minutos se adicionaron 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1 diluido en agua) y se dejó reaccionar durante 30 min. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm. Para la cuantificación de resultados se empleó una curva patrón de ácido gálico; la ecuación de la recta obtenida corresponde a $y = 2.0877[x] + 0.0341$; $r^2 = 0.9935$. Las unidades se expresaron como mg ac. gálico/ g mtra. seca.

Flavonoides totales

Se determinaron mediante el método de cloruro de aluminio con lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm [Zhishen *et al.* 1999]. Del extracto metanólico se tomaron 100 µL en un tubo de ensaye y se adicionaron 140 µL de agua y 30 µL de NaNO₃ al 5%, transcurridos 5 min se agregaron 30 µL de AlCl₃ al 10%, 200 µL de NaOH 1M y 500 µL de agua. Finalmente, se midió la absorbancia y se empleó una curva patrón de catequina; la ecuación de la recta obtenida corresponde a $y = 1.7228[x] + 0.0885$; $r^2 = 0.9912$. Los resultados se expresaron como mg de catequina/ g mtra. seca.

Antocianinas totales

De acuerdo con el método de pH diferencial [Abdel-Aal, 1999]. Del extracto metanólico se tomaron 200 µL en un tubo de ensaye y se adicionaron 1800 µL de un buffer de cloruros (pH 1) y en otro tubo con dicho extracto se agregaron 1800 µL de un buffer de acetatos (pH 4.5). Se midió la absorbancia de ambos tubos a una longitud de onda de 510 y 700 nm. Los resultados se obtienen con la siguiente ecuación y se reportaron como mg cianidina-3-glucósido/ g mtra. seca.

$$A^* = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH 1} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH 4.5}$$
$$AT = (A^* \times PM \times FD \times 100) / (\epsilon \times 1)$$

Dónde= A*: absorbancia corregida, PM: peso molecular de cianidina-3-glucósido (449.2 g/mol), FD: factor de dilución (10), ϵ : absortividad molar de cianidina-3-glucósido (26900 L/cm*mg).

Carotenos totales

Se determinaron mediante la técnica descrita por Rodríguez-Amaya con lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm [Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004]. El extracto obtenido para carotenos una vez filtrado se llevó a un volumen de aforo de 10 mL con hexano, posteriormente se midió la absorbancia. El contenido de carotenos se expresó como μg de β -caroteno / g de mtra. seca de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Carotenos totales} = (A * V * 10^4) / (2592 * Pm)$$

Donde= A: absorbancia a 450 nm, V: volumen de aforo (10), 10^4 : constante de conversión de unidades mg/g, 2592: coeficiente de extinción molar de b-caroteno, Pm: peso de la muestra (g).

7.3.1.2. Análisis cualitativo de compuestos bioactivos por CCF

Obtención de extractos:

Para la identificación de los compuestos bioactivos por CCF se realizó una extracción inicial con metanol; se pesó 1.0 g de muestra seca de las diferentes flores y se adicionaron 20 mL de MeOH: H₂O: Ac. acético (80:20:1%), posteriormente se sonicó durante 30 min y se filtró al vacío; a dicho extracto se le evaporó el metanol en rotavapor a 30°C y se realizó una extracción con hexano, la fase orgánica obtenida funcionó como extracto para identificar *carotenos y triterpenos*. Con la fase acuosa se realizó una nueva extracción, realizando lavados con acetato de etilo, la fase orgánica se recuperó y funcionó como extracto para identificar *ácidos fenólicos y clorogénicos*. Finalmente, la fase acuosa restante se empleó como extracto para identificar *antocianinas y flavonoides*.

Identificación cromatográfica

Se emplearon placas de gel de sílice en las cuales se colocaron aplicaciones de los diferentes extractos y estándares conocidos; una vez seca la placa se colocó en una cámara cromatográfica saturada con la fase móvil correspondiente como se describe en la tabla 3. Finalmente, las placas fueron reveladas para la identificación de los compuestos.

Tabla 3. Sistemas de elución para identificación de compuestos por CCF.

Compuesto a identificar	Estándares de referencia	Sistema de elución	Revelador
Ácidos fenólicos	Ácidos HC: Ferúlico, cafeico, cumárico, sinápico, clorogénico. Ácidos HB: Gálico, vainillínico, <i>p</i> -hidroxibenzoico.	Cloroformo: Tolueno: Acetato de etilo: Acetona: Ac. fórmico (40:40:30: 20:10)	Lámpara UV Cloruro férrico al 2%
Flavonoides	Catequina, rutina, luteolina, quercetina, kaempferol	Acetato de etilo: Agua: Ac. fórmico (85:10:15)	Lámpara UV
Antocianinas	Bibliográfica	Acetato de etilo: Agua: Ac. fórmico: Metanol (85:10:15:5)	Luz blanca
Carotenos	β -caroteno (zanahoria), luteína (pimiento morrón).	Hexano: Acetato de etilo (7:3)	Luz blanca
Triterpenos y Esteroles	α y β amirina, betulina lupeol, β -sitoesterol.	Hexano: Acetato de etilo (7:3)	Anisaldehído al 1%

HC: Ácidos hidroxicinámicos, **HB:** Ácidos hidroxibenzoicos

7.3.2. Segunda etapa: Estudio de la flor de alache *Anoda cristata* (L.)

7.3.2.1. Tratamiento de muestra y cuantificación de compuestos bioactivos totales

Se estudiaron las partes más representativas de la planta de *Anoda cristata* mediante análisis cuantitativos y cualitativos. Las partes seleccionadas fueron las flores, hojas verdes y rojas, tallos, botones, semilla o fruto y la raíz; estas fueron secadas en estufa a 45°C mientras que las flores se sometieron a tres procesos de secado diferentes para la elección del más adecuado de acuerdo con el contenido de compuestos bioactivos totales. Los métodos de secado seleccionados para las flores de alache fueron estufa a 45°C, liofilización y secado por microondas.

Una vez secas las diferentes partes la planta, estas se sometieron a molienda y se almacenaron en un lugar fresco y seco para la cuantificación de fenoles, flavonoides, antocianinas y carotenos totales de acuerdo con las metodologías descritas anteriormente para cada caso.

7.3.2.2. Identificación del perfil fitoquímico por CCF de las partes de la planta

La identificación cualitativa de los compuestos bioactivos de *Anoda cristata* se realizó de acuerdo con la metodología descrita anteriormente para la obtención de los extractos para cada parte de la planta. Posteriormente, los extractos se corrieron en capa fina de sílice para la identificación de los diferentes grupos con los estándares y sistemas de elución descritos en la tabla 4.

Tabla 4. Sistemas de elución para identificación de compuestos por CCF en planta de alache.

Compuesto a identificar	Estándares de referencia	Sistema de elución	Revelador
Ácidos fenólicos	Ácidos HC: Ferúlico, cafeico, cumárico, sinápico, clorogénico. Ácidos HB: Gálico, vainillínico, <i>p</i> -hidroxibenzoico.	Cloroformo: Tolueno: Acetato de etilo: Acetona: Ac. fórmico (40:40:30: 20:10)	Lámpara UV Cloruro férrico al 2%
Flavonoides	Catequina, rutina, epicatequina	Acetato de etilo: Agua: Ac. fórmico (85:10:15)	Lámpara UV
Antocianinas	Bibliográfica	Acetato de etilo: Agua: Ac. fórmico (85:10:15)	Luz blanca
Carotenos	β -caroteno (zanahoria), luteína (pimiento morrón).	Hexano: Isopropanol: Agua (100:10:0.5)	Luz blanca
Triterpenos y Esteroles	α y β amirina, betulina lupeol, β -sitoesterol.	Hexano: Diclorometano: Acetato de etilo (7:1.5:1.5)	Anisaldehído al 1%

HC: Ácidos hidroxicinámicos, **HB:** Ácidos hidroxibenzoicos

7.3.2.3. Caracterización y cuantificación de antocianinas en flores y hojas de *Anoda cristata*

7.3.2.3.1. Identificación y caracterización del perfil de antocianinas

La identificación de antocianinas se realizó en las flores y en las hojas rojas del alache por HPLC; Para esto, se hizo una extracción con relación 1:20 de la muestra seca con la mezcla de disolventes MeOH: Agua: Ac. acético [80: 20: 1%], al extracto obtenido se le evaporó el metanol en rotavapor y posteriormente se hicieron lavados con hexano; a la fase acuosa obtenida se le hicieron lavados nuevamente con acetato de etilo.

El extracto acuoso obtenido finalmente se sometió a un proceso de purificación adsorbiéndolo en amberlita y realizando lavados con abundante agua, una vez concluido esto, las antocianinas se desadsorbieron con metanol acidificado al 1%. El extracto purificado se concentró en rotavapor y se inyectaron 20 µL en un equipo de HPLC (Waters) [método modificado reportado por Torres, 2016] a una longitud de onda de 520 y 325 nm. Se empleó una columna Hipersil - Gold C-18 (250 X 4.5 mm, 5 µm), con flujo de 1 mL/min. Las fases móviles utilizadas fueron: **A:** Agua / Acetonitrilo / Ac. fórmico (90:10:1%) y **B:** Acetonitrilo (100) con el gradiente de elución descrito en la tabla 5.

Tabla 5. Gradiente de elución en HPLC para identificación de antocianinas.

Tiempo	% A	% B
-	97.0	3.0
30.0	80.0	20.0
40.0	80.0	20.0
43.0	70.0	30.0
50.0	70.0	30.0
53.0	97.0	3.0
56.0	97.0	3.0

Por tiempos de retención y de acuerdo con lo observado en cromatografía en capa fina se realizaron asignaciones tentativas de antocianinas. De igual forma, el mismo extracto purificado se analizó por HPLC-EM con producto iónico (MS^2) en modo positivo (IES^+) de acuerdo con el método mencionado anteriormente, para la caracterización de las antocianinas presentes.

7.3.2.3.2. Separación y cuantificación de antocianinas en flores y hojas

Una vez identificadas y caracterizadas las antocianinas presentes en las flores y hojas de *Anoda cristata* se procedió a realizar la cuantificación por HPLC. Para ello, se efectuó la separación de las antocianinas previamente estudiadas mediante una CCF- preparativa de 2mm de espesor; se colocaron 30 mg de extracto purificado de antocianinas tanto de flores como de hojas rojas; el sistema de elución empleado fue: acetato de etilo: ácido fórmico: agua (85:15:10).

Las fracciones de la placa una vez separadas se extrajeron con metanol acidificado al 1% y se concentraron hasta sequedad en rotavapor.

El extracto de antocianina purificado se analizó por HPLC-EM con producto iónico (MS^2) en modo positivo (IES^+) de acuerdo con el método mencionado anteriormente, para la confirmación de la caracterización de las antocianinas presentes.

Finalmente se realizaron las curvas patrón de cada antocianina en HPLC (Waters) de acuerdo con el método modificado reportado por Torres, 2016. Posteriormente se inyectaron las muestras de flores y hojas para la cuantificación de antocianinas.

7.3.2.4. Aplicación de las antocianinas de *Anoda cristata* como biocolorante en un alimento.

7.3.2.4.1. Pruebas de color

Se realizó un extracto acuoso de flores de *Anoda cristata* y se concentró en rotavapor para hacer pruebas de estabilidad de antocianinas, enfocándose inicialmente en la permanencia del color; para ello, se efectuaron pruebas con tratamiento térmico empleando diferentes ácidos. En viales cerrados se colocaron 2 mL del extracto y se acidificaron al 1% con los siguientes ácidos: ácido acético, ácido cítrico, ácido málico y ácido láctico

Los viales se colocaron en un baño de agua a 60°C durante 30 min, y se evaluó la permanencia del color con los diferentes ácidos y se seleccionó el que mantuvo el color más vibrante y parecido al extracto inicial antes del tratamiento térmico.

7.3.2.4.2. Ensayos de copigmentación

La estabilidad de las antocianinas de *Anoda cristata* se evaluó en el extracto acuoso y en uno purificado; y se empleó un extracto concentrado a partir de romero (*Salvia rosmarinus*) para usar el ácido rosmarínico presente como copigmento.

En viales cerrados se colocaron ambos extractos de *Anoda cristata* con el copigmento de ácido rosmarínico en proporción 1:10 respectivamente; se emplearon dos controles (vial sin copigmento) para cada tipo de extracto.

Todos los viales fueron acidificados al 1% con ácido láctico para favorecer la reacción de copigmentación y posteriormente se colocaron en un baño de agua a 60°C durante 30 min. Se determinó el contenido de antocianinas totales antes y después del tratamiento térmico, y posteriormente se expusieron a la luz durante 7 días a temperatura ambiente. Finalmente, se evaluó la permanencia del color en ambos extractos para su posterior aplicación como biocolorante en un alimento.

7.3.2.4.3. Caramelo duro

Las flores de alache se sanitizaron y secaron en estufa a 45°C, una vez secas, se realizó un extracto acuoso acidificado al 1% con ácido láctico y se concentró en rotavapor, dicho extracto se empleó como biocolorante para la elaboración de caramelo. La formulación empleada corresponde a la siguiente:

Agua.....	500 mL
Azúcar refinada.....	200 g
Glucosa.....	520 g
Saborizante artificial.....	2 mL
Extracto de flor.....	10 mL

En un recipiente metálico se calentó el agua y el azúcar hasta disolverse, posteriormente, se añadió la glucosa y se incorporaron todos los ingredientes hasta alcanzar la temperatura de bola dura o punto de quiebre del caramelo (~140°C); una vez alcanzada dicha temperatura se retiró del fuego y se agregó rápidamente 2 mL de saborizante artificial y 10 mL del extracto concentrado de flor de alache; finalmente, la mezcla se vertió en moldes de silicón y una vez fríos se desmoldaron los caramelos y se almacenaron en un lugar fresco y seco. Se evaluó la permanencia del color del extracto una vez agregado en la mezcla y en el caramelo final.

8. Resultados y discusión

8.1. Primera etapa: Estudio de flores comestibles mexicanas

8.1.1. Cuantificación de compuestos bioactivos totales

En las 10 muestras de flores se cuantificó el contenido de fenoles, flavonoides y carotenos totales, únicamente en el caso de las antocianinas totales se omitieron las flores de calabaza, mostaza y los gualumbos de maguey debido a que estas no presentan pigmentaciones por la presencia de antocianinas, por lo que su cuantificación en este trabajo sería considerada como resultados falsos positivos.

8.1.1.1. Fenoles totales

En la Tabla 6 se presentan los resultados de fenoles totales/g de mtra. seca de las flores comestibles mexicanas analizadas.

Tabla 6. Fenoles totales de flores comestibles.

Flor	Fenoles totales [mg ac. gálico/ g mtra. seca]
Capuchina N.	73.47 ± 1.53
Colorín	93.38 ± 1.75
Noche buena	166.88 ± 1.46
Pata de vaca	67.09 ± 0.85
Flor de alache	39.49 ± 0.53
Flor de manita	128.87 ± 2.79
Flor de mayo	132.26 ± 1.10
Flor de calabaza	42.59 ± 1.75
Flor de mostaza	47.86 ± 2.48
Gualumbos	44.30 ± 2.22

Datos expresados como media ± desviación estándar, n= 3

Se observa que la flor de noche buena es la que presentó el contenido más alto de compuestos fenólicos (166.88 mg ac. gálico/g mtra seca); anteriormente se ha descrito que en diversas plantas del género *Euphorbia* poseen este tipo de compuestos ya que predomina la presencia de flavonoides y algunos taninos [Yang *et al.*, 2011].

La flor de mayo y la flor de manita también presentan un contenido mayor de fenoles totales en comparación con las demás flores. En este caso, también influye la variedad utilizada; para la flor de mayo, al emplear la variedad roja (*P. rubra f*), se ha descrito que posee un contenido superior de fenoles totales, ya que en la variedad blanca o *Plumeria rubra* (L). cv. *Acutifolia* los valores de fenoles se encuentran en 16.35 mg ac. gálico/g mtra. seca [Mulík y Ozuna 2020], por lo que la variedad roja presenta hasta 87% más fenoles de acuerdo con lo obtenido en el ensayo.

Para la capuchina naranja, se reporta un contenido de 62.52 mg ac. gálico/ g bs [Garzón *et al.*, 2015] por lo que el contenido de fenoles totales se asemeja más a lo obtenido en el laboratorio.

En lo que respecta a la flor de colorín, existen reportes de un total de 362.61 mg ac. gálico/g mtra seca [Mulík y Ozuna 2020] para las variedades americanas, sin embargo, la muestra descrita se refiere a la parte aérea completa de la planta, por lo que el contenido de fenoles puede variar considerando que en este ensayo se utilizó únicamente el pétalo rojo.

Dentro del género *Erythrina* (colorines), se han aislado tanto ácidos fenólicos como algunos taninos [Gabr *et al.*, 2019], lo mismo para la flor de pata de vaca [Tripathi *et al.*, 2019]. La flor de alache no ha sido estudiada para describir un perfil de fenoles presentes, sin embargo, se sabe que posee actividad biológica debido a dos flavonoides [Juárez-Reyes *et al.*, 2015].

Las flores de calabaza, mostaza, así como los gualumbos presentaron un contenido de compuestos fenólicos que oscila entre los 42 y 47 mg ac. gálico/ g mtra. seca, en este caso no se encontraron referencias específicas del contenido de fenoles, sin embargo, podemos considerar que este tipo de flores no se caracterizan por tener colores característicos debido a compuestos fenólicos como antocianinas, por lo que el contenido de fenoles totales puede ser menor en comparación con aquellas que presentan colores específicos entre rojo y azul como las capuchinas o la noche buena.

Existen reportes de que en la flor de calabaza el intervalo del contenido de fenoles totales es de 3.14 a 9.48 mg de ác. gálico/g de flor seca empleando diferentes métodos de secado [Loubet 2010]; es un contenido mucho menor a lo obtenido en este trabajo (42.59 mg ac. gálico/ g flor seca), sin embargo, se debe considerar que el contenido de compuestos bioactivos también depende del estado de madurez de las flores utilizadas, así como de la técnica de extracción.

8.1.1.2. Flavonoides totales

Con respecto a la cuantificación de flavonoides, este tipo de compuestos pertenecen a la familia de los fenólicos por lo que su contenido no debe superar el de los compuestos fenólicos totales [Escamilla, *et al.*, 2009]. De acuerdo con el método espectrofotométrico de cloruro de aluminio (Zhishen *et al.* 1999) se obtuvieron los resultados descritos en la tabla 7.

Tabla 7. Flavonoides totales de flores comestibles.

Flor	Flavonoides totales [mg catequina/ g mtra. seca]
Capuchina N.	26.25 ± 1.37
Colorín	62.84 ± 3.49
Noche buena	128.67 ± 6.09
Pata de vaca	62.84 ± 3.49
Flor de alache	35.29 ± 1.90
Flor de manita	42.16 ± 2.87
Flor de mayo	49.52 ± 3.14
Flor de calabaza	2.24 ± 0.05
Flor de mostaza	10.83 ± 0.35
Gualumbos	2.84 ± 0.18

Datos expresados como media ± desviación estándar, n= 3

En la tabla 7 se observa que al igual que el contenido de fenoles totales, la nochebuena es la flor que presentó el contenido más alto de flavonoides; en dicha flor se ha identificado un perfil con diversos tipos de flavonoides como flavanonas, flavonoles y flavonas, dentro de los que destaca la rutina con un contenido de 36.29 mg/ g mtra. seca [Gu *et al.*, 2018].

La flor de manita y flor de mayo evidenciaron tener un contenido mayor de fenoles en comparación con las demás flores, sin embargo, la cantidad de flavonoides representa menos del 50% del total de compuestos fenólicos; 37.7% y 37.4% respectivamente, por lo que se puede indicar que la presencia de fenoles en dichas plantas es debida principalmente a los ácidos fenólicos.

Para la capuchina se reporta un contenido de flavonoides totales de 26.0 mg/ g mtra. seca de un extracto etanólico de flores [Bazylko *et al.*, 2014]; el resultado se asemeja al obtenido experimentalmente (26.25 mg / g mtra. seca).

De igual forma, en la figura 26 se observa que más del 50% de los compuestos de naturaleza fenólica corresponden a flavonoides para el caso de las flores de noche buena, los colorines, la pata de vaca y la flor de alache. En el caso de los colorines, se ha confirmado que las especies del género *Erythrina* son ricas principalmente en isoflavonoides y flavanonas [Yenesew *et al.*, 2014].

En lo que respecta a la flor de pata de vaca y la flor de alache, estas resaltan en esta determinación ya que, aunque su contenido de fenoles totales es menor en comparación otras flores, su contenido de flavonoides es superior, representando más del 90% del total de sus compuestos fenólicos como se observa en la figura 26.

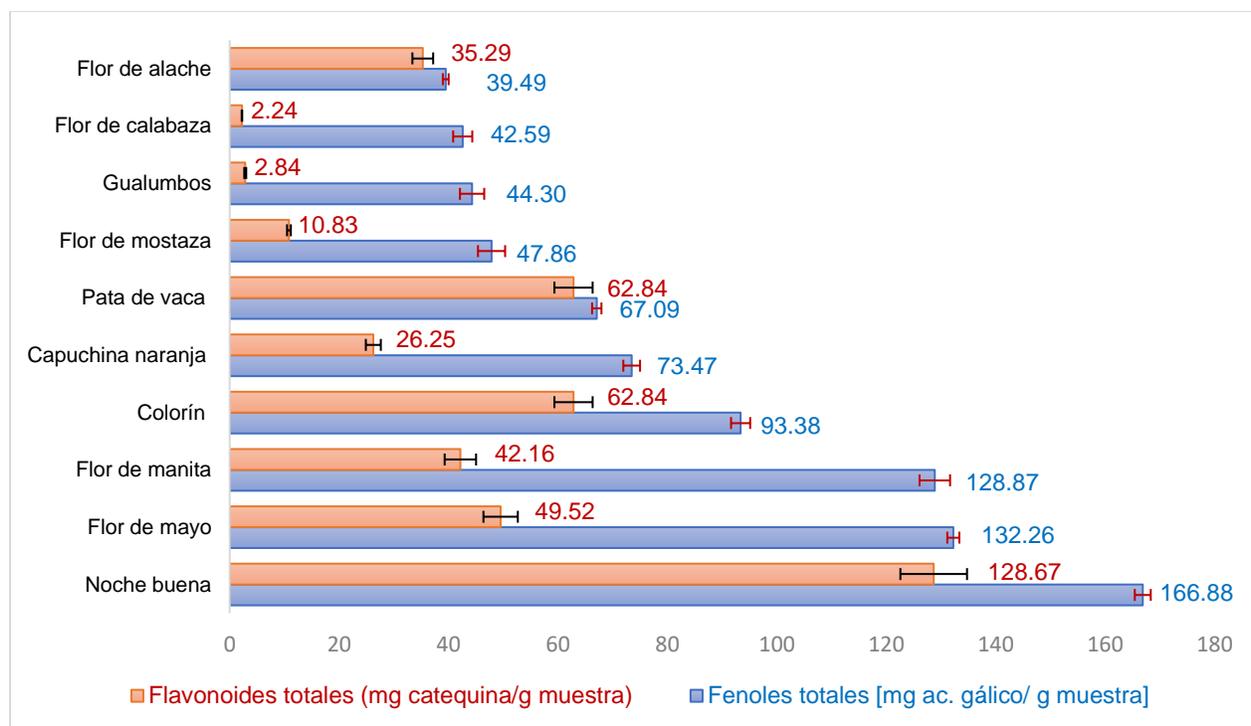


Figura 26. Gráfico del contenido de fenoles y flavonoides en flores comestibles.

Lo mencionado anteriormente es importante debido a que dentro de estos flavonoides se encuentran además las antocianinas, particularmente, en la flor de alache se observa que tiene un contenido importante de dichos compuestos de tipo fenólico. Estas flores con contenido importante de flavonoides (que además poseen colores muy representativos a simple vista), pueden ser fuentes potenciales para estudio de biodisponibilidad y estabilidad de antocianinas para su posterior aplicación como biocolorantes.

En el caso de la flor de calabaza y los gualumbos, los valores de flavonoides se encuentran en cantidades menores con respecto a otras flores, lo que es congruente debido a que estas flores no presentan pigmentos como las antocianinas que pertenecen al mismo grupo de compuestos por lo que los valores tienden a ser mínimos, como es el caso de lo reportado para una variedad de gualumbo de *Agave durangensis*, con un contenido de 1.21 mg flavonoides/ g mtra. seca [Mulík y Ozuna 2020].

Por su parte, la flor de mostaza tiene un 24% de estos compuestos con respecto a su contenido de fenoles totales, y se ha encontrado que esta planta posee flavonoides de quercetina, miricetina y rutina [Boscariol *et al.*, 2019]

8.1.1.3. Antocianinas totales

Las antocianinas son compuestos pertenecientes a los flavonoides, por lo que, de igual forma su contenido no debe superar el contenido de flavonoides ni de fenoles totales [Escamilla, *et al.*, 2009]. Para este ensayo se emplearon todas las flores, exceptuando la flor de calabaza, mostaza y los gualumbos. De acuerdo con el método de pH diferencial [Abdel-Aal, 1999], se obtuvieron los resultados descritos en la tabla 8.

Tabla 8. Antocianinas totales de flores comestibles.

Flor	AT (mg cianidina 3-glucósido/g muestra)
Capuchina naranja	0.21 ± 0.01
Colorines	14.74 ± 0.77
Noche buena	11.93 ± 0.79
Pata de vaca	1.69 ± 0.08
Flor de alache	1.40 ± 0.06
Flor de manita	5.45 ± 0.47
Flor de mayo	0.56 ± 0.04

Datos expresados como media ± desviación estándar, n= 3

La flor de colorín presentó el contenido más alto de antocianinas con respecto a las demás flores; aunque no existe un reporte del contenido específico para esta variedad, se sabe que las especies del género *Erythrina* son ricas en antocianinas de cianidina [Arita *et al.*, 2014]. En el caso de la noche buena, se cuantificó un total de 11.93 mg cianidina-3-glucósido/ g mtra. seca; en el punto

óptimo de pigmentación roja se ha encontrado hasta un total de 6.82 mg/g de mtra fresca de antocianinas totales [Slatnar *et al.*, 2013]; por lo tanto, el contenido de antocianinas varía dependiendo de los diferentes estados de maduración de las brácteas.

Para el caso de la capuchina, se ha reportado un contenido de antocianinas como 0.72 mg/g mtra. seca [Garzón y Wrolstad, 2009] en la capuchina naranja. El contenido de antocianinas determinado en el laboratorio de 0.21 mg cianidina-3-glucósido/g mtra seca presenta una cantidad menor en comparación con el estudio mencionado, sin embargo, la presencia de antocianinas se ve afectada por factores como el estado de madurez de la flor, el pH, así como el tratamiento previo que se le dé a la flor para ser analizada [Aguilera *et al.*, 2011].

Sobre la flor de pata de vaca y de alache, estas presentaron un contenido semejante de antocianinas 1.69 mg cianidina-3-glucósido/g mtra. seca y 1.40 mg cianidina-3-glucósido/g mtra. seca, respectivamente; cabe señalar que de esta última no hay estudios acerca de antocianinas, sin embargo, se ha encontrado que la planta de la que proviene la flor de alache posee actividad biológica, esto se relaciona directamente con los compuestos de tipo flavonoide que están presentes [Juárez *et al.*, 2015]; dentro de los cuáles se encuentran las antocianinas.

Con respecto a la flor de manita, los extractos arrojaron lecturas de absorbancia dando como resultado un contenido de 5.45 mg cianidina-3-glucósido/g mtra. seca; no se ha descrito un perfil específico de antocianinas, anteriormente se encontró que esta flor posee un flavonoide con coloración roja insoluble en extractos alcohólicos, además de epicatequina [Velázquez *et al.*, 2012], por lo que se intuye que las lecturas si corresponden a la presencia de antocianinas ya que el extracto metanólico se mantuvo homogéneo.

La flor de mayo posee un contenido menor con respecto a las demás flores de antocianinas totales, sin embargo, se ha estudiado que esta variedad roja de *Plumeria rubra* posee antocianinas de cianidina [Vettumperumal *et al.*, 2018], lo cual también se evidencia con la coloración característica que estas flores presentan.

Para todos los casos es importante considerar que las muestras se pueden ver afectadas por el tratamiento de secado previo de acuerdo con la estabilidad de las diferentes antocianinas presentes, además del estado de madurez de cada flor, lo que influye directamente en la pigmentación y el contenido de estos compuestos.

Las flores de calabaza, mostaza, y los gualumbos no fueron incluidos en este ensayo ya que se sabe que no tienen antocianinas en su composición química, la pigmentación en este tipo de flores está dirigida hacia los amarillos que normalmente se dan por la presencia de compuestos carotenoides en la flor, así como betalaínas o compuestos de tipo flavonoide no antocianínicos.

8.1.1.4. Carotenos totales

En la Tabla 9 se presenta el contenido de carotenos totales de las flores comestibles. El mayor contenido de carotenos se encuentra en la flor de noche buena con 519.56 μg β -caroteno/g mtra. seca, seguido por la flor de mostaza con 547.19 μg β -caroteno/g mtra. seca; los valores reportados para carotenos en zanahoria, la cual es considerada como una fuente rica en estos pigmentos datan de los 663 hasta 900 μg de β caroteno/g [Beltrán et al., 2012]; por lo que estos valores dan indicio de una cantidad significativa de carotenos presentes en las muestras, lo que también proporciona propiedades específicas, principalmente la pigmentación amarilla en el caso de la flor de mostaza, la cual posee tanto pigmentos carotenoides como clorofilas [Frede et al., 2019].

Tabla 9. Carotenos totales de flores comestibles.

Flor	Carotenos totales (μg β -caroteno/g mtra. seca)
Capuchina N.	132.8 \pm 2.83
Colorín	91.35 \pm 1.15
Noche buena	519.56 \pm 8.40
Pata de vaca	43.79 \pm 1.80
Flor de alache	39.32 \pm 0.62
Flor de manita	10.58 \pm 0.69
Flor de mayo	8.05 \pm 0.68
Flor de calabaza	166.59 \pm 8.69
Flor de mostaza	547.19 \pm 8.85
Gualumbos	340.93 \pm 13.00

Datos expresados como media \pm desviación estándar, n= 3

Los extractos correspondientes a los gualumbos de maguey también evidenciaron la presencia de carotenos debido a la coloración observada, sin embargo, se debe considerar que estas flores también llamadas cacayas pueden variar en el contenido de compuestos debido a que estas pueden provenir de especies diferentes de agaves; además del estado de maduración de la flor.

En el caso de las flores de capuchina, estas también presentan una cantidad de carotenos mayor dentro de las flores de estudio, se ha reportado que hay un contenido 350 μg carotenos/g de flor; sin embargo, es la luteína el compuesto mayoritario más que β -caroteno [Niizu y Rodríguez-Amaya, 2006].

Con respecto a la flor de calabaza, esta es una de las flores más consumidas en México y se sabe que posee compuestos beneficiosos para la salud, en este caso, la presencia de carotenos se ha descrito alrededor de los 400 μg de carotenos/g de flor seca [Martínez *et al.*, 2008]. Un factor importante para considerar es la degradación de los carotenoides, la cual se debe fundamentalmente a reacciones de oxidación, ya sean no enzimáticas o a enzimas como las lipooxigenasas [Gordon y Barret, 2001]; éstas últimas han sido reportadas como las posibles responsables de la degradación de carotenoides totales en flores de calabaza almacenadas a 20 °C [Martínez *et al.*, 2008].

La flor de alache, pata de vaca, flor de manita y la flor de mayo, presentaron un contenido menor de carotenos con respecto a las demás flores, esto además se logró observar en los extractos realizados, en donde la pigmentación fue casi nula; sin embargo, en algunas plantas como la familia de las fabáceas (colorines) y la de malváceas (alache) se han identificado algunas xantofilas como luteína.

Aunque el contenido puede ser mínimo, usar un extracto concentrado permite corroborar de forma cualitativa en capa fina si en efecto hay presencia de pigmentos de carotenoides. Por otro lado, esto deja ver que las flores mencionadas anteriormente son fuentes que proporcionan pigmentos antocianínicos, más que de carotenoides.

8.1.2. Análisis cualitativo de compuestos bioactivos por CCF

En los ensayos de cromatografía en capa fina se incluyeron estándares y/o referencias de los más representativos que se encuentran en las flores y plantas en general. Debido a que los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente presentes en las plantas; todas las flores fueron analizadas para identificar ácidos fenólicos y flavonoides. Para la identificación de las antocianinas sólo se utilizaron las flores de capuchina, colorín, noche buena, pata de vaca, alache, manita y flor de mayo. En el caso de los carotenoides se agregaron las flores restantes de calabaza, mostaza y gualumbos de maguey, debido a las pigmentaciones que presentan por estos compuestos.

8.1.2.1. Ácidos fenólicos

En la Figura 27-A, se observa que todas las flores presentan una banda característica que podría referirse tanto al ácido cumárico, como al ferúlico, sin embargo, se sabe que los R_f de ambos compuestos son muy similares por lo que dichas bandas podrían estar sobrepuestas; por ello, usando el revelador con cloruro férrico al 2% como se muestra en la figura 27-B, se puede diferenciar entre uno y otro de acuerdo a la coloración que presenten.

En este caso podemos señalar que las flores presentan una tendencia mayor a poseer ácidos hidroxicinámicos, ya que de los estándares empleados como ácidos hidroxibenzoicos solo fueron tentativamente identificados en algunas flores. Tal es el caso de la flor de noche buena, en la que se han identificado compuestos fenólicos simples y ácido gálico [Fernández 2013], lo que se observa claramente en la placa en región señalada con rectángulo; mientras que el ácido vainillínico se observó en la pata de vaca; esto coincide con lo descrito en un estudio fitoquímico en el que se reporta la existencia de algunos ácidos fenólicos incluyendo el vainillínico [Parekh *et al.*, 2006].

En las flores de mostaza para diferentes variedades se ha identificado ácido sinápico [Lindeboom y Wanasundara 2007], el cual también se puede observar en la figura 27-A y para la flor de calabaza se reporta la presencia de ácido cumárico, así como ácido p-hidroxibenzoico; los cuáles se encuentran también en las semillas [Krimer-Malešević 2020].

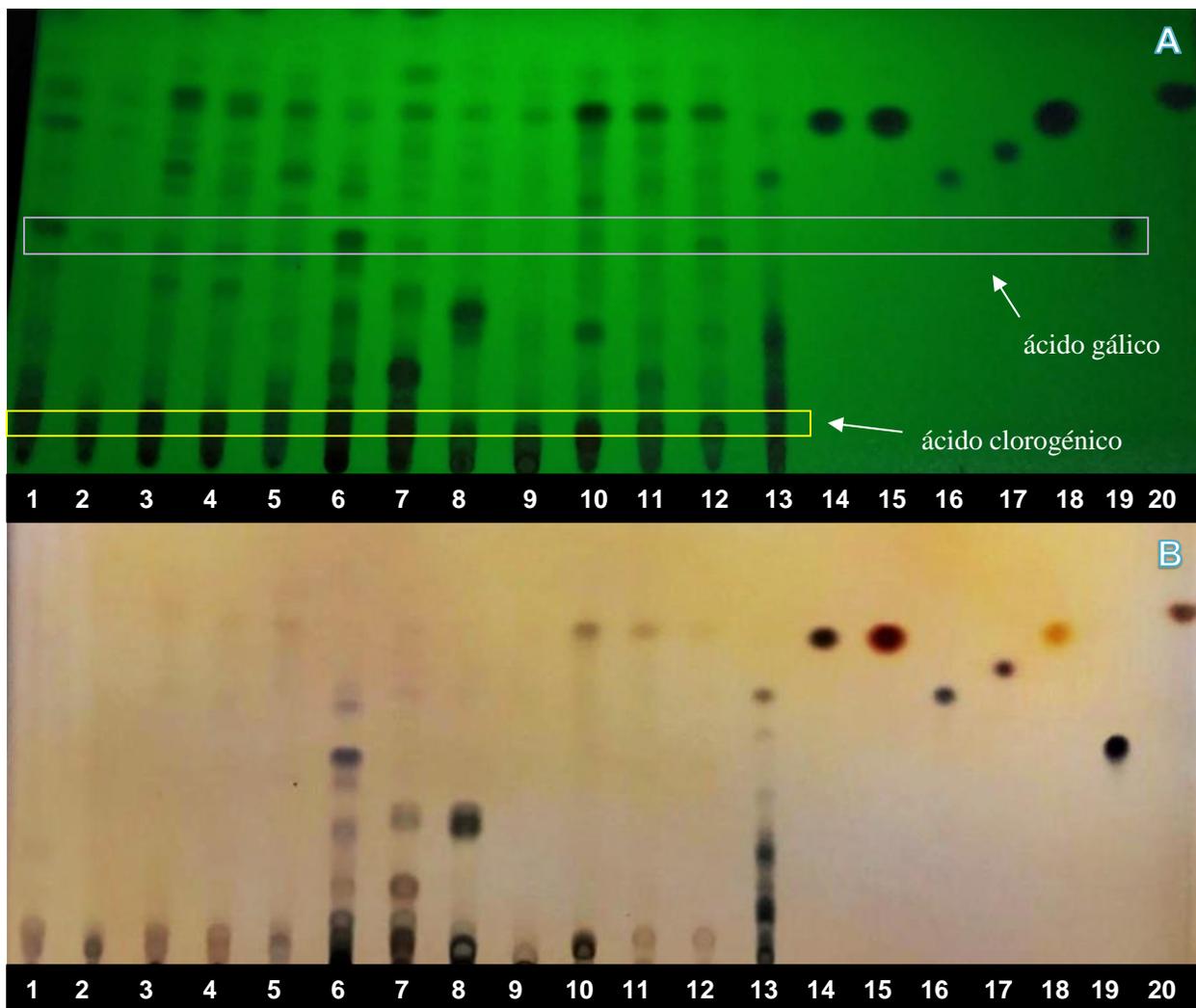


Figura 27. CCF de ácidos fenólicos en flores comestibles.

Extractos fase orgánica de acetato de etilo (1 y 2: capuchina; 3 y 4: colorines; 5: alache; 6: noche buena; 7: pata de vaca; 8: flor de manita; 9: flor de calabaza; 10: flor de mostaza; 11: flor de mayo; 12: gualumbos); Referencias (13: ac. clorogénicos de camote; 14: ac. ferúlico; 15: ac. cumárico; 16: ácido cafeico; 17: ac. sinápico; 18: ac. p-hidroxibenzoico; 19: ac. gálico; 20: ac. vainillínico). Fase móvil: cloroformo: tolueno: acetato de etilo: acetona: ac. fórmico (40:40:30: 20:10). Revelado: **A:** luz UV; **B:** cloruro férrico al 2%.

En cuanto a los ácidos clorogénicos, estos refieren a la unión de ácido quínico con algún otro ácido hidroxicinámico, como puede ser cafeico, ferúlico o cumárico; en la figura 27 se observa tentativamente que todas las flores presentan ácidos clorogénicos de acuerdo con la referencia empleada en el que existe una mezcla de varios de estos, particularmente, el ácido cafeoilquínico (monoclorogénico) aparece al inicio de la placa (zona señalada en color amarillo), por lo que este se observa con mayor concentración en flores como la capuchina, la pata de vaca y noche buena.

En el caso de las flores de capuchina se han identificado ácidos clorogénicos como el 3-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, así como 3-cumaroilquínico (Garzón *et al.*, 1015) por lo que se comprueba que los ácidos tanto cumárico, como cafeico se encuentran presentes y en unión con el ácido quínico. Así mismo en la figura 27-A se observa que los colorines tienen bandas bastantes semejantes a las de capuchinas en la zona en la que se observan los ácidos clorogénicos, por lo que se considera probable que se encuentren también este tipo de compuestos, al igual que ácido cafeico y cumárico.

Con respecto a la flor de mayo, sólo se han identificado compuestos flavonoides y antocianas [Ghosh *et al.*, 2018], sin embargo, en la placa se observan las bandas que podrían corresponder a ácido clorogénico y ácido cumárico o ferúlico.

En el caso de la flor de alache y la flor de manita, los estudios son escasos con respecto a este tipo de compuestos, solo se ha identificado en esta última la unión de ácido gálico con otros compuestos [Velázquez *et al.*, 2012], esto explicaría el hecho de que la banda observada en ese extracto no tiene el mismo Rf pues el ácido no se encuentra en su forma libre; este además, es un factor importante a considerar con las demás flores, pues estos ácidos podrían estar ligados a otras moléculas.

8.1.2.2. Flavonoides

Para este ensayo se observa en la Figura 28 que la flor de capuchina es en la que se detectaron mayor número de flavonoides, con respecto a las bandas observadas. De acuerdo con Garzón 2015 se han identificado en flores de capuchina flavonoides como miricetina dihexósido, quercetina dihexósido, kaempferol dihexósido, kaempferol acetildihexósido, así como quercetina acetildihexósido.

Así mismo, en un estudio de 2016, Bernardino reporta que de los compuestos fenólicos presentes en flores de colorín se encuentran flavonoides como quercetina; en la Figura 28 se nota una banda ligera que podría corresponder a la de quercetina.

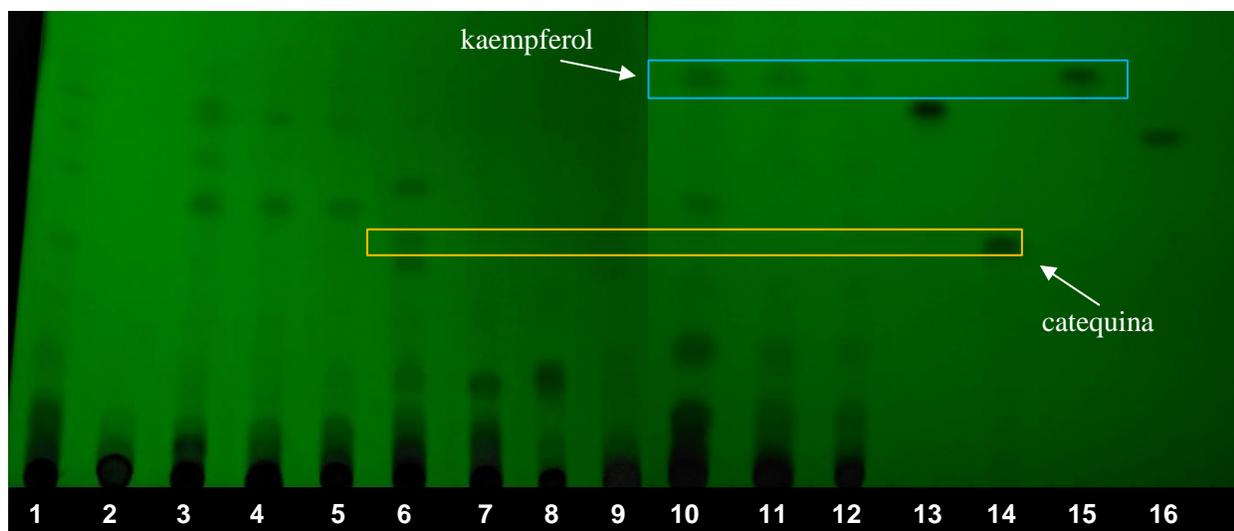


Figura 28. CCF de flavonoides en extractos de flores comestibles.

Extractos acuosos (1 y 2: capuchina; 3 y 4: colorines; 5: alache; 6: noche buena; 7: pata de vaca; 8: flor de manita; 9: flor de calabaza; 10: flor de mostaza; 11: flor de mayo; 12: gualumbos); Referencias (13: quercetina; 14: catequina; 15: kaempferol; 16: luteolina). Fase móvil: acetato de etilo: agua: ac. fórmico (85:10:15) Revelado: luz UV.

Para las flores de alache se ha estudiado principalmente el quelite más que sus flores, sin embargo, en este se ha encontrado la presencia de dos flavonoides característicos con actividad biológica, acacetina y diosmetina [Juárez *et al.*, 2015]; se observa en la Figura 28 dos bandas en la zona alta de la placa, esto evidencia la posibilidad de que los flavonoides presentes en dicho quelite sean los mismos presentes en la flor y los más representativos y/o en mayor concentración.

En la flor de noche buena se observa, al igual que en la capuchina un número mayor de bandas con respecto a las demás flores; en esta se han identificado flavonoides como epicatequina, naringina, rutina y miricetina, coincidiendo principalmente con el estándar de catequina (zona amarilla); además de flavonoides glicosilados como quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-ramnosilgalactósido, y glucósidos de kaempferol [Gu *et al.*, 2018]; este tipo de flavonoides poseen un peso molecular mayor que los aglicones debido a la unión con otras moléculas como dichos azúcares, por lo que pueden observarse en el inicio de la placa, esto explicaría la acumulación de bandas que no se ven separadas en la parte inferior, ya que son flavonoides que no están en forma de aglicón. Lo mismo ocurre para la pata de vaca en la que se han descrito glucósidos de quercetina y miricetina en la especie *Bauhinia* [Ahmed *et al.*, 2019]

La flor de manita ha sido estudiada precisamente por la actividad biológica debida a tres flavonoides identificados como isoquercetina, catequina y epicatequina [Velázquez et al., 2009], sin embargo, se intuye que estos están en concentraciones muy bajas ya que no se evidenciaron claramente las bandas en la placa.

Para el caso de la flor de mayo variedad roja, se observa una banda que indica la presencia de kaempferol (zona azul señalada); para esta flor se ha reportado que posee además de este, quercetina [Ghosh *et al.*, 2018]. En esta última, así como en los gualumbos se observa la tendencia de que todas poseen kaempferol, este tipo de flavonoide ha sido reportado en numerosos estudios sobre plantas, lo que hace referencia a que es de los más abundantes de la naturaleza.

Sobre la flor de mostaza no se encontraron reportes específicos de flavonoides en las flores, sin embargo, estudios sobre las hojas han encontrado la presencia de luteolina y apigenina [Onyilagha *et al.*, 2003]. Con respecto a la flor de calabaza, se observa que el extracto se quedó acumulado en la parte inferior, y se han identificado en esta especie flavonoides como ramnazina-3-rutinósido, isorhamnetina-3-rutinosido-4-ramnósido e isorhamnetina-3-rutinósido [Itokawa *et al.*, 1981]; por lo que el sistema de elución no es conveniente para este tipo de compuestos mono y diglicosilados.

8.1.2.3. Antocianinas

Para este ensayo se utilizaron las flores de capuchina naranja, colorines, flor de alache, noche buena, pata de vaca, flor de manita y flor de mayo y se empleó un sistema de elución de tipo agua/ácido para antocianinas no aciladas, ya que en las flores no es común que las antocianinas se encuentren unidas a compuestos fenólicos.

Como se observa en la tabla 10, los diferentes aglicones de las antocianinas presentan un valor de R_f específico dependiendo del sistema de elución, así como un color característico que se observa en la placa, de esta forma se puede hacer una interpretación cualitativa para cada caso, tomando como referencia de igual forma lo reportado en estudios previos de cada flor.

Tabla 10. Rf de antocianidinas en cromatografía en capa fina.

Antocianidina	Rf(x100) en			Color visible en placa
	Forestal	Ac. fórmico	BAW	
Pelargonidina	68	33	80	rojo
Cianidina	49	-	68	magenta
Peonidina	63	30	71	magenta
Delfinidina	32	13	42	púrpura
Petunidina	46	20	52	púrpura
Malvidina	60	27	58	púrpura

Fuente: Adaptado de Sing de Ugaz, 1997.

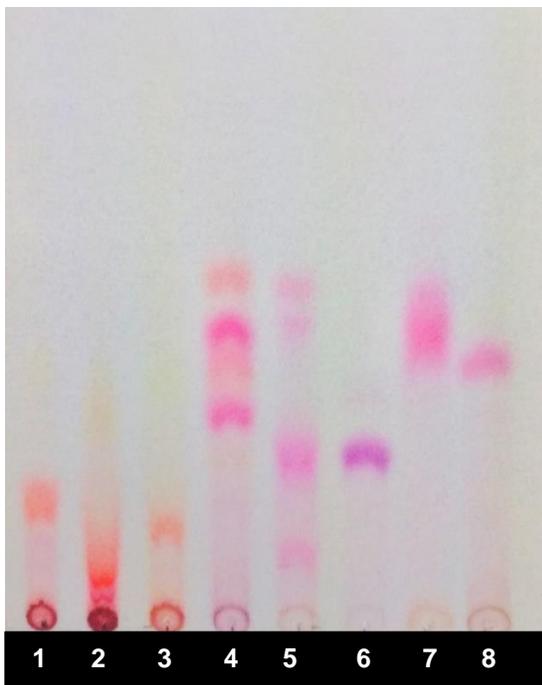


Figura 29. CCF de antocianinas en extractos de flores comestibles.

Extractos acuosos (1: capuchina; 2 y 3: colorines; 4: noche buena; 5: pata de vaca; 6: alache; 7: flor de manita; 8: flor de mayo). Fase móvil: acetato de etilo: agua: ac. fórmico (85:10:15) Revelado: luz blanca.

Para el caso de la capuchina se observa en la Figura 29 la presencia de dos antocianinas, las cuales han sido reportadas como cianidina-3-soforósido y pelargonidina-3-soforósido [Garzón *et al.*, 2015]; basándonos en los colores que se observaron en la placa se confirma lo reportado en el estudio mencionado anteriormente.

Para las dos muestras de colorines se observa principalmente dos bandas de color rojo-naranja; se ha reportado para la variedad de *Erythrina coralloides* a las antocianinas pelargonidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido y pelargonidina-3-soforósido [Scogin 1991], lo cual coincide con lo observado, ya que pelargonidina se observa en estas tonalidades como se describe en la tabla 10.

De acuerdo con lo reportado por Slatnar 2013, la noche buena posee 11 antocianinas, de las cuales siete son de cianidina, tres de pelargonidina y una de delfinidina, en la placa se pueden observar cuatro bandas predominantes únicamente, lo que coincide con lo que se ha descrito ya que son cinco antocianinas las mayoritarias en dicha flor, estas corresponden a cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-rutinósido,

pelargonidina-3-glucósido y pelargonidina 3-rutinósido [Slatnar *et al.*, 2013], esto también se confirma con las tonalidades de las bandas ya que cianidina y pelargonidina se ven rosa/rojizo y naranja/rojizo respectivamente.

La flor de pata de vaca presentó dos tipos de antocianinas con tonalidades magenta a naranja, en este caso, considerando y correlacionando las bandas con las otras flores, se estipula que dichas antocianinas pueden ser de cianidina y pelargonidina; en cambio, en la flor de manita parece ser cianidina-3-glucósido de acuerdo con el color magenta característico; además de coincidir con una de las antocianinas de noche buena en las cuales si se ha identificado a cianidina.

Con respecto a la flor de mayo, en la variedad roja utilizada en este trabajo se han identificado cianidina-3-O- β -(2"-glucopyranosyl-O- β -galactopiranósido) y cianidina-3-O- β -galactopiranósido [Byamukama *et al.*, 2011]; en la placa se logra observar una de estas que aparentemente es la de mayor concentración.

Finalmente, la flor de alache solo presentó una antocianina visible en la placa; basándonos en los valores de Rf experimentales y en el color azulado/morado se puede considerar que la flor de alache posee una antocianina de delphinidina o malvidina

8.1.2.4. Carotenos

Para la identificación de carotenos, se realizaron extracciones en alimentos ricos en β caroteno y licopeno para utilizarlos como referencia; estos fueron extracto de espinaca, zanahoria y jitomate. En la Figura 30 se observa que todas las flores estudiadas, presentaron la banda correspondiente a β -caroteno (zona marcada en rojo), la cual suele tener un %Rf de 94-95, por lo que normalmente eluye hasta arriba en la placa cromatográfica. En este caso, fueron la capuchina naranja, la flor de calabaza, mostaza y gualumbos quienes presentaron las bandas más intensas y/o concentradas de dicho compuesto.

Dentro de los carotenos reportados en flores de capuchina se encuentran principalmente luteína, α y β caroteno, así como violaxantinas y zeaxantinas [Rodríguez-Amaya, 2004]; mientras que en la flor de calabaza se ha descrito también la presencia de luteína y β -caroteno [Alamilla, 2009].

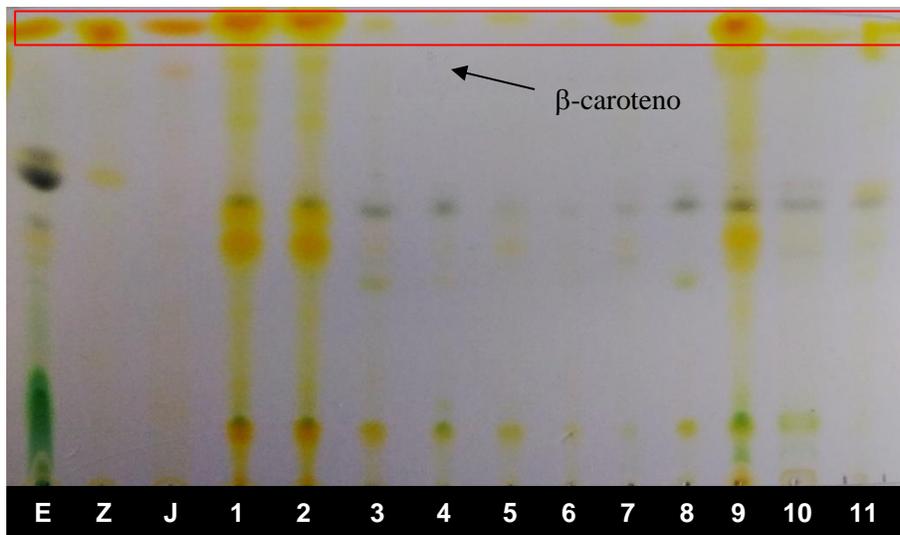


Figura 30. CCF de carotenoides en flores comestibles. Extractos fase orgánica de hexano (1 y 2: capuchina; 3: noche buena; 4: flor de mayo; 5: colorines; 6: pata de vaca; 7: flor de manita; 8: flor de alache; 9: flor de calabaza; 10: flor de mostaza; 11: gualumbos). Referencias (E: espinaca; Z: zanahoria; J: jitomate). Fase móvil: hexano: acetato de etilo (7:3) Revelado: luz blanca

En la cuantificación de carotenos totales, las flores de noche buena, mostaza y gualumbos fueron las que presentaron un contenido mayor de dichos compuestos con respecto a las demás flores; en este caso es importante tomar en cuenta que este tipo de pigmentos son muy fáciles de degradar con exposición a la luz, así como a la temperatura ambiente, el hecho de que no se hayan observado más bandas concentradas en las demás flores nos hace referencia a que posiblemente estos se descompusieron antes del momento de realizar las aplicaciones en la placa.

La cromatografía en capa fina de carotenos empleando disolventes con hexano y/o éter de petróleo evidencia tres zonas características en las que se encuentran los carotenos en la parte superior, xantofilas como astaxantina y cantaxantina en la parte media y luteína y zeaxantina en la parte inferior de la placa [Hynstova et al., 2018]; esto se puede observar claramente en la figura 30 en donde se denota que todas las flores poseen además de carotenos, bandas características de xantofilas.

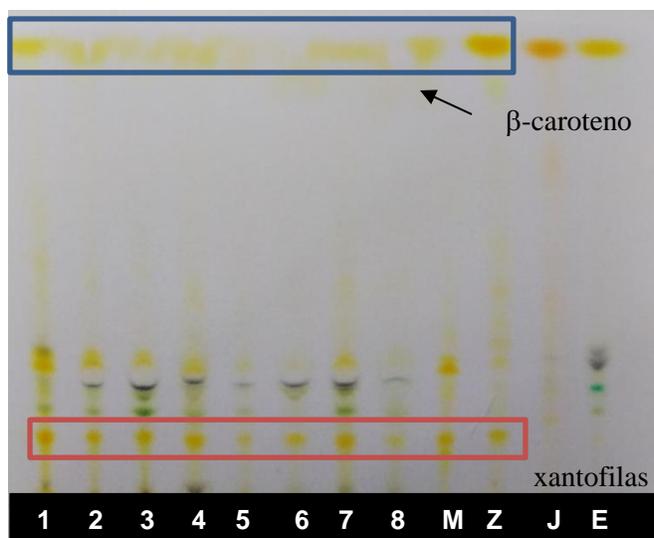


Figura 31. CCF de carotenoides en flores comestibles.

Extractos fase orgánica de hexano (**I**: capuchina; **2 y 3**: colorines; **4**: noche buena; **5**: pata de vaca; **6**: alache; **7**: flor de manita; **8**: flor de mayo; Referencias (**M**: morrón; **E**: espinaca; **Z**: zanahoria; **J**: jitomate). Fase móvil: hexano: isopropanol: agua (100:10:0.5). Revelado: luz blanca

Se realizó una placa más de carotenos empleando únicamente las flores en las que posiblemente hubo una descomposición del pigmento, además se utilizó una fuente de luteína (pimiento morrón) y el sistema de elución se cambió a hexano: isopropanol: agua (100:10:0.5).

En esta nueva placa (Figura 31) se confirma que todas las flores poseen β -caroteno en diferentes grados de concentración, como se ilustra en el recuadro azul; al igual que luteína y probablemente zeaxantina (zona marcada en rojo), ya que esta se corroboró con el %Rf reportado para luteína (28) utilizando este sistema de elución.

Esto hace sentido con lo que se ha descrito en diversas flores, particularmente en el caso de la familia de las fabáceas y malváceas, en las cuales, diferentes especies de plantas han evidenciado tener xantofilas como luteína [Niizu y Rodríguez-Amaya 2005].

8.1.2.5. Triterpenos

Para la identificación de triterpenos en capa fina se empleó el mismo extracto de hexano utilizado en la identificación de carotenos, y se utilizaron referencias de triterpenos pentacíclicos (α y β amirina, lupeol, betulina, ac. ursólico) y fitoesteroles (β -sitoesterol).

En la Figura 32 se observa que la flor de capuchina presenta bandas que pueden corresponder a betulina y ácido oleanólico o ursólico, aunque las bandas no están por completo definidas, existen reportes de que esta flor posee triterpenos pentacíclicos [De Medeiros et al., 2000].

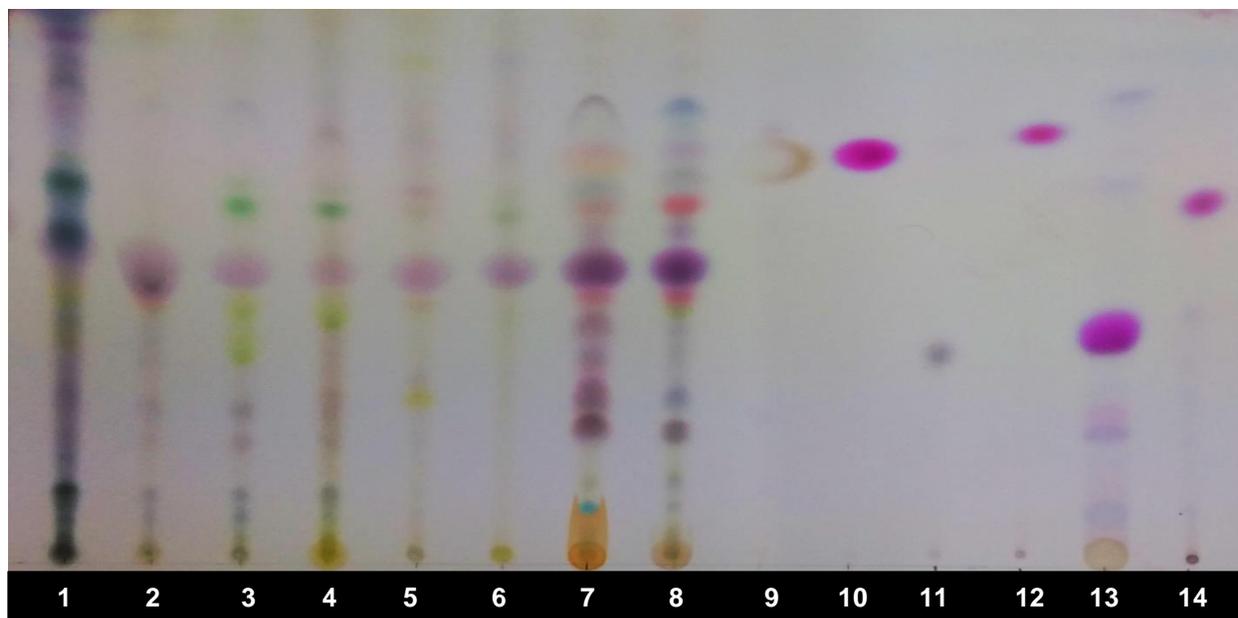


Figura 32. CCF de carotenoides en flores comestibles.

Extractos fase orgánica de hexano (**1**: capuchina; **2** y **3**: colorines; **4**: noche buena; **5**: pata de vaca; **6**: flor de manita; **7**: flor de mayo; **8**: flor de alache); Referencias (**9**: α -amirina; **10**: β -amirina; **11**: betulina; **12**: lupeol; **13**: ac. ursólico + ac. oleanólico; **14**: fitoesteroles comerciales). Fase móvil: hexano: acetato de etilo (7:3) Revelado: anisaldehído al 1%

Con respecto a los colorines, se observan principalmente bandas coloridas en la parte inferior de la placa, anteriormente se ha reportado en un estudio de los fitoquímicos de especies del género *Erythrina* que estas poseen ácido oleanólico [Farag *et al.*, 2016]; lo cual coincide con una de las bandas de la referencia empleada con dicho triterpeno.

En el caso de la noche buena, se ha identificado la presencia de lupeol [Armentha 2012], en la placa no se observa claramente la banda, sin embargo, esto se puede deber a que la muestra no está concentrada lo suficiente; lo mismo para el caso de la flor de pata de vaca y manita; las cuales presentan un perfil parecido en la placa. En este caso no se observan bandas correspondientes a triterpenos pentacíclicos, sin embargo, en todas las flores predomina una banda en la parte media de la placa que puede corresponder a β -sitoesterol de acuerdo con el color y la cercanía a la banda que aparece en la mezcla de fitoesteroles comerciales.

Tanto la flor de mayo como la flor de alache presentan una variedad más amplia de bandas coloridas; para el caso de la flor de alache no existen reportes aún sobre el perfil de compuestos terpénicos presentes; sin embargo, la placa muestra que es la única flor que evidenció claramente la presencia de α y β amirina, además de que probablemente también tenga fitoesteroles.

Para la flor de mayo se han identificado principalmente compuestos tetra y pentacíclicos como lupeol, ácido ursólico y ácido oleanólico [Dubois y Rezzonico 2007]; esto se relaciona directamente con el hecho de que las flores del género *Plumeria* han sido ampliamente estudiadas debido a que poseen compuestos aromáticos, dentro de los cuales existen esta gran variedad de terpenos [Gong *et al.*, 2019].

8.2. Segunda etapa: Estudio de Anoda cristata (L.) Schltdl

De acuerdo con los resultados obtenidos en las etapas previas para la flor de alache, se decidió ampliar su estudio para dar a conocer su perfil, esto debido a que es una planta con información escasa acerca del perfil de fitoquímicos presentes. Las investigaciones se han enfocado en el análisis de la actividad biológica de compuestos como flavonoides en sus hojas, sin embargo, en las flores se encontró que además poseen una antocianina desconocida, así como compuestos triterpénicos y carotenoides; al ser una planta poco explotada en nuestro país y que se da en abundancia la mayor parte del año en zonas muy comunes, esta podría ser considerada una fuente potencial de fitoquímicos para su posterior aplicación biotecnológica y de esta forma aprovechar dicha planta que comienza a considerarse un residuo.

8.2.1. Cuantificación de compuestos bioactivos totales

Para la cuantificación de compuestos bioactivos totales en la planta, se emplearon las partes más representativas de la planta: flores, hojas verdes, hojas rojas, tallos, fruto, botones y raíz.

Prueba de método de secado

Para evidenciar si el tratamiento de secado influía significativamente en el contenido de compuestos bioactivos en las flores, estas se sometieron a tres procesos diferentes de secado: Liofilizado, secado en estufa a 50°C y secado por microondas. De acuerdo con la tabla 11, en todos los casos, la cuantificación de bioactivos totales es mayor para la muestra que fue liofilizada; en este caso el resultado tiene coherencia ya que al ser un proceso de secado que se basa en sublimar

el hielo de un producto congelado, el agua del producto pasa directamente de estado sólido a vapor sin pasar por el estado líquido, por lo que la estructura y compuestos químicos presentes en la flor no se ven afectados. En cambio, se evidenció una pérdida significativa de compuestos bioactivos en las muestras sometidas a secado por microondas; a pesar de que es un proceso muy eficaz y rápido, la forma de energía que se manifiesta en forma de calor a través de su interacción con el material vegetal de la flor, propicia la descomposición hasta en un 50% en el caso de los carotenoides con respecto al material liofilizado.

Tabla 11. Compuestos bioactivos totales en flores de alache con diferente tratamiento de muestra.

Método de secado	Fenoles totales [mg ac. gálico/ g muestra]	Flavonoides totales (mg catequina/g muestra)	Antocianinas totales (mg cianidina 3-glucósido/g muestra)	Carotenos totales (μg β -caroteno/g muestra)
Microondas	30.98 \pm 0.44	23.18 \pm 1.12	0.804 \pm 0.028	23.66 \pm 1.34
Liofilizado	39.94 \pm 2.17	35.31 \pm 0.12	1.696 \pm 0.105	42.56 \pm 0.93
Estufa	39.49 \pm 0.53	35.29 \pm 1.90	1.404 \pm 0.059	39.32 \pm 0.62

Datos expresados como media \pm desviación estándar, n= 3

En el caso del secado por estufa, se obtuvieron valores muy parecidos a los de las flores liofilizadas; de acuerdo con estos resultados se decidió emplear el secado en estufa tanto para las flores como para las demás partes de la planta, aunque el proceso de liofilizado mostró ser el óptimo, la cantidad de energía y tiempo necesario para obtener las muestras secas es mayor; por lo que el secado en estufa es una opción viable a nivel laboratorio. Por lo tanto, todas las partes de planta de alache se sometieron a proceso de secado por estufa a 45°C para la cuantificación de compuestos bioactivos totales; los resultados se encuentran descritos en la tabla 12.

Tabla 12. Compuestos bioactivos totales en *Anoda cristata* cuantificados a partir de un extracto metanólico para fenoles, flavonoides y antocianinas totales, y de un extracto de hexano para carotenos totales).

Parte de <i>Anoda cristata</i>	Fenoles totales [mg ac. gálico/ g mtra. seca]	Flavonoides totales [mg catequina/g mtra. seca]	Antocianinas totales [mg cianidina 3-glucósido/g mtra. seca]	Carotenos totales [μg β -caroteno/g mtra. seca]
Flor	39.49 \pm 0.53	35.29 \pm 1.90	1.404 \pm 0.059	39.32 \pm 0.62
Hoja roja	78.94 \pm 3.90	66.99 \pm 0.39	1.547 \pm 0.060	63.36 \pm 2.99
Hoja verde	65.68 \pm 2.48	29.27 \pm 0.71	0.126 \pm 0.010	69.17 \pm 2.45
Tallos	16.42 \pm 0.72	10.93 \pm 0.13	0.084 \pm 0.011	83.00 \pm 3.29
Fruto	41.07 \pm 1.62	22.66 \pm 0.74	0.130 \pm 0.009	72.90 \pm 0.83
Botones	59.83 \pm 1.08	43.50 \pm 2.42	0.011 \pm 0.005	10.70 \pm 0.39
Raíz	39.69 \pm 1.32	35.91 \pm 1.04	NC	47.99 \pm 1.70

Datos expresados como media \pm desviación estándar, n= 3

*NC= no cuantificado.

Fenoles y flavonoides totales

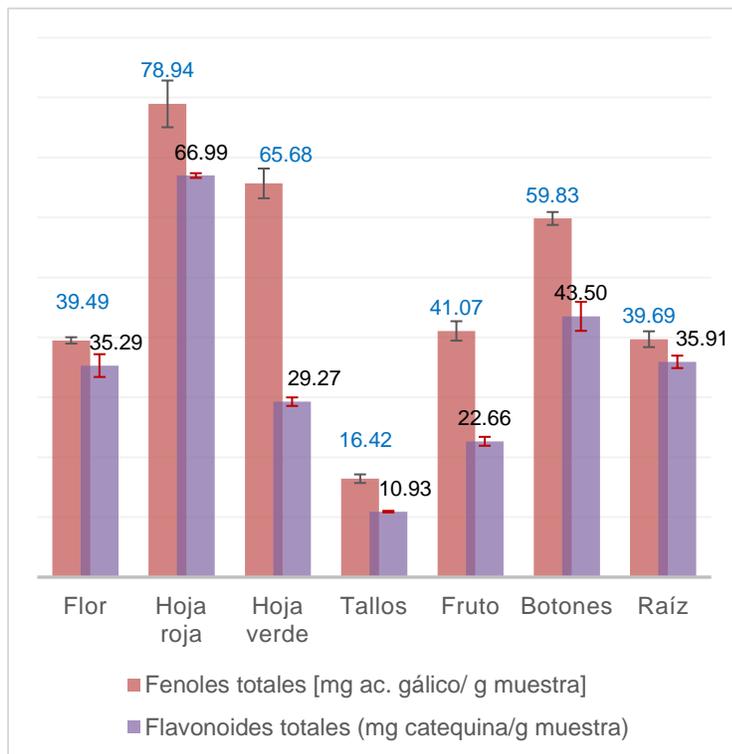


Figura 33. Gráfico de fenoles y flavonoides totales en *Anoda cristata* por g de muestra seca.

De acuerdo con los resultados de la tabla 12 y la Figura 33, se puede observar que el contenido mayor de fenoles y flavonoides se encuentra en las hojas rojas y verdes de la planta, esto tiene congruencia debido a que en la etapa previa a la madurez de las plantas, estos metabolitos secundarios predominan para posteriormente dar paso a la conformación de otro tipo de compuestos como las antocianinas; eso explica porque el contenido de flavonoides es mayor en las hojas rojas, pues estas presentan ya este tipo de pigmentos; por lo tanto, en las hojas rojas se observa la misma tendencia

que en el estudio previo de las flores, en donde más del 90% de los compuestos fenólicos presentes, corresponden a los flavonoides.

Con respecto a los botones, estos resultaron tener una mayor cantidad de compuestos fenólicos que las flores, al igual que de flavonoides, esto da pauta para establecer que, aunque el contenido de flavonoides es mayor, estos no corresponden en primera instancia a las antocianinas; lo mismo sucede para las semillas de la planta.

En la raíz también se obtuvieron resultados cuantificables para ambos compuestos; y se sabe que en las raíces también se da la síntesis, acumulación y liberación de compuestos, que interfieren en la relación planta-suelo; por lo que pueden existir compuestos como ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos simples, aminoácidos, flavonoides e incluso vitaminas [Oliveros-Bastida *et al.*, 2009].

En el caso de los tallos, se observó un contenido menor de compuestos fenólicos con respecto a las demás partes de la planta; anteriormente, diversos estudios han demostrado que la capacidad de distribución de carbono asimilado por raíz hacia el tallo es un factor fundamental con lo cual, la distribución de carbono entre los diferentes órganos de la planta influye también en los compuestos orgánicos y/o metabolitos presentes; se ha observado que la asimilación de carbono desde el medio de crecimiento en plantas jóvenes es trasladado a la raíz, mientras que en plantas adultas, este es trasladado de manera preferencial al tallo [Palta *et al.*, 1997]; en este caso, al haber mayor cantidad de compuestos fenólicos en la raíz que en el tallo podemos dar pauta a que la planta analizada corresponde a una etapa joven en su ciclo fisiológico.

Antocianinas totales

Para la cuantificación de antocianinas totales, los valores más altos corresponden a las flores y a las hojas rojas (Figura 34), esto es evidente por el tipo de pigmentación que estas presentan; sin embargo, los extractos de las demás partes de la planta, al ser acidificados al 1% mostraron tonalidades parecidas a las antocianinas por lo que se hizo también la cuantificación, y en efecto, se encontraron valores de absorbancia positivos.

En el caso de las hojas verdes, los valores evidentemente son muy bajos en concentración ya que el pigmento no se encuentra desarrollado en su totalidad como en las hojas rojas, las cuales ya pasaron por un proceso específico de maduración y desarrollo del color.

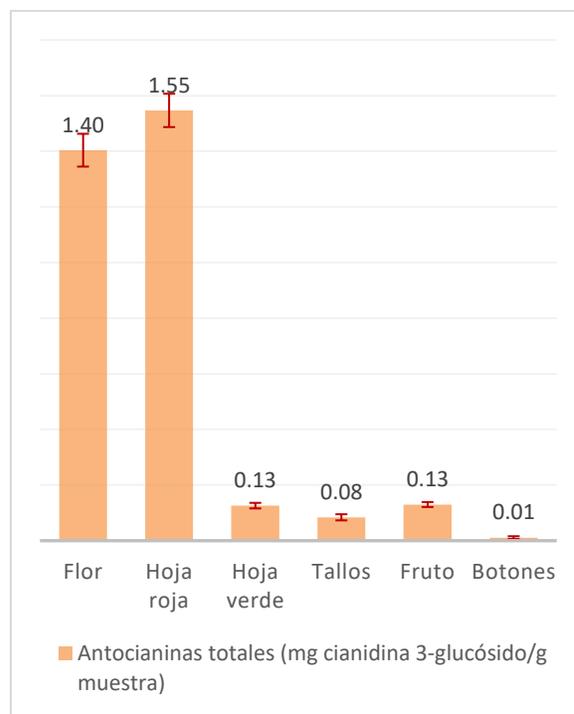


Figura 34. Gráfico de antocianinas totales en planta de *Anoda cristata* por g de muestra seca.

Con este ensayo se evidencia el hecho de que la planta de alache es rica en antocianinas en sus flores y hojas, en este caso, el contenido de estos compuestos en las hojas es 10% más que en las flores; así mismo, estos dos órganos poseen más del 90% de estos pigmentos con comparación con

las demás partes de la planta. Sobre esto se buscó emplear una confirmación de tipo cualitativa con cromatografía en capa fina, la cual se discute más adelante.

Carotenos totales

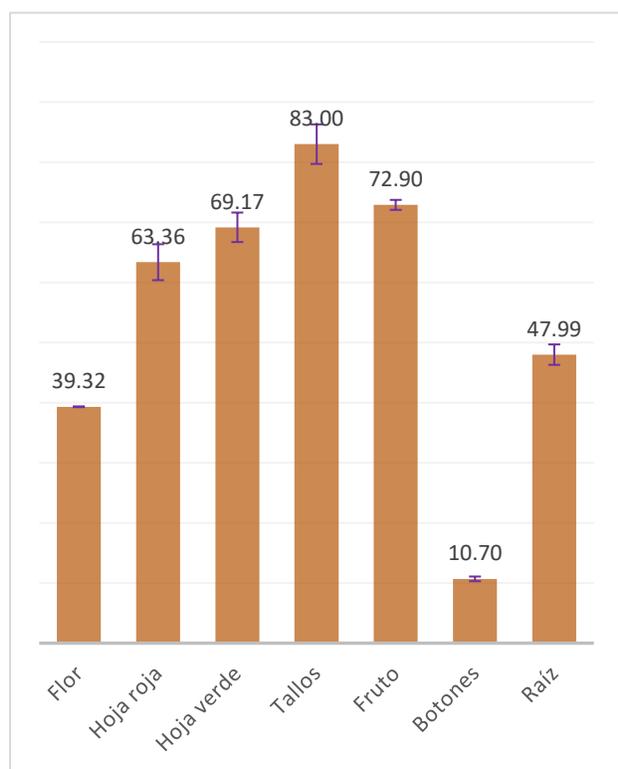


Figura 35. Gráfico de μg de β -caroteno/g de mtra. seca en planta de *Anoda cristata*.

Para la cuantificación de carotenoides, se emplearon extractos de hexano de cada parte de la planta.

Anteriormente, las flores mostraron tener un contenido de carotenos menor con respecto a otras flores de estudio en la primera etapa con $39.32 \mu\text{g}$ b-caroteno/g mtra. seca; en este ensayo se encontró que la raíz de la planta posee un contenido similar y/o cerca al de las flores.

Al igual que en el ensayo de las antocianinas, se obtuvieron pruebas positivas para las demás partes de la planta, sin embargo, de acuerdo con los resultados, se observa que el contenido de carotenos es mayor en los tallos, el fruto y las hojas verdes respectivamente.

Cabe destacar que, aunque estos órganos de *Anoda* no tenga pigmentación específica, estas pueden tener cantidades significativas de luteína u otras xantofilas características de algunos quelites como en el caso de la espinaca [Tritordeum 2018]. Sin embargo, el contenido de compuestos de clorofila también puede influir en la cuantificación por lo que, lo más recomendable es hacer una separación de ambos pigmentos en el extracto de hexano para realizar la medición por separado.

8.2.2. Identificación del perfil fitoquímico por CCF

Ácidos fenólicos

En la Figura 36 se observa que tanto las flores como las hojas presentan un perfil más parecido en cuanto a sus compuestos fenólicos, particularmente, como se observa en la Figura 36-B, el revelado de la placa evidencia bandas a la altura del ácido clorogénico (zona señalada amarilla en Figura 36-A).

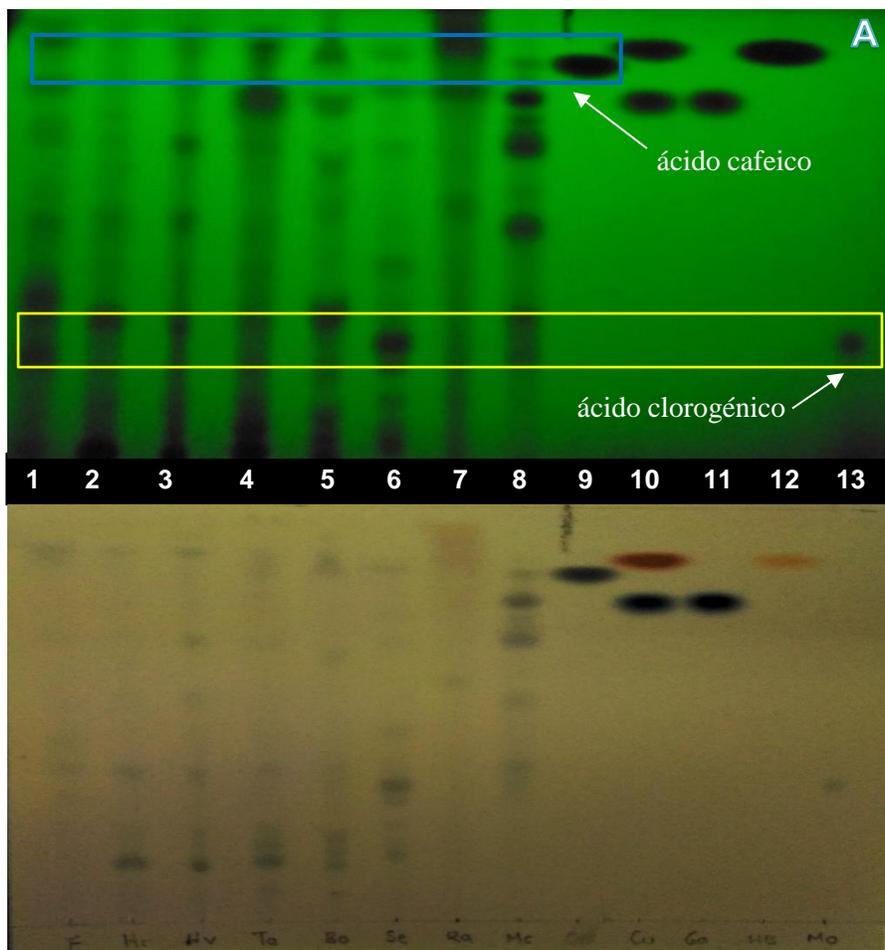


Figura 36. CCF de ácidos fenólicos en *Anoda cristata*.

Extractos fase orgánica de acetato de etilo (**1**: flores; **2**: hoja verde; **3**: hoja roja; **4**: tallos; **5**: fruto; **6**: botones; **7**: raíz); Referencias (**8**: clorogénicos de camote; **9**: ac. cafeico; **10**: ac. cumárico + ac. gálico; **11**: ac. gálico; **12**: ac. hidroxibenzoico; **13**: ácido clorogénico). Fase móvil: cloroformo: tolueno: acetato de etilo: acetona: ac. fórmico (40:40:30: 20:10). Revelado: **A**: luz UV; **B**: cloruro férrico al 2%.

En todos los extractos se encuentra esta misma banda, aunque están en muy baja concentración, logran observarse sobre todo en los botones y la flor. Sobre esta variedad de *Anoda* no se encuentran reportes aún sobre el perfil de ácidos fenólicos presentes, sin embargo, estudios sobre otras especies de la misma familia malváceas han identificado compuestos como el ácido clorogénico y cafeico [Morais *et al.*, 2017].

La referencia de ácido cafeico (número 9) coincide mayoritariamente con el fruto, los botones y la raíz de la planta (zona señalada azul) sin embargo, tanto en las flores como en las hojas se encuentra una banda muy cercana a esta referencia. De acuerdo con la Figura 36-B en la placa revelada no se identificaron ácidos fenólicos como el cumárico o hidroxibenzoico. Las hojas verdes, presentaron además bandas que se asemejan a las reportadas para el caso de las hojas de camote en las que se han identificado isómeros del ácido clorogénico [Torres, 2016].

Algunos reportes para plantas de malvas parecidas a *Anoda cristata* han reportado que, si poseen ácido clorogénico e hidroxibenzoico, sin embargo, estos se encuentran a nivel de trazas [Türker y Dalar 2013], por lo que es probable que la concentración de este tipo de compuestos en esta familia de plantas sea mínima y por lo tanto no es tan factible observarlos por cromatografía en capa fina.

Flavonoides

Para la identificación de los flavonoides se utilizó el extracto acuoso resultante de cada parte de la planta una vez hechos lavados con hexano y acetato de etilo. En este extracto también se evidencian las bandas de antocianinas, las cuales son coloridas y corresponden a las que se observan en la parte inferior, por lo tanto, los flavonoides que no son antocianinas se encuentran en la parte superior.

Los estudios realizados en *Anoda cristata* se han enfocado hasta la fecha en la actividad biológica debido a dos flavonoides presentes en las hojas o quelite de esta planta; estos corresponden a las flavonas acacetina y diosmetina [Juárez-Reyes *et al.*, 2015]; para este ensayo no se contaron con las referencias de dichos compuestos, por lo que no se confirmó dicha información de forma cualitativa.

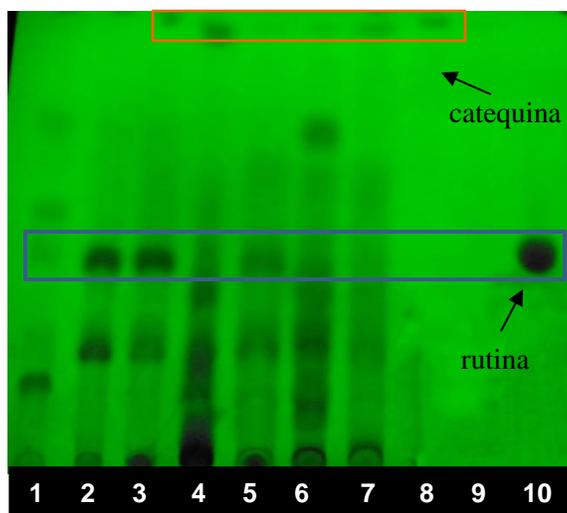


Figura 37. CCF de flavonoides en *Anoda cristata*.

Extractos acuosos (1: flores; 2: hoja verde; 3: hoja roja; 4: tallos; 5: fruto; 6: botones; 7: raíz); Referencias (8: catequina; 9: epicatequina; 10: rutina). Fase móvil: acetato de etilo: agua: ac. fórmico (85:10:15) Revelado: luz UV.

Lo observado en la placa (Figura 37) nos indica que el perfil es muy similar en todas las partes de la planta, variando únicamente la concentración de las bandas en cada una. En el caso de las flores la concentración de los compuestos presentes es menor, mientras que, en las hojas, el fruto y los botones es mucho mayor. En el caso de los tallos se observa que en la parte inferior existe una acumulación de compuestos, lo que nos indica que el sistema podría resolverse mejor para esta parte de la planta y evidenciar si se trata de flavonoides glicosilados.

Con respecto a los estándares empleados en este ensayo, se observa que todas las partes de la planta coinciden con la de rutina (barra azul) y con catequina (barra naranja). Otros estudios sobre malvas han descrito la presencia de flavonoides como rutina, catequina, quercetina [Morais *et al.*, 2017] y kaempferol [Türker y Dalar 2013].

Antocianinas

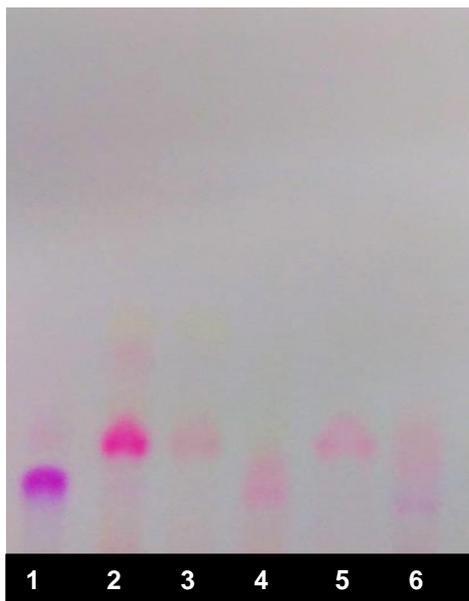


Figura 38. CCF de antocianinas en *Anoda cristata*.

Extractos acuosos (1: flores; 2: hoja verde; 3: hoja roja; 4: tallos; 5: fruto; 6: botones). Fase móvil: acetato de etilo: agua: ac. fórmico (85:10:15)
Revelado: luz blanca.

La identificación de antocianinas se realizó de igual forma con el extracto acuoso empleado para la identificación de flavonoides. Así mismo, se usaron todas las partes de la planta exceptuando la raíz, ya que anteriormente se logró cuantificar antocianinas en estas partes con el método de pH diferencial.

De manera cualitativa se confirma con lo observado en la Figura 38 que todas las partes de *Anoda cristata* poseen antocianinas, pues en todos los casos se denotan bandas de colores característicos de estos compuestos, particularmente estas pueden ser antocianinas de cianidina de acuerdo con la tonalidad del pigmento.

En el caso de las flores se observa una antocianina como se había descrito anteriormente, la cual por la coloración dada puede ser de delphinidina o malvidina; sin embargo, además se observa claramente una banda más a la altura de la antocianina presente en la hoja roja, por lo que es probable que esta se encuentra igualmente en la flor, aunque en menor concentración.

Lo mismo se observa para las hojas verdes, el fruto y los botones, con lo cual se da la pauta de que es la misma antocianina y que la concentración de esta depende del estado de madurez y/o desarrollo fisiológico en las partes de la planta; aunque esta propiamente no aporte un efecto de pigmentación pues el contenido es muy bajo en comparación con las hojas rojas. En los tallos también se presenta una banda colorida de diferente Rf a la de las hojas y demás órganos de *Anoda*, por lo que probablemente sea de una antocianina con diferente grado de glicosilación.

En la placa se logran observar en promedio dos antocianinas para cada parte del alache, sin embargo, pueden existir demás antocianinas en cantidades mínimas que no se logren apreciar con este método cualitativo.

Carotenos

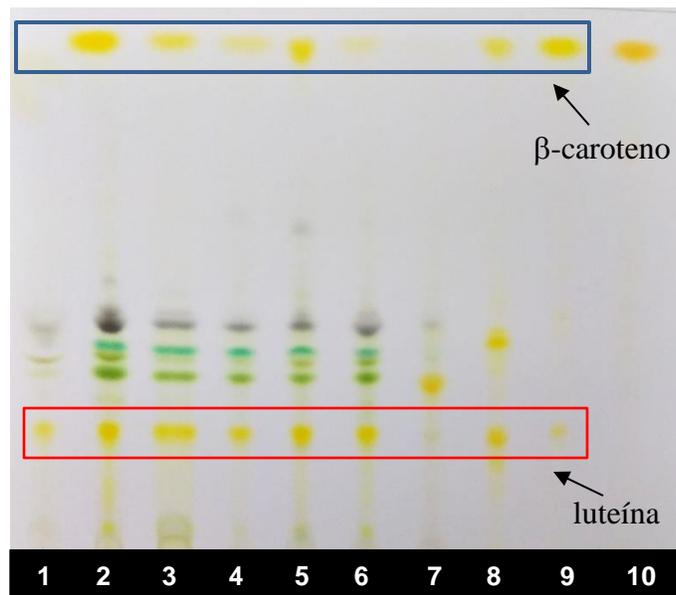


Figura 39. CCF de carotenoides en *Anoda cristata*. Extractos fase orgánica de hexano (1: flores; 2: hoja verde; 3: hoja roja; 4: tallos; 5: fruto; 6: botones; 7: raíz); Referencias (8: pimienta morrón; 9: zanahoria; 10: jitomate). Fase móvil: hexano: isopropanol: agua (100:10:0.5). Revelado: luz blanca.

En la identificación de carotenoides por CCF, se utilizó como referencia un extracto de pimienta morrón amarillo, ya que se ha reportado que este es una buena fuente de luteína y β -caroteno; de igual forma se utilizó el extracto de zanahoria y de jitomate. El sistema de elución fue hexano: isopropanol: agua (100:10:0.5); y para este sistema se encontró que luteína presenta un %RF de 28 [Hynstova *et al.*, 2018].

Anteriormente se ha investigado en diversas especies de malvas como la malva silvestre, que estas poseen β -caroteno y xantofilas como luteína [Barros *et al.*, 2010], de ahí que el sistema cromatográfico se adaptara para observar dichos compuestos.

Como se observa en la Figura 39, todas las partes del alache poseen tanto β -caroteno (barra azul) como luteína (barra roja), esto se corroboró con las referencias empleadas, además, se observa que, en efecto, las hojas, frutos, botones y tallos poseen un contenido mayor de dichos compuestos, esto debido a que la intensidad de las bandas es mayor, además de que se corrobora lo obtenido en la cuantificación por métodos espectrofotométricos. En el caso de la raíz, esta presenta una banda diferente a luteína que por el %Rf determinado (34) esta puede corresponder a la xantofila astaxantina. De igual forma, esta podría estar presente en los demás órganos de la planta, sin embargo, la presencia de las clorofilas en este caso estaría enmascarando dicha banda, por lo que lo ideal para las hojas y tallos, sería realizar un método de extracción únicamente de clorofilas y evidenciar si en efecto existen más xantofilas en las muestras.

Triterpenos

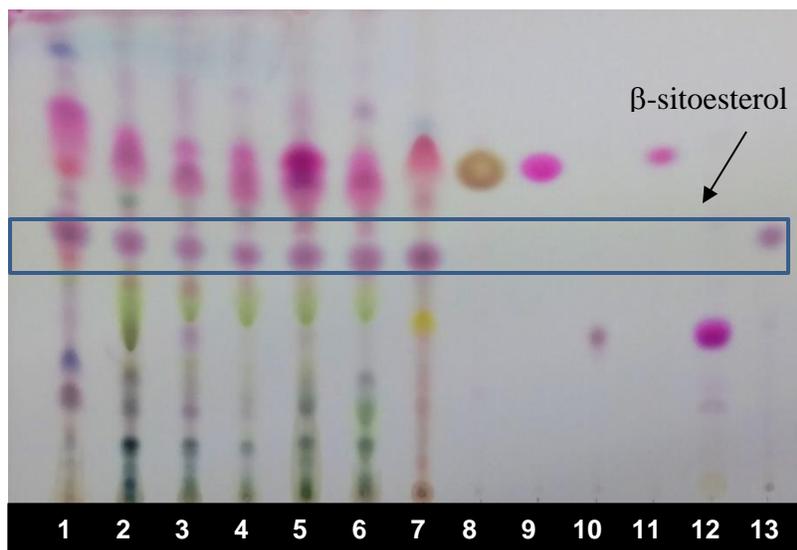


Figura 40. CCF triterpenos en *Anoda cristata*.

Extractos fase orgánica de hexano (1: flores; 2: hoja verde; 3: hoja roja; 4: tallos; 5: fruto; 6: botones; 7: raíz); Referencias (8: α -amirina; 9: β -amirina; 10: betulina; 11: lupeol; 12: ac. ursólico + ac. oleanólico; 13: β -sitoesterol). Fase móvil: hexano: diclorometano: acetato de etilo (7:1.5:1.5). Revelado: anisaldehído al 1%

Para la identificación de triterpenos se utilizó el mismo extracto de hexano empleado para la placa de carotenos, en este caso se empleó un nuevo sistema de elución de hexano: diclorometano: acetato de etilo (7:1.5:1.5). Se usaron los mismos estándares de referencia y la mezcla comercial de fitoesteroles se sustituyó por β -sitoesterol aislado.

Como se muestra en la figura 40, todas las partes de la planta de alache presentan fitoesteroles,

particularmente β -sitoesterol (barra azul), lo mismo se observa para los triterpenos pentacíclicos α y β amirina. Aunque la concentración de las bandas es bastante similar en todos los casos, se puede notar que es en el fruto o semilla de la planta donde predominan dichos compuestos.

En el caso de las flores, las hojas rojas y el fruto se observa una banda en la parte inferior que puede corresponder con betulina. En la especie de *Malva silvestris* se han aislado, además, sesquiterpenos y un diterpeno acíclico tetrahidroxilado, así como dos monoterpenos conocidos, y demás compuestos aromáticos [Cutillo *et al.*, 2006].

La flor de alache, además, evidenció tener un perfil parecido a la flor de mayo, en la cual se han identificado diversos compuestos terpénicos que proporcionan diferentes olores y protección en general [Gong *et al.*, 2019]. Igual que las espinas urticantes, que defienden a las plantas frente a la agresión de los herbívoros, los terpenos ejercen también numerosas funciones protectoras [Ormeño y Fernández 2012]; en este caso, como se observó en el ensayo; *Anoda cristata* posee diversos de estos compuestos.

8.2.3. Identificación y caracterización de antocianinas en flores y hojas por HPLC

Debido a que las flores y hojas de la planta mostraron tener un contenido mayor de antocianinas, las cuáles además no han sido reportadas; se procedió a realizar la identificación mediante HPLC (520 nm). Se utilizó un extracto acuoso purificado concentrado y se obtuvieron los siguientes cromatogramas mostrados en la figura 41.

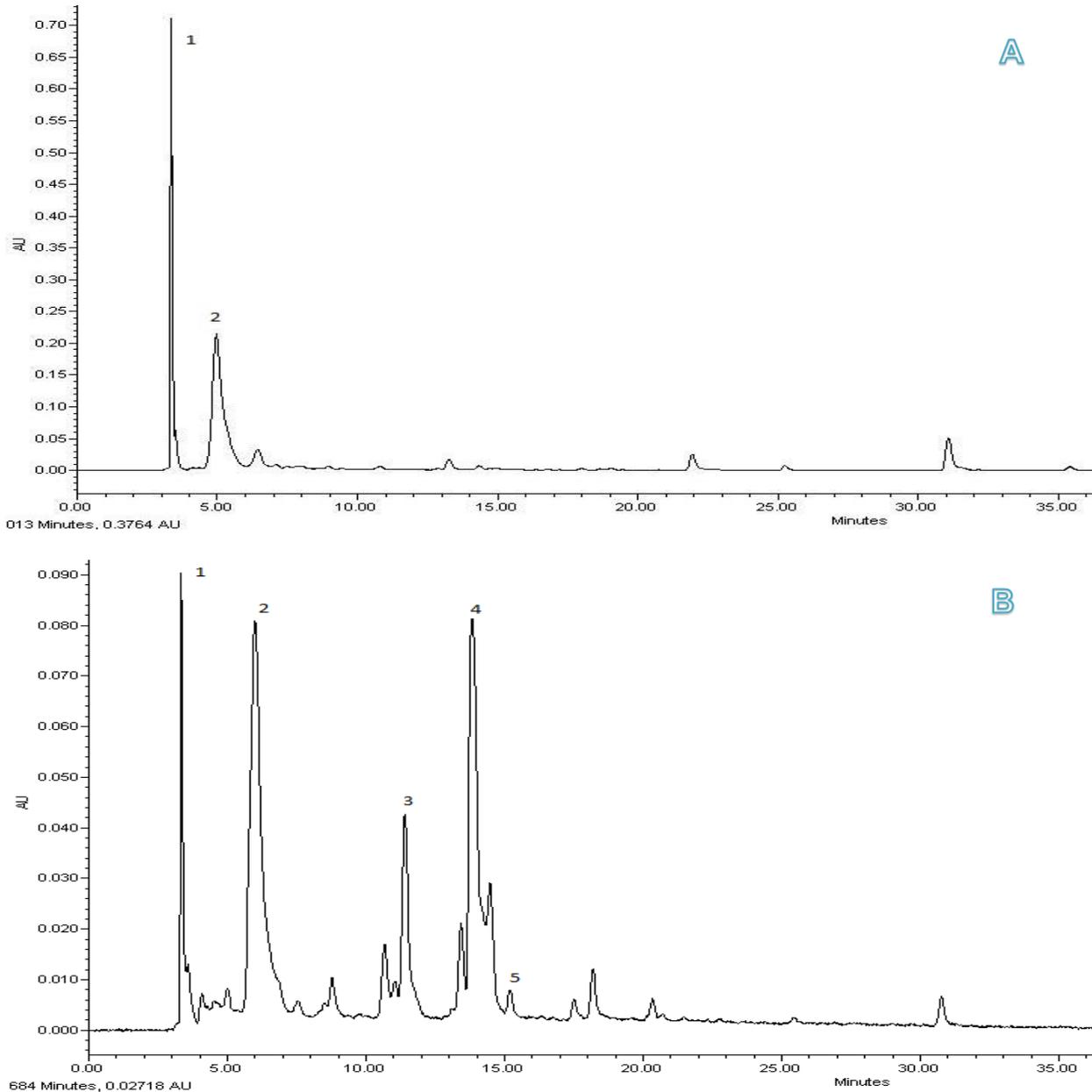


Figura 41. Cromatograma de antocianinas (λ :520 nm) de *Anoda cristata*. Extracto metanólico: **A**: Flores; **B**: Hojas rojas. Método cromatográfico reportado por Torres 2016.

Inicialmente se identificaron dos picos (1 y 2) predominantes en la flor de alache, los cuales pueden referirse a lo observados en cromatografía en capa fina. En el caso de las hojas, se habían observado dos antocianinas con luz visible en placas cromatográficas, sin embargo, por la identificación en HPLC se evidencia que son más antocianinas las que están presentes.

Los mismos extractos se analizaron mediante HPLC-EM para la caracterización de las antocianinas presentes tanto en las flores como en las hojas. Cabe destacar que existe un amplio registro sobre antocianinas comunes en el mundo vegetal, así mismo se conoce con exactitud la huella dactilar de cada aglucón y de los principales azúcares que se encuentran unidos a estos con respecto a su peso molecular. De acuerdo con la interpretación de los espectros de masas obtenidos (anexo 3), los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Identificación y caracterización parcial de antocianinas en flores y hojas de *Anoda cristata*.

Pico	tr (min)	[M] ⁺ (m/z)	MS ² (m/z)	Antocianina
Flores				
1	3.2	611	465/303	delfinidina-3-rutinósido
2	4.7	611	465/303	delfinidina-3-rutinósido
Hojas				
1	3.2	595	449/287	cianidina-3-rutinósido
2	6.2	595	449/287	cianidina-3-rutinósido
3	12.1	743	611/465/303	delfinidina 3-rutinósido-5-arabinósido
4	14.6	611	465/303	delfinidina 3-rutinósido
5	15.3	757	625/479/317	petunidina-3-rutinósido-5-arabinósido

En la identificación por HPLC de las antocianinas de las flores se evidenciaron dos picos, los cuales corresponde a delfinidina-3-rutinósido, esto sugiere que se trata de dos isómeros y es una antocianina la que está presente (Figura 42); de igual forma esto confirma la información obtenida por CCF en donde se observó una antocianina en tonalidades moradas.

Para el caso de las hojas del alache, se identificaron cinco antocianinas (Figura 43), dentro de las cuáles también se encuentran mono y diglicosiladas de cianidina, delfinidina y petunidina.

En esta, también se presentan dos picos que sugieren ser los isómeros correspondientes a cianidina-3-glucósido; esta antocianina, de acuerdo con la Figura 41-A es la predominante en toda la materia vegetal de la hoja, lo cual se confirma con lo observado en la cromatografía en capa fina donde se observó una banda principal en tonalidades magenta.

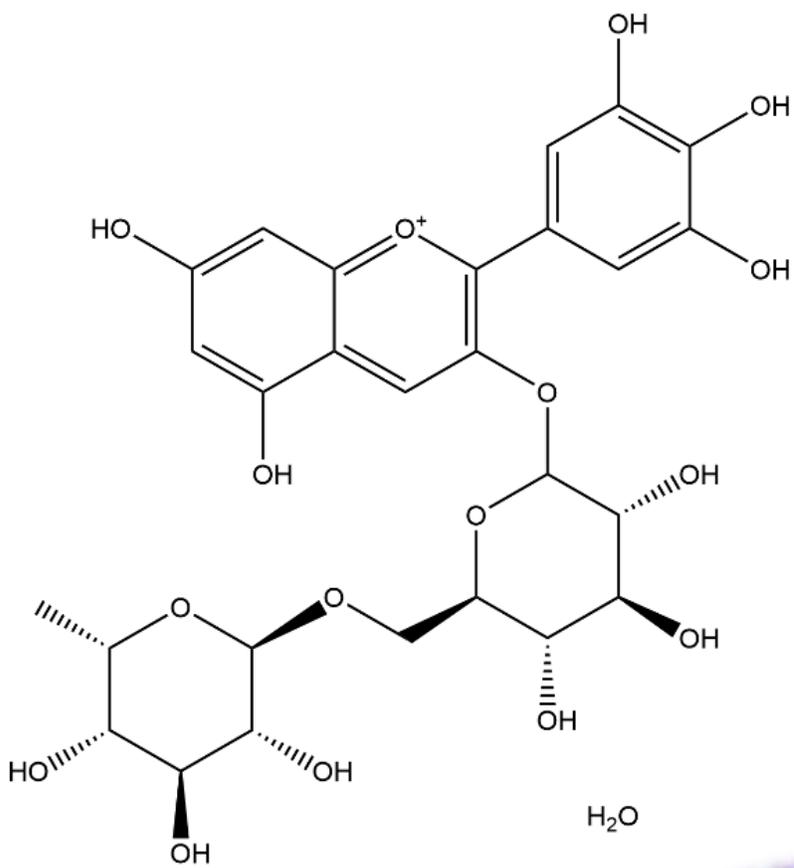
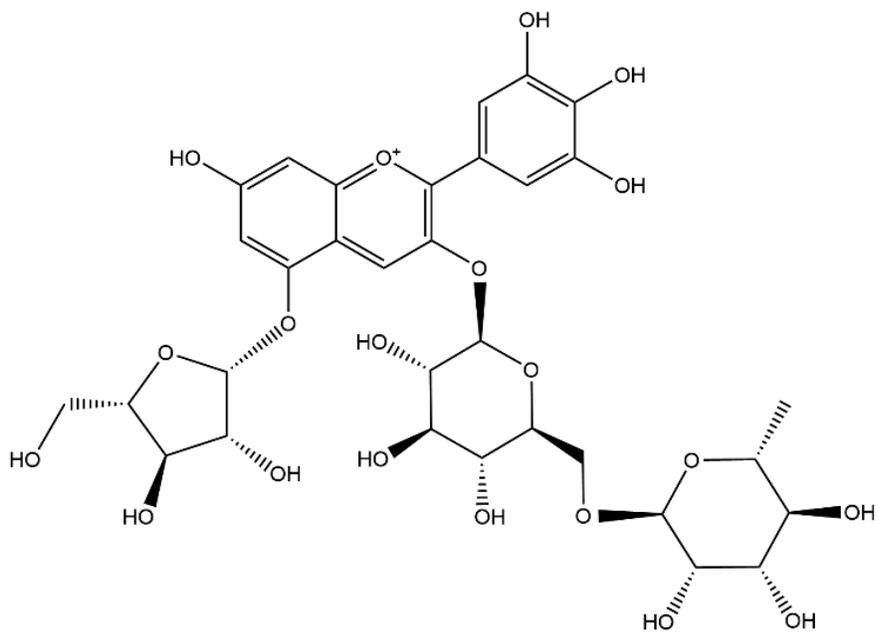
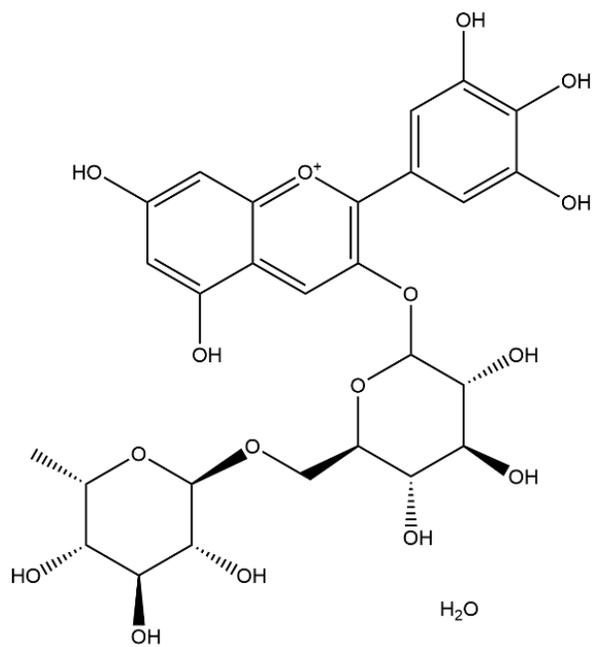


Figura 42. Delfinidina-3-rutinósido, antocianina caracterizada en flores de *Anoda cristata*.

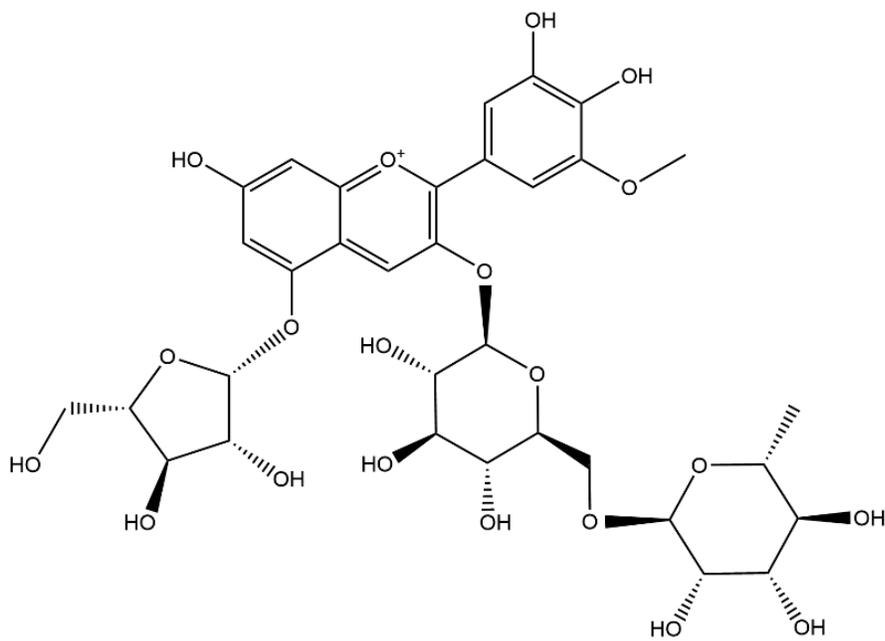


delfinidina-3-rutinósido-5-arabinósido

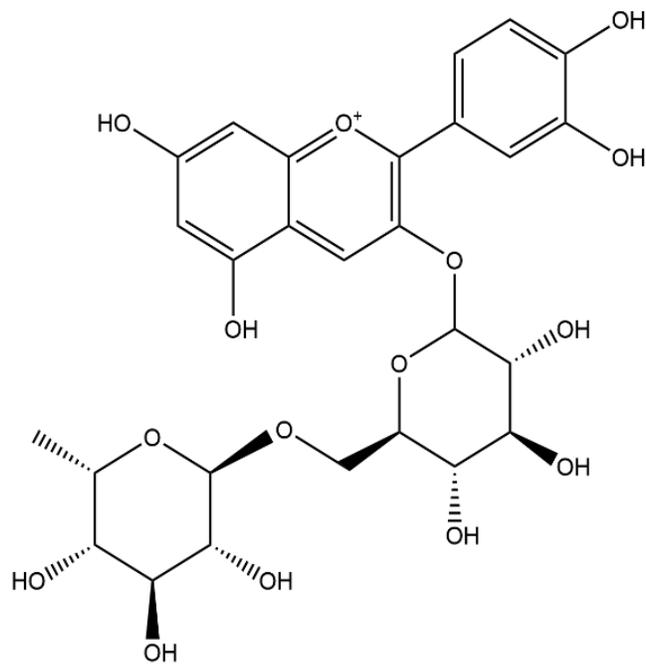


delfinidina-3-rutinósido

Figura 43-A. Antocianinas identificadas en hojas de *Anoda cristata*



petunidina-3-rutinósido-5-arabinósido



cianidina-3-rutinósido

Figura 43-B. Antocianinas identificadas en hojas de *Anoda cristata*

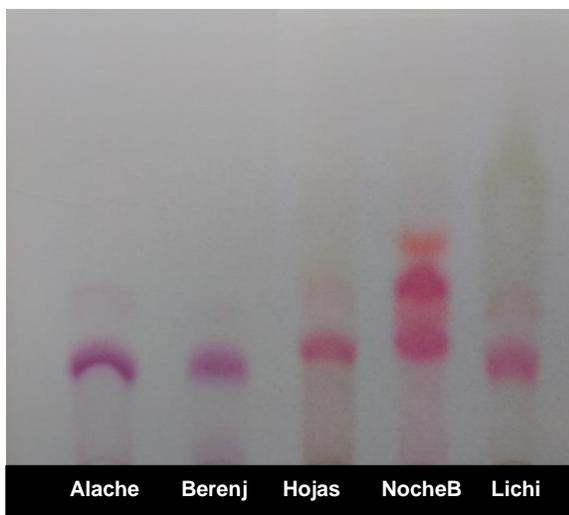


Figura 44. CCF de antocianinas en flores y hojas de *Anoda cristata*

Extractos acuosos. Fase móvil: acetato de etilo: agua: ac. fórmico (85:10:15) Revelado: luz blanca.

De forma cualitativa se realizó una confirmación en cromatografía en capa fina para las antocianinas predominantes de la flor y las hojas de alache utilizando fuentes de delfinidina 3-rutinósido y cianidina-3-rutinósido, las cuáles se han reportado que se encuentran en la cáscara de berenjena (delfinidina) [Wu y Prior 2005]; y en la flor de noche buena [Gu *et al.*, 2018] y la cáscara de lichi [Ibrahim y Mohamed 2015].

Como se observa en la figura 44, la antocianina de la referencia de berenjena coincide con la presente en la flor por lo que se confirma que ésta corresponde a delfinidina-3-rutinósido. Lo mismo para el caso de las hojas rojas, en las cuáles se observa que ésta coincide con la antocianina reportada para las brácteas de noche buena cianidina-3-rutinósido, al igual que con la de lichi, aunque esta se encuentra ligeramente desplazada hacia la parte inferior de la placa.

8.2.4. Cuantificación de antocianinas en flores y hojas por HPLC

Una vez identificadas las antocianinas presentes en flores y hojas, se prosiguió a realizar la cuantificación de delfinidina-3-rutinósido (flores y hojas) y de cianidina-3-rutinósido (hojas).

En la Figura 45 se muestra la zona señalada de la placa que se separó tanto para las flores como para las hojas y se realizaron curvas patrón para cada una mediante el uso de HPLC (Figura 46) para la posterior cuantificación de estas en las muestras de flor y hojas, las curvas obtenidas corresponden a las siguientes:

$$\text{Delfinidina-3-rutinósido: } y = 442663[x] + 16032 \quad R^2 = 0.9918$$

$$\text{Cianidina-3-rutinósido: } y = 40108[x] + 19545 \quad R^2 = 0.9939$$

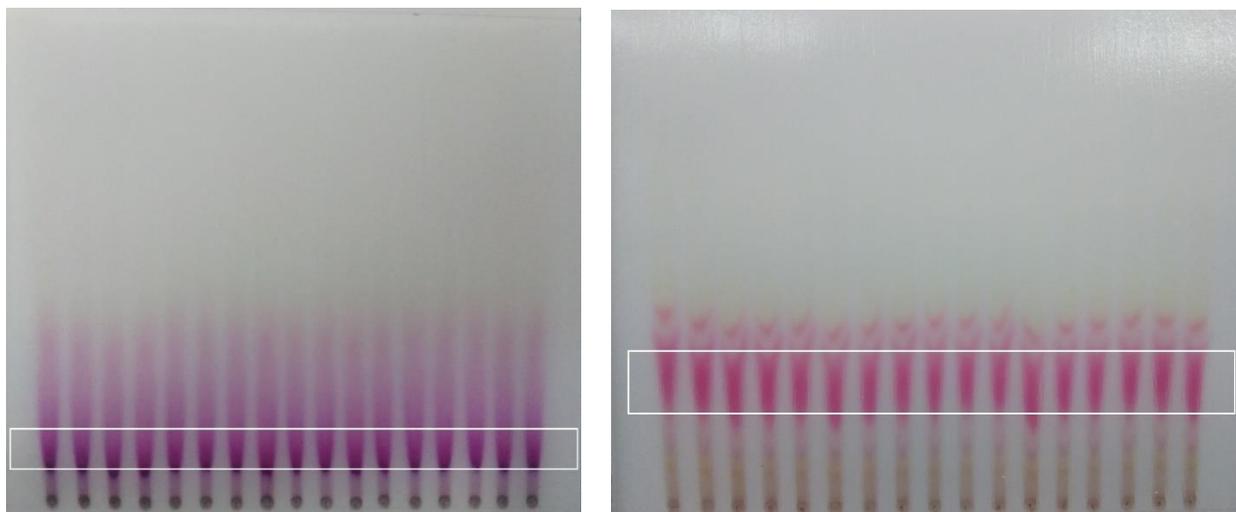


Figura 45. CCF de antocianinas en flores y hojas de *Anoda cristata*.

Extractos acuosos: **A:** Placa de flores; **B:** Placa de hojas rojas. Fase móvil: acetato de etilo: agua: ac. fórmico: metanol (85:10:15:5) Revelado: luz blanca. Zona marcada: región aislada de la placa.

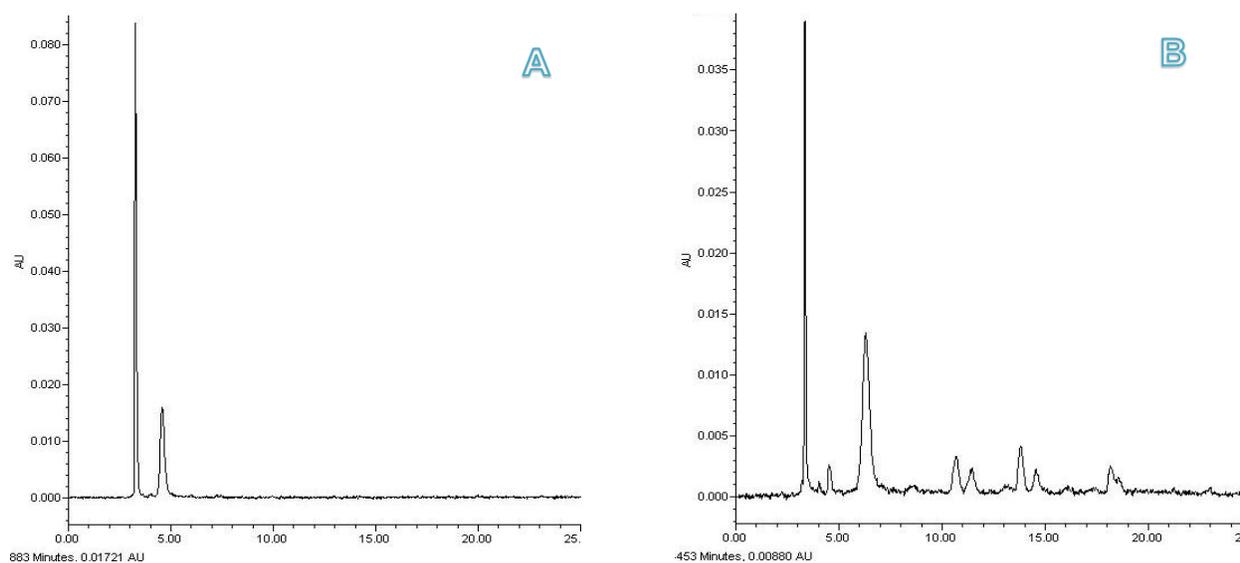


Figura 46. Cromatograma de la región separada de antocianinas (λ :520 nm) de *Anoda cristata*.

Extracto metanólico: **A:** Flores; **B:** Hojas rojas. Método cromatográfico reportado por Torres 2016.

En la tabla 14 se muestran los resultados de cuantificación para ambas antocianinas en las flores y hojas de alache; como se observó en la primera identificación de los compuestos por HPLC (figura 47B), en las hojas rojas predomina la antocianina de cianidina-3-rutinósido, mientras que en las flores delphinidina-3-rutinósido.

Tabla 14. Cuantificación de antocianinas en flores y hojas de *Anoda cristata*.

Muestra	Antocianinas totales (mg AT/g mtra. seca)	mg delphinidina-3-rutinósido/g mtra. seca	mg cianidina-3-rutinósido/g mtra. seca
Flores	1.404	0.934	NC
Hoja roja	1.547	0.629	0.794

NC: no cuantificada

Comparando estos valores con los obtenidos en la cuantificación de antocianinas totales por el método de pH diferencial podemos establecer que, en el caso de las flores, dicha antocianinas representa más del 66%, el restante puede corresponder al otro isómero.

En las hojas rojas se cuantificó además de la antocianina principal de cianidina, el contenido de delphinidina-3-rutinósido que también se encuentra en la flor; de esta se puede decir que corresponde al 40% de las antocianinas totales, mientras que cianidina-3-rutinósido al 51%, el restante se encuentra distribuido entre las otras tres antocianinas identificadas en menor concentración.

8.2.5. Aplicación de las antocianinas de *Anoda cristata* como biocolorante

8.2.5.1. Ensayos de color y copigmentación



Figura 47. Sanitización de flores

Las flores fueron sanitizadas (Figura 47) y posteriormente secadas en estufa, molidas y almacenadas en un recipiente limpio y cerrado libre de humedad.

Para evidenciar el cambio de color proporcionado por la acidificación y posterior tratamiento térmico en el color del extracto floral, se emplearon cuatro ácidos distintos en un extracto acuoso de flor de alache comestible; todos fueron acidificados al 1% y se sometieron a tratamiento térmico de 60°C durante 30 min suponiendo que esta es la técnica con menor temperatura para asegurar la inactivación de patógenos en un alimento (pasteurización lenta).

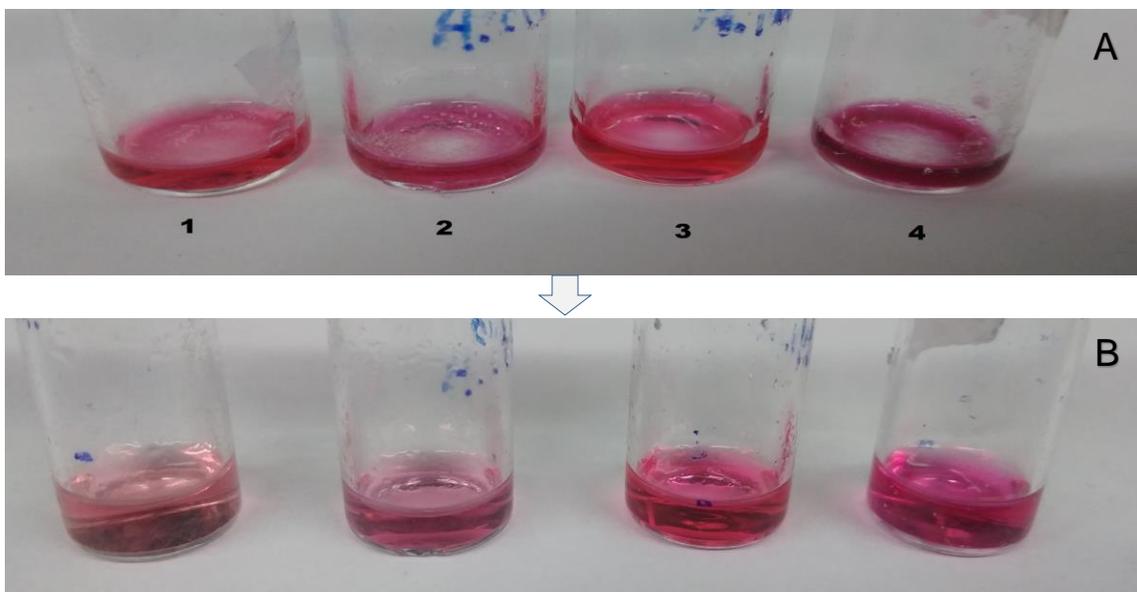


Figura 48. Pruebas de color para extractos acidificados de flor de alache.
A: Extracto sin tratamiento térmico; **B:** Extracto posterior a 30 min de tratamiento térmico 60°C
(**1:** ácido acético; **2:** ácido cítrico; **3:** ácido málico; **4:** ácido láctico).

De los cuatro ácidos empleados, como se observa en la figura 48, fueron el ácido cítrico y el ácido láctico quienes mostraron una coloración visiblemente más intensa de las antocianinas después del tratamiento térmico; así mismo, se puede notar que el ácido acético fue el que se vio más afectado en cuanto a la permanencia del color, además de que éste no es adecuado para usar en alimentos, por lo cual fue completamente descartado.

Finalmente, el vial con ácido láctico fue el que mantuvo su color de mejor manera con respecto al original, aunque estas son observaciones de manera subjetiva, se decidió emplear dicho ácido ya que visiblemente este presenta una coloración más intensa después del tratamiento térmico con respecto a los otros ácidos, además de que su uso está permitido para la elaboración de alimentos.

De acuerdo con los resultados anteriores, se observó que el tratamiento térmico a 60° no afectaba de manera visible el color del extracto; sin embargo, se realizó un ensayo rápido de copigmentación para ver el efecto que éste tenía sobre las antocianinas, basándonos en la permanencia del color y la concentración del compuesto mediante HPLC.

Debido a que el enfoque del trabajo es la aplicación biotecnológica en alimentos de compuestos bioactivos provenientes de plantas, se empleó como copigmento un extracto seco de ácido rosmarínico (AR) proveniente de romero (*Salvia rosmarinus*); el cual se utiliza desde la antigüedad en la medicina tradicional, gracias a las múltiples propiedades que se le han atribuido como el potente efecto antioxidante de algunos de sus componentes.

Como se muestra en la figura 49, inicialmente, los viales mantuvieron su color, sin embargo, después del almacenamiento en condiciones adversas, se logra observar que el efecto del copigmento de ácido rosmarínico no ayuda a la permanencia de color, contrario a esto, se degrada y la antocianina pasa a su forma de chalcona (incolora), esto lo confirmamos con el control del extracto acuoso purificado (EPA), en el cual, se observa la pérdida completa de color.

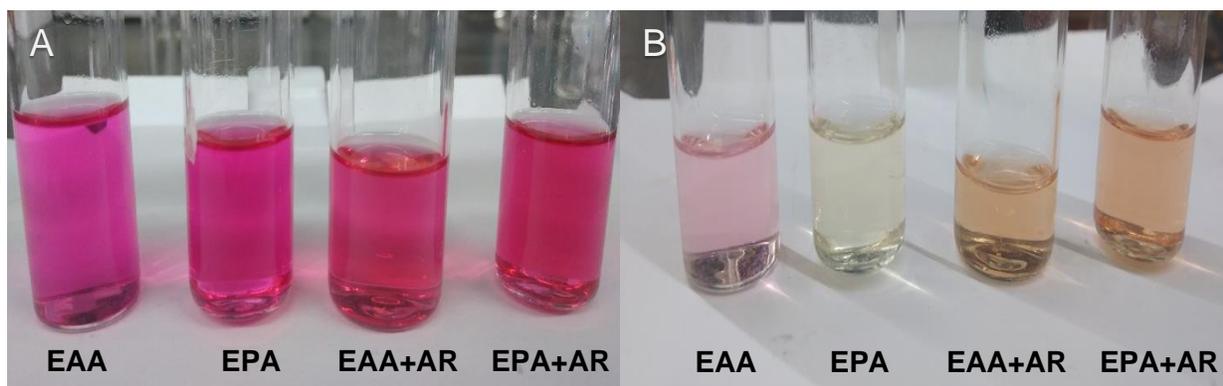


Figura 49. Pruebas de copigmentación

Extractos acuosos (EAA: extracto acuoso de antocianinas, **EPA:** extracto purificado de antocianinas, **EAA+AR:** extracto acuoso de antocianinas con copigmento de ácido rosmarínico, **EPA+AR:** extracto purificado de antocianinas con copigmento de ácido rosmarínico). **A:** Extractos sin tratamiento térmico acidificados al 1% con ácido láctico. **B:** Extractos con 60 min de tratamiento térmico a 70°C y almacenamiento a la luz por 1 semana.

En el caso del control del extracto acuoso de antocianinas (EAA), se evidenció la permanencia (aunque menos intensa) de la pigmentación. En este caso, podemos señalar que las antocianinas de la flor de alache ejercen un efecto de copigmentación intermolecular con los flavonoides presentes en la flor; ya que como se observa, es cuando se retiran estos compuestos con la purificación del extracto cuando la antocianina queda mayormente expuesta, propiciando que el tratamiento térmico, y la exposición a la luz la degraden con mayor rapidez, aun cuando existe el

copigmento de ácido rosmarínico en disolución con el extracto de alache, este pudiera no estar en condiciones óptimas de pureza, poseer agentes pro oxidantes o inclusive entrar en competencia con otros compuestos del alache si este no se purificó de manera adecuada, de esto se da a relucir que para saber con exactitud el efecto del ácido rosmarínico faltan ajustes experimentales.

Normalmente, la copigmentación intermolecular está dada por un mecanismo análogo a la auto asociación en soluciones ácidas, en estas influyen la cantidad de antocianina y molécula de copigmento presente; considerando los estudios previos a esta planta en donde se identificaron los flavonoides acetina y diosmetina en los quelites [Juárez-Reyes *et al.*, 2015], podemos resaltar que si estos compuestos se encuentran de igual forma en las flores, estos pueden ejercer un efecto de protección copigmentando a la antocianina de delphinidina.

A modo de confirmación cualitativa se realizó una prueba en HPLC (λ :520 nm) con el extracto acuoso de antocianinas (EAA) antes y después de someterse a tratamiento térmico durante una hora a 70°C. Como se muestra en la figura 50, el cambio en la concentración del pico (altura) una vez que se realizó el tratamiento térmico en el extracto es mínimo, de esta forma podemos dar pauta a que las flores no necesitan el copigmento de ácido rosmarínico, pues al usarlo con el extracto purificado, la antocianina es más susceptible a deteriorarse debido a que se encuentra expuesta por la ausencia de otros compuestos como flavonoides; mientras que el uso con el extracto acuoso aunque puede ejercer cierto grado de protección, este afecta directamente en la coloración del extracto, lo cual no es deseable pues se busca emplear este extracto como una aplicación biotecnológica para un alimento.

Por lo tanto, los extractos acuosos de la flor de alache funcionan y resisten hasta cierto punto el efecto de la temperatura sin necesidad de usar un copigmento externo.

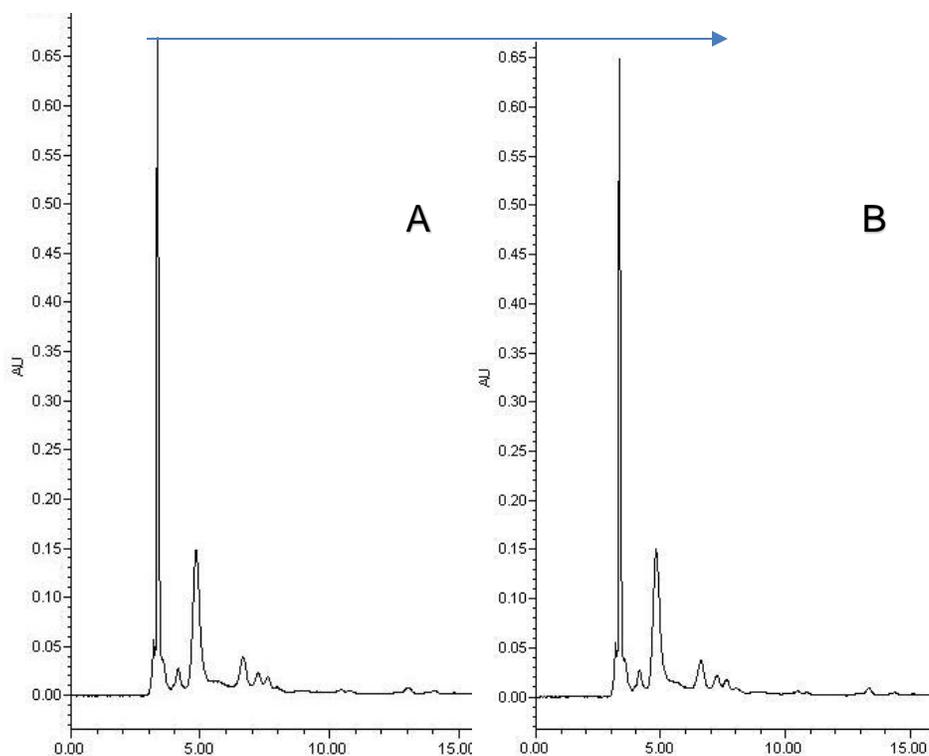


Figura 50. Cromatograma de extracto de flor de alache (λ :520 nm) Extractos acuosos (**A**: Sin tratamiento térmico; **B**: 60 min de tratamiento térmico 70°C). Método cromatográfico reportado por Torres 2016.

8.2.5.2. Aplicación de color en un alimento (caramelo duro)

Finalmente, para evaluar la funcionalidad del extracto de flor de alache como biocolorante en alimentos, se elaboró caramelo duro. El proceso de elaboración del caramelo duro implica iniciar con una cantidad de azúcar mayor a la que podría disolverse en agua, por ello, se necesita elevar la temperatura para que exista un equilibrio dinámico y se pueda solubilizar la sacarosa (azúcar). Cuando se alcanza el punto óptimo de temperatura donde el agua comienza a evaporarse, los solutos (en este caso azúcares) comienzan a concentrarse de tal forma que se obtiene una solución saturada; la velocidad con la que se disuelven los solutos disminuye, y la velocidad de cristalización de estos empieza a aumentar hasta alcanzar un equilibrio, es decir, los cristales de sacarosa y la solución se encuentran en equilibrio dinámico [Husband 2014].

Este tipo de aplicación en confitería es factible porque, es necesario alcanzar una temperatura muy elevada (aproximadamente 140°C) para llegar a la condición de punto de quiebre o bola dura, en la cual se da la saturación de los azúcares; es en este momento cuando se da la adición del colorante, la cual tiene que ser muy rápida para homogeneizar la mezcla con el color y proceder al vaciado en moldes para que se efectúe el fenómeno de transición vítrea.

Para la prueba se empleó un extracto acuoso de antocianinas (Figura 51) de flor de alache previamente acidificado con ácido láctico; alcanzando una temperatura de bola dura o punto de quiebre de 134°C, en ese punto la adición del bicolorante de alache se efectuó hasta homogeneizar la mezcla.



Figura 51. Flores de alache sanitizadas y extracto acuoso de antocianinas concentrado.

Como se observa en las fotografías del caramelo (Figura 52), el color proporcionado por el extracto de alache resistió de manera satisfactoria el tratamiento térmico al que se llegó en el punto de quiebre, lo que permitió que una vez dada la cristalización, este quedara atrapado en el confite. Las coloraciones dadas resultaron en tonalidades rosáceas / magenta, las cuales de forma subjetiva son agradables a la vista, al igual que la brillantez proporcionada por los azúcares.

La prueba se enfocó únicamente en la permanencia del color debido a la copigmentación intermolecular que las antocianinas ejercen con los demás compuestos presentes en el extracto acuoso, la cuantificación de antocianinas totales en matrices alimentarias de este tipo no es factible de hacer por la naturaleza de la muestra con alta concentración de azúcares, sin embargo, a simple vista, el extracto de alache se puede considerar como una alternativa para el desarrollo de nuevos bicolorantes.



Figura 52. Caramelos con biocolorante de flor de alache.

9. Conclusiones

De las diez flores comestibles estudiadas, se cuantificaron e identificaron los compuestos bioactivos representativos fenólicos y terpénicos; de manera cuantitativa con los ensayos espectrofotométricos, se encontró que la flor de noche buena, de mayo y manita fueron quienes presentaron un mayor contenido de fenoles con respecto a las otras muestras, estos datan de 128 a 167 mg de ácido gálico/g mtra. seca. Con respecto al contenido de flavonoides, las flores de calabaza, gualumbos de maguey, capuchina, manita y flor de mayo poseen menos del 50% de estos compuestos dentro de sus fenoles totales, por lo que dichos compuestos corresponden principalmente a los ácidos fenólicos; caso contrario en las flores de noche buena, colorines, pata de vaca y alache, en las que dichos flavonoides superan el 50%. Particularmente, la flor de alache presentó un contenido de flavonoides del 90% del total de sus compuestos fenólicos.

Las muestras que poseen antocianinas fueron la noche buena y los colorines, siendo estas las que evidenciaron los valores más altos de todas las flores con 11.93 y 14.74 mg de cianidina-3-glucósido/g mtra seca, respectivamente. La pata de vaca y el alache presentaron valores similares en un rango de 1.4 a 1.7 mg de cianidina-3-glucósido/g mtra seca; mientras que la capuchina y flor de mayo poseen menos de 1 mg de antocianinas totales.

De igual forma, el mayor contenido de carotenos se encontró en la flor de noche buena y la flor de mostaza, con valores entre 519 y 547 μg de β caroteno/g mtra. seca los cuáles se acercan a los reportados para carotenos en zanahoria (663 hasta 900 μg de β caroteno/g base seca), la cual es considerada como una fuente rica en estos pigmentos [Beltrán et al., 2012].

De forma cualitativa con la cromatografía en capa fina, en todos los casos se encontró que las flores poseen fitoquímicos pertenecientes a los diferentes grupos de metabolitos secundarios; principalmente se evidenció la presencia en todas las flores de ácido clorogénico y β -caroteno; además, las flores de capuchina, colorines, noche buena, pata de vaca, flor de mayo, alache y flor de manita fueron las que presentaron una o más antocianinas en sus extractos acuosos.

Para la planta de *Anoda cristata*, se encontró que en las hojas se encuentra el contenido más alto de fenoles totales, dentro de los cuales el 90% corresponde a flavonoides como es el caso de la flor de alache, y los tallos. En las hojas verdes, el contenido de fenoles es debido principalmente a ácidos fenólicos; y de forma cualitativa se observó coincidencia con las bandas de ácido clorogénico y ácido cafeico en placa.

Los carotenos en esta planta se encuentran entre los 10 y 83 μg de β caroteno/g mtra. seca, siendo los tallos y frutos quienes presentaron los valores más elevados; de igual forma en capa fina se confirmó la presencia de β -caroteno y la xantofila luteína; así como compuestos triterpénicos como β -sitoesterol y α -amirina.

Con respecto a las antocianinas se encontró en los ensayos de cromatografía en capa fina que todas las partes de la planta poseen dichos compuestos, de estos, son las hojas rojas las que presentan el contenido más alto siendo 10% más que en las mismas flores y 90% más que en las otras partes de la planta. Estas se identificaron y caracterizaron de las flores y hojas rojas del alache, donde las mayoritarias fueron delfinidina-3-rutinósido y cianidina-3-rutinósido respectivamente.

Además, las antocianinas de las flores de alache resistieron el proceso de pasteurización lenta (60°C por 30 min) en un extracto acuoso acidificado con ácido láctico y durante el desarrollo de un alimento de confitería (caramelo duro) alcanzando 134°C en el punto de adición del color; por lo que dichos compuestos mostraron tener resistencia al tratamiento térmico debido a un posible mecanismo de copigmentación intermolecular con sus flavonoides y/o compuestos presentes en el extracto acuoso, ya que no hubo necesidad de emplear una fuente externa para copigmentar la molécula siendo que los ensayos con ácido rosmarínico mostraron perjudicar el color característico del extracto.

Finalmente, se confirmó que la planta de alache es una fuente rica de compuestos bioactivos, de tal manera que, se podría aprovechar este residuo o maleza del campo, ya sea para uso y/o aplicación biotecnológica o farmacológica de algunos de sus compuestos, así como alimento general empleando sus flores y quelites en platillos típicos mexicanos y explotando su consumo tradicional como una flor endémica de México.

10. Bibliografía

Aguilar, J (2003). “Evaluación de un proceso cromatográfico para la obtención de extractos fenólicos de tomillo (*Thymus vulgaris*) libres de sustratos de polifenoloxidasas”. Tesis de grado. Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey.

Ahmed, A., Moodley, N., Eloff, J. (2019). Bioactive compounds from the leaf extract of *Bauhinia galpinii* (Fabaceae) used as antidiarrhoeal therapy in southern Africa. *South African Journal of Botany*.

Akhtar, N., Saleem, M., Riaz, N., Ali, M. S., Yaqoob, A., Nasim, F.-H., Jabbar, A. (2013). Isolation and characterization of the chemical constituents from *Plumeria rubra*. *Phytochemistry Letters*, 6(2), 291–298.

Alamilla, L., Solano, L., Jiménez, C. (2016). Col morada (*Brassica oleracea* var. capitata f. rubra) como indicador de pH. *Innovación tecnológica para la seguridad alimentaria*. 406 - 409.

Arita, T., Miyazaki, S., Teramoto, S., & Yoshitama, K. (2014). Major anthocyanin biosynthesis in the brilliant crimson petals from *Erythrina crista-galli* L. *Scientia Horticulturae*, 168, 272–280.

Armenta, R. (2012). Moléculas con actividad biológica: obtención de lupeol de resinas, plantas comestibles y medicinales. Tesis de grado. Universidad Nacional Autónoma de México.

Ávalos, E., Pérez, U. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

Ballesteros, L., Díaz, A. (2017). La antocianina como sustituto de los indicadores de pH sintéticos: un paso hacia los productos verdes. Tesis de grado, Universidad de la Costa CUC.

Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: A comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1466–1472.

Bazytko, A., Parzonko, A., Jeż, W., Osińska, E., & Kiss, A. K. (2014). Inhibition of ROS production, photoprotection, and total phenolic, flavonoids and ascorbic acid content of fresh herb juice and extracts from the leaves and flowers of *Tropaeolum majus*. *Industrial Crops and Products*, 55, 19–24.

Belmonte, J., Arroyo, I., Vázquez, M., Cruz, D., Cabrera, E. (2016). Colorantes artificiales en alimentos. *Revista Naturaleza y tecnología*. 10 (1), 24-38.

- Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S., Olmedilla A. (2012). Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A: utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutrición Hospitalaria*, 27(4), 1334-1343.
- Bernardino, A., Montañez, J., Vivar, M., Mayolo J., Acosta, G., González, L. (2016) Efecto of drying on the antioxidant capacity and concentration of phenolic compounds in different parts of the *Erythrina americana* tree. *BioResources*. 11(4) 9741-9751.
- Boonphong, S., Puangsombat, P., Baramée, A., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Kittakoop, P. (2007). Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory, and cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*, 70(5), 795–801.
- Boscariol, G., Hilckner, M., De Alencar, S., De Castro, R. (2019). Biologically active compounds from white and black mustard grains: An optimization study for recovery and identification of phenolic antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 135, 294–300.
- Bracho, J., Rodríguez, C., Llanes, F. (2009). Triterpenos pentacíclicos en propóleo. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(4), 439-452.
- Brindis, F. (2011). Evaluación de la eficacia antihiperlipémica de *Ligusticum porteri* Coult., *Hydrangea seemannii* y *Anoda cristata* (L) Schlttdl. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Byamukama, R., Namukobe, J., Jordheim, M., Andersen, Ø. M., & Kiremire, B. T. (2011). Anthocyanins from ornamental flowers of red frangipani, *Plumeria rubra*. *Scientia Horticulturae*, 129(4), 840–843.
- Cartaya, O., Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Revista Cultivos Tropicales*. 22 (2) 5-14.
- Castaños, 2018. Consumen quiote como medicina. Zócalo [en línea] (Actualizado al 2018) Disponible en: http://zocalo.com.mx/new_site/articulo/consumen-quiote-como-medicina
- Castaños, E. (2015). Los terpenos. *Ciencia on the crest*. [en línea]. (Actualizado al 03/07/2015). Disponible en: <https://cienciaonthecrest.com/2015/07/03/los-terpenos/> [Consultado el 24/01/20].
- Castro, M. (2012). Comparación de los compuestos terpénicos del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) extraídos de las hojas frescas y secas. Tesis de grado. Universidad Nacional del centro de Perú. Huancayo.

Cevallos-Casals, B., Cisneros-Zeballos, L. (2004). Stability of Anthocyanin based Aqueous Extract of Andean Purple Corn and Red Fleshed Sweet Potato Compared to Synthetic and Natural Colorants. *Food Chem.* 86: 69-77.

Chanfón Küng. (2007). Flor de manita: una “manita” para el corazón y los nervios. CONABIO Biodiversitas. [en línea] Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv74art3.pdf>

Cuttillo, F., Dabrosca, B., Dellagrecia, M., Fiorentino, A., Zarrelli, A. (2006). Terpenoids and phenol derivatives from *Malva silvestris*. *Phytochemistry*, 67(5), 481–485.

De La Parra, C., Serna, S., Liu, R. (2007). Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4177–4183.

De Medeiros, J., Macedo, M., Contancia, J., Nguyen, C., Cunningham, G., Miles, D. (2000). Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), 157–165.

Dias, M., Olmedilla, A., Mercadante, A., Osorio, C., Vargas, L., Meléndez, A- (2017). Tabla de contenido en carotenoides de alimentos iberoamericanos.

Dubois, M.G., Rezzonico, B., (2007). Pentacyclic triterpenes from *Plumeria inodora*. *Chem. Nat. Compd.* 43, 351–352

Durst, R., Wrolstad, R. (2001). Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. In: *Handbook of Food Analytical Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons. p. 33-45.

Escamilla, C., Cuevas, E., Guevara, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México*, 52 (2), 73-75.

Fahmy, N., Al-Sayed, E., El-Shazly, M., Singab, A. (2018). Comprehensive review on flavonoids biological activities of *Erythrina* plant species. *Industrial Crops and Products*, 123, 500–538.

Farag, M., Mekky, H., El-Masry, S. (2016). Metabolomics driven analysis of *Erythrina lysistemon* cell suspension culture in response to methyl jasmonate elicitation. *Journal of Advanced Research*, 7(5), 681–689.

Fernández, I. (2014). *Bioquímica del aceite de olivo: triterpenos pentacíclicos* (Tesis de grado). Universidad de Jaén.

Fernández, Leticia. (2013). “Respuesta de la nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima*) CV. Valenciana al efecto de diferentes nutrimentos bajo condiciones de hidroponía en invernadero. (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma de Chapingo.

- Ferney, J., O'Leary, N., Moran, R., O'Halloran, A., Nolan, J., Beatty, S., Young, I., Kenny, R. (2017). Plasma lutein and zeaxanthin are associated with better cognitive function across multiple domains in a large population-based sample of older adults: findings from the Irish Longitudinal Study on Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 72(10), 1431-1436.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Vinholes, J., Silva, S., Valentão, P., Andrade, P. (2012). *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. *Food Chemistry*, 134(2), 894–904.
- Frede, K., Schreiner, M., Baldermann, S. (2019). Light quality-induced changes of carotenoid composition in pak choi *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 193, 18-30.
- Gabr, S., Bakr, R., Mostafa, E., El-Fishawy, A., El-Alfy, T. (2019). Antioxidant activity and molecular docking study of *Erythrina × neillii* polyphenolics. *South African Journal of Botany*, 121, 470–477
- García, E., Fernández, S. (2007) Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Universidad Politécnica de Valencia.
- Garzón, A., Manns, D., Riedl, K., Schwartz, S., Padilla-Zakour, O. (2015) Identification of phenolic compounds in petals of nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*) by High-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry and determination of oxygen radical absorbance capacity (ORAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 63, 1803-1811.
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta biol Colomb.* 13. 27-36.
- Ghosh, M., Kumar, A., Barman, R., Imam, M., Ibne W., Mir, I. (2018). Current status of phytochemical and phytopharmacological study of some medicinal plants used by the tribes in Bangladesh: A review. 1089-1095.
- Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos, un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM.* 26 (6), 80-84.
- Gómez, R., Martínez, G. (2012) Fuentes y beneficios de los antioxidantes fenólicos. *Ciencia cierta*, 31 (8) 13-19.
- Gong, W., Xu, S., Liu, Y., Wang, C., Martin, K., Meng, L. (2019). Chemical composition of floral scents from three *Plumeria rubra* L. (Apocynaceae) forms linked to petal color properties. *Biochemical Systematics and Ecology*, 85, 54–59.
- González-Aguilar, G. (2007). Improving Antioxidant Capacity of Fresh-Cut Treated with UV-C. *Journal of Food Science*, 72(3), S197-S202.

- Gordon E., and M. Barret. (2001). Colorimetric method for the determination of lipoxygenase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (1): 32-37.
- Gu, Z., Chen, H., Yang, R., Ran, M. (2018). Identification of DFR as a promoter of anthocyanin accumulation in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*, willd. ex Klotzsch) bracts under short-day conditions. *Scientia Horticulturae*, 236, 158–165.
- Haselmair-Gosch, C., Miosic, S., Nitarska, D., Roth, B. L., Walliser, B., Paltram, R., Halbwirth, H. (2018). Great cause—small effect: undeclared genetically engineered orange petunias harbor an inefficient dihydroflavonol 4-reductase. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Herrera, M., Rodriguez, R., Ruiz, V. (2006). Functional properties of pentacyclic triterpenes contained in “orujo” olive oil. *Curr. Nutr. Food Sci.* 2, 45-50.
- Husband, T. (2014). La ciencia dulce de hacer caramelos. *Chem Matters*. American Chemical Society. [en línea], (Última actualización: noviembre de 2014). Disponible en: <https://www.acs.org/content/dam/acsorg/education/resources/highschool/chemmatters/spanish-translations/chemmatters-oct2014-candymaking-spanish-trans.pdf>
- Hynstova, V., Sterbova, D., Klejdus, B., Hedbavny, J., Huska, D., Adam, V. (2018). Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 108–118.
- Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A. (2015). *Litchi chinensis*: medicinal uses, phytochemistry, and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 492–513.
- Itokawa, H., Oshida, Y., Ikuta, A., Inatomi, H., Ikegami, S. (1981). Flavonol glycosides from the flowers of *Cucurbita pepo*. *Phytochemistry*, 20(10), 2421–2422.
- Jimenez, M., Castillo, I., Azuara, E., Beristain, C.I. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina subsp capuli*) extracts. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(1), 29-37.
- Juárez-Reyes, K., Brindis, F., Medina-Campos, O., Pedraza-Chaverri, J., Bye, R., Linares, E., Mata, R. (2015). Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 161, 36–45.
- Juárez, K. (2016). Estudio de la especie *Anoda cristata* (L.) Schltdl. (malvaceae) como fuente potencial de agentes útiles para el tratamiento de la diabetes mellitus y sus complicaciones. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Koike, A., Barreira, J., Barros, L., Santos-Buelga, C., Villavicencio, A., Ferreira, I. (2015). Irradiation as a novel approach to improve quality of *Tropaeolum majus* L. flowers: Benefits in phenolic profiles and antioxidant activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 30, 138–144.
- Kozikowski, A., Tückmantel, W., Böttcher, G., Romanczyk, L. (2003). Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. *The Journal of Organic Chemistry*, 68(5), 1641-1658.
- Kopjar M., Jakšić, V. (2012). Influence of sugars and chlorogenic acid addition on anthocyanin content, antioxidant activity and color of blackberry juice during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*. 36: 545–552.
- Krimer-Malešević, V. (2020). Pumpkin Seeds. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, 533–542.
- Lara, E., Osorio, P., Jiménez, A., Bautista, S. (2013). Contenido nutricional, propiedades funcionales y conservación de flores comestibles. Revisión. *Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. 63 (3), 197-208.
- Li, A., Li, S., Li, H., Xu, D., Xu, X., Chen, F. (2014). Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wildflowers. *Journal of Functional Foods*, 6, 319–330.
- Linares, E., R. Bye, N. Ortega, A.E. Arce. 2017. *Quelites: sabores y saberes del sureste del Estado de México*. México, CDMX: Universidad Nacional Autónoma de México. 90 p.
- Lindeboom, N., Wanasundara, P. K. J. P. D. (2007). Interference of phenolic compounds in *Brassica napus*, *Brassica rapa* and *Sinapis alba* seed extracts with the Lowry protein assay. *Food Chemistry*, 104(1), 30–38.
- Lira S. (2009). Proyecto Recopilación y análisis de la información existente de las especies de los géneros Cucurbita y Sechium que crecen y/o se cultivan en México.
- López, N., Miguel, M., Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 32(3): 81-91
- Marcano, D. (2018). *Introducción a la Química de los colorantes*. Colección Divulgación Científica y Tecnológica. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales, Caracas, Venezuela. 254 p.
- Martínez, T., Jaramillo, F., Alamilla, L. (2008). Relación de la actividad de lipasa y lipoxigenasa con el contenido de carotenoides de la flor de calabaza. *Memorias del VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, 21-26 junio 2009.

- Martínez, O. (2019). “Guía de consulta de flores mexicanas comestibles (tesis de grado). Universidad Autónoma del Estado de México.
- Martínez, S., González, J., Culebras, J., Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17 (6) 271-278.
- Martínez-Valdivieso, D., Gómez, P., Font, R., Alonso-Moraga, Á., Del Río-Celestino, M. (2015). Physical and chemical characterization in fruit from 22 summer squash (*Cucurbita pepo* L.) cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1225–1233.
- Martín-Peñasco, J. (2019). El porqué del color de las flores. BGT. [en línea] (Actualizado al 8/02/2019) Disponible en: <https://blogthinkbig.com/porque-color-flores>
- Mejía, B. López, A., Guerrero, B. (2011). Mostaza: características químicas, botánicas y sus aplicaciones en el área de alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 5(1), 32-40.
- Meléndez-Martínez, I., Heredia, J. (2007) Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57 (2).
- Moldován, S. (2016). Investigación del proceso de tintura sobre tejidos de algodón con colorantes naturales extraídos de micro y macroalgas: *Arthrospira platensis*, *Synechococcus* sp., *Ulva* sp. Trabajo de investigación. Universidad Politécnica de Valencia.
- Morais, S., Calixto-Júnior, J., Ribeiro, L., Sousa, H., Silva, A., Figueiredo, F., Coutinho, H. (2017). Phenolic composition and antioxidant, anticholinesterase and antibiotic-modulating antifungal activities of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) ethanol extract. *South African Journal of Botany*, 110, 251–257.
- Mulík, S., Ozuna, C. (2020). Mexican edible flowers: cultural background, traditional culinary uses, and potential health benefits. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 100235.
- Nacz, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and Analysis of Phenolics in Food. *Journal of Chromatography*, 1054, 95-111.
- Navarro, I., González, R., García, V., Bautista, A., Periago, M. (2015) Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterization of Phenolic Compounds by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. *Int. J. Mol. Sci.* 16. 805-822.
- Nilton, J. (2019). Colorantes naturales, técnicas ancestrales aplicadas al presente. Asociación Peruana de Técnicos Textiles. [en línea] Disponible en: <http://apttperu.com/colorantes-naturales-tecnicas-ancestrales-aplicadas-al-presente/>
- Niizu, P., Rodríguez-Amaya, D. (2006). Flowers and Leaves of *Tropaeolum majus* L. as Rich Sources of Lutein. *Journal of Food Science*, 70(9), S605–S609.

Oliveros-Bastidas, A., Macías, F., Fernández, C., Marín, D., Molinillo, José. (2009). Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. *Química Nova*, 32(1), 198-213.

Onyilagha, J., Bala, A., Hallett, R., Gruber, M., Soroka, J., Westcott, N. (2003). Leaf flavonoids of the cruciferous species, *Camelina sativa*, *Crambe* spp., *Thlaspi arvense* and several other genera of the family Brassicaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(11), 1309–1322.

Ormeño, E., Fernández, E. (2012). Los terpenos de las plantas. *Investigación y Ciencia*. [en línea] (Actualizado al 2012). Disponible en: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/neurociencia-de-la-identidad-549/los-terpenos-de-las-plantas-8599>

Palta, J.; Gregory, P. (1997). Drought affects the fluxes of carbon to roots and soil in ¹³C pulse labelled plants of wheat. *Soil Biol. Biochem.* 1997, 29, 1395-1403.

Parekh, J., Karathia, N., Chanda, S. (2006). Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegata* L. bark. *African Journal of Biomedical Research*, 9 (1), 53-56.

Peñarrieta, J., Tejada, L. (2014) Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos *Revista Boliviana de Química*, 31 (2), 68-81.

Petrova, I., Petkova, N., Ivanov, I. (2016). Five edible flowers – valuable source of antioxidants in human nutrition. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(4), 604–610.

Puente, C., García, S., Gutiérrez, J. (2017). Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. *Industrial Crops and Products*, 105, 225–230.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Cassassus, C., Pouysgu, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis. *Angewandte Chemie – International Edition*. 50 (3), 586-621.

Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.

Rein, M. (2005). Copigmentation Reactions and Color Stability of Berry Anthocyanins. [en línea] (Actualizado s/f) Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/47932357_Copigmentation_Reactions_and_Color_Stability_of_Berry_Anthocyanins

Rendón, B., Bye, R., Nuñez-Farfán, J. (2001). Ethnobotany of *Anoda cristata* (L.) Schl (malvaceae) in central Mexico: Uses, Management and population differentiation in the community of Santiago mamalhuazuca, Ozumba, state of Mexico. *Economic Botany*, 55(4): 545-554.

Reyes, F. (2007). Caracterización del efecto anticancerígeno del ácido maslínico, triterpeno pentacíclico de origen natural (Tesis doctoral). Universidad de Granada.

Rodriguez-Amaya, D., Kimura, M. (2004) HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. HarvestPlus Technical Monograph 2, International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Washington DC and Cali.

Ruiz, L. (2012). Mostaza en medicina natural para tratar reumas, resfriados, dolor de cabeza, sabañones, etc. *Plantas Medicinales: Fitoterapia, salud natural, herbolaria* [en línea] (Actualizado al 17/02/2020) Disponible en: <https://www.plantas-medicinales.es/mostaza-para-tratar-reumas-resfriados-dolor-de-cabeza-sabanones-etc/>

Sánchez, A., Flores, L. (1999) Carotenoides: estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones, *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, 41:175-191.

Sarmiento, T. (2012). Investigación de la aplicación de flores en la gastronomía y propuesta de autor para la cocina ecuatoriana. Tesis de grado. Universidad Internacional del Ecuador.

Saunier, A., Blande, J. D. (2019). The effect of elevated ozone on floral chemistry of *Brassicaceae* species. *Environmental Pollution*, 113257.

Servia, J., Verdalet, I. (2013). Physicochemical parameters and antioxidant compounds in edible squash (*Cucurbita pepo*) flower stored under controlled atmospheres. *Journal of Food Quality*, 36(5), 302–308.

Shipp J., Abdel-Aal S. (2010). Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*, 4: 7-22.

Sidana, J., Singh, B., Sharma, O. (2016). Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, 130, 22–46.

Sing de Ugaz, O. (1997). *Colorantes Naturales*. Lima: Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Slatnar, A., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., Stampar, F., Schmitzer, V. (2013). Anthocyanin and chlorophyll content during poinsettia bract development. *Scientia Horticulturae*, 150, 142–145.

Suárez, M. y Narváez, G. (2016). *Copigmentación intermolecular de antocianinas glicosiladas*. Madrid: Editorial Académica Española.

Suárez, Martha., Yazán, E., Narváez, G. (2018). Influence of stabilization by intermolecular copigmentation on the antioxidant capacity of anthocyanines of the fruit of *Vaccinium Floribundum* Kunth. *InfoANALITICA*. 6(1), 39-53.

Timberlake, C. (1980). Anthocyanins-Occurrence, Extraction and Chemistry. *Food Chem*; 5(1)69-80.

Torres, A. (2016). Caracterización y cuantificación de compuestos bioactivos de *Ipomoea batatas* (L.) lam variedad morada y en un snack de camote. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.

Trejo, L., Olson, M., Bye, R. (2015). Datos históricos y diversidad genética de las nochebuenas (*Euphorbia pulcherrima*) del Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(2), 478–485.

Tripathi, A., Gupta, P., Singh, S. (2019). Antidiabetic, anti-hyperlipidemic and antioxidant activities of *Bauhinia variegata* flower extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 101142.

Türker, M., Dalar, A. (2013). In vitro antioxidant and enzyme inhibitory properties and phenolic composition of *M. neglecta* Wallr. (Malvaceae) fruit: A traditional medicinal fruit from Eastern Anatolia. *Industrial Crops and Products*, 51, 376–380.

Valenzuela B., Alfonso, A. (2004). Fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Revista chilena de nutrición*, 31(1), 161-169.

Vela, E. (2019). *Arqueología Mexicana: La calabaza, el tomate y el frijol*, Catálogo. [en línea] Disponible en: <https://arqueologiamexicana.mx/mexico-antiguo/las-flores-de-la-calabaza>

Velázquez, C., Calzada, F., Esquivel, B., Barbosa, E., Calzada, S. (2009). Antisecretory activity from the flowers of *Chiranthodendron pentadactylon* and its flavonoids on intestinal fluid accumulation induced by *Vibrio cholerae* toxin in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(3), 455–458.

Velázquez, C., Correa-Basurto, J., García-Hernández, N., Barbosa, E., Tesoro-Cruz, E., Calzada, S., Calzada, F. (2012). Anti-diarrheal activity of (–)-Epicatechin from *Chiranthodendron pentadactylon* Larreat: Experimental and computational studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 716–719.

Vélez-Terranova, M., Campos, R., Sánchez-Guerrero, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(3),489-499.

Vibrans, H. (2003). Notas sobre neófitas 3. Distribución de algunas *Brassicaceae* de reciente introducción en el centro de México. *Acta Botánica Mexicana* 65: 31-44.

Wu, X., Prior, R. L. (2005). Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry in common foods in the united states: vegetables, nuts, and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3101–3113.

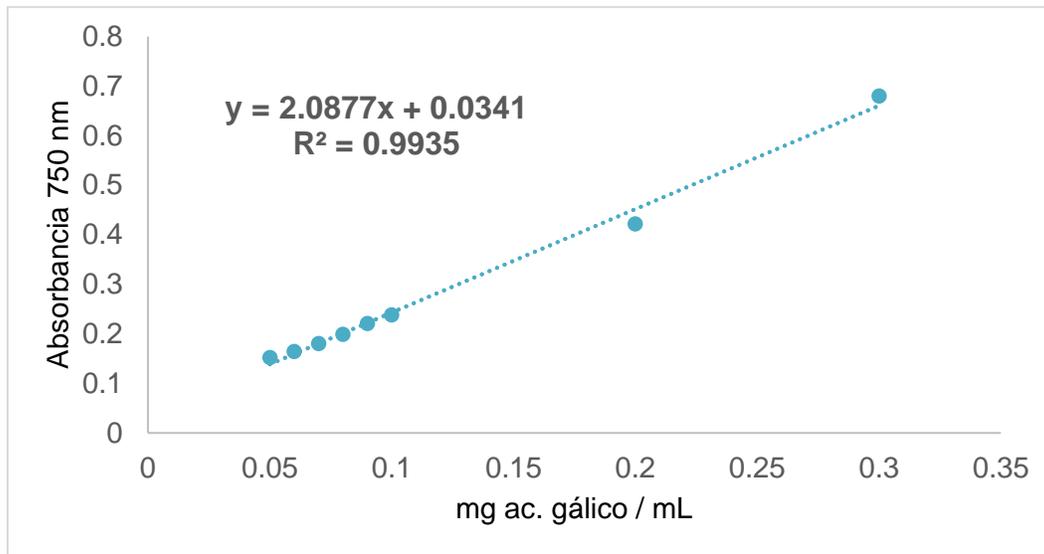
Yang, Z., Jia, L., Shen, Y., Ohmura, A., Kitanaka, S. (2011). Inhibitory effects of constituents from *Euphorbia lunulata* on differentiation of 3t3-11 cells and nitric oxide production in RAW264.7 cells. *Molecules*, 16(10), 8305–8318.

Yenesew, A., Akala, H., Twinomuhwezi, H., Chepkirui, C., Irungu, B., Eyase, F., Waters, N. (2012). The antiplasmodial and radical scavenging activities of flavonoids of *Erythrina burttii*. *Acta Tropica*, 123(2), 123–127.

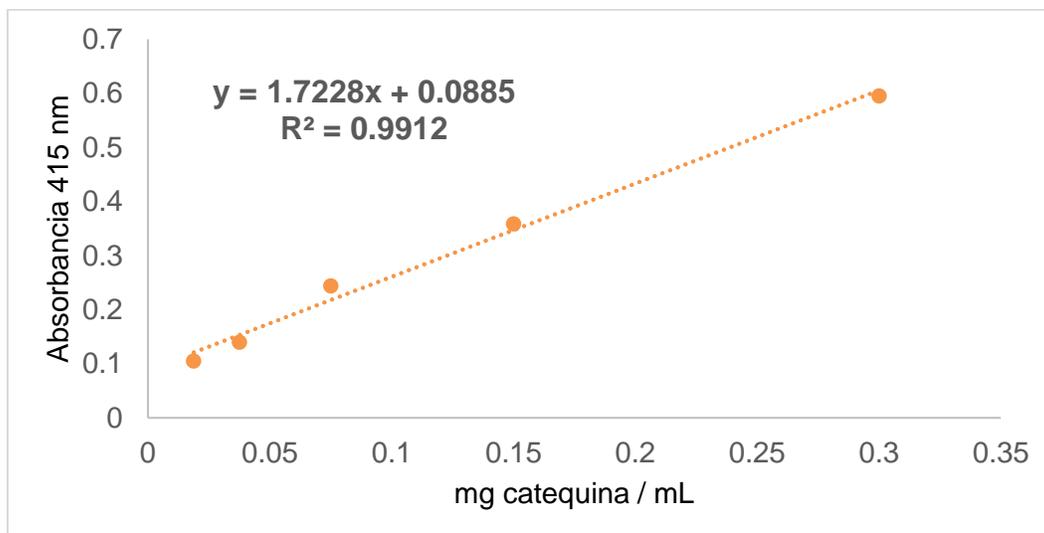
Zhishen J., Mengcheng T. y Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64: 555-559.

11. Anexo

Anexo I. Curva patrón de fenoles



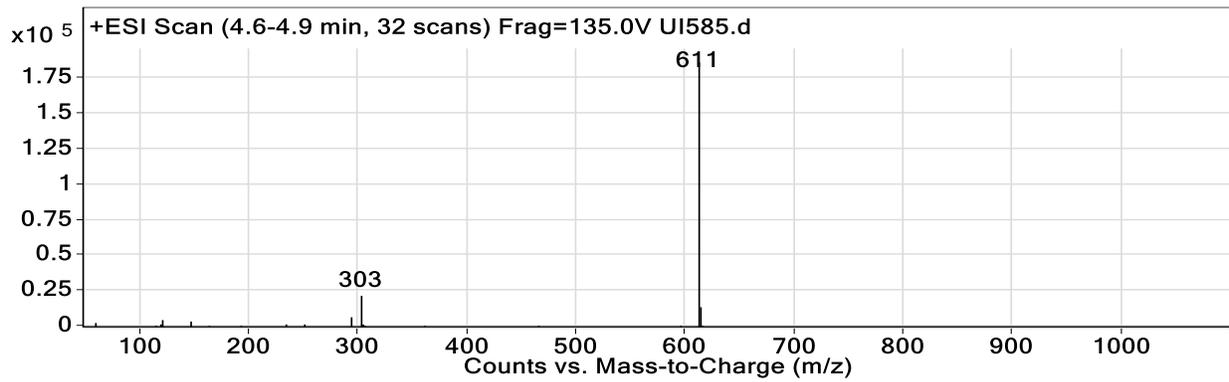
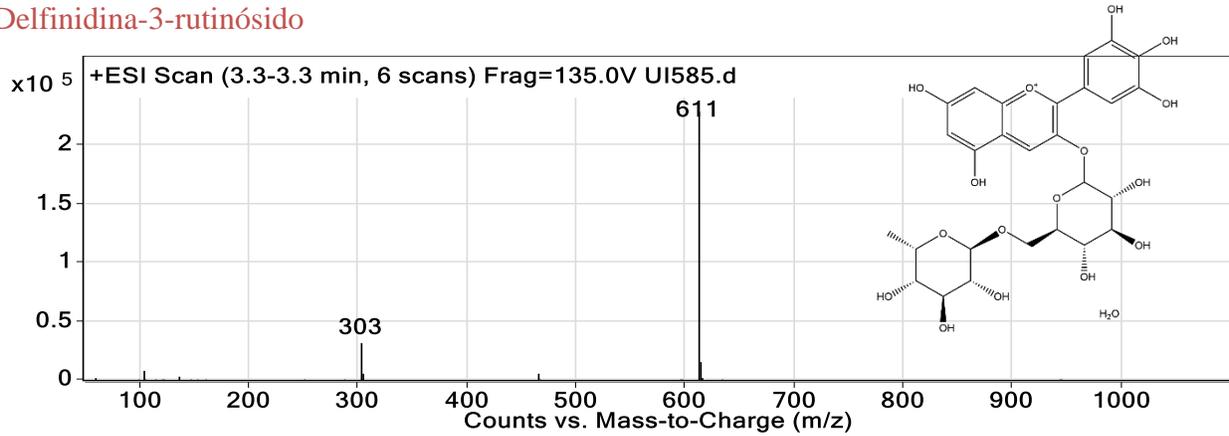
Anexo II. Curva patrón de flavonoides



Anexo III. Espectros de masas para antocianinas de flores y hojas de alache

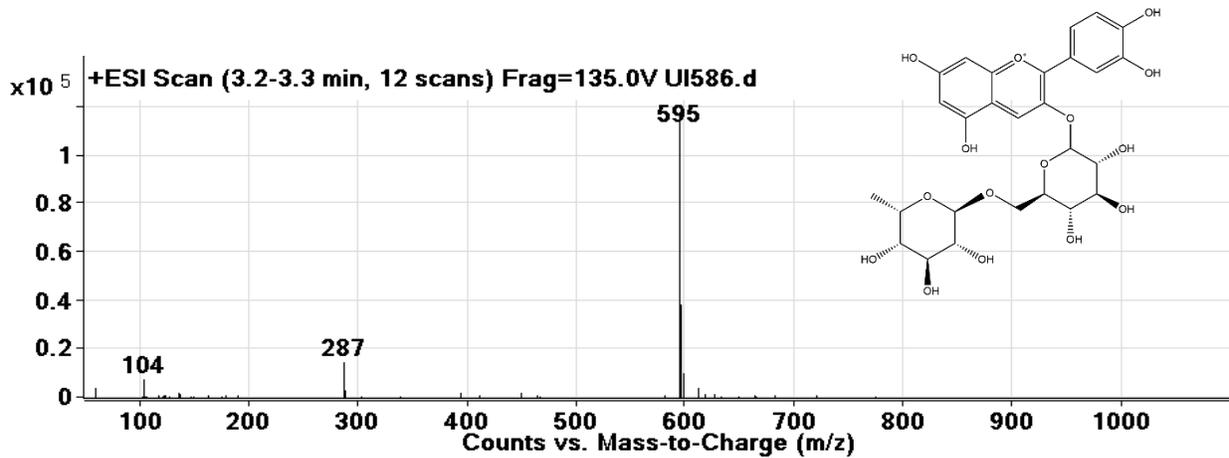
Flores de alache

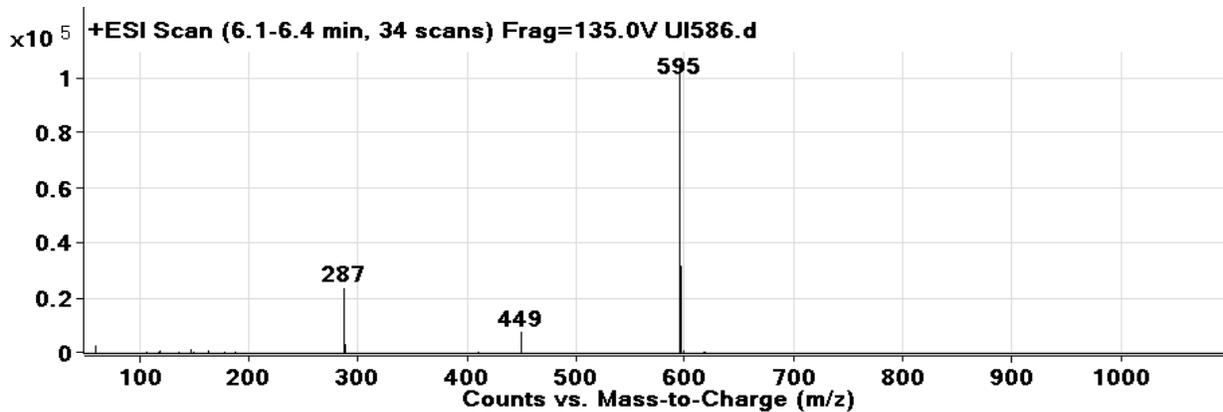
Delfinidina-3-rutinósido



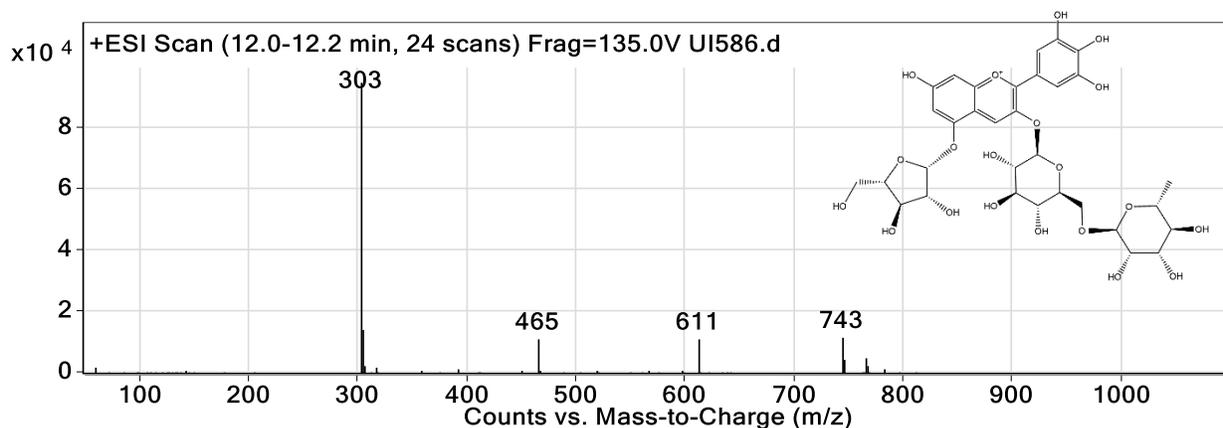
Hojas rojas de alache

cianidina-3-rutinósido

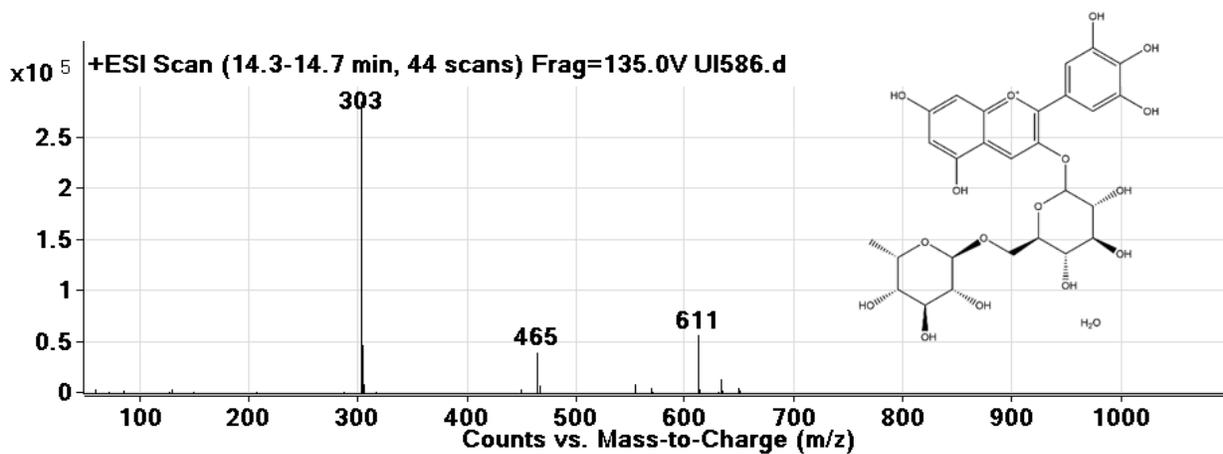




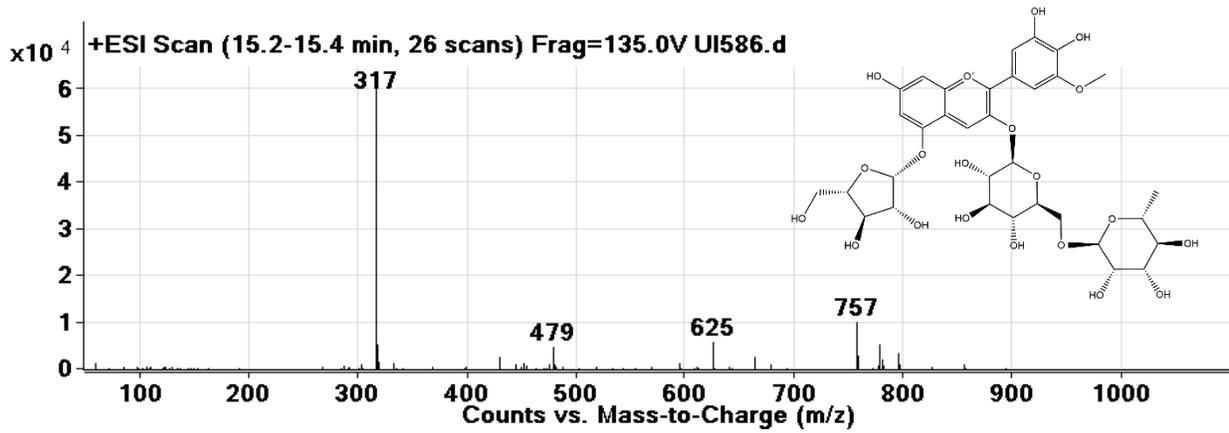
delphinidina 3-rutinósido-5-arabinósido



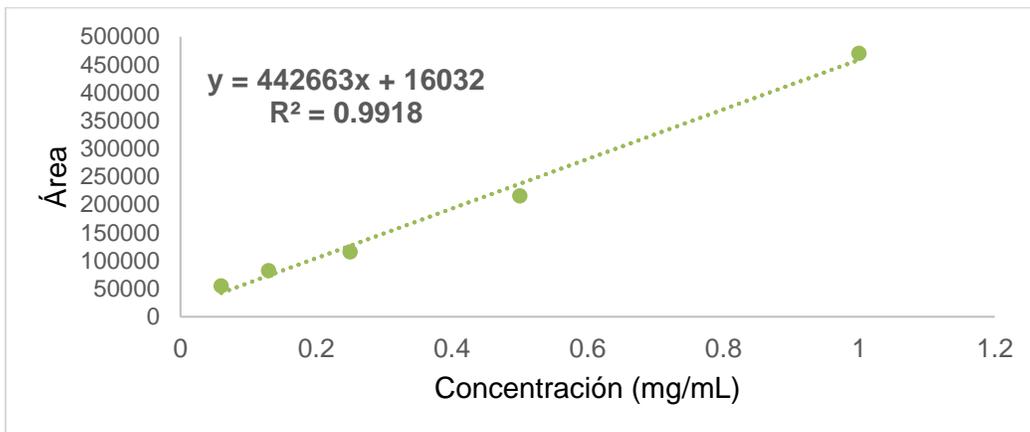
delphinidina 3-rutinósido



petunidina-3-rutinósido-5-arabinósido



Anexo IV. Curva patrón delfinidina-3-rutinósido



Anexo V. Curva patrón cianidina-3-rutinósido

