

Universidad Autónoma Metropolitana



Casa abierta al tiempo

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Biotecnología

Proyecto de Especialidad

Determinación del contenido de carotenos, antocianinas y compuestos fenólicos totales así como de la capacidad antioxidante de begonias comestibles (*Begonia x thuberhybrida*) roja, rosa y anaranjada.

Presenta

I.B.I. Elizabeth Barrón Álvarez

Directora: Dra. Elsa Bosquez Molina

Asesora: Dra. Deni Nava Arenas

Lectora: Dra. Silvia Bautista Baños.

Ciudad de México Marzo 2016

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biotecnología



Determinación del contenido de carotenos, antocianinas y compuestos fenólicos totales así como de la capacidad antioxidante de begonias comestibles (*Begonia x thuberhybrida*) rosa, roja y anaranjada.

Presenta

I.B.I Elizabeth Barrón Álvarez

Para obtener el grado de

Especialidad en Biotecnología

Directora: Dra. Elsa BosquezMolina

Handwritten signature of Dra. Elsa BosquezMolina in black ink on a white background.

Asesora: Dra. Deni Nava Arenas

Handwritten signature of Dra. Deni Nava Arenas in black ink on a white background.

Lectora: Dra. Silvia Bautista Baños

Handwritten signature of Dra. Silvia Bautista Baños in black ink on a white background.

“Cristaliza tus metas. Elabora un plan para alcanzarlas. Fíjate una fecha límite. Entonces, con suprema confianza, lleva adelante tu proyecto.”

~Paul J. Meyer~

~Agradecimientos~

A la gente del vivero Ecoflor que de no ser por su atención y su apoyo jamás me hubiera sido posible realizar este trabajo.

A la Dra. Elsa por la orientación y ayuda que me brindo para la realización de este proyecto, por confianza pero sobre todo por brindarme su apoyo y amistad que me permitieron aprender más que lo estudiado en el proyecto.

A mis Padres, por apoyar en todo momento mis locuras y decisiones, pero sobre todo mi carácter, porque sin ellos no sería lo que soy hasta ahora.

A la Dra. Deni por su apoyo, sus consejos, su paciencia, su amistad y su buen bullying, pero sobre todo gracias por enseñarme a formar un radical y muchas cosas más.

A mi hermana “Naye” que nunca titubeo para ayudarme y apoyarme en cada momento. Gracias por tu tiempo, tus consejos, y tu apoyo incondicional.

Ara gracias por ayudarme, escucharme, en muchas ocasiones guiarme, por aquellas comidas, salidas y conversaciones y sobre todo por estar al pendiente de que no incendiara el laboratorio.

A Sac por cada momento de su apoyo, su amistad y por cambiar mi vida con su singular personalidad.

A mis compañeros de laboratorio: Juan Pablo gracias por tus consejos y permitirme invadir tu espacio de vez en cuando sin que me acusaras, a Caro y Lupita por los momentos agradables, tanta risa y por enseñarme que sin Bullying no hay amistad, gracias.

Al pequeño compañero Davidcito, por tu insistencia en este trabajo, las buenas pláticas en el laboratorio, los momentos de estudio, de series, de películas y por dejarme ser un “Gigante Amistoso” y compartir tus poke-alegrías.

A cada uno de ustedes GRACIAS!!!

No existe nada imposible, ni reto muy grande, nunca te rindas sigue adelante, ¡así que vamos, el imposible no existe!

Resumen

En México el consumo de flores en la alimentación data desde la época prehispánica, no obstante esta práctica ha ido disminuyendo debido a la poca información acerca de sus propiedades. Estudios recientes han demostrado la presencia de importantes moléculas bioactivas en las flores silvestres y ornamentales, principalmente compuestos con actividad antioxidante y propiedades anti-inflamatorias, las cuales están representadas mayoritariamente por polifenoles, siendo consideradas como alimentos funcionales. El objetivo del estudio consistió en comparar la cantidad de pigmentos y compuestos fenólicos de flores comestibles de begonias rosas, anaranjadas, y rojas (*Begonia x thuberhybrida*) así como su actividad antioxidante, elaborando una de matriz ortogonal de Taguchi tomando como parámetros: el solvente (agua, etanol, y metanol acidificadas con HCl), concentración del solvente, acción mecánica (homogeneización y sonicación) y tiempo de maceración (0, 60 y 120 min.).

La máxima concentración de pigmentos se encontró extrayendo con metanol acidificado 1.0 %, homogeneizando y con un tiempo de maceración de 60 min, obteniendo en las begonias rojas la mayor cantidad de pigmentos (518 mg de antocianinas expresadas como cianidina 3-glúcosido por cada 100g de muestra en base seca y 39 mg por g de fenoles totales expresada como equivalentes de ácido gálico) y un porcentaje de inhibición de 30% para radical ABTS y 75% para FRAP. El contenido de antocianinas, compuestos fenólicos totales y carotenos en las flores de begonia influye positivamente en la capacidad antioxidante que presentan, ya que a mayor concentración de estos, la capacidad será mucho mayor como se observa en la flor roja, siendo la begonia un potencial antioxidante natural debido al gran contenido de pigmentos que contiene.

Abstract

In Mexico the consumption of flowers in feeding data from pre-Hispanic times, however this practice has been declining due to the lack of information about their properties. Recent studies have shown the presence of important bioactive molecules in wild and ornamental flowers, mainly compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties, which are mainly represented by polyphenols, being considered as functional foods. Thus the aim of the study was to compare the amount of pigments and phenolic compounds on edible flowers of begonia (*Begonia x thuberhybrida*): pink, orange and red, and its antioxidant activity, developed a design of 9 experiments using Taguchi orthogonal matrix taking as parameters: solvent (water, ethanol, and methanol acidified with HCl), mechanical action (homogenization and sonication) and maceration time (0, 60 and 120 min). The maximum concentration of pigment was obtained by extracting with acidified methanol 1.0%, homogenizing and soaking time of 60 min, obtaining in red begonias the highest concentration of pigments (518 mg anthocyanins expressed as cyd-3glc per 100g sample on dry basis and 39 mg per g of total phenols expressed as Gallic acid equivalents) and a percentage inhibition of 30% to ABTS radical and 75% ABTS to FRAP. The content of anthocyanins and total phenolic compounds in flowers of begonia positively influences the antioxidant capacity which has, since the higher concentration of these, the capacity will be much higher as seen on the red flower, being the begonia flower a natural antioxidant potential due to the high content of pigments containing.

Índice General

1. Introducción	11
2. Generalidades.....	13
2.1 Begonias.....	13
2.2 Compuestos Fenólicos.....	14
2.2.1 Flavonoides	15
2.2.2 Estructura y clasificación.....	15
2.3 Antocianinas.....	17
2.3.1 Extracción	18
2.3.2 Cuantificación	19
2.4 Carotenos	19
2.4.1 Extracción de carotenos.....	21
2.5 Pigmentos.....	22
2.5.1 Los pigmentos como antioxidantes.....	23
2.6 Capacidad antioxidante	24
2.6.1 Técnicas para la determinación de capacidad antioxidante.....	25
3. Hipótesis	26
4. Objetivos	26
4.1 General.....	26
4.2 Particulares.....	26
5. Equipo.....	27
6. Reactivos.....	27
7. Material Biológico	28
8. Metodología	28
8.1 Diseño experimental.....	28
8.2 Preparación de la muestra.....	29
8.3 Preparación de extractos.....	30
8.4 Cuantificación de antocianinas.....	30
8.5 Cuantificación de fenoles totales.....	30
8.6 Determinación de la capacidad antioxidante	32
8.6.1 ABTS•+.....	32

8.6.1.1	FRAP.....	33
8.7	Extracción de Carotenos.....	34
9.	Resultados y discusión.....	36
9.1	Antocianinas.....	37
9.2	Fenoles totales.....	39
9.4	Capacidad antioxidante	43
9.4.1	ABTS●+.....	43
9.4.2	FRAP.....	45
9.4.3	Evaluación de capacidad antioxidante	47
9.5	Análisis de superficie de respuesta	49
10.	Conclusiones	50
11.	Referencias.....	51

Índice de cuadros

<i>Cuadro 1. Clasificación de flavonoides.....</i>	<i>16</i>
<i>Cuadro 2. Cianidinas más comunes encontradas en plantas</i>	<i>17</i>
<i>Cuadro 3. Antecedentes de extracción de antocianinas</i>	<i>19</i>
<i>Cuadro 4. Estructura y coloración de carotenos más comunes.....</i>	<i>20</i>
<i>Cuadro 5. Antecedentes de extracción de carotenos</i>	<i>22</i>
<i>Cuadro 6. Parámetros y niveles para determinar la óptima extracción.....</i>	<i>28</i>
<i>Cuadro 7. Diseño experimental obtenido por el método de Taguchi.....</i>	<i>29</i>
<i>Cuadro 8. Curva tipo para la determinación de fenoles</i>	<i>31</i>
<i>Cuadro 9. Curva tipo de β-caroteno</i>	<i>35</i>
<i>Cuadro 10. Resultados de la cuantificación de antocianinas totales extraídas</i>	<i>38</i>
<i>Cuadro 11. Análisis estadístico de P y de múltiples rangos de antocianinas</i>	<i>39</i>
<i>Cuadro 12. Resultados de la cuantificación de fenoles totales extraídos</i>	<i>40</i>
<i>Cuadro 13. Análisis estadístico de P y de múltiples rangos para fenoles totales</i>	<i>41</i>
<i>Cuadro 14. Resultados de la cuantificación de carotenos totales extraídos.....</i>	<i>41</i>
<i>Cuadro 15. Análisis estadístico de P y de múltiples rangos para carotenos.....</i>	<i>43</i>
<i>Cuadro 16 . Porcentaje de inhibición del radical ABTS en las tres flores</i>	<i>44</i>
<i>Cuadro 17. Análisis estadístico de P y de múltiples rangos de la capacidad antioxidante por el método de ABTS•+.....</i>	<i>45</i>
<i>Cuadro 18. Porcentaje de inhibición por el método del FRAP</i>	<i>46</i>
<i>Cuadro 19 Análisis estadístico de P y de múltiples rangos de la capacidad antioxidante por el método de FRAP.....</i>	<i>46</i>
<i>Cuadro 21. Condiciones de optimización del diseño de Taguchi.....</i>	<i>49</i>

Índice de figuras

<i>Figura 1. Diversas coloraciones de las flores de Begonia (Samenzucht, 2015)</i>	14
<i>Figura 2. Clasificación de los compuestos fenólicos</i>	15
<i>Figura 3. Estructura básica de flavonoides</i>	16
<i>Figura 6. Preparación de la muestra de flor de begonia</i>	29
<i>Figura 7. Curva tipo de ácido gálico</i>	31
<i>Figura 8. Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu</i>	32
<i>Figura 9. Estructura del ABTS</i>	32
<i>Figura 10. Cambio en la coloración del radical ABTS</i>	33
<i>Figura 11. Reacción de la prueba de FRAP</i>	34
<i>Figura 12. Curva tipo de β-Caroteno</i>	35
<i>Figura 13. Comparación de extracción utilizando metanol neutro y acidificado</i>	36
<i>Figura 14. Comparación de extracción utilizando etanol neutro y acidificado</i>	36
<i>Figura 15. Comparación de extracción utilizando agua neutra y acidificada</i>	37
<i>Figura 16. Comparación del contenido de antocianinas totales en las tres flores</i>	38
<i>Figura 17. Extractos de Begonia obtenidos</i>	39
<i>Figura 18. Comparación del contenido de fenoles totales en las tres flores</i>	40
<i>Figura 19. Comparación de extracción con Hexano: Acetona y Acetona</i>	42
<i>Figura 20. Comparación de carotenos en las tres flores</i>	42
<i>Figura 21. Resultados de la comparación de % inhibición de radical ABTS\bullet+ en las 3 flores</i>	44
<i>Figura 22. Cambio en la coloración del método de FRAP</i>	45
<i>Figura 23. Comparación del porcentaje de inhibición del FRAP en las 3 flores</i>	46
<i>Figura 24. Comportamiento de la concentración de antocianinas</i>	47
<i>Figura 25. Comportamiento de la concentración de antocianinas</i>	48
<i>Figura 26. . Comportamiento de la concentración de Fenoles totales</i>	48
<i>Figura 27. Comportamiento de la concentración de Fenoles totales</i>	49
<i>Figura 28. Análisis de superficie de respuesta del método de Taguchi</i>	49

1. Introducción

En las últimas décadas del siglo pasado, se generaron cambios importantes en el estilo de vida de gran parte de la población mundial, algunos de ellos, como la inserción de las mujeres al campo laboral, incidieron directamente en el tiempo que se dedica a la selección, adquisición y preparación de los alimentos. Durante este tiempo, la conveniencia y el hedonismo fueron los ejes rectores de la alimentación. Fue a finales del siglo XX cuando un sector de la población comenzó a concientizarse acerca de los efectos de la calidad de la alimentación en la salud humana, su relación con la proliferación de enfermedades crónico degenerativas e incluso, aspectos ecológicos como la generación de basura, culturales como la pérdida de tradiciones culinarias y sociales como el pago justo a los productores.

Ya en los primeros años del presente siglo, surgieron grandes grupos de consumidores dispuestos a cambiar su alimentación y estilo de vida, dirigiendo su atención hacia el consumo de alimentos “mas naturales”, producidos en sistemas orgánicos (aquellos en que no se han empleado fertilizantes, productos químicos, plaguicidas ni hormonas de crecimiento), amigables con los ecosistemas y “de comercio justo” (sistemas de comercialización en que se promueve que los productores tengan un ingreso digno y estable).

Una de las propuestas de estos grupos gira en torno a la diversificación de la alimentación y a incluir en ella elementos de su entorno próximo. Estos cambios incluyen la reinserción de alimentos que si bien eran consumidos en la antigüedad, se quedaron rezagados por diversas razones. Entre estos elementos se encuentran las flores.

Ya en las culturas precolombinas, las flores eran consideradas como símbolo ligado a todas las artes (Mendez, 2012) y eran consumidas tanto por sus propiedades medicinales como por su aporte culinario. Por ejemplo, había flores que se usaban en la bebida de cacao: *itzcuinyolloxúchitl*, y *eloxochicuáhuil* para incrementar el sabor. Otras eran usadas en platillos salados, los indígenas comían principalmente: la flor de calabaza (*ayoxóchitl*), la flor de yuca (*iczote*); la flor del maguey llamada gualungo, flor del nopal (*nopalxochitll*), la flor del tule, flor del frijol y la de colorín; el *cacaoxochitl* o flor del cacao y la orejuela o *ucinacaztli* eran usadas en la bebida llamada pozonqui o espuma de cacao. Finalmente se reportan dos orquídeas utilizadas en las bebidas: la flor de Jamaica cuyo uso se extendió con la colonización española y la vainilla o *tlixochil* (flor negra), llamada así por

el color que adquiere el fruto o vaina cuando se seca, pero es sólo su vaina la parte útil en bebidas, postres y repostería (Soto, 2003).

Hoy en día las flores comestibles son usadas por chefs para añadir color, fragancia, y sabor a alimentos y bebidas (Mlcek & Rop, 2011). Además, diversos estudios revelan la composición química de las flores silvestres y ornamentales, exponiendo la presencia de importantes moléculas bioactivas. Varias especies de flores que se utilizan para decoración son también una fuente substancial de antioxidantes, capaces de revertir los efectos negativos de los radicales libres. En las flores, los principales compuestos con actividad antioxidante y propiedades anti-inflamatorias están representados por polifenoles, carotenoides y vitamina C (Kelley y cols., 2001).

El mercado de flores comestibles empezó a tener éxito a finales de 1980, cuando los jefes de cocina de restaurantes de alto estándar comenzaron a incluir flores "libres de pesticidas" en la lista de compra, con la finalidad de ser utilizadas en ensaladas y/o como aderezo o guarnición en diferentes platos culinarios. No todas las flores son comestibles pues para que puedan serlo no deben contener productos tóxicos o contaminantes para la salud, como herbicidas, pesticidas y algunos fertilizantes (Coll i Llorens, 2004).

Se calcula que en el mundo existen más de 250 especies de flores que son comestibles. Aunque solamente un pequeño grupo está disponible en el mercado. La lista de flores comestibles es muy amplia, las más vendidas son los pensamientos (*Viola x wittrockiana*), aunque también encontramos: claveles (*Dianthus caryophyllus*), caléndulas (*Caléndula officinalis*), capuchinas (*Tropaeolum majus*), margaritas (*Anthemis cotula*), flores de borraja (*Borago officinalis*), geranios aromáticos (*Geranium phaeum*), rosas mini (*Miniatura centifolia*), violetas (*Calydorea xiphioides*), flor de lavanda (*Lavandula angustifolia*), primulas (*Primula veris*), guisantes de olor (*Lathyrus odoratus*), orquídeas (*Cattleya trianae*), conejitos (*Antirrhinum barrelieri*), fucsia (*Fuchsia magellanica*), entre otras (Coll i Llorens, 2004).

Algunos puntos a considerar al consumir flores es que no todas son comestibles, pues existen variedades que son tóxicas o nocivas para la salud humana, entre estas encontramos: adelfa (*Nerium oleander*), azafrán de otoño (*Crocus sativus*), azalea (*Rhododendron simsii*), dicentra (*Dicentra spectabilis*), hiedra inglesa (*Hedera hélix*), iris (*Iris tuberosa*), glicina (*Wisteria sinensis*), flor del tabaco (*Árnica montana L.*), lirio o azucena del valle (*Haworthia cuspidata*), acónito (*Aconitum napellus*), arveja dulce (*Pisum sativum L.*) entre otras.

Además de los ya mencionados pensamientos, existe otra planta dominante del mercado, las begonias (*Begonia x thuberhybrida*), estas forman parte de las flores de ornato más bonitas y variadas.

2. Generalidades

2.1 Begonias

Pertenecientes a la familia de las Begoniáceas, en el género *Begonia* se agrupan unas 2000 especies que crecen principalmente en regiones calurosas y húmedas. Algunas se valoran por sus flores, unas por su precioso follaje y otras por poseer ambas características. Son plantas decorativas y han sido objeto de muchas hibridaciones (Lluis, 2011), por lo tanto el género es difícil clasificar únicamente por sus características morfológicas. Los métodos modernos como la biología molecular han sido muy útiles para distinguir entre diferentes especies y la formación de nuevas clasificaciones. Oginuma y Peng en 2002, investigaron la morfología de 14 especies de begonias taiwanesas para dilucidar sus características y evolución cromosómica. Entre todas las especies investigadas no se encontraron diferencias genotípicas significativas (Oginuma & Peng, 2002).

Los resultados de las investigaciones con respecto a las begonias, sugieren la presencia de alteraciones en la metilación del ADN, influenciando el fenotipo de la planta, dando como resultado la aparición de especies variantes, entre ellas *Begonia x thuberhybrida* (Hvoslef-eide & Munster, 2007), una especie con rizomas subterráneos espesos y con gran acumulación de agua, los cuales se elevan arrastrándose luego sobre la superficie, formando unos troncos espesos. Las flores tienen coloración que va desde el blanco al rojo como se puede observar en la Figura 1 (Samenzucht, 2015) (Thompson, 2000).



Figura 1. Diversas coloraciones de las flores de Begonia (Samenzucht, 2015)

2.2 Compuestos Fenólicos

El término compuestos fenólicos engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unido a estructuras aromáticas o alifáticas.

Los polifenoles o compuestos fenólicos ayudan a prevenir el riesgo de enfermedades crónicas como cáncer, degeneración neuronal relacionada con la edad y enfermedades cardiovasculares. Las plantas contienen una gran variedad de compuestos fenólicos como fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, taninos y ligninas (Gimeno Creus, 2004).

Estos compuestos pueden clasificarse en 5 grupos como se muestra en la Figura 2, siendo el grupo más importante el de los flavonoides, incluyendo flavonas, isoflavonas y antocianidinas (González Jiménez, 2010).

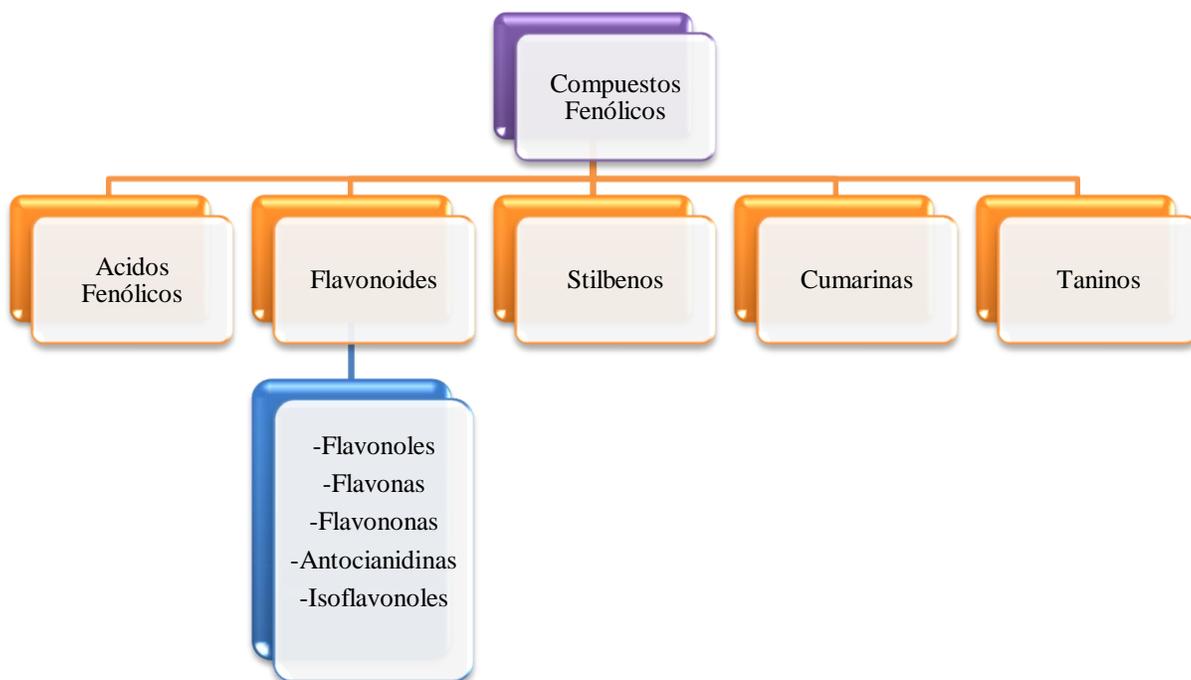


Figura 2. Clasificación de los compuestos fenólicos

2.2.1 Flavonoides

Son moléculas presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, hortalizas y son parte esencial no energética de la dieta humana (Culebras & Tuñón, 2002).

2.2.2 Estructura y clasificación

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo de pirano (C) (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Figura 3) (Gracia Nava, 2006).

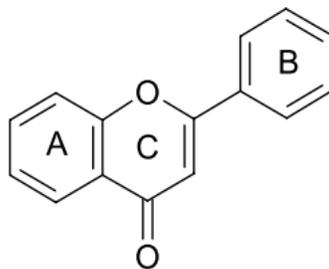


Figura 3. Estructura básica de flavonoides

Esta estructura básica permite patrones de sustitución y variaciones en el anillo C, en función de sus características estructurales, se pueden clasificar de acuerdo a como se muestra en el Cuadro 1 (Escamilla y cols., 2009).

Cuadro 1. Clasificación de flavonoides

Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
Flavanos	Con un grupo –OH en posición 3 del anillo C	Catequina	
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3	Diosmetina	
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C	Quercetina	
Antocianidinas	Tiene un grupo –OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C	Cianidina	

Las antocianinas y flavonoles son pigmentos importantes en una gran variedad de frutas y hortalizas. Mientras que la mayoría de los polifenoles no son pigmentos, son de igual importancia pues son responsables de los cambios de color, principalmente el oscurecimiento, que se desarrolla durante el almacenamiento y procesamiento de hortalizas (González Jiménez, 2010).

2.3 Antocianinas

Son un grupo de pigmentos de colores que van de rojo a azul o morado, hidrosolubles ampliamente distribuidos en el reino vegetal, están constituidas por una molécula de antocianidina, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico para formar la antocianina (Ortíz y cols., 2011). El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos (-OH) del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos (OCH₃) provoca la formación del color rojo (Li y cols., 2012).

Hasta ahora existen reportadas más de 500 antocianinas y 23 antocianidinas, de las cuales solo seis son las más comunes en las plantas y se presentan en el Cuadro 2, estas se encuentran distribuidas en la naturaleza: un 80% en hojas, 69% en frutas y 50% en flores, siendo la cianidina la que se encuentra con una frecuencia mayor (50%) (Castañeda-Ovando, y cols., 2009) (Garz, 2008).

Cuadro 2. Cianidinas más comunes encontradas en plantas

Cianidina	Color	λ Max (nm)
Pelargonidina	Naranja	449-530
Cianidina	Naranja-Rojo	506-535
Delfinidina	Azul-Rojo	508-544
Peonidina	Naranja-Rojo	506-535
Petunidina	Azul-Rojo	508-535
Malvidina	Azul-Rojo	510-535

Las antocianinas son sustancias relativamente inestables, teniendo un comportamiento aceptable en medio ácido. Se degradan, cambiando el color, por acción de pH, calor, oxígeno y luz (Pojer y cols., 2013).

Efecto del pH: Es uno de los factores más importantes ya que son más estables a un pH ácido que en un medio neutro o alcalino.

Las antocianinas pueden ser encontradas en diferente forma química dependiendo del pH de la solución (Garz, 2008). A pH 1, el catión flavilio (color rojo) es predominante y contribuye a los colores púrpura y rojo. A pH entre 2 y 4 color azul, mientras que en 5 y 6 el ión flavilio es susceptible a un ataque nucleofílico por parte del agua, produciéndose carbinol y chalcona, las dos formas son incoloras, por último a pH mayores a 7, las antocianinas son degradadas dependiendo de sus grupos sustituyentes (Castañeda-Ovando y cols., 2009).

Efecto de la temperatura: La estabilidad está directamente relacionada con la temperatura, sus conversiones estructurales son reacciones endotérmicas. Resisten bien los procesos térmicos a alta temperatura-corto tiempo. Por efecto del calor se degradan según una cinética de primer orden. En general, las características estructurales que conducen a una mayor estabilidad al pH son las mismas que conducen a una mayor estabilidad térmica. Por lo tanto, las antocianinas altamente hidroxiladas son menos estables térmicamente que las metiladas, glicosiladas o acetiladas (Li y cols., 2012).

Efecto de la luz: Se ha reconocido que la luz es un factor que acelera la degradación, se ha observado que la sustitución del hidroxilo en C-5 hace que estos compuestos sean más susceptibles a la fotodegradación. Sin embargo, la copigmentación puede retrasarla cuando ésta se presenta con flavonas polihidroxiladas, isoflavonas y auronas sulfonadas (Garz, 2008).

Las antocianinas están presentes en diferentes órganos de las plantas, tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces. La principal fuente de antocianinas son frutas rojas, especialmente bayas y uvas rojas, algunos cereales, como el maíz morado, entre las bebidas destaca el vino tinto (Wesche-Ebeling y cols., 1983).

2.3.1 Extracción

La extracción de antocianinas es comúnmente llevada a cabo con metanol o etanol conteniendo una pequeña cantidad de ácido (15%, HCl 1M) con el objetivo de obtener la forma del catión flavilio, el cual es estable en un medio altamente ácido, además el espectro de absorción de las antocianinas depende del pH (Ortíz y cols., 2011), es por eso que varios investigadores han llevado a cabo técnicas de extracción con diferentes solventes de manera satisfactoria, los cuales se resumen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Antecedentes de extracción de antocianinas

Autores	Trabajo
Willkinson y cols., 1977	Comenzó a extraer satisfactoriamente antocianinas usando metanol con pequeñas cantidades de HCl
Aguilera Ortiz y cols., 2005	Compararon dos métodos de extracción de antocianinas en <i>Ficus carica</i> variedad Misión, usando una solución acidificada de metanol: agua: ácido fórmico, y otra con acetona: agua: HCl, en donde la solución de metanol fue la más efectiva.
Martínez-Cruz y cols., 2011	Extrajeron antocianinas de <i>Rubus adenotrichus</i> Schltdl (zarzamora) usando metanol acidificado con HCl 0.01%.

2.3.2 Cuantificación

Las antocianinas presentan un espectro de absorción característico con bandas alrededor de 250, 370 y 500- 545 nm. Esta última banda de absorción varía con el pH del medio (Ortega & Guerra, 2006), por lo que es fácilmente cuantificarla por métodos analíticos de espectrofotometría como son:

- Espectrometría de masas
- Espectrofotometría UV-visible
- Cromatografía de alta resolución (HPLC)

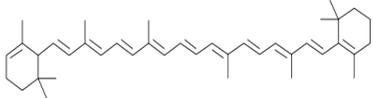
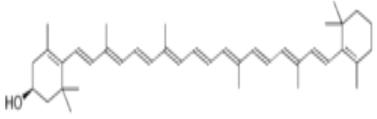
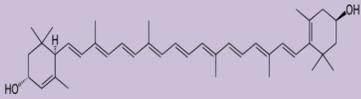
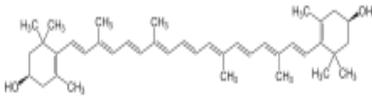
2.4 Carotenos

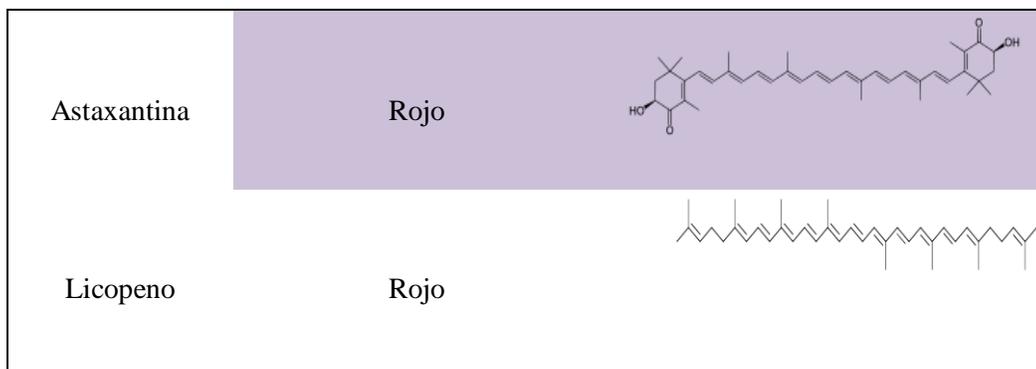
Son pigmentos que van desde el amarillo al rojo, se localizan en las células vegetales en el interior de orgánulos especializados, cloroplastos y cromoplastos; en los primeros acompañan a las clorofilas (Mínguez Mosquera y cols., 2005), estructuralmente hablando los carotenoides son los únicos tetraterpenos naturales, derivados de la unión de 8 unidades de isopreno que originan un esqueleto de 40 átomos de carbono. En general se clasifican en dos grandes grupos: carotenos (estrictamente hidrocarburos) y xantofilas, derivados de los anteriores por incorporación de funciones oxigenadas (Martínez, 2003).

La principal función biológica de carotenos es la de servir como pigmentos secundarios en la recolección de la luz durante el proceso fotosintético, y como sustancias fotoprotectoras, inhibiendo la propagación de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, por tanto impidiendo la acción nociva de éstos a nivel celular (Mínguez Mosquera y cols., 2005).

Se conocen alrededor de 600 carotenoides, de los cuales solo 7 se consideran importantes y se muestran en el Cuadro 4, sin embargo el caroteno más comúnmente encontrado es el β -caroteno, y normalmente constituye entre el 25-30% del contenido total de carotenoides en las plantas. La luteína es la xantofila más abundante (40-45%), pero siempre se encuentra en menor proporción que el β -caroteno (Namitha & Negi, 2010).

Cuadro 4. Estructura y coloración de carotenos más comunes

Nombre	Color	Estructura
α -Caroteno	Naranja- Amarillo	
β -Caroteno	Rojo-Anaranjado-Amarillo	
β -Criptoxantina	Rojo	
Luteína	Amarillo	
Zeaxantina	Amarillo	



Durante años, la importancia nutricional de los carotenos se debió sobre todo al hecho de que algunos poseen actividad provitamínica A, la cual sigue siendo objeto de estudio en la actualidad. No obstante, que el interés por estos compuestos isoprenoides se haya multiplicado no solo en Latinoamérica, sino a nivel mundial, se ha debido a estudios (Singh y cols., 2015) en los que se concluye que son compuestos antioxidantes y benéfico para la prevención de diversas enfermedades, como trastornos oculares, vasculares, etc. (Meléndez-Martínez y cols., 2007).

2.4.1 Extracción de carotenos

Dada su alta conjugación de enlaces dobles presentes en sus moléculas se descomponen por efecto de la luz, la temperatura y el aire, por estas razones la extracción se debe preferiblemente realizar en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor, y en ausencia de oxígeno. Además se debe hacer lo más rápido posible, y a partir de tejidos frescos, para evitar la degradación por la acción conjunta de estos factores adversos.

Debido a que en su mayoría son solubles en solventes no polares como éter etílico, benceno, cloroformo, acetona, acetato de etilo, entre otros; y a que se deben extraer de tejidos frescos, los cuales presentan un alto contenido de agua la cual dificulta una extracción eficiente, es conveniente eliminar dicha agua (Martinez, 2003). Es por ello que se han desarrollado diversas técnicas, buscando los mejores resultados (Cuadro 5).

Cuadro 5. Antecedentes de extracción de carotenos

Autor	Trabajo
Thaipong y cols., 2006	Extrajeron carotenoides de extractos de guayaba utilizando etanol/hexano, homogeneizando y filtrando varias veces hasta lograr concentrar la muestra.
Valdiviezo Macías, 2013	Extrajo Licopeno de sandía usando etanol a temperatura de ebullición dejando reposar por 24h, y separando la fase orgánica, filtrando hasta obtener cristales de licopeno.
Singh y cols., 2015	Extrajeron carotenos totales de mango con hexano/acetona para después analizarlos espectrofotométricamente

2.5 Pigmentos

Los pigmentos naturales han sido conocidos por el ser humano desde tiempos inmemorables y cumplen importantes funciones en la naturaleza como favorecer la fotosíntesis (clorofila), y absorción de energía (carotenos). Estos existen en cuatro formas químicas principalmente: clorofilas, carotenos, betalainas y antocianinas, las estructuras básicas de estos compuestos se muestran en la Figura 4, cada uno de ellos da un color particular: verde, anaranjado, amarillo y morado respectivamente. Son de particular interés los carotenoides y las antocianinas por sus propiedades antioxidantes ya que participan como secuestrantes de radicales libres. Estos pigmentos se localizan principalmente en las plantas y flores aunque también se pueden encontrar en hongos, los animales sin embargo los adquieren a través de su dieta pues no son capaces de sintetizarlos (Rey Castellanos, 2011).

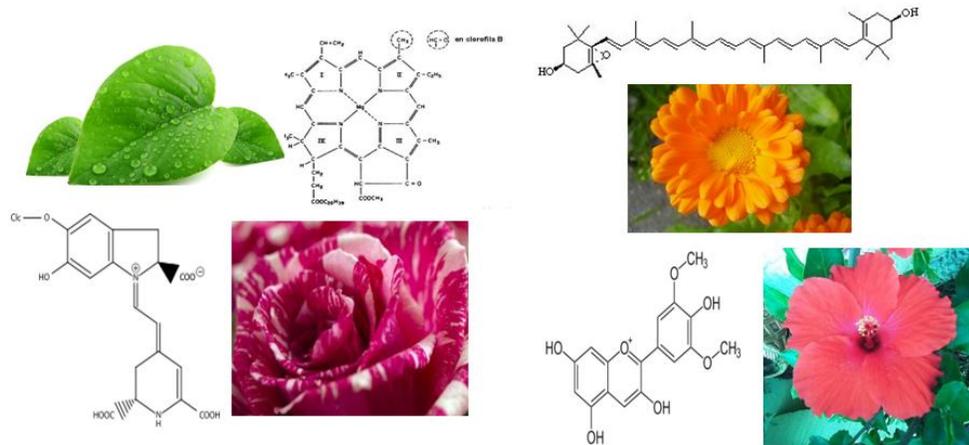


Figura 4. Estructuras de los principales pigmentos presentes en las flores.

En las flores los pigmentos cumplen diversas funciones como atraer insectos polinizadores. El color final de la flor depende de los pigmentos particulares sintetizados y las concentraciones de estos, así como de muchos otros factores celulares físicos y químicos tales como la temperatura y el pH. Por ejemplo, diferentes flores sintetizan diferentes carotenoides, y por lo tanto aparecen de color rojo, naranja o amarillo. Los colores en las flores se hacen más intensos o más oscuros, conforme aumenta la cantidad de pigmentos (Miller y cols., 2011).

La misma flor puede contener carotenoides y flavonoides, hay flavonoides como las antocianinas que presentan coloración rojo (pelargonidina), violeta (cianidina) o azul (delfinidina), y otros flavonoides que son de color blanco, marfil o amarillo claro. La concentración de estos pigmentos aumenta a medida que se desarrolla la flor y algunos de los pigmentos más ligeros se pueden convertir en los más oscuros durante el desarrollo, estos son los que confieren a las flores sus propiedades antioxidantes. (Miller y cols., 2011).

2.5.1 Los pigmentos como antioxidantes

Protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental, y sustancias químicas presentes en los alimentos, el organismo humano no puede producirlos, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Los pigmentos están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, hortalizas y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Culebras & Tuñón, 2002). Un ejemplo de estos compuestos son los polifenoles, ya que contienen en su estructura química

un número variable de grupos hidroxilo-fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías como cáncer, diabetes, entre otras. (Culebras & Tuñón, 2002) (Márquez & Bustamante, 2009).

2.6 Capacidad antioxidante

Los antioxidantes son moléculas que tienen la propiedad de evitar o prevenir la oxidación con otras moléculas. Se produce una oxidación, siempre que una especie cede electrones a otra, la especie que gana electrones se reduce, y la que pierde se oxida. En estas reacciones de oxidación, a veces, se pueden producir radicales libres (Almajano, 2009), que se definen como especies muy oxidativas que contienen uno o más electrones desapareados, lo cual produce daños al organismo (Figura 5), también se pueden formar especies reactivas de oxígeno (ERO) a partir de radicales (Pedraza-Chaverri, 2006).



Figura 5. Daños causados al organismo por las EROS

Por diversas causas puede perderse el balance entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes. Lo anterior puede deberse a un aumento en la producción de ERO, a una disminución en los sistemas antioxidantes y de reparación, o a una combinación de estos factores. A tal condición se le denomina estrés oxidativo (Venereo Gutiérrez, 2002), para combatirlo se utilizan sustancias antioxidantes.

Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones, comparado con el sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato (Pedraza-chaverri, 2006). Las sustancias antioxidantes pueden clasificarse en antioxidantes primarios, secundarios o terciarios en cuanto a la función que realizan para ejercer este tipo de actividad biológica.

Los antioxidantes primarios son los que previenen la formación de nuevas ERO, este efecto se logra con la conversión de estas en moléculas menos perjudiciales, antes de que éstas puedan reaccionar; o evitan su producción a partir de otras moléculas, destacan las enzima superóxido dismutasa (SOD), glutatión peróxidasa (GPx) y catalasa (CAT), así como las proteínas de unión a metales ferritina y ceruloplasmina. Los secundarios capturan los radicales libres y evitan las reacciones en cadena, ejemplos de ellos son: las vitaminas E y C, β -carotenos, ácido úrico, bilirrubina, albúmina y glutatión. Mientras que los terciarios son los encargados de la reparación de las biomoléculas dañadas, en este grupo se incluyen las enzimas reparadoras del ADN y la metionina sulfóxido reductasa (MsrA) (Atala y cols., 2013).

2.6.1 Técnicas para la determinación de capacidad antioxidante

En la actualidad, debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un método que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, por tanto, es bueno trabajar con varios métodos para facilitar la comparación e interpretación de los resultados. Las características “ideales” que debe reunir un método de determinación de capacidad antioxidante son: sencillez, mecanismo químico definido y punto final fijo, reproducibilidad, adaptabilidad a sustancias antioxidantes hidrofílicas y lipofílicas así como elevado rendimiento de análisis. Las medidas de la actividad anti radical se pueden realizar mediante dos estrategias distintas, en función de la información que se desea obtener:

Determinación directa: El radical se emplea como un factor de cuantificación (produce una señal analítica). La adición del antioxidante, antes o después de la generación del radical, provoca una disminución de la señal. En el ensayo de post-adición se forma el radical en ausencia de la muestra y así, cuando se añade la sustancia antioxidante se produce un descenso en la señal debido a la disminución de la concentración del radical. En ensayos de inhibición, la muestra se añade a los sustratos de oxidación antes que sea generado el radical, la reacción comienza con la adición del oxidante (Agudo, 2010), ejemplos de ello son:

- **ABTS \bullet +**: El radical ABTS \bullet + se genera a partir de su precursor el Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verdeazulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible (Durmaz, 2012).

- **DPPH:** Se basa en la reducción del radical DPPH (púrpura) a 1,1-difenil-2-picryl hidracina (amarillo) (Müller y cols., 2011).

Determinación indirecta: La presencia de radicales libres produce la pérdida o aparición de una especie química, y por tanto, en presencia de un antioxidante se provoca el aumento o disminución de la señal (Agudo, 2010).

- **ORAC:** El fundamento del método ORAC se basa en la habilidad que tienen los compuestos antioxidantes para bloquear radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno. En este método, el radical artificial AAPH (2,2'-Azobis-(2-aminopropano)-dihidrocloruro) oxida a la fluoresceína de forma que esta pierde su fluorescencia, las sustancias antioxidantes presentes en el extracto obtenido a partir del alimento disminuirían dicha pérdida de fluorescencia (Atala y cols., 2013).
- **FRAP:** Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} que es menos oxidante. El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado azul (Müller y cols., 2011).

3. Hipótesis

La actividad antioxidante de los extractos de flores de begonia (*Begonia x thuberhybrida*) comestibles está relacionada con el tipo y cantidad de pigmentos y compuestos fenólicos.

4. Objetivos

4.1 General

Establecer la relación entre la cantidad de pigmentos y compuestos fenólicos en flores comestibles de *Begonia x thuberhybrida* y su actividad antioxidante

4.2 Particulares

- Establecer el método de extracción adecuado y de cuantificación de antocianinas, carotenos y compuestos fenólicos totales en los extractos.

- Determinar la capacidad de secuestro de radicales libres de los extractos obtenidos por medio de las técnicas ABTS y FRAP.
- Establecer la relación, entre la cantidad y tipo de pigmentos extraídos y la capacidad antioxidante.

5. Equipo

- Homogeneizador Politrón OMNI International Modelo GCH-01
- Sonicador de Baño BRANSONIC CLEANER Modelo 150R-DTH
- Espectrofotómetro Genesys Modelo 10S UV/Vis
- Espectrofotómetro Jenway Modelo 6705 UV/Vis

6. Reactivos

- Etanol
- Nitrógeno líquido
- Metanol
- Reactivo de Folin-Ciocalteu 1:10
- Agua destilada
- Solución TPTZ 10 mM
- Solución de ácido clorhídrico 1N
- Solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM
- Solución persulfato potásico 2.45mM
- Solución Buffer de acetatos 0.3 mM pH 3,6
- Solución de ácido gálico
- Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS)
- β -caroteno
- Hexano
- Acetona

7. Material Biológico

La recolección de flores se realizó en el vivero Ecoflor, de la comunidad de San Gregorio Atlapulco, Del. Xochimilco, Ciudad de México. Se seleccionaron flores abiertas de la variedad *Solenia* con coloraciones roja, rosa y anaranjada.

8. Metodología

8.1 Diseño experimental

Para determinar la extracción óptima se elaboró un diseño experimental de matriz ortogonal por el método de Taguchi para el que se contemplaron cuatro factores con tres niveles, que se muestran en el Cuadro 6, para ello se utilizó en programa Design Expert 7.

Cuadro 6. Parámetros y niveles para determinar la óptima extracción

Factores	Niveles
Solvente	Metanol, Agua, Etanol,
% solvente (en agua)	0, 50 y 100 %
Acción mecánica	Homogeneizado (H), Sonicado (S), Homogeneizado-Sonicado (H-S).
Tiempo de maceración (min).	0, 60, 120 (min)

Cuadro 7. Diseño experimental obtenido por el método de Taguchi

	Solución extractora	% solvente (en agua)	Acción Mecánica	Tiempo (min)
1	Etanol	0	H-S	60
2	Metanol	100	H	60
3	Etanol	50	H	120
4	Agua	100	H	60
5	Metanol	0	H-S	0
6	Etanol	100	S	0
7	Agua	50	H-S	0
8	Metanol	50	S	120
9	Agua	0	S	120

El diseño se compone de un total de nueve experimentos, mostrados en el Cuadro 7 en los cuales se cuantificaron antocianinas y compuestos fenólicos totales para cada una de las muestras de begonia, también se determinó la capacidad antioxidante de los extractos utilizando los métodos del radical ABTS•+ y Ferric ion Reducing Antioxidant Power (FRAP).

8.2 Preparación de la muestra

Las muestras biológicas frescas se congelaron y trituraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, de cada una se realizó una mezcla homogénea de los pétalos de 5 flores, distribuyéndola en diferentes tubos a una temperatura de -80°C para su posterior análisis.

**Figura 4. Preparación de la muestra de flor de begonia**

8.3 Preparación de extractos

Los extractos de begonia fueron obtenidos a partir de 0.5 g de polvo homogéneo de flores, empleando soluciones extractoras como metanol, etanol y agua, además también se realizó la extracción con soluciones acidificadas con ácido clorhídrico 1N en proporción 85:15, sometiénolas a la acción mecánica y tiempo correspondiente de acuerdo al diseño experimental, las mezclas de extracción (solvente-muestra) se centrifugaron a 3500xg durante 30 minutos, se decantó el sobrenadante y la muestra fue extraída nuevamente en iguales condiciones hasta lograr la máxima extracción de compuestos. El volumen se ajustó a 10 mL en un matraz aforado utilizando la solución extractora correspondiente (Nava, 2009).

8.4 Cuantificación de antocianinas

Una vez obtenidos los extractos, se procedió a realizar una cuantificación de antocianinas totales midiendo la absorbancia de cada uno de los extractos a una longitud de onda de 535 nm (máximo de absorción de la cianidina 3-glucósido), posteriormente los resultados se obtuvieron mediante la ecuación estandarizada de Wrolstad, la cual utiliza el peso molecular y el coeficiente de extinción molar de la cianidina 3-glucósido.

$$AcyTot = \left(\frac{A}{\epsilon} \right) \left(\frac{Vol}{1000} \right) MW \left(\frac{1}{Peso\ de\ la\ muestra} \right) 10^6$$

Donde: $AcyTot = Concentracion\ total\ de\ antocianinas = \frac{mg}{kg}$

A= absorbancia media

ϵ =absortividad molar (cianidina 3-glucósido =25965 cm⁻¹M⁻¹)

MW= peso molecular de la cianidina 3-glucósido=449 g/mol

Vol.= volumen final de la solución.

8.5 Cuantificación de fenoles totales

La concentración de fenoles totales en extractos fue medida por espectrofotometría, con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, basado en la reducción química del reactivo que es una mezcla de tungsteno y óxido de molibdeno, los productos de esta reducción tienen color azul y un máximo de

absorbancia en 765 nm. La magnitud de la absorbancia a dicha longitud de onda, es proporcional a la concentración de fenoles (Nava, 2009).

Se realizó una curva tipo de ácido gálico (0.35 mg/mL) con las concentraciones que se presentan en el Cuadro 8, con concentraciones de 0 mg/L a 350 mg/L en intervalos de 50 mg/L, el coeficiente de correlación obtenido para la curva (Figura 7) fue de 0.9981.

Cuadro 8. Curva tipo para la determinación de fenoles

Concentración mg/L	ABSORBANCIA		
	Muestra 1	Muestra 2	Promedio
0	0	0	0
50	0.335	0.329	0.339
100	0.668	0.714	0.684
150	1.033	1.039	1.037
200	1.358	1.349	1.360
250	1.681	1.645	1.672
300	2.008	1.984	2
350	2.241	2.239	2.236

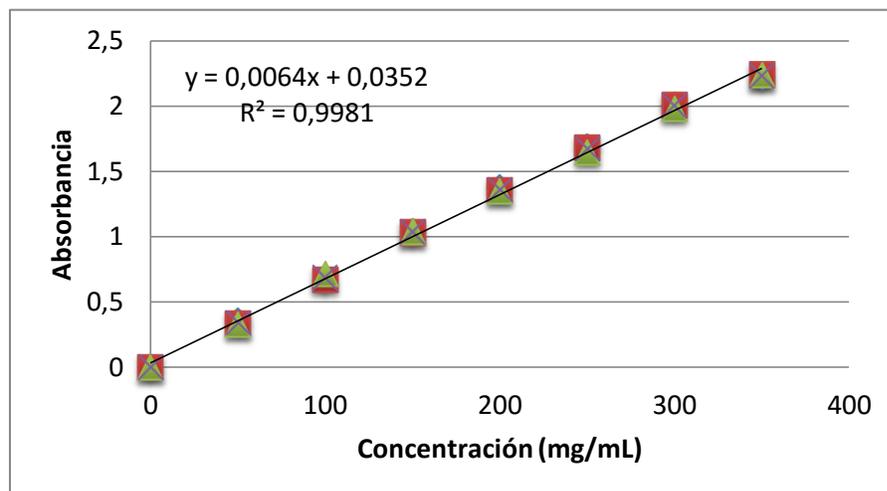


Figura 5. Curva tipo de ácido gálico

Para la determinación de fenoles se tomaron 100 μL de extracto y se añadieron 750 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10), esperando 5 minutos, posteriormente se añadieron 750 μL de solución de carbonato de sodio y se dejó reaccionar por 90 min en oscuridad, la coloración azul obtenida fue medida espectrofotométricamente a 725 nm (Figura 8).

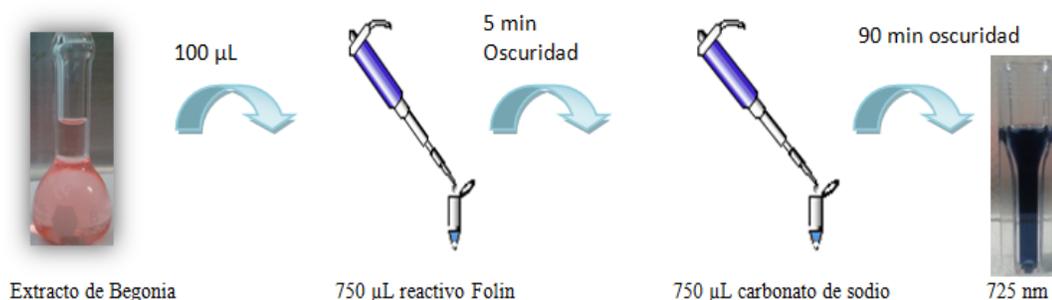


Figura 6. Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

8.6 Determinación de la capacidad antioxidante

La cuantificación de la capacidad antioxidante se realizó según los métodos de FRAP y ABTS•+.

8.6.1 ABTS•+

El radical ABTS•+ se generó a partir de su precursor el Ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS) (Figura 9) (Prior y cols., 2005) . El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible.

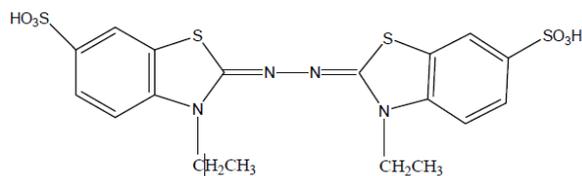


Figura 7. Estructura del ABTS

El punto final de la reacción lo marca la sustancia antioxidante empleada, fijando tiempos cortos o muy elevados que pueden interferir en los resultados finales, lo cual, es un inconveniente. La ventaja de este ensayo es que puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada caso.

Existen varios métodos de generación del radical ABTS:

- Enzimáticamente (mioglobina, peróxidasa de rábano).
- Químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico, radicales peroxilo).
- Electroquímicamente.

Para el presente trabajo previamente se formó el radical mezclando a partes iguales solución de ABTS 7mM y persulfato potásico 2.45 mM. La mezcla se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 24 horas hasta la formación del radical. La técnica consistió en mezclar en una celda 1950µL de radical a la que previamente se le adicionaron 50 µL de muestra, la absorbancia se midió al tiempo 0 min de reacción, así como pasados 10 min a 734 nm (Figura 10). Los resultados se expresan como % de inhibición del radical, la cual se obtiene a partir de la siguiente relación:

$$\%INH = \left(\frac{Abst_0 - Abst_{10}}{Abst_0} \right) * 100$$

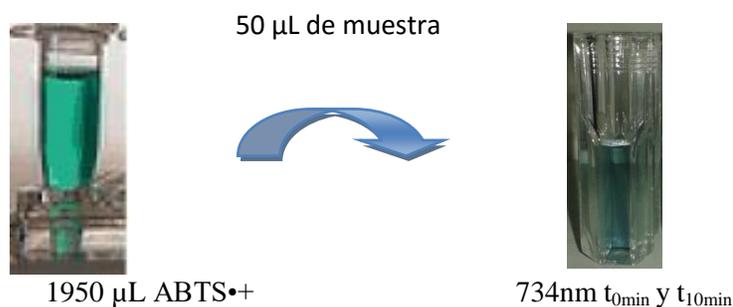


Figura 8. Cambio en la coloración del radical ABTS

8.6.1.1 FRAP

Se trata de un método espectrofotométrico ya que se mide la absorbancia del Fe^{2+} . Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} y más alta la señal de absorbancia (Figura 11).

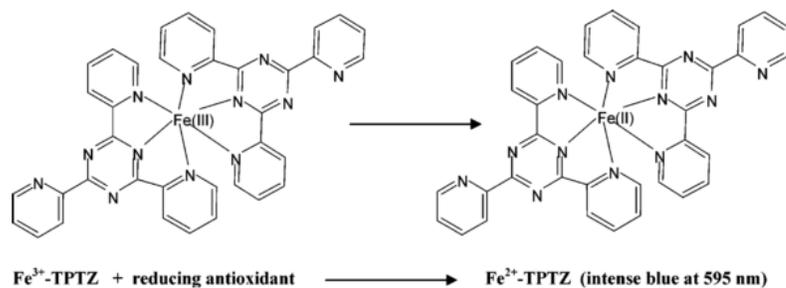


Figura 9. Reacción de la prueba de FRAP

Para esta técnica previamente se preparó una solución de trabajo diario mezclando solución del complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) y solución de FeCl_3 en una solución de acetatos, manteniéndola a 37°C , posteriormente se mezclaron en un tubo $150\mu\text{L}$ de extracto y $2850\mu\text{L}$ de la solución de FRAP, se tomaron los valores de absorbancia a 593 nm al tiempo 0 min y a los 30 min , dado que a los 4 min , el tiempo que se toma habitualmente, la reacción para formar el complejo hierro-TPTZ aún no ha terminado, reduciéndose así el complejo de incoloro a coloreado. Los resultados al igual que los del radical $\text{ABTS}\bullet+$ se expresan en % de inhibición mediante la misma relación.

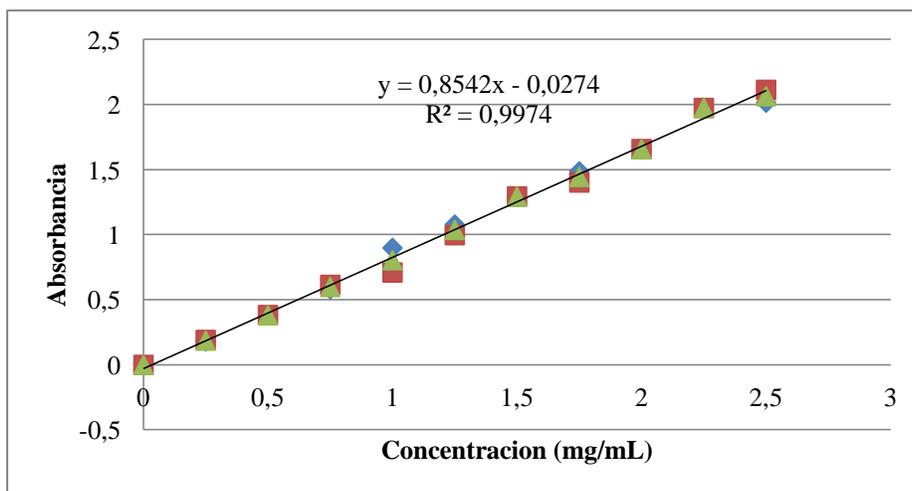
8.7 Extracción de Carotenos

Para la extracción de carotenos se utilizó el método citado por Singh y cols. (2015), usando mezclas de Hexano: Acetona en una relación $7:3$ y $5:5$, así como acetona, sometidos a las diferentes acciones mecánicas (Homogeneizado, Sonicado, Homogeneizado-Sonicado) y tiempos de maceración (0 min , 60 min , 120 min) utilizadas para la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas.

Para la obtención de extracto se pesaron 0.5 g de flor, se maceraron con 2 mL de la solución extractora durante el tiempo y acción mecánica correspondiente y se centrifugó durante 5 min a $3500\times g$ para lograr la separación de fases, esta se separó y se repitió la operación, ajustando el volumen final de 10 mL , se midió absorbancia a 450 nm , para evaluar las muestras se realizó una curva tipo de β -Caroteno ($0\text{-}2.5\mu\text{g/mL}$), se presentan los resultados en el Cuadro 9, obteniendo un coeficiente de correlación de 0.9974 (Figura 12).

Cuadro 9. Curva tipo de β -caroteno

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Muestra 1	Muestra 2	Promedio
0	0	0	0
0,25	0.181	0.192	0.187
0,5	0.38	0.383	0.382
0,75	0.582	0.615	0.599
1	0.899	0.71	0.805
1,25	1.078	0.997	1.038
1,5	1.291	1.295	1.293
1,75	1.487	1.402	1.445
2	1.656	1.659	1.658
2,25	1.977	1.975	1.976
2,5	2.016	2.114	2.065

**Figura 10. Curva tipo de β -Caroteno**

9. Resultados y discusión.

La primera etapa de experimentación, consistió en la selección de las soluciones extractoras más adecuadas para la extracción de los pigmentos. Con base en la literatura consultada, se propusieron 3 solventes: metanol, etanol y agua, tanto a pH neutro como acidificado (3.2) con HCl y en diferentes concentraciones (0, 50 y 100 %) para la extracción de los compuestos.

En las Figuras 13, 14 y 15 se muestran los gráficos comparativos de la maceración usando los diferentes solventes (neutros y acidificados). Se observa que las soluciones acidificadas son un mejor método de extracción, puesto que se obtiene una mayor cantidad de pigmentos, en algunos incluso el doble, por ejemplo en la begonia rosa se obtienen 150 mg/kg de antocianinas usando metanol acidificado al 100%, mientras que usando metanol bajo las mismas condiciones se obtienen 73mg/kg de antocianinas.

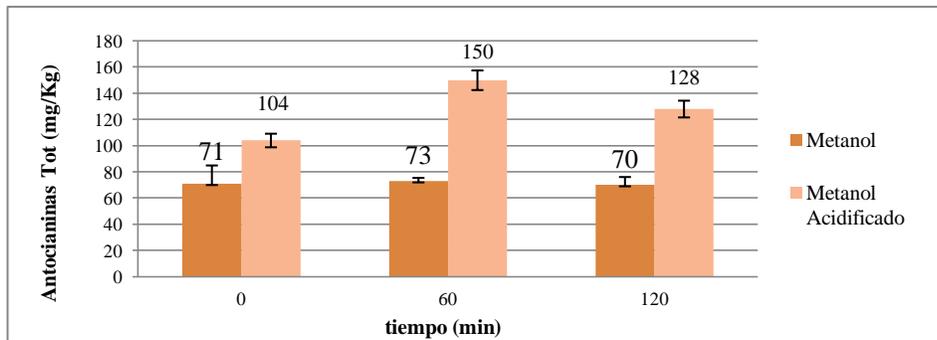


Figura 11. Comparación de extracción utilizando metanol neutro y acidificado

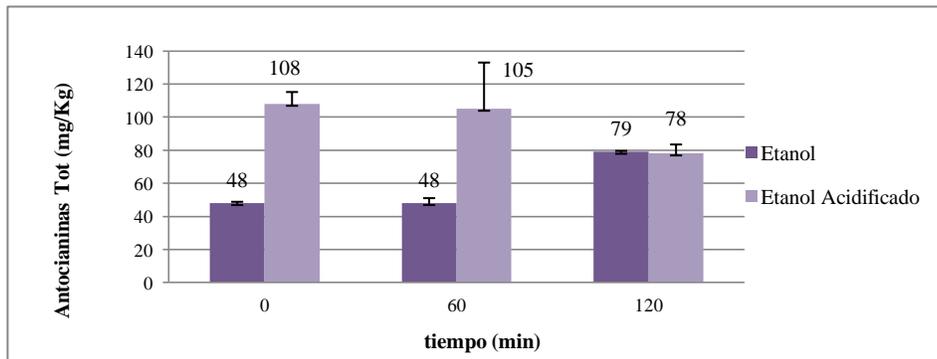


Figura 12. Comparación de extracción utilizando etanol neutro y acidificado

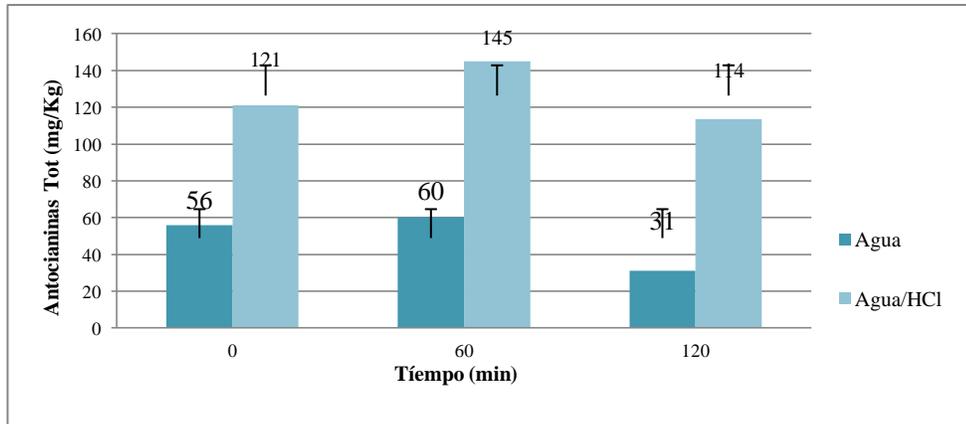


Figura 13. Comparación de extracción utilizando agua neutra y acidificada

9.1 Antocianinas

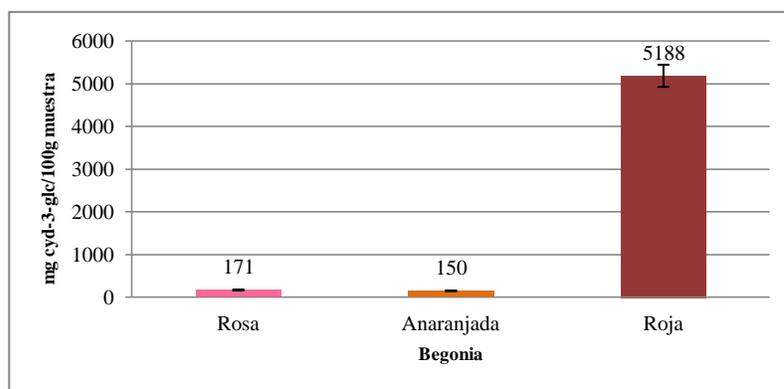
Seleccionado como método de maceración las soluciones acidificadas, se procedió a realizar la extracción y cuantificación de compuestos antociánicos de las tres mezclas de flores (rosa, anaranjada y roja) a partir del diseño experimental mostrado en el cuadro 7.

En el Cuadro 10 se observa que la máxima concentración se logró extrayendo con metanol acidificado 1N en proporción 85:15 y al 100%, homogeneizando la muestra durante 1 min y con un tiempo de maceración de 60 min, obteniendo así una extracción de antocianinas totales de 518 mg de begonia roja, 17 mg en begonia rosa, 15 mg en begonia Anaranjada, por cada 100 g de muestra, expresados como cianidina-3-glucosido (cyd-3-glc).

De las tres coloraciones de flores comparadas, los extractos de la flor roja son los que presentan el mayor contenido de antocianinas ya que la concentración máxima en begonia rosa representa apenas el 2.8% del total de las obtenidas en la begonia con mayor cantidad de compuestos y la naranja 3.2%, es importante señalar que la diferencia entre el contenido de compuestos entre la begonia roja y la flor de Jamaica, la cual es conocida por su contenido de antocianinas, es similar, teniendo la flor de Jamaica 606 mg por cada 100 g de muestra, siendo la diferencia de 14% entre el contenido de antocianinas totales.

Cuadro 10. Resultados de la cuantificación de antocianinas totales extraídas

Tratamiento	Solución extractora	% solvente (en agua)	Acción M	Tiempo (min)	Begonia Rosa (mg/kg)	Begonia Anaranjada (mg/kg)	Begonia Roja (mg/kg)
1	Etanol acidificado	0	H-S	60	121	78	432
2	Metanol acidificado	100	H	60	171	150	5188
3	Etanol acidificado	50	H	120	104	105	2732
4	Agua acidificada	100	H	60	164	145	3994
5	Metanol acidificado	0	H-S	0	125	104	1176
6	Etanol acidificado	100	S	0	155	133	2819
7	Agua acidificada	50	H-S	0	123	121	1798
8	Metanol acidificado	50	S	120	58	108	1453
9	Agua acidificada	0	S	120	74	114	277

**Figura 14. Comparación del contenido de antocianinas totales en las tres flores**

La Figura 16 muestra el gráfico de comparación de antocianinas totales en las tres flores, para conocer si existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido de los compuestos extraídos en las tres flores los datos fueron analizados usando el software Statgraphics donde se realizó una comparación de ANOVA y una prueba complementaria de múltiples rangos (Cuadro 11) en donde la begonia roja es la que presenta una mayor diferencia de antocianinas en comparación con las otras flores, esto se esperaba debido a que la intensidad de color del extracto de begonia roja es mayor

(Figura 17), por lo que se necesito realizar una dilución 1:100 para poder realizar los cálculos, mientras que no existen diferencias significativas en el contenido de las flores rosas y anaranjadas .

Cuadro 11. Análisis estadístico de P y de múltiples rangos de antocianinas

		Antocianinas
Rosa-Naranja	Diferencia	4.1
Rosa-Roja	Diferencia	-2086
Naranja-Roja	Diferencia	-2090
	Valor de P entre grupos	0.0001



Figura 15. Extractos de Begonia obtenidos

9.2 Fenoles totales

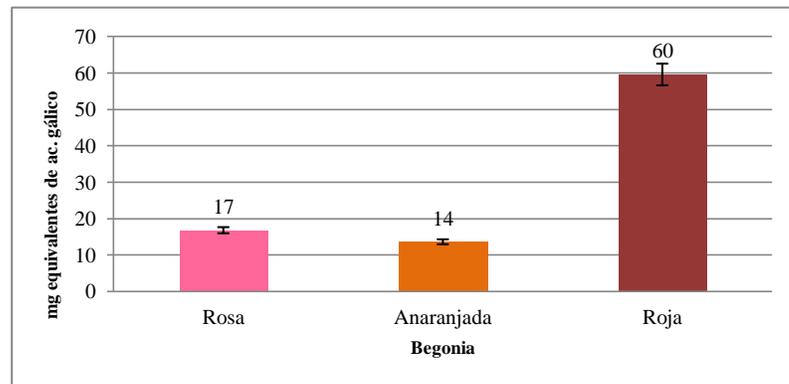
De los extractos obtenidos para la cuantificación de antocianinas se tomó una pequeña muestra para la cuantificación de fenoles totales a partir del método de Folin-Ciocalteu, reportando los resultados obtenidos en el Cuadro 12, expresando su concentración en equivalentes de ácido gálico por gramo en base húmeda.

Las lecturas obtenidas fueron analizadas usando la curva tipo de ácido gálico (Figura 7), se realizaron los cálculos a partir de la ecuación de la recta obtenida: $Y = 0.006 X + 0.0292$.

Al igual que la extracción de antocianinas las condiciones de extracción óptimas son usando metanol acidificado como solución extractora, homogeneizando la muestra y macerando 60 min.

Cuadro 12. Resultados de la cuantificación de fenoles totales extraídos

Tratamiento	Solución extractora	% solvente (en agua)	Acción M	Tiempo (min)	Begonia Rosa (mg/g)	Begonia Anaranjada (mg/g)	Begonia Roja (mg/g)
1	Etanol acidificado	0	H-S	60	9	9	43
2	Metanol acidificado	100	H	60	17	14	60
3	Etanol acidificado	50	H	120	9	10	45
4	Agua acidificada	100	H	60	13	13	55
5	Metanol acidificado	0	H-S	0	12	10	51
6	Etanol acidificado	100	S	0	13	13	52
7	Agua acidificada	50	H-S	0	8	9	45
8	Metanol acidificado	50	S	120	8	11	32
9	Agua acidificada	0	S	120	8	11	37

**Figura 16. Comparación del contenido de fenoles totales en las tres flores**

En la Figura 18 se muestra la gráfica de comparación de fenoles totales extraídos en las 3 flores, las máximas concentraciones de fenoles totales que se obtienen son: 60 mg en la begonia roja, 17 mg en la flor rosa, 14 mg en la flor anaranjada, todas expresadas en equivalentes de ácido gálico, se observa que no existe diferencia significativa en la cantidad de compuestos fenólicos entre la flor rosa y anaranjada, mientras que entre la roja y la rosa es más del triple, para conocer si existía o no diferencias estadísticamente significativas se realizó una comparación de ANOVA y una prueba complementaria de múltiples rangos (Cuadro13) igual que en el contenido de antocianinas la flor roja es la que presenta un mayor contenido de compuestos fenólicos extraídos.

Cuadro 13. Análisis estadístico de P y de múltiples rangos para fenoles totales

Compuestos Fenólicos		
Rosa-Naranja	Diferencia	-0.5
Rosa-Roja	Diferencia	-35.8
Naranja-Roja	Diferencia	-35.3
Valor de P entre grupos		0.0000

9.3 Carotenos

Una vez obtenidos los extractos con las soluciones extractoras correspondientes las muestras se analizaron a una longitud de onda de 450nm y se evaluaron con la curva tipo de β -caroteno obtenida (Figura 12), con la cual se cuantificaron los compuestos carotenoides totales.

Los resultados se presentan en el Cuadro 14, donde se observa que la mayor concentración de compuestos carotenoides se logra utilizando hexano: acetona en proporción 50:50 como solución extractora, homogeneizando 1 min y con un tiempo de maceración de 60 min.

Cuadro 14. Resultados de la cuantificación de carotenos totales extraídos

	Solución extractora	Concentración	Acción Mecánica	Tiempo (min)	Begonia Rosa (mg/g)	Begonia Naranja	Begonia Roja
1	Acetona	100	S	0	0,014	0,158	0,068
2	Acetona	100	H	120	0,033	0,066	0,184
3	Acetona	100	H-S	60	0,037	0,159	0,194
4	Hexano/Acetona(50:50)	100	H-S	0	0,015	0,184	0,078
5	Hexano/Acetona(50:50)	100	S	120	0,016	0,167	0,081
6	Hexano/Acetona(50:50)	100	H	60	0,094	0,206	0,083
7	Hexano/Acetona(70:30)	100	H-S	0	0,028	0,159	0,081
8	Hexano/Acetona(70:30)	100	S	120	0,017	0,141	0,069
9	Hexano/Acetona(70:30)	100	H	60	0,044	0,106	0,079

Si bien las condiciones anteriores son las más favorables para la extracción de carotenos el caso de la begonia roja es especial, ya que al extraer con acetona se obtiene una mayor concentración, sin

embargo al ser la acetona un compuesto polar utilizado también para la extracción de antocianinas y dado que la longitud de onda en la cual se tomo lectura entra dentro del espectro de las antocianinas, la extracción y cuantificación de carotenos usando acetona no es tomada como el tratamiento más efectivo, en la Figura 19 se observa la coloración roja en el extracto con acetona, lo que indica claramente la presencia de antocianinas, mientras que al ser extraída con hexano: acetona (50:50) la coloración es completamente amarilla, siendo este el principal factor por el cual se toma la cuantificación de compuestos carotenoides utilizando la mezcla de Hexano: Acetona.



Figura 17. Comparación de extracción con Hexano: Acetona y Acetona

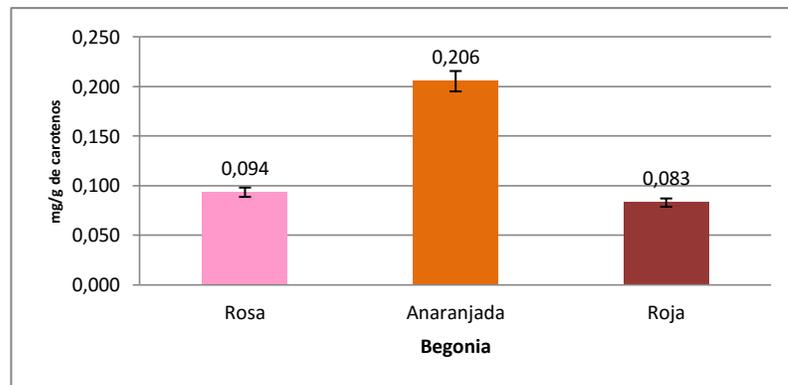


Figura 18. Comparación de carotenos en las tres flores

De las tres coloraciones de flores, la que contiene una mayor cantidad de carotenos es la flor anaranjada, teniendo así 0.206 mg/ g de muestra, mientras que la flor rosa contiene un 45% de compuestos carotenoides y la flor roja tiene un 40% con respecto a la flor de mayor extracción de estos compuestos. En la Figura 20 se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en el contenido de compuestos de las flores rosas y la rojas, sin embargo es la anaranjada la que tiene un

contenido mayor en la comparación entre grupos la diferencia tampoco es significativa como se observa en el cuadro 15, para este análisis se realizó una comparación de ANOVA y una prueba de múltiples rangos con el software Statgraphics.

Cuadro 15. Análisis estadístico de P y de múltiples rangos para carotenos

		Carotenos
Rosa-Naranja	Diferencia	-0.12
Rosa-Roja	Diferencia	-0.04
Naranja-Roja	Diferencia	0.08
Valor de P entre grupos		0.0000

9.4 Capacidad antioxidante

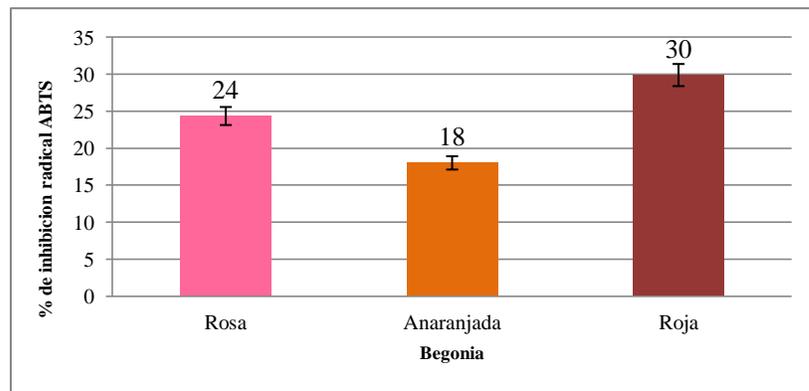
La capacidad antioxidante se determinó por dos técnicas, el método del radical ABTS●+ y por el método FRAP.

9.4.1 ABTS●+

Para el método del ABTS●+ las muestras se manejaron en obscuridad y se midió absorbancia a tiempo cero y a los diez minutos, estas se analizaron para obtener un porcentaje de inhibición del radical, indicados en el Cuadro 16.

Cuadro 16 . Porcentaje de inhibición del radical ABTS en las tres flores

Tratamiento	Solución extractora	% solvente (en agua)	Acción M	Tiempo (min)	Begonia Rosa (%Inhibición)	Begonia Anaranjada (%Inhibición)	Begonia Roja (%Inhibición)
1	Etanol acidificado	0	H-S	60	16	11	19
2	Metanol acidificado	100	H	60	24	18	30
3	Etanol acidificado	50	H	120	12	11	17
4	Agua acidificada	100	H	60	19	17	29
5	Metanol acidificado	0	H-S	0	11	12	22
6	Etanol acidificado	100	S	0	16	17	28
7	Agua acidificada	50	H-S	0	15	12	24
8	Metanol acidificado	50	S	120	14	16	25
9	Agua acidificada	0	S	120	10	12	25

**Figura 19. Resultados de la comparación de % inhibición de radical ABTS en las 3 flores**

Al tener la máxima concentración de antocianinas y compuestos fenólicos en la extracción con metanol, la mayor capacidad antioxidante se observó bajo las mismas condiciones (metanol acidificado, homogeneizando y con un tiempo de maceración de 60 min), teniendo así que la begonia roja es la que presenta un mayor porcentaje de inhibición del radical, sin embargo en la Figura 21 se muestra la gráfica de comparación entre el porcentaje de inhibición, donde las tres flores presentan una ligera diferencia, esto quizá se deba a que existen más compuestos en las flores los cuales le confieran

propiedades antioxidantes y estas se reflejan en la capacidad antioxidante, al igual que en compuestos fenólicos se realizó un ANOVA y prueba complementaria de múltiples rangos para obtener las diferencias estadísticas (Cuadro 17).

Cuadro 17. Análisis estadístico de P y de múltiples rangos de la capacidad antioxidante por el método de ABTS●+

		ABTS
Rosa-Naranja	Diferencia	1.33
Rosa-Roja	Diferencia	-9.0
Naranja-Roja	Diferencia	-10.33
Valor de P entre grupos		0.0000

9.4.2 FRAP

De igual manera se analizaron las muestras con el método de FRAP, característico por el cambio de coloración que presentan al finalizar el tiempo de reacción de 30min (azul)(Figura 22), para después calcular el porcentaje de inhibición del radical.

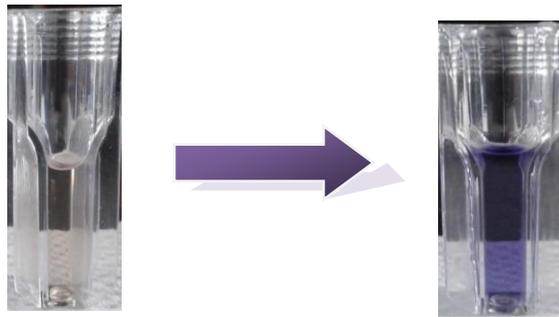
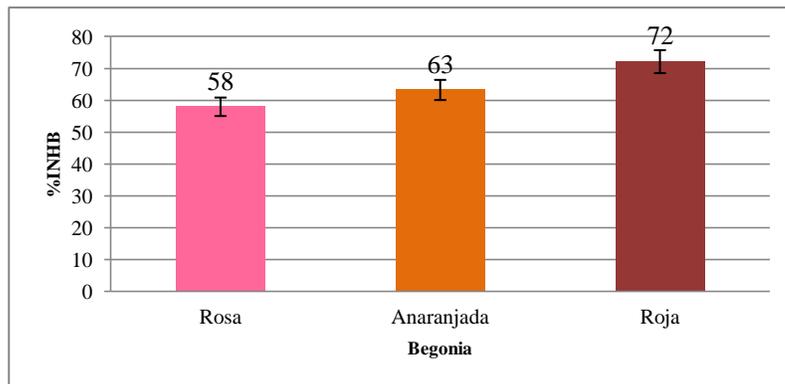


Figura 20. Cambio en la coloración del método de FRAP

En el Cuadro 18 se observa que en las tres flores existe una mínima diferencia en el porcentaje de inhibición entre ellas, sin embargo la begonia roja es quien tiene el porcentaje mayor, esta diferencia se puede ver en la figura 23, donde se muestra la comparación del porcentaje de inhibición del FRAP en las tres coloraciones de flores, al igual que con el método del ABTS se observó que las tres presentan una capacidad antioxidante similar, debido a la presencia de otros compuestos, los cuales le confieren esta propiedad.

Cuadro 18. Porcentaje de inhibición por el método del FRAP

Tratamiento	Solución extractora	% solvente (en agua)	Acción M	Tiempo (min)	Begonia Rosa	Begonia Anaranjada	Begonia Roja
1	Etanol acidificado	0	H-S	60	54	51	61
2	Metanol acidificado	100	H	60	58	63	72
3	Etanol acidificado	50	H	120	57	55	44
4	Agua acidificada	100	H	60	54	52	58
5	Metanol acidificado	0	H-S	0	55	48	55
6	Etanol acidificado	100	S	0	51	54	37
7	Agua acidificada	50	H-S	0	57	44	46
8	Metanol acidificado	50	S	120	56	54	53
9	Agua acidificada	0	S	120	54	50	37

**Figura 21. Comparación del porcentaje de inhibición del FRAP en las 3 flores**

Para analizar si existe diferencias estadísticamente significativas se realizó el estudio ANOVA y prueba complementaria de múltiples rangos, donde se observa que si existen diferencia entre la capacidad antioxidante entre la flor naranja y roja, mientras que entre la naranja y rosa es mínima (Cuadro 19).

Cuadro 19 Análisis estadístico de P y de múltiples rangos de la capacidad antioxidante por el método de FRAP

	FRAP
Rosa-Naranja	Diferencia 2.6
Rosa-Roja	Diferencia 3.7
Naranja-Roja	Diferencia 1.1
	Valor de P entre grupos 0.5528

Debido a la cantidad de compuestos totales en la begonia de color rojo su capacidad antioxidante es mayor, pudiendo así ser comparada con uno de las flores antioxidantes de mayor consumo a nivel nacional, la Jamaica, ya que la capacidad antioxidante es muy similar teniendo una diferencia del 10% por el método del ABTS●+ y 3% en el método del FRAP.

9.4.3 Evaluación de capacidad antioxidante

La evaluación de la capacidad antioxidante se determinó graficando la concentración de antocianinas y compuestos fenólicos con respecto a los dos métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante.

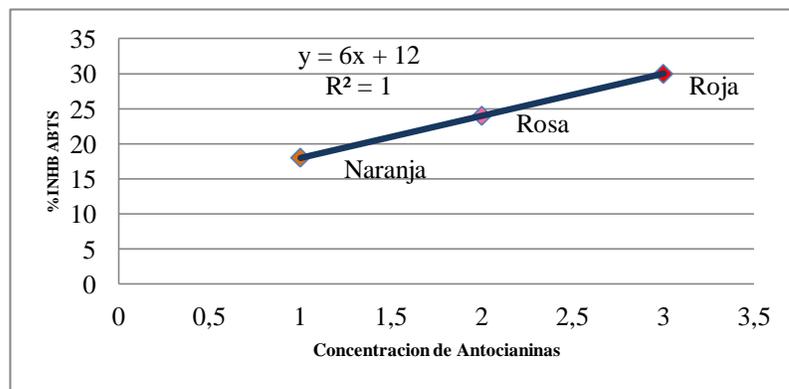


Figura 22. Comportamiento de la concentración de antocianinas con respecto al método de ABTS ●+

En la Figura 24 Se observa que la concentración de antocianinas totales es directamente proporcional a la capacidad antioxidante presentada por el método del ABTS●+, por lo que al tener una mayor cantidad de antocianinas totales en la flor roja es donde se presenta la mayor capacidad de inhibición del radical, obteniendo así un coeficiente de correlación de 1, mientras que en la figura 25 observamos que la concentración de antocianinas totales no es proporcional al porcentaje de Inhibición obtenido mediante el método de FRAP, por lo que el mejor método para evaluar la capacidad antioxidante de las antocianinas totales es mediante el método del radical ABTS●+.

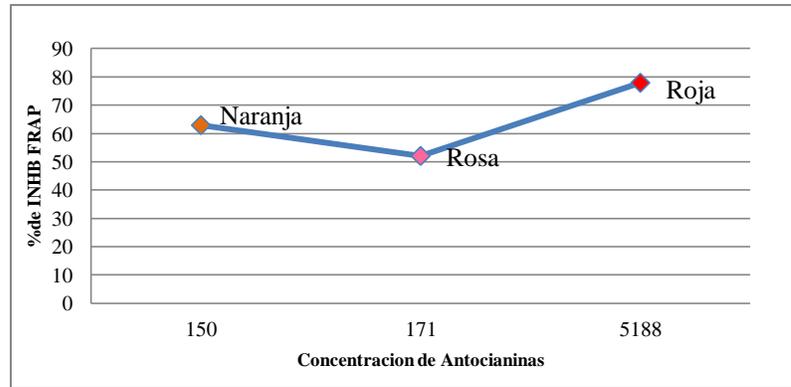


Figura 23. Comportamiento de la concentración de antocianinas con respecto al método de FRAP

Para la evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos totales se graficaron las concentraciones de fenoles totales y los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición del método ABTS y FRAP.

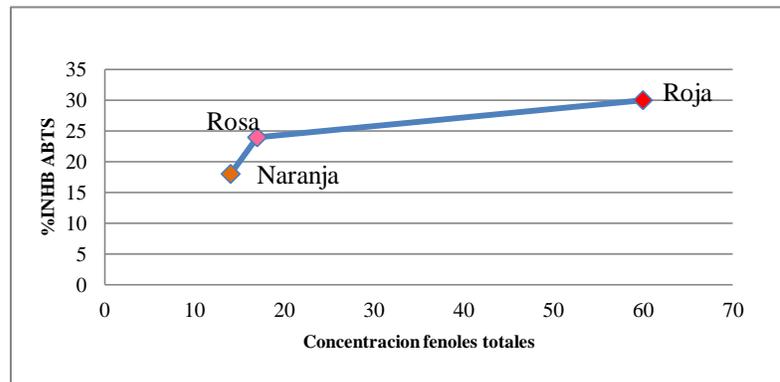


Figura 24. . Comportamiento de la concentración de Fenoles totales con respecto al método de ABTS •+

En la Figura 26 observamos que si bien la concentración de compuestos fenólicos va en aumento junto con el porcentaje de inhibición del radical ABTS•+, la diferencia entre la concentración de fenoles de la begonia rosa y naranja no es muy certera por este método, sin embargo comparando con el método de FRAP se observa que la concentración y el porcentaje de inhibición son directamente proporcionales, teniendo un coeficiente de correlación de 0.9922 como se muestra en la Figura 27, lo cual hace que FRAP sea el mejor método para la evaluación de capacidad antioxidante de compuestos fenólicos totales.

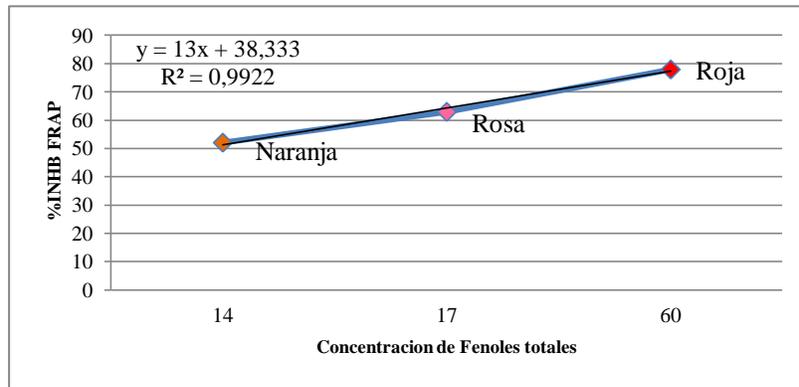


Figura 25. Comportamiento de la concentración de Fenoles totales con respecto al método de FRAP

9.5 Análisis de superficie de respuesta

Para evaluar el método de Taguchi se realizó una optimización de múltiples respuestas con el programa shatgraphics, donde se obtuvieron las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos, antocianinas y carotenos (Cuadro 21).

Factor	Óptimo Fenoles y Antocianinas	Óptimo Carotenos
Solvente	Metanol Acidificado	Hexano: Acetona (50:50)
Concentración solvente en agua	100 %	100%
Tiempo de maceración	60 min	60 min
Acción Mecánica	Homogeneizando	Homogeneizado

Cuadro 20. Condiciones de optimización del diseño de Taguchi

Con la evaluación del diseño de Taguchi se observa en la Figura 28 que la deseabilidad estará a mayor concentración del solvente, mientras que al aumentar el tiempo de maceración esta disminuye, con esto además podemos decir que la aplicación de una acción mecánica es favorable para aumentar la respuesta de extracción.

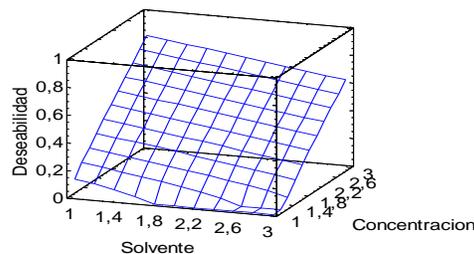


Figura 26. Análisis de superficie de respuesta del método de Taguchi

Los resultados del modelo son altos al igual que los resultados experimentales, por lo que se puede decir que hay un buen ajuste y que la extracción bajo las condiciones obtenidas por el método de Taguchi es una buena opción para la obtención de compuestos fenólicos y antocianinas.

10. Conclusiones

En el presente estudio se logró optimizar el método de extracción de compuestos fenólicos, antocianinas así como de carotenos, además se demostró que las flores de begonia pueden ser consideradas alimentos funcionales, particularmente las flores rojas que contienen la mayor cantidad de compuestos extraídos, pudiendo ser comparada con la flor de Jamaica, una de las flores más conocidas por su potencial antioxidante y de amplio consumo a nivel nacional.

Para futuros estudios es recomendable llevar a cabo la caracterización e identificación de los compuestos que confieren estas propiedades.

11. Referencias

- Agudo, L. (2010). *Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos*. Retrieved from http://www.autodidacta.anpebadajoz.es/autodidacta_archivos/numero_9_archivos/1_a_medina.pdf
- Aguilera Ortiz, M., Alanis Guzmán, M. G., & Carmen, R. V. M. Del. (2005). Comparación de dos Métodos de Extracción de Antocianinas en Ficus carica variedad misión. *VII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y III Foro de Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, 331–339.
- Almajano, M. P. (2009, September). Determinacion de la actividad antioxidante de las bayas de Goji. *Consorti Escola Industrial de Barcelona*, 1–12.
- Atala, E., Aspée, a., Speisky, H., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2013). Antioxidant capacity of phenolic compounds in acidic medium: A pyrogallol red-based ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32(2), 116–125. doi:10.1016/j.jfca.2013.09.007
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. D. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. a., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.001
- Coll i Llorens, M. (2004). Flores comestibles. *Horticultura*, 82–83.
- Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides y sus propiedades antioxidantes. *Departamento de Fisiología, Universidad de León*, 271–278.
- Durmaz, G. (2012). Freeze-dried ABTS + method: A ready-to-use radical powder to assess antioxidant capacity of vegetable oils. *Food Chemistry*, 133(4), 1658–1663. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.064
- Escamilla Jiménez, C. I., Cuevas Martínez, Y. E., & Guevara Fonseca, J. (2009, April). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Medigraphic*, 52(2), 73–75.
- Garz, G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biol. Colomb.*, 13(3), 27–36.
- Gimeno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. *Ámbito Farmacéutico*, 23, 80–84.
- González Jiménez, F. E. (2010). *CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LA SEMILLA Y ACEITE DE CHÍA (Salvia hispanica L .), MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR . Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.*

- Gracia Nava, M. A. (2006). *Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales*. Universidad Autónoma de Querétaro. Mexico D.F.
- Hvoslef-eide, A. K., & Munster, C. (2007). Chapter 9 BEGONIA (pp. 241–275).
- Kelley, K. M., Kelley, K. M., Behe, B. K., Behe, B. K., Biernbaum, J. a, Biernbaum, J. a, ... Poff, K. L. (2001). Consumer and Professional Chef Perceptions of Three Edible-flower Species. *HortScience*, 36(1), 162–166. Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/cgi/content/abstract/36/1/162>
- Li, H., Deng, Z., Zhu, H., Hu, C., Liu, R., Young, J. C., & Tsao, R. (2012). Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. *Food Research International*, 46(1), 250–259. doi:10.1016/j.foodres.2011.12.014
- Lluis, R. P. (2011). Las Begonias. *Horticultura*, 9–46.
- Márquez, . Ma. Andrea Trejo, & Bustamante, S. P. (2009). Evaluación De Capacidad Antioxidante Y Determinación De Fenoles Totales Para Frutos. *Universidad Nacional Autónoma De México*.
- Martínez, A. (2003). *Carotenoides*. Universidad de antioquia.
- Martínez-Cruz, N. D. S., Arévalo-Niño, K., Verde-Star, M. J., Morales, C. R. M., Oranday-Cárdenas, A., Adriana Núñez-González, M., & Eufemia Morales-Rubio, M. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de rubus adenotrichus Schldl (zarzamora). *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 42(4), 66–71.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Pigmentos carotenoides: Consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 57(2), 109–117.
- Mendez, E. G. D. (2012). Historia y patrimonio gastronomico nacional. *Red Tercer Milenio*.
- Miller, R., Owens, S. J., & R?rslett, B. (2011). Plants and colour: Flowers and pollination. *Optics and Laser Technology*, 43(2), 282–294. doi:10.1016/j.optlastec.2008.12.018
- Mínguez Mosquera, M. I., Pérez Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2005). Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples “colorantes” naturales. *Agroscic*, 2–7. Retrieved from <http://digital.csic.es/handle/10261/5754>
- Mlcek, J., & Rop, O. (2011). Fresh edible flowers of ornamental plants - A new source of nutraceutical foods. *Trends in Food Science and Technology*, 22(10), 561–569. doi:10.1016/j.tifs.2011.04.006
- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), 139–148. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.045

- Namitha, K. K., & Negi, P. S. (2010). Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(8), 728–760. doi:10.1080/10408398.2010.499811
- Nava, A. D. (2009). *ESTUDIO DE CAMBIOS ESTRUCTURALES Y EN ALGUNOS COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE LA ELABORACIÓN DE TEGÜINO DE MAIZ AZUL (Zea mays)*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- Oginuma, K., & Peng, C. (2002). Karyomorphology of Taiwanese Begonia (Begoniaceae): taxonomic implications. *Dragon Wing*, 115, 225–235.
- Ortega, M. G., & Guerra, M. (2006). Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos. *Redalyc.org*, XL, 3–11.
- Ortíz, M. A., Reza, C., Gerardo, R., Madinaveitia, C., Ciencias, F. De, Universidad, Q., ... Artículo, A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*, 13, 16–22. Retrieved from <http://www.biotecnia.uson.mx/revistas/articulos/16-BIO-11-DPA-06.pdf>
- Pedraza-chaverri, N. C. J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes : aspectos básicos. In *Profesores al día (Biomedicina)* (pp. 164–173).
- Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., & Stockley, C. S. (2013). The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 483–508. doi:10.1111/1541-4337.12024
- Prior L, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4290–4302.
- Rey Castellanos, E. R. (2011). *RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Eddy Rocío Rey Castellanos **, Julien Wist Grupo de Aplicaciones en Resonancia Magnética Nuclear , Facultad de Ciencias , *Resumen Palabras clave Keywords Introducción*.
- Samenzucht, B. E. (2015). Flower Power Nonstop. Colorido interminable. *Benary*, 1–4.
- Singh, D., Siddiq, M., & Dolan, K. D. (2015). Total phenolics , carotenoids and antioxidant properties of Tommy Atkin mango cubes as affected by drying techniques. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 564–568. doi:10.1016/j.lwt.2014.04.015
- Soto, I. V. (2003). Flores e insectos en la dieta prehispánica y actual de México.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-zevallos, L., & Hawkins, D. (2006). Comparison of ABTS , DPPH , FRAP , and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675. doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003
- Thompson, B. (2000). *Begonia Registration Handbook*.
- Valdiviezo Macías, J. A. (2013). Extracción del Carotenoide Licopeno a partir de los Rechazos Post

Cosecha del Mercado Interno de *Citrullus Lanatus* (Sandía) para su Futura Aplicación en Alimentos. *Centro de Investigacion Cientifica Y Tecnologica*.

Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126–133.

Wesche-Ebeling, P., and Montgomery, M. W. (1983). *No Extraction and partial characterization of strawberry polyphenoloxidase. IFT Meet.*