

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO
DE LA REPUBLICA (PROPAC)**

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Efecto de diferentes métodos de cocción sobre el contenido y
capacidad antioxidante de la flor de calabaza
(*Cucurbita pepo L.*)**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta

L.N. ALMA LETICIA LOUBET GONZÁLEZ

Dirigido por:

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

Santiago de Querétaro, Qro., Septiembre 2010



Universidad Autónoma de Querétaro
 Facultad de Química
 Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
 Programa de Posgrado en alimentos del Centro de la República (PROPAC)

Efecto de diferentes métodos de cocción sobre el contenido y capacidad antioxidante de la flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.)

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:

L.N. Alma Leticia Loubet González

Dirigido por:

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

SINODALES

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
 Presidente

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
 Secretario

Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
 Vocal

Firma

Dr. Gerardo Ortiz González
 Suplente

Firma

Dra. Dora Marina Gutiérrez Avella
 Suplente

Firma

Q.B. Magali E. Aguilar Olvera
 Director de la Facultad

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
 Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

La flor de calabaza fue incluida en la dieta desde la época prehispánica y hoy en día es consumida por toda Latinoamérica. Existe amplia literatura que ha reportado diferentes efectos sobre la calidad nutracéutica y nutricional en vegetales al aplicar diferente temperatura, tiempo y método de cocción. En el presente trabajo, el contenido de compuestos fenólicos, carotenoides y capacidad antioxidante de la flor de calabaza (*Cucurbita pepo L.*) sometida a cinco métodos de cocción (cocción en agua, cocción al vapor, salteado, horneado y microondas) fueron evaluados. Para ello, se obtuvieron extractos hexánicos y metanólicos de las flores crudas y cocinadas. El contenido de fenoles y carotenoides en los extractos metanólicos y hexánicos respectivamente fue estimado mediante ensayos espectrofotométricos y por HPLC. La capacidad antioxidante de los extractos fue evaluada usando los métodos ABTS y DPPH. De manera adicional para los extractos metanólicos se utilizó el método de FRAP y capacidad quelante. El intervalo del contenido de fenoles totales fue de 3.14 a 9.48 mg. eq. de ácido gálico/g de flor seca, con un orden ascendente de flores cocidas < salteadas < al vapor < microondas < horneadas. En HPLC cinco ácidos fenólicos y dos carotenoides fueron identificados y cuantificados, encontrándose en mayor cantidad el ácido gálico, *p*-cumárico y rosmarínico en las flores cocidas por el método de horneado, el ac. protocatéuico para el microondas y la rutina para el vapor. Zeaxantina y β -caroteno fueron encontrados en mayor cantidad cuando el método de cocción en agua es utilizado. En la capacidad antioxidante, los porcentajes de inhibición para ABTS y DPPH se encontraron en el intervalo de 46.3 a 87.9% y 10.68 a 40.87%, respectivamente. Los valores del poder reductor se encontraron de 22.65 a 71.83 $\mu\text{mol eq. FeSO}_4/\text{g}$ de flor seca y la mayor capacidad quelante la presentó el método de salteado obteniendo un valor de 30.82 $\mu\text{mol eq de EDTA/g}$ de de flor seca. La capacidad antioxidante en un medio ácido (FRAP), neutro (TEAC) o básico (Fenoles totales), presentó una correlación positiva.

(Palabras clave: flor de calabaza, métodos de cocción, contenido de antioxidantes y capacidad antioxidante).

SUMMARY

The squash blossoms have been part of the diet since pre-Columbian times and today there are consumed in Latin America. Extensive literature has reported different effects on the nutraceutical and nutritional quality of plants by applying different temperature, time and method of cooking. In this paper, the content of phenolic compounds, carotenoids and antioxidant capacity of squash blossoms (*Cucurbita pepo* L.) subjected to five methods of cooking (boiling, steaming, sauté, baking and microwave) were evaluated. Hexane and methanol extracts were obtained from raw blossoms and cooking processes. The phenols and carotenoids content in methanol and hexane extracts respectively were estimated by spectrophotometric and HPLC assays. The antioxidant capacity of the extracts was evaluated through the ABTS and DPPH methods. Additionally, the FRAP method and chelating capacity assay were used to evaluate methanolic extracts. The range of total phenolic content was 3.14 to 9.48 mg. eq. gallic acid/g Dry Blossoms Weight (DBW), with an increasing order of blossoms cooked < boiling < steamed < microwave < baked. In HPLC determination, five phenolic acids and two carotenoids were identified and quantified, finding a major amount of gallic, *p*-coumaric and rosmarinic acids in baking-cooked-blossoms, protocatecuic acid for microwave and rutin for steaming methods. Zeaxanthin and β -carotene were found in larger quantities when the boiling method was used. Regarding antioxidant capacity, the percentages of inhibition for ABTS and DPPH assays were found in the range of 46.3 to 87.9% and 10.68 to 40.87%, respectively. Reducing activity values ranged from 22.65 to 71.83 mol eq. FeSO₄/g DFW. The sauté cooking method presented the best chelation capacity obtaining a value of 30.82 mol eq of EDTA/g DFW. The antioxidant capacity in an acidic medium (FRAP), neutral (TEAC) or basic (total phenols) showed a positive correlation in all results.

(Keywords: squash blossoms, cooking methods, content of antioxidants and antioxidant capacity).

Dedicado a los seres más importantes de mi vida, a quienes amo con una fuerza desconocida:

A mis mejores amigos:

Dios y María Santísima

A mis padres:

Roberto y Leticia

A mis hermanos:

Miguel, Lizeth y Karla

A quien amo:

Eduardo

Este logro también es suyo...

AGRADECIMIENTOS

¡A DIOS: Agradezco infinitamente a ese ser supremo que aunque no se ve, existe... sé que él me puso en este camino y que ahora, él mismo permite que concluya para comenzar uno nuevo... Gracias por amarme como me amas Señor!!!

Agradezco principalmente este logro a los seres que me han dado la vida, mis padres: "Roberto y Lety": quienes han estado dispuestos a dar todo por mí. Ambos son el mayor ejemplo de lucha y esfuerzo inquebrantables que pueda poseer. Admiro su fortaleza con la que han logrado salir adelante, sin duda alguna es gracias a ustedes que hoy logro este objetivo, porque este es el resultado de todo su esfuerzo, apoyo y amor incondicional. Gracias por todo, por apoyarme en mis decisiones, compartir mis alegrías y derrotas y por ser siempre un motivo de inspiración en mi vida. Tal vez no existan palabras que puedan definir lo que significan para mí. **LOS AMO.**

¡A mi hermano Miguel y a su esposa Ingrid: Hermanito jamás olvidaré cuando dijiste que mi esfuerzo algún día llegaría a su final, aunque ese final fuera el comienzo de otro gran reto. Te admiro por todos tus logros y tu fortaleza. Ingrid: gracias por esas palabras que lograban que recobrara los ánimos cada vez que me sentía frágil. Y gracias por dar vida a ese ser tan hermoso y maravilloso que ahora es la alegría de nuestras vidas "beberringo".

¡A mis hermanas Liz y Karlis: nenas siempre han estado presentes en mí existir, gracias por ser mis amigas y confidentes a la vez, por ser quienes en mis alegrías y derrotas han sabido escucharme y darme un cálido abrazo, por lograr que un día nublado se vuelva soleado, pero sobre todo por estar a mi lado y brindarme su confianza y apoyo incondicional.

De manera muy especial a mi novio EDUARDO.

Porque Tú formas parte primordial en mi vida. ¡A lo largo de este camino jugaste un papel muy importante para que pudiera lograr este objetivo que hoy comparto contigo. Gracias amor por todo tu apoyo brindado, por no dejarme caer o levantarme si la caída era inevitable, por estar ahí cuando más lo necesité y por soportar la distancia, por compartir conmigo mis triunfos y fracasos, alegrías y tristezas. Pero sobre todo por creer en mí, porque jamás olvidaré cuando decías que "si podía". Sé que es el comienzo de un largo camino por recorrer, un camino que sin lugar a dudas deseo compartir a tu lado. **TE AMO!!!**
Este logro también es tuyo...

¡Al Sr. Eduardo y a la Sra Terz: porque se convirtieron en segundos padres para mí cuando comencé este reto, gracias por todo el apoyo y consejos que me brindaron a lo largo de este camino y por permitirme entrar a su hogar, el cual me brindó la calidez y amor cuando me encontraba fuera del mío. Agradezco a dios haber conocido a seres tan especiales como ustedes.

¡A Lucy: Por ser como una hermana para mí y por brindarme mucho cariño durante todo este tiempo. Y también por ya no ponerse celosa de mí jeje.

¶ **La Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ)** por permitirme realizar mis estudios de Posgrado.

¶ **El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico otorgado a través de la beca.

¶ **El Instituto Gastronómico de Estudios Superiores (IGES S.C.)**, por el apoyo para la realización de los métodos de cocción.

¶ **mi Directora de Tesis con gran admiración, la Dra. Sandra Mendoza:** Alguna vez me dijo que si dios me había puesto en este camino era por algo,, y que razón tenía, hoy comparto con usted este logro, porque la investigación es realmente una simbiosis y sin sus conocimientos tal vez esto no hubiera culminado. Gracias por todo su apoyo para realizar este trabajo y por haberme aceptado en su grupo de investigación.

¶ **todos mis sinodales:** Mil Gracias!!! Cada una de sus sugerencias fueron de vital importancia en el desarrollo del proyecto, gracias por confiar en mí, por el apoyo otorgado y por aceptar ser partícipes de este reto.

¶ **Dr. Gerardo Ortiz:** con un gran respeto, porque sus valiosas aportaciones y conocimientos lograron mejorar este trabajo, gracias por todo Dr.

¶ **Lic. Alfredo del Río:** por brindarme un espacio para la realización de los métodos de cocción, por su ayuda y por sus valiosas sugerencias en cuanto a ello.

¶ **mis amigos del laboratorio de Nutracéuticos. Fang:** en ti encontré a una AMIGA siempre estará agradecida de haberte conocido, te quiero mucho nena!!! **Héctor:** siempre alegraste los días en el labo con tus ocurrencias, eres una gran persona hermanito. **Bety:** por ser una abeja reina muy especial, gracias por tus consejos y tu apoyo. **Almis:** por tus sugerencias para mi trabajo y recordarme que existe alguien que siempre escucha. **Adri y Karlita:** por siempre estar dispuestas a ayudar, por esa virtud de compañerismo que les caracteriza y porque siempre alegraban el labo con su presencia.

Son todas personas muy valiosas. Con ustedes compartí muchos momentos especiales, los cuales quedarán grabados en mi memoria. Cada uno fue pieza importante, no solo en el laboratorio (donde pasamos la mayor parte del tiempo juntos) sino también fuera de él. Por todos esos momentos compartidos y esas pláticas inolvidables: ¶ todos GRACIAS!!!

¶ **Raque:** por compartir conmigo sus conocimientos del HPLC. Sé que batallamos mucho con mis muestras, pero realmente pienso que valió la pena...pues el tiempo compartido, las careajadas (y que careajadas jeje!) y nuestra amistad, eso que es una buena recompensa. Gracias por todo raquelito!

¶ **mis amigas Lau, Tésita y Vanz:** Con quienes viví experiencias inolvidables, gracias hijas por todos esos momentos compartidos a lo largo de la Maestría, por la hora de la comida que disfrutábamos juntas. Finalmente toda cosecha da frutos y me da gusto saber que su amistad fue uno de ellos. Las quiero y estimo mucho. Éxito para todas.

INDICE GENERAL

	Pág.
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice General	vi
Índice de Cuadros	ix
Índice de Figuras	xi
I. Introducción	1
II. Justificación	3
III. Revisión de la literatura	4
3.1 Flores comestibles	4
3.1.1 Consumo de las flores	7
3.1.2 Composición química y valor nutricional	8
3.2 Flor de Calabaza (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	10
3.2.1 Botánica	10
3.2.2 Suelo y clima	10
3.2.3 Contenido nutrimental	13
3.3 Metabolitos secundarios	16
3.3.1 Polifenoles	17
3.3.1.1 Naturaleza de los polifenoles	17
3.3.1.2 Propiedades antioxidantes de los polifenoles	18
3.3.1.3 Flavonoides y ácidos fenólicos	19
3.3.2 Carotenoides	20
3.4 Procesamiento de frutas y vegetales	22
3.4.1 Efectos del procesamiento sobre las características físicoquímicas y nutrimentales de los vegetales	23
IV. Hipótesis	26
V. Objetivos	27
VI. Materiales y métodos	28

6.1	Material biológico	29
6.2	Métodos de cocción	29
	A) Cocción en agua	29
	B) Cocción al vapor	31
	C) Salteado	31
	D) Horneado	31
	E) Microondas	31
6.3	Obtención de los extractos	32
	6.3.1 Extracto hexánico	32
	6.3.2 Extracto metanólico	32
6.4	Identificación de metabolitos secundarios	33
	6.4.1 Determinación de fenoles totales	33
	6.4.2 Determinación de carotenos totales	33
	6.4.3 Identificación y cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides mediante HPLC	34
	6.4.4 Identificación y cuantificación de carotenos mediante HPLC	35
6.5	Evaluación de la capacidad antioxidante	36
	A) Método 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH)	36
	B) Ensayo de ABTS (2-2' azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)	36
	C) Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)	37
	D) Capacidad quelante del hierro (II)	37
6.6	Diseño y análisis estadístico	38
VII.	Resultados y discusiones	39
	7.1 Identificación de metabolitos secundarios	39
	7.1.1 Determinación de fenoles totales	39
	7.1.2 Determinación de carotenoides totales	44
	7.2 Identificación de ácidos fenólicos y flavonoides mediante HPLC	50
	7.3 Cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides mediante HPLC	58
	7.4 Identificación de carotenoides totales mediante HPLC	62
	7.5 Cuantificación de carotenoides totales mediante HPLC	70

7.6 Evaluación de la capacidad antioxidante	75
7.6.1 Ensayo de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)	75
7.6.2 Ensayo de ABTS (azino-bis 2-2 (ácido 3-ethylbenzthiazolina-6-sulfónico))	80
7.6.3 Método de FRAP (Poder antioxidante de reducción férrica).	86
7.6.4 Capacidad Quelante del hierro (II)	90
7.7 Comparación de los ensayos utilizados de capacidad antioxidante (Fenoles totales, DPPH, ABTS y FRAP)	93
7.8 Comparación entre métodos de cocción en relación a los compuestos nutracéuticos y la capacidad antioxidante	97
VIII Conclusiones	101
IX Referencias bibliográficas	103

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Flores comestibles.	5
2	Composición bromatológica de las flores de <i>Cucurbita pepo</i> L	14
3	Composición de aminoácidos de las flores de <i>Cucurbita pepo</i> L	15
4	Condiciones del gradiente de elución para la cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides	34
5	Condiciones del gradiente de elución para la cuantificación de carotenos	35
6	Contenido de fenoles totales de las flores crudas y cocidas	40
7	Contenido de carotenos totales de las flores crudas y cocidas	45
8	Ácidos fenólicos y flavonoides a identificar en los extractos metanólicos de las flores crudas y cocinadas	50
9	Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides de los extractos metanólicos de la flor de calabaza cruda y cocida	59
10	Contenido de zeaxantina y β -caroteno de los extractos hexánicos de la flor de calabaza cruda y cocida	70
11	Cinética de la capacidad para secuestrar el radical DPPH del extracto metanólico de la flor de calabaza cruda a diferentes concentraciones	76
12	Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas determinada por el ensayo DPPH	78
13	Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas determinada por el ensayo ABTS	82
14	Capacidad reductora de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas determinada por el ensayo FRAP	87
15	Capacidad reductora determinada por el ensayo FRAP de diferentes vegetales en estudios publicados	87
16	Capacidad quelante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas, determinada por la capacidad de quelación del hierro (II)	91

17	Coeficiente de correlación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante determinada por los diferentes métodos	94
-----------	---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Flor de calabaza macho (<i>Cucurbita pepo L</i>)	12
2	Flor de calabaza hembra (<i>Cucurbita pepo L</i>)	12
3	Estructuras químicas de las principales clases de polifenoles	20
4	Diagrama de flujo de la estrategia general	28
5	Diagrama de flujo de los métodos de cocción	30
6	Efecto de los métodos de cocción en el contenido de fenoles totales de las flores de calabaza	43
7	Efecto de los métodos de cocción en el contenido de carotenoides totales de las flores de calabaza	49
8	Cromatograma de estándares (flavonoides y ácidos fenólicos)	51
9	Cromatograma del extracto de la flor cruda	52
10	Cromatograma comparando el extracto metanólico de la flor cruda (en azul) con el cromatograma de estándares (en negro)	52
11	Estructura de los ácidos fenólicos identificados en la flor de calabaza (HPLC)	53
12	Estructura del flavonoide identificado en la flor de calabaza (HPLC)	54
13	Cromatograma comparativo del extracto de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor cocida (en azul)	55
14	Cromatograma comparativo del extracto de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor cocida al vapor (en azul)	56
15	Cromatograma comparativo del extracto de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto metanólico de la flor salteada (en azul)	56

16	Cromatograma comparativo del extracto de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor horneada (en azul)	57
17	Cromatograma comparativo del extracto de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor en microondas (en azul)	57
18	Efecto de los métodos de cocinado sobre el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides de flor de calabaza	61
19	Cromatograma de estándares de los carotenoides identificados	63
20	Cromatograma del extracto hexánico de la flor cruda	63
21	Cromatograma comparativo del extracto hexánico de la flor cruda (en negro) con el cromatograma de zeaxantina (en azul) y β -caroteno (en verde)	64
22	Estructura de la zeaxantina identificada en la flor de calabaza cruda	65
23	Estructura del β -caroteno identificada en la flor de calabaza cruda	65
24	Cromatograma comparativo del extracto hexánico de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor cocida con agua (en azul)	66
25	Cromatograma comparativo del extracto hexánico de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor cocida al vapor (en azul)	66
26	Cromatograma comparativo del extracto hexánico de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor salteada (en azul)	67
27	Cromatograma comparativo del extracto hexánico de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor horneada (en azul)	67
28	Cromatograma comparativo del extracto hexánico de la flor	68

	cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor en microondas (en azul)	
29	Efecto de los métodos de cocinado sobre el contenido de carotenos y xantófilas de flor de calabaza	74
30	Cinética de DPPH para el extracto metanólico de la flor de calabaza cruda medido a diferentes concentraciones (10, 20, 50 y 100 mg)	76
31	Cinética de DPPH para el extracto metanólico de las flores cruda y cocidas determinado a 520 nm	77
32	Efecto de los métodos de cocción en Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas, determinada por el ensayo DPPH	79
33	Cinética de ABTS para los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas determinada a 734 nm	81
34	Efecto de los métodos de cocción en Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas, determinada por el ensayo ABTS	85
35	Cinética de FRAP para los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas determinada a 595 nm	86
36	Efecto de los métodos de cocción en capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las flores. crudas y cocidas, determinada por el ensayo de FRAP	89
37	Efecto de los métodos de cocción en Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas, determinada por la capacidad de quelación de hierro (II)	92
38	Gráfico radial de comparación entre la capacidad antioxidante determinada por el ensayo de DPPH y el método de FRAP, de los extractos metanólicos de la flor de calabaza sometida a diferentes métodos de cocción	94
39	Gráfico radial de comparación entre la capacidad	96

	antioxidante determinada por los ensayos de DPPH y ABTS, de los extractos metanólicos de la flor de calabaza sometida a diferentes métodos de cocción	
40	Gráfico radial de comparación entre la capacidad antioxidante determinada por el ensayo de ABTS y el método de FRAP, de los extractos metanólicos de la flor de calabaza sometida a diferentes métodos de cocción	96
41	Gráfico radial de los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante en los extractos metanólico y hexánico de la flor de calabaza cruda	97
42	Gráfico radial de los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante en los extractos metanólico y hexánico de la flor de calabaza sometida al método de cocción en agua	98
43	Gráfico radial de los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante en los extractos metanólico y hexánico de la flor de calabaza sometida al método de vapor	98
44	Gráfico radial de los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante en los extractos metanólico y hexánico de la flor de calabaza sometida al método de salteado	99
45	Gráfico radial de los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante en los extractos metanólico y hexánico de la flor de calabaza sometida al método de horneado	99
46	Gráfico radial de los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante en los extractos metanólico y hexánico de la flor de calabaza sometida al método de microondas	100

I. INTRODUCCIÓN

La vida de los mamíferos depende del oxígeno como aceptador final de electrones durante el transporte de éstos y de los protones en la mitocondria de las células, siendo éste un importante proceso metabólico (llamado cadena de transporte de electrones en la mitocondria), sin embargo, dicho proceso también genera metabolitos tóxicos. Entre ellos se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS), moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada que causan daño celular oxidando a una gran variedad de moléculas biológicamente importantes, entre las cuales se pueden mencionar: el ADN, las proteínas, los hidratos de carbono y los lípidos. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Esto lleva a una situación conocida como estrés oxidativo. La implicación del estrés oxidativo en la etiología y progresión de varios desórdenes agudos y crónicos ha llevado a la sugerencia de que los antioxidantes pueden proporcionar efectos benéficos a la salud como agentes profilácticos ya que tales moléculas están directamente asociadas con el proceso de envejecimiento y muchas enfermedades crónico degenerativas como: la obesidad, la diabetes *mellitus*, la artritis reumatoide, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares y cáncer.

Estudios epidemiológicos han mostrado consistentemente la asociación inversa que existe entre el consumo de frutas y vegetales (y otros alimentos) con la prevalencia de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo. Por ello, actualmente se ha incrementado el interés por la relación que existe entre el uso de los antioxidantes naturales y el mantenimiento de numerosas condiciones fisiológicas, muchas de las cuales involucran el daño de los radicales libres. Aunque los efectos protectores han sido atribuidos a antioxidantes bien conocidos como vitamina C, E y β caroteno, los compuestos fenólicos también pueden jugar un papel importante dentro de tales efectos.

México es uno de los países con una gran diversidad de plantas, las cuales han sido tradicionalmente utilizadas para su consumo como alimento o por sus propiedades curativas dentro de la medicina tradicional. Muchas de estas plantas silvestres comestibles, se han considerado fuentes de alimentación que no se han explotado lo suficiente a nivel industrial y tampoco han sido estudiadas lo suficiente a nivel científico, a pesar de esto muchas se han introducido como alimentos complementarios en diversas ciudades de África y Áreas tropicales de Latinoamérica.

La historia de las flores comienza miles de años atrás y desde entonces forman parte no solo como productos ornamentales, sino también se han considerado parte importante del arte culinario en muchos países del mundo, entre los cuales destacan: España, Francia, Italia y Brasil.

Desde hace mucho tiempo las flores han jugado un papel muy importante en la dieta en muchas regiones indígenas de México, África y América Central, sin embargo, a través de los años su consumo ha disminuido. A pesar de ello en años recientes se ha observado un interés renovado en estos productos ya que no solo su importancia radica en la atracción de los platillos que las llevan como ingrediente dando un toque especial y un sabor propio, sino también por sus propiedades benéficas que aportan a la salud. Estas características son utilizadas con fines culinarios en diversas regiones dando como consecuencia una diversidad a la dieta de la población.

Muchas flores de plantas silvestres son recolectadas y consumidas localmente en diferentes áreas durante la estación en que florecen. En nuestro país la flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) es altamente demandada y se cultiva para incluirse en la alimentación, preparándose de diversas formas. El presente estudio, tiene la finalidad de determinar sus componentes y propiedades antioxidantes, así como el efecto de los diferentes métodos de cocción en su preparación sobre estos mismos.

II. JUSTIFICACIÓN

La calabaza (*Cucurbita pepo L.*) se ha considerado desde tiempos muy remotos como una de las plantas más antiguas de nuestro país, cultivándose para ser usada como alimento o con fines medicinales. De tal forma que, a través de los años, se han estudiado diferentes variedades de *Cucurbita* enfocándose principalmente a sus frutos y semillas, existiendo escasas investigaciones científicas que hablen de sus flores. Dichas investigaciones se han enfocado principalmente al estudio genético de éstas, de tal forma que no hay datos que hablen de sus propiedades antioxidantes. Las flores de la calabaza, se han difundido en muchas partes del mundo integrándose en una gran variedad de platillos. Sin embargo, su consumo ha disminuido de manera considerable debido a la introducción de nuevos productos que han ido desplazando a éste y muchos otros alimentos (frijol, maíz y calabaza), los cuales han formado parte de nuestra cultura durante mucho tiempo.

La mayoría de los vegetales son sometidos a algún proceso de cocción previo a su consumo. La flor de calabaza, frecuentemente se prepara bajo alguno de éstos, aunque también es ampliamente consumida en crudo. Actualmente, la aplicación de tratamientos térmicos es la forma más extendida de conservación de alimentos y la industria se ha preocupado por implementar tecnologías de cocinado, procesamiento, conservación, enfriado y envasado que garanticen la calidad higiénica de los alimentos y prolonguen la vida útil del producto, minimizando las alteraciones en los mismos. Por lo cual, es importante evaluar las modificaciones que se producen al aplicar diferentes tratamientos térmicos usados comúnmente.

III. REVISIÓN DE LA LITERATURA

3.1 Flores comestibles

La historia de las flores comestibles puede remitirse a miles de años atrás, desde entonces, son utilizadas integrándolas en una gran variedad de platillos de diferentes países del mundo. Por ejemplo, la cabriola (*Capparis spinosa*) es una flor que brota de un arbusto mediterráneo de hoja perenne, usado como un condimento durante 2,000 años en Europa. Los amargones son hierbas amargas referidas en el Viejo Testamento de la Biblia y las flores de *daylilys* y crisantemos han sido usadas por los chinos y griegos durante siglos. Posteriormente el uso de las flores continuó con los romanos quienes incluyeron malvas, rosas y violetas en una gran variedad de platillos (Lynn, 2007). Los persas usaban una planta llamada mastuerzo en su dieta, cuyas hojas cocidas tienen un sabor a la col, su pistilo puede sustituir a las alcaparras y su flor tiene múltiples usos, desde aderezar mantequillas, quesos, ensaladas, cremas, sopas y hasta postres (Padilla de Ortiz, 2004).

Por otro lado, en el arte culinario de Francia durante los siglos XIII y XIV se utilizaron diversas plantas espinosas como las rosas al igual que las violetas y maravillas, las cuales fueron también usadas durante el renacimiento como colorantes naturales (Lynn, 2007).

Las flores comestibles eran muy populares durante la época Victoriana (entre 1837-1890), sobre todo formando parte de una gran variedad de ensaladas. Muchas de estas flores también solían consumirse como encurtidos, almacenándose para su uso posterior durante los meses invernales cuando las flores frescas no estaban disponibles (Lynn, 2007). En China se siguen comiendo crisantemos, lirios, azucenas y después de una comida abundante es indispensable una infusión de jazmín, crisantemo y flor de loto. Así mismo, en Japón los crisantemos se comen crudos, en ensaladas o simplemente cocidos al vapor y aderezados con salsa de soya. En esta región son clásicos los dulces de

arroz con pétalos de rosas y con relleno de frijol de soya o flores de cerezo (Padilla de Ortiz, 2004). Los indígenas prehispánicos del altiplano (en México) utilizaban como alimento la flor de calabaza, el izote, la malva, el colorín, el tzonpantli, la flor de biznaga y la flor de mayo, entre otras (Padilla de Ortiz, 2004).

Actualmente en países donde es más común la ingestión de flores: España, Francia y Brasil, existe una gran cantidad de viveros orgánicos. En México, África y América Central también se siguen empleando muchas semillas, hojas y flores de plantas silvestres y son probablemente de las pocas regiones donde se usan para incluirlas en la dieta de la población, pues en muchas otras partes se destinan primordialmente a la medicina tradicional por sus propiedades curativas (Sotelo, 1997; Kislichenko and Vel'ma, 2006). No obstante, en los últimos 15 años ha resurgido la idea de utilizar las flores con fines culinarios (Lynn, 2007). Una lista parcial de flores comestibles que se usan en distintas partes del mundo se presenta en la Cuadro 1.

Cuadro 1. Flores comestibles.

Nombre común	Nombre científico	Sabor
Anís	<i>Pinpinella anisum</i>	Anís
Manzana	<i>Malus spp</i>	Floral
Arugula	<i>Eruca vesicaria sativa</i>	Picante
Borraja	<i>Borago officinalis</i>	Herbal
Brócoli	<i>Brassica officinalis</i>	Picante
Caléndula	<i>Caléndula officinalis</i>	Ligeramente amargo
Manzanilla	<i>Chamaemelum noblis</i>	Dulce de manzana
Cebollina	<i>Allium schoeonoprasum</i>	Cebolla
Diente de León	<i>Taraxacum officinale</i>	Miel
Daylily	<i>Hemerocallis spp</i>	Dulce
Clavel	<i>Dianthus spp</i>	Clavo de olor
Eneldo	<i>Anenthum graveolens</i>	Herbal

Eldeberry	<i>Sambucus canadensis</i>	Dulce
Chibirita	<i>Bellis perennis</i>	Ligeramente amargo
Pensamiento	<i>Viola tricolor</i>	Vino
Lila	<i>Syringa vulgaris</i>	Varios
Clavel de la india	<i>Tagetes patula</i>	Amargo
Cerezo	<i>Cerazus avium</i>	Ácido
Trébol rojo	<i>Trifolium pratense</i>	Dulce
Rosa	<i>Rosa spp</i>	Perfumado
Flor de los muertos	<i>Tagetes signata</i>	Picante y herbal
Calabaza	<i>Cucurbita pepo</i>	Vegetal
Girasol	<i>Helianthus annus</i>	Varios
Tulipán	<i>Tulipa spp</i>	Vegetal
Violeta	<i>Viola odorata</i>	Perfumado y dulce

(Lauderdale y Evans, 2007).

Por citar algunos ejemplos se tiene que la flor de capulín chino (*Prunus mume*) es una planta originaria de China que ha sido ampliamente cultivada y distribuida en Asia por más de 3000 años. Su fruto se consume frecuentemente en conserva o en vino. En la medicina tradicional de China, varias partes de la planta (fruta inmadura, flores, ramas, hojas, semillas y raíces) se han usado en la medicina herbolaria, particularmente las flores ejercen un uso esencial para el tratamiento de dolores de estómago o padecimientos de los ojos y la piel. Además de ser utilizados como expectorantes y sedantes o se incluyen en la preparación de diferentes comidas y bebidas, destacando como principal función de las flores de *Prunus mume*, la de su capacidad antioxidante que le confieren estas partes a la planta (Jiayi *et al.*, 2009). En Tailandia, se consumen normalmente las flores de *Sesbania javanica* Miq. en diferentes platillos de este país, pero también tienen una elevada incidencia de ser usadas en la medicina tradicional y son usadas como antiinflamatorios para las picaduras de insectos, los dolores intestinales, la curación de abscesos y el tratamiento de la fiebre.

Actualmente existe un gran interés en ella, debido a los estudios reportados recientemente en relación con sus propiedades antimutagénicas y a su alto contenido de flavonoides (Tangvarasittichai *et al.*, 2005).

Las flores de *Daylily* (*Hemerocallis fulva* Linn) han sido utilizadas como verduras o como hierba medicinal desde hace cientos de años en el norte de Asia. Sus raíces y hojas han sido aplicadas en tratamientos inflamatorios e ictericia. Estudios farmacológicos demuestran que las flores de Daylily pueden facilitar cambios neurológicos en el sueño en los ratones de laboratorio y producir un impacto en la actividad motora en las ratas como resultado de la alteración de los niveles normales de neurotransmisores o alterando varios de estos en sistema nervioso central (Zhang *et al.*, 2004). Extractos de estas flores han mostrado una inhibición en la proliferación del cáncer de colon (Cichewicz *et al.*, 2004).

En México, debido a la biodiversidad vegetal que posee, muchas hojas y flores han sido consumidas desde antes de la conquista de Mesoamérica y este hábito persiste hoy en día en mucha gente de diversas culturas con distintos niveles económicos (Castelló y Piña-Lujan, 1987). De tal forma que el consumo de flores en nuestro país no es novedad y a pesar de que el mercado de la flor comestible no es muy grande, actualmente existen productores que cosechan las flores para el consumo humano (García y Villarubia, 2003). Muchas flores de plantas silvestres son colectadas y consumidas localmente en diferentes áreas durante la estación en que florecen. En nuestro país la flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) es altamente demandada, la planta se cultiva principalmente por las flores que son preparadas de diversas formas para incluirse en la dieta (Sotelo *et al.*, 2007).

3.1.1 Consumo de las flores

Desde tiempos inmemoriales las flores han jugado un papel muy importante en la alimentación de muchas regiones indígenas, hoy en día se establece un interés renovado en dichos productos naturales gracias a que poseen una gran variedad de colores, aromas y sabores inusuales (Barash, 1997),

cuyas características son utilizadas como ingredientes en diversos restaurantes que buscan dar un toque especial y sabores propios a sus exquisitos platillos (Sotelo *et al.*, 2007), además de las propiedades benéficas que poseen para la salud. De tal forma que quizá esté muy cerca el día en que podamos comprar los pétalos frescos empacados en la sección de especias de los supermercados, ya que el cultivo orgánico de flores para consumo humano es una tendencia que se disemina cada vez más por el mundo (García y Villarubia, 2003). Las flores son usadas tradicionalmente en muchos estilos de cocina entre las cuales se encuentran: el Europeo, el Asiático, el Hindú, el Oriental, el Medio Oriental y el Victoriano; siendo utilizadas como ensaladas, guarniciones o bien como parte íntegra de un platillo (Lauderdale y Evans, 2007).

Existen otros usos de las flores, entre los cuales se encuentran que pueden también freírse después de ser cubiertas con harina de maíz, utilizarse como ingredientes para helados, bebidas preparadas, jaleas, mermeladas, tés y vinos o bien agregarse a mantequillas herbales y queso para untar. Otras también son usadas para marinar las comidas o preparar vinagres y aderezos. Las flores normalmente tienen el sabor de sus plantas con excepción de la manzanilla y la lavanda las cuales poseen un sabor más sutil (Lauderdale y Evans, 2007).

3.1.2 Composición química y valor nutricional

Existe escasa información acerca del valor nutricional de muchas flores. Sotelo *et al.*, (1997) desarrollaron un estudio del contenido nutrimental de flores silvestres en regiones de México (Hidalgo, Puebla y D.F.), donde se reporta un alto contenido de nutrientes similar al de las semillas y hojas de su respectiva planta de lugares como México y África.

En estudios previos se ha determinado la composición nutrimental de semillas de plantas silvestres, principalmente leguminosas, donde se reporta que las proteínas son los principales componentes (Ruíz y Sotelo, 2001). Así mismo, un alto contenido de proteínas se ha reportado en hojas y flores, de igual forma los minerales se encuentran en elevada proporción (Glew *et al.*, 1997). Sin embargo,

es importante realizar estudios para descartar la presencia de agentes quelantes (fitatos, oxalatos y taninos) (Sotelo *et al.*, 2007). Subsecuentemente esto no proporciona suficiente información acerca de la composición química y el valor nutricional de las flores de plantas silvestres mexicanas (Sotelo *et al.*, 2007) por lo cual es importante indagar aún más sobre este tema.

Por otra parte, se ha mostrado que el nivel de plaguicidas en estos alimentos es muy alto (García y Villarubia, 2003) y aún no han sido evaluados para determinar su inocuidad alimentaria, por lo cual es importante resaltar que deben consumirse únicamente aquellas flores que estén libres de cualquier residuo químico y que hayan sido cultivadas de manera orgánica con el único propósito de ser consumidas, ya que muchas de ellas pueden causar alergias o toxicidad. Sin perder de vista que el polen que poseen algunas de ellas pueden provocar cuadros alérgicos, por lo cual se ha establecido que es importante eliminarlo, así como las partes reproductivas (PSU, 2002). Se ha establecido que muchas especies poseen algunos factores antinutricionales y componentes tóxicos pero en bajas concentraciones (Sotelo, 1996; Sotelo *et al.*, 2007), sin embargo, a través del tiempo la gente ha aprendido a eliminarlos o disminuirlos, transmitiendo la información de generación en generación, como es el caso de las especies de *Erythrina* las cuales poseen un alto contenido de alcaloides (Sotelo, 1997; García-Mateos *et al.*, 1996). De tal forma que son eliminados durante el proceso de cocción para lograr que la concentración disminuya y no se presenten efectos perjudiciales a la salud al ser consumidos.

3.2 Flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.)

3.2.1 Botánica

Es una planta rastrera o trepadora cuyo ciclo es anual y alcanza una longitud de 10 metros. Su tallo es hirsuto y acanalado; las hojas que miden hasta 10 cm son acorazonadas, lobuladas y unisexuales con el cáliz unido a la corola. Existen diversas especies que pertenecen al género de *Cucurbita*, entre las más importantes se encuentran: *C. pepo*, *C. mostacha*, *C. mixta*, *C. máxima*, *C. ficifolia*. Las dos primeras son originarias de América y ampliamente distribuidas en el norte y el sur, ninguna de ellas se conoce en estado silvestre, por lo que se ha establecido que son producto de la domesticación. *C. pepo* se ha identificado como la calabaza de verano y se consume en su estado inmaduro, no así *C. mostacha* y *C. máxima* que son consumidas en su estado maduro y han sido clasificadas como las calabazas de invierno (Salunkhe y Kadam, 1998).

Los cultivares de calabaza son comúnmente divididos en dos clases: arbustos y bayas. Los arbustos (calabazas de verano) producen muchos tallos cortos entrelazados y frutos que poseen carne tierna, con semillas y piel blanda que se llevan a su maduración para ser almacenados por largos periodos y consumirlos posteriormente. Las bayas (calabazas de invierno) poseen frutos ricos en pulpa que tienen la característica de ser firmes con semillas gruesas y piel dura (Salunkhe y Kadam, 1998).

3.2.2 Suelo y clima

Los suelos arenosos y limosos con un pH que va de un rango de 6.5 a 7.5 son ideales para el óptimo crecimiento de estas plantas pues en estas condiciones los cultivos se desarrollan de una mejor manera y producen frutos de excelente calidad. Ambos cultivos (*C. pepo* y *C. mostacha*) requieren de una adecuada cantidad de nutrientes esenciales y por lo tanto se requiere de suelos fértiles para las cosechas. La temperatura apta para desarrollarse va de los 18 a 27 °C, siendo lo ideal de 18 a 20.5 °C. Los cultivos toman de 3 a 4 meses para emerger el fruto

maduro en la especie de verano, sin embargo la especie de invierno únicamente requiere de unos 40 a 50 días (Salunkhe y Kadam, 1998).

México se ha reconocido durante mucho tiempo como una de las regiones importantes en la domesticación de cultivos de *Cucurbita pepo* L. desde el año 8,000 A.C., junto con el maíz (*Zea mays*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), algodón (*Gossypium hirsutum*) y chile (*Capsicum annuum*) (Lentz *et al.*, 2007). Se cultiva durante todo el año como verdura o con propósitos médicos. Entre los beneficios farmacológicos de varias especies de calabaza se encuentran: antidiabético, antihipertensivo, antitumoral, antimutagénico, inmunomodulador, hipocolesterolémico y antiinflamatorio (Esuoso *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 2006).

Cucurbita pepo L. es una planta anual y monoica, es decir, que posee en la misma planta flores masculinas y femeninas en diferentes lugares. Sus flores son ampliamente distribuidas en Europa, Asia y América (Leman *et al.*, 2007). Las flores machos se localizan al final de los tallos delgados y estas polinizan a las flores hembras (Figura 1), las cuales se presentan al extremo de los pedúnculos cortos tienen una forma bien definida y poseen un ovario en la base de la corola que está dividido en tres secciones (Figura 2). Normalmente los agentes polinizadores de estas plantas son las abejas, pero existen otros insectos que realizan dicha función (avispas o polillas). Las abejas son necesarias para transferir el polen (llevándolo en sus extremidades) de la flor macho a la flor hembra la cual produce una mayor cantidad de néctar y atrae más a los insectos que las flores machos; éstos últimos, en cambio, preparan los granos de polen para ser transportados hacia las hembras (De Menezes *et al.*, 2005, Leman *et al.*, 2007). Cabe mencionar que el viento no es capaz de polinizar a las especies de *Cucurbita* (De Menezes *et al.*, 2005).



Figura 1. Flor de calabaza macho (*Cucurbita pepo* L.)

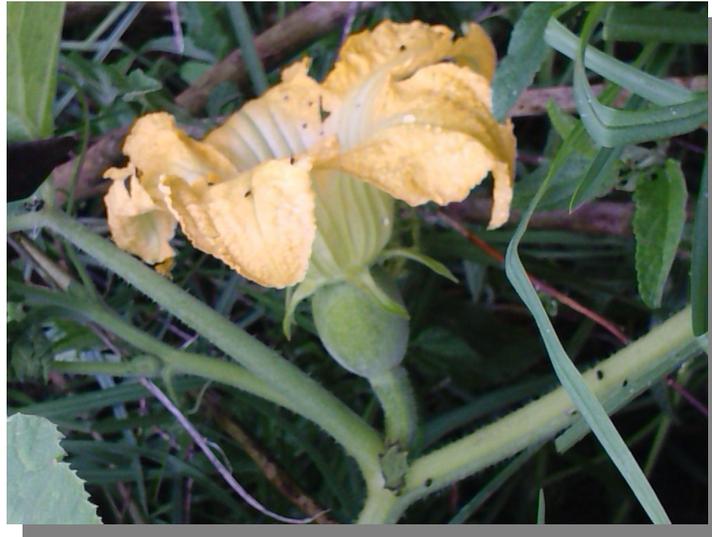


Figura 2. Flor de calabaza hembra (*Cucurbita pepo* L.)

Wolfenbarger (1965) reportó que las plantas pertenecientes a la especie *Cucurbita pepo* L. polinizadas de forma natural por los insectos, tenían un rendimiento del 500% en comparación con las puestas a prueba con insectos en invernaderos. Actualmente gracias a investigaciones genéticas se ha demostrado que *Cucurbita pepo* L. puede crecer aún cuando la estación en la que florece dicha especie no es la adecuada o cuando los insectos polinizadores se encuentran ausentes, ya que la reducción en las poblaciones de las abejas en muchas áreas del mundo ha afectado desfavorablemente la polinización de la cosecha de las plantas (De Menezes *et al.*, 2005) de manera que, Skinner y Lovett (1992) mostraron que las plantas prescindidas de polinizadores no producen frutos.

La viabilidad del polen en una flor masculina recién abierta es del 92% aproximadamente, disminuye a 75% por el cierre de la flor en ese mismo día y es de sólo 10% al día siguiente (Nepi y Pacini, 1993). Por lo anterior, las flores hembras deben polinizarse lo más pronto posible, es decir, en el día en que la flor macho abre, para tener la seguridad de que el polen se encuentra viable (De Menezes *et al.*, 2005). Las flores abren temprano por la mañana y cierran al medio día (Free, 1992; Nepi y Pacini, 1993). Posteriormente, el desarrollo de fruta después de la polinización y la fertilización es activado por la acción coordinada de las hormonas del crecimiento, las cuales son proporcionadas y reguladas por los granos de polen, el cual es el encargado de desarrollar a las semillas (Gillaspy *et al.*, 1993).

3.2.3 Contenido nutrimental

Habitualmente el fruto es utilizado como verdura, cuya pulpa es rica en provitamina A, así como en calcio y fósforo. La pulpa puede consumirse en dulce y en conserva como confitura. Las hojas y puntas tiernas se consumen en Mesoamérica y algunos países fuera de la región (FAO, 1993). En los últimos años ha surgido un interés renovado en sus semillas, ya que poseen un elevado valor nutricional. Se ha establecido que contienen muchos esteroides y vitaminas entre las cuales se encuentran principalmente vitaminas B y E y minerales como el

Ca, P, K, Mg, Mn, Fe, y Zn. El selenio se encuentra en cantidades moderadas, sin embargo, varios estudios han demostrado que la adición adecuada de dicho mineral promueve el crecimiento de la planta y además suponen un incremento en la capacidad antioxidante, ayudando a disminuir el estrés oxidativo en estas plantas (Smrkolj *et al.*, 2005). Las semillas de calabaza han sido usadas por siglos en la medicina tradicional del norte de América y México principalmente como agentes antihelmínticos, en problemas de riñón y trastornos del tracto urinario. La fruta por su parte, contiene un 50% de aceite, carotenoides, proteínas, tocoferoles, fitoesteroles y fitoestrógenos (Matus *et al.*, 1993).

En lo que se refiere a las flores, recientemente Sotelo *et al.*, (2007) realizaron una investigación sobre el contenido de nutrientes en varias especies de flores comestibles mexicanas, donde incluyeron a la flor de *Cucurbita pepo* L. En el Cuadro 2 se presentan dichos resultados, en donde se observa que estas partes de la planta poseen una importante cantidad de minerales. Así mismo, en el Cuadro 3 se presentan los resultados pertenecientes al contenido de aminoácidos cuyos resultados de igual forma son elevados.

Cuadro 2. Composición bromatológica de las flores de *Cucurbita pepo* L.

	Composición (g/kg)
Proteína Cruda	219 ± 4
Cenizas	159 ± 3.4
Fibra	105 ± 3
Extracto Etéreo	50 ± 0.8
Minerales	9.32 ± 26
Extracto libre de nitrógeno	471

(Sotelo *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Composición de aminoácidos de las flores de *Cucurbita pepo* L.

Aminoácido	Composición (%)	Media ± DS
Ácido aspártico	5.54	10.01 ± 0.12
Serina	5.42	9.79 ± 0.05
Ácido glutámico	17.07	30.82 ± 0.11
Glicina	5.38	9.71 ± 0.02
Histidina	1.58	2.85 ± 0.09
Arginina	5.47	9.88 ± 0.10
Alanina	5.98	10.79 ± 0.11
Prolina	4.78	8.63 ± 0.01
Treolina	3.16	5.71 ± 0.06
Valina	7.61	13.74 ± 0.05
Lisina	5.75	10.39 ± 0.03
Isoleucina	5.39	9.73 ± 0.05
Leucina	8.97	16.21 ± 0.01
Tirosina	5.12	9.24 ± 0.03
Fenilalanina	7.50	13.54 ± 0.16
Metionina	1.72	3.11 ± 0.02
Cisteína	1.81	3.27 ± 0.01
Triptófano	1.75	3.16 ± 0.03

(Sotelo *et al.*, 2007).

Por otro lado, se sabe que algunas flores comestibles poseen factores tóxicos. Estos mismos autores, también incluyeron dichos estudios en esta especie, observando únicamente valores de 1.40 ± 0.09 (TUI/mg de muestra en base seca) para los inhibidores de tripsina. No se detectó actividad hemoaglutinante, actividad hemolítica y contenido de alcaloides.

Las flores de esta especie también son una buena fuente de ácido fólico y carotenoides y son a menudo prescritas a pacientes que presentan: letargo, embarazo y anemia (Leman *et al.*, 2007).

En cuanto al contenido de fitoquímicos se refiere, Leman *et al.*, (2007) desarrolló un estudio relacionado con la capacidad antioxidante y propiedades *in vitro* de flores machos y hembras. Dichos autores reportaron que los extractos de la flor de calabaza hembra ($0.184 \pm 0.03 \mu\text{g}$ ácido gálico/ml) contienen mayor concentración de fenoles totales en comparación con los extractos de flor macho ($0.119 \pm 0.01 \mu\text{g}$ ácido gálico/ml). Ambos extractos (macho y hembra) poseen una alta capacidad para secuestrar el radical 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH) la cual es dependiente de la concentración.

Adicionalmente los efectos antiinflamatorios y cardioprotectores de *Cucurbita pepo L.* pueden relacionarse con una actividad sobre las células inmunocompetentes (Winkler *et al.*, 2005).

3.3 Metabolitos Secundarios

Los productos naturales orgánicos son sustancias derivadas del metabolismo secundario de las plantas, los cuales participan directamente en los mecanismos de defensa y supervivencia, ayudando a la planta a protegerse contra herbívoros e insectos (Delgado, 2005).

A partir de plantas sólo se han aislado y caracterizado más de 110 mil metabolitos secundarios y se estima que quedan varios millones de sustancias por descubrir ya que sólo se han analizado una ínfima parte de las fuentes naturales disponibles (Pietra, 2002). Así, la diversidad de los metabolitos secundarios, puede circunscribirse a una serie de grupos estructurales denominados terpenoides, acetogeninas, fenoles, flavonoides y alcaloides, por mencionar algunos. Esta diversidad estructural, puede racionalizarse al tomar en cuenta las rutas biosintéticas mediante las cuales los organismos vivos fabrican estos productos naturales. De tal forma que, los terpenoides provienen de la ruta de la

acetil-coenzima A y del ácido mevalónico, los compuestos aromáticos provienen de la ruta del ácido shikímico, mientras que las acetogeninas provienen de la ruta de la acetil-coenzima A (Delgado, 2005).

3.3.1 Polifenoles

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen uno de los más grandes grupos de metabolitos secundarios de las plantas, con más de 800 estructuras fenólicas descubiertas actualmente, que pueden ir desde moléculas simples como son los ácidos fenólicos, fenilpropanoides y flavonoides (siendo estos últimos el subgrupo más conocido), hasta los altos compuestos polimerizados (ligninas, melaninas, taninos) (Soobrattee *et al.*, 2005).

3.3.1.1 Naturaleza de los polifenoles

Los polifenoles se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y por consiguiente forman parte importante de la dieta en cantidades significativas, principalmente en alimentos provenientes de las plantas, considerándose a las frutas y a las verduras las principales fuentes de dichos compuestos (Scalbert and Williamson, 2000). Frutas como la manzana, la uva, la pera, la cereza y varias frutillas contienen alrededor de 200-300 mg/100 gr de peso fresco de tales componentes. Así mismo los cereales, bebidas estimulantes (chocolate y café) y algunas leguminosas también los contienen en cantidades considerables (Scalbert *et al.*, 2005).

Aunque el consumo de fenoles varía considerablemente entre regiones geográficas, se estima que el intervalo de consumo total se encuentra de 20 mg a 1 g/día (Soobrattee *et al.*, 2005), siendo éste valor más alto que el reportado para otros antioxidantes conocidos, de manera que, es cerca de 10 veces más que la vitamina C y 100 veces más que la vitamina E y los carotenoides (Scalbert and Williamson, 2000).

3.3.1.2 Propiedades antioxidantes de los polifenoles

El reciente interés por estudiar a los polifenoles se explica debido a la complejidad estructural, la cual le confiere una gran variedad de propiedades biológicas. Estudios moleculares han revelado que dichos compuestos ejercen acciones moduladoras en las células por su interacción con un amplio espectro de moléculas centrales en la maquinaria de señalización celular (Soobrattee *et al.*, 2005).

Por otra parte, investigaciones en modelos de animales sobre estos compuestos, han mostrado que cuando son incluidos en la dieta limitan el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas como diabetes, cáncer y osteoporosis (Scalbert *et al.*, 2005). De tal forma que los polifenoles se consideran sustancias potencialmente activas como agentes profilácticos debido a su alta prevalencia en la dieta y además a sus efectos plurifarmacológicos entre los cuales destacan un amplio rango de efectos biológicos: antibacteriales, antiinflamatorios, antialérgicos, hepatoprotectores, antitrombóticos, antivirales, anticarcinogénicos, antimutagénicos y vasodilatadores (Middleton *et al.*, 2000).

Recientemente se ha establecido que tales efectos se presentan debido a la capacidad antioxidante que poseen (Jiayi *et al.*, 2009). En relación con lo anterior, se sabe que el daño oxidativo de las moléculas biológicas del cuerpo humano está relacionado con procesos degenerativos patológicos como diabetes, enfermedades coronarias y cáncer. Dichos padecimientos llevan implícitos la formación de radicales libres que causan daño oxidativo a las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos que contribuyen a la degeneración de células somáticas y a la patogenia de estas enfermedades (Scalbert *et al.*, 2005). Los antioxidantes presentes en los alimentos pueden limitar este daño por acción directa sobre las especies reactivas de oxígeno a través de la simulación de la defensa de los sistemas endógenos. Los polifenoles pueden aceptar un electrón para formar

radicales relativamente estables, rompiendo las cadenas de oxidación de los componentes celulares (Scalbert *et al.*, 2005).

3.3.1.3 Flavonoides y ácidos fenólicos

Los principales tipos de polifenoles son definidos de acuerdo a la naturaleza de sus esqueletos de carbono, siendo los flavonoides y los ácidos fenólicos los más ampliamente reconocidos. Los flavonoides son los más abundantes en la dieta y son a su vez distribuidos en diversas clases, de acuerdo al grado de oxidación del oxígeno heterocíclico: flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, isoflavonas, proantocianinas y antocianinas (Scalbert *et al.*, 2005). Entre los más comunes se tiene a la quercetina presente en las manzanas, algunos vegetales y principalmente en la cebolla (0.3 mg/g de peso fresco) y el té (10-25 mg/L) (Hertog *et al.*, 1993); la catequina un flavanol encontrado en el té verde (1g/L) (Lee y Kader, 2000) y en diversas frutas; la hesperitina un flavanol presente en las frutas cítricas. Las antocianinas como la cianidina, las cuales podemos hallar como pigmentos de frutas de color rojo como la fresa y la frambuesa (0.15 a 4.5 mg/g de peso fresco) y en el vino tinto cuyo contenido promedio es de 26 mg/L (Clifford, 1996). La daidzeina la principal isoflavona del frijol; las proantocianinas, comunes en muchas frutas como la manzana, la uva y de igual forma se encuentra presente en la cocoa; estas son las responsables del sabor astringente y ácido de los alimentos (Figura 3).

Por otro lado, uno de los ácidos fenólicos más comunes es el ácido caféico que se encuentra en forma de ésteres como el ácido clorogénico y está presente en muchas frutas y vegetales. Otro componente perteneciente a esta clasificación es el ácido ferúlico disponible en la pared celular de los cereales. Finalmente los taninos hidrolizados que son ácidos fenólicos que esterifican para un poliol (Scalbert *et al.*, 2005) (Figura 3).

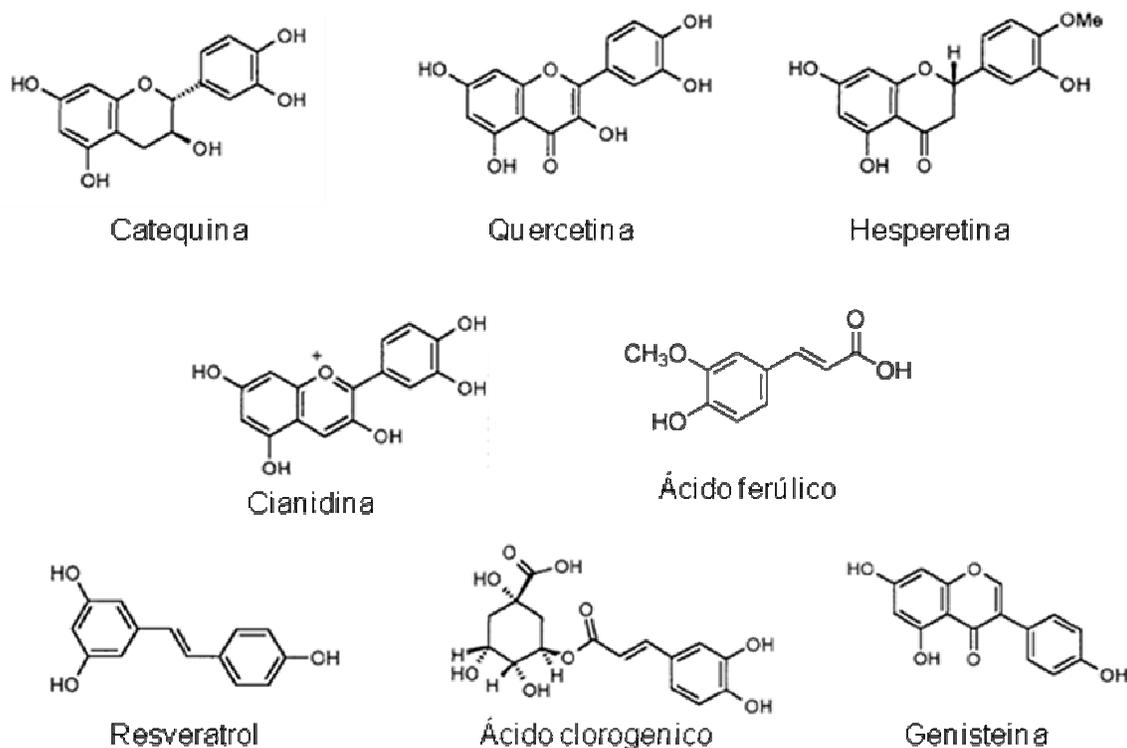


Figura 3. Estructuras químicas de las principales clases de polifenoles (Scalbert, *et al.*, 2005)

3.3.2 Carotenoides

Los carotenoides han atraído por más de un siglo el interés de investigadores de diferentes áreas del conocimiento incluyendo la química, bioquímica, biología, ciencia y tecnología de los alimentos, medicina, farmacia y nutrición. Y estos fascinantes compuestos continúan siendo investigados profusamente (Rodríguez-Amaya *et al.*, 1999). Los carotenoides son pigmentos naturales sintetizados por las plantas y por los microorganismos. Se encuentran presentes en hojas, raíces, semillas, frutas y flores como pigmentos fotosintéticos y como entidades fotoprotectoras (Voutilainen *et al.*, 2006). Tienen la capacidad de absorber luz visible (Paiva y Rusell, 1999) y son los responsables de dar el color rojo y amarillo a muchas frutas y verduras (Voutilainen *et al.*, 2006). Forman una amplia categoría de moléculas que incluyen a los carotenos y a las xantofilas y

son parte de una larga clasificación de moléculas llamadas terpenoides e isoprenoides (Wildman, 2001)

De más de 600 carotenoides que se encuentran en la naturaleza y que han sido caracterizados, alrededor de 40 están presentes en la dieta típica de los humanos. De éstos sólo 14 han sido identificados en la sangre y los tejidos (Crews *et al.*, 2001); en este sentido, cabe mencionar que las concentraciones en el plasma son consideradas como biomarcadores del consumo de frutas y verduras (Voutilainen *et al.*, 2006); los más comunes son el licopeno, luteína, α caroteno, β caroteno, β criptoxantina y zeaxantina. La síntesis de los carotenoides sigue la ruta metabólica del isoprenoide cuya secuencia en las plantas es la siguiente: fitoeno-fitoflueno- ζ caroteno-neurosporeno-licopeno- γ caroteno y β caroteno (Paiva y Rusell, 1999).

Los carotenoides junto con otros dos pigmentos fotosintéticos (clorofilas y ficobilinas) están involucrados en la absorción de la energía luminosa en forma de fotones, atrapada por los sistemas de enlaces dobles conjugados que caracterizan a dichos pigmentos quienes permiten un mayor intervalo de longitud de onda y de absorción de fotones en la región azul del espectro luminoso (400 a 500 nm) (muestran una coloración amarilla, con una excepción del pigmento primario rojo del tomate, llamado licopeno) (Khachik *et al.*, 2002) Los pigmentos se pueden encontrar unidos a proteínas en estructuras fotosintéticas de cloroplastos de las plantas y son producidos con propósitos reproductivos, tal es el caso de la pigmentación de las flores que permite atraer y guiar a los insectos polinizadores hacia ellas (Wildman, 2001).

Varios efectos biológicos han sido atribuidos a los carotenoides y por ello se han reconocido como sustancias beneficiosas, de tal forma que muchos estudios epidemiológicos han relacionado el alto consumo de los carotenoides y la baja incidencia de enfermedades crónico degenerativas. Un posible mecanismo de acción es la actividad antioxidante, ya que poseen la capacidad de atrapar eficientemente los radicales libres y también muestran un efecto protector contra

las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en oxidaciones *in vitro*: sin embargo, otros mecanismos podrían estar implicados en sus efectos benéficos (Voutilainen *et al.*, 2006), entre los que destacan: su conversión a retinol por la actividad de la provitamina A, modulan actividades enzimáticas de las lipogenasas (moléculas proinflamatorias e inmunomoduladoras), poseen propiedades antioxidantes que han sido observadas anteriormente con la vitamina A, activan la expresión de genes con la codificación de mensajes para la producción de proteínas. Sin embargo, los mecanismos biológicos de protección son aún inciertos (Paiva y Rusell, 1999). Entre otras funciones de los carotenoides se encuentran: inmunomodulador, inhibidores de carcinogénesis, protección contra el ADN y contra la peroxidación (Tapiero *et al.*, 2004).

3.4 Procesamiento de frutas y vegetales

Durante siglos el almacenamiento y el procesamiento de alimentos se han utilizado para transformar las frutas y los vegetales (los cuales pertenecen al grupo de alimentos más perecederos) en productos seguros, estables y de alta calidad (Rickman *et al.*, 2007). En décadas recientes las porciones de vegetales mínimamente procesados y/o procesados en los supermercados se ha incrementado considerablemente, cuyo objetivo ha sido aumentar su vida de anaquel, sin embargo, como consecuencia de ello su integridad estructural es frecuentemente alterada. Una pérdida significativa de nutrientes puede ocurrir como resultado de una degradación térmica o lixiviación durante la esterilización, o pasteurización y deshidratación. También durante el almacenamiento y con los métodos de cocción tradicionales utilizados comúnmente en casa (Kalt, 2005), resultando también en un menor contenido de humedad, una menor tasa de la respiración y disminución en el crecimiento de algunos microorganismos, además de presentarse distintos cambios químicos (Rickman *et al.*, 2007).

El secado ha sido desde tiempos remotos un medio de conservación de alimentos cuyos objetivos son disminuir el peso para fines de transportación y almacenamiento y disminuir el agua presente en ellos la cual puede ser eliminada

por condiciones ambientales o por una variedad de procesos controlados los cuales utilizan técnicas que emplean diferentes medios como: el calor, el aire, el frío y la ósmosis (el agua se elimina de 1- 5%), donde se alcanzan niveles de hasta un 15% de agua eliminada (Rickman *et al.*, 2007). La refrigeración permite una tasa de respiración más baja y por lo tanto da lugar a una vida de anaquel más larga del alimento de varios días o semanas. Por el contrario el congelamiento, enlatado y secado transforman dichos alimentos en productos que pueden ser consumidos alrededor de todo el año y que pueden transportarse de manera segura alrededor de todo el mundo, ya que conservan el alimento durante meses o años (Rickman *et al.*, 2007).

3.4.1 Efectos del procesamiento sobre las características fisicoquímicas y nutrimentales de los vegetales

Existe amplia literatura que ha reportado a través de los años los efectos del almacenamiento, procesamiento y cocción sobre la calidad nutricional de las frutas y los vegetales. El lavado, el pelado y el blanqueado, que son pasos preliminares en algunos procedimientos, son los responsables de la pérdida de nutrientes solubles en agua que presentan estos productos y dependiendo del procesamiento que se lleve a cabo, se pueden presentar también cambios en la textura, el color, el sabor y la calidad nutrimental (Rickman *et al.*, 2007).

Los componentes de los alimentos que más sufren cambios durante el procesamiento y que podrían alterar su valor nutritivo son: proteínas, grasas y vitaminas. Los cambios pueden implicar la destrucción o bien modificaciones químicas que afectan la biodisponibilidad o propiedades biológicas. Los procesos térmicos asociados frecuentemente con el enlatado y los tratamientos como el blanqueado (el cual es un importante paso antes del enlatado y congelado en muchos vegetales) modifican algunos nutrientes sensibles al calor como el ácido ascórbico (vitamina C) y la tiamina (Fennema, 1982). Por lo cual muchos estudios en vegetales son enfocados a los efectos sobre estas vitaminas.

En el caso del ácido ascórbico en varios estudios realizados, se ha observado un decremento considerable durante las condiciones del horneado y enlatado en diversos alimentos vegetales (Rickman *et al.*, 2007). Así mismo los que han sido sometidos a dicho procesamiento y fueron almacenados presentan una disminución del 15% en comparación con los productos almacenados frescos y congelados (Rickman *et al.*, 2007).

Por otra parte, muchos de los vegetales son sometidos a métodos de cocción antes de ser consumidos, en relación a lo anterior, se sabe que los métodos a los que son sometidos inducen significativamente cambios en la composición química influyendo en la concentración y biodisponibilidad de compuestos bioactivos en los vegetales (Miglio *et al.*, 2008). Sin embargo, los efectos negativos o positivos dependen de las diferencias en las condiciones de los procesos así como de las características nutricionales y morfológicas de cada especie vegetal (Ou *et al.*, 2002; Bernhardt y Schlich, 2006; Podsêdek, 2007), por lo cual la magnitud de la degradación es dependiente del método de cocción, de los nutrientes y del alimento. El proceso de cocción en microondas presenta resultados controversiales en la literatura con respecto al contenido de compuestos que promueven la salud (vitaminas, minerales y compuestos fenólicos), debido a las diferentes condiciones que son empleadas en los estudios realizados; entre las cuales se encuentran: el tiempo de cocción, la potencia que presente el horno de microondas (W) y la adición de agua durante el procedimiento (López-Berenguer *et al.*, 2007).

Las propiedades físicas de los vegetales también son ampliamente afectadas por los tratamientos térmicos. La textura y el color son considerados parámetros importantes en la calidad de los vegetales cocidos y estos pueden tener una fuerte influencia en la preferencia de los consumidores, debido a los cambios en la estructura (los cuales son frecuentemente provocados por la ruptura de la membrana celular) y a la menor calidad del color que exhiben en comparación con los vegetales frescos (Turkmen *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Howard *et al.*, (1999), quienes compararon zanahorias refrigeradas y frescas, sin cocinar y cocidas en microondas, congeladas y enlatadas, encontraron que no todos los métodos de cocción arrojaban valores bajos de ácido ascórbico, ya que la cocción en microondas podía aumentar el contenido de dicha vitamina en las zanahorias estudiadas. Aunque esto no fue un patrón general, dado que los resultados se expresaron en base húmeda y aparentemente el aumento puede atribuirse a la pérdida de sólidos solubles, los autores sugirieron que la tasa de difusión de ácido ascórbico fuera de la célula puede ser más lenta que la de otros sólidos tales como azúcares. Por otro lado, las zanahorias sometidas al enlatado presentaron un contenido de vitamina C más bajo, aunque estos resultados pueden ser insignificantes nutrimentalmente hablando, debido a que las zanahorias no son buenas fuentes de dicha vitamina.

Aunque el consumo de los vegetales frescos y sin procesar ha sido ampliamente defendido a través de los años, actualmente diversos estudios han demostrado que la biodisponibilidad *in vivo* de muchos compuestos fenólicos es mayor cuando son sometidos a algún método de cocción, a pesar de esto aún falta completar los efectos que pudieran tener tales procedimientos sobre las propiedades nutricionales en los vegetales (Link y Potter, 2004) pues la literatura a menudo habla de un solo vegetal (Glyszczyńska-Świgło, 2006), de una sola familia de hortalizas (Podsêdek 2006) o un solo grupo de fitoquímicos (Lee y Kader, 2000). Sandberg y Anderine (1986) sugirieron que los procesos a los que son sometidos los alimentos como la cocción, la fermentación y la molienda pueden reducir o eliminar los niveles de ácido fítico por alteración del hexafosfato de inositol a otras formas de degradación por ejemplo: penta, tetra, tri, di y monofosfato. El proceso de calentamiento podría destruir complementariamente los factores antinutricionales aunque también lo hace con la vitamina C. Por consiguiente es necesaria la información sobre el contenido de inhibidores y el efecto de los métodos de cocción para predecir la biodisponibilidad total de nutrientes especialmente hierro, calcio y zinc en estos alimentos (Somsu *et al.*, 2008).

IV. HIPÓTESIS

Las condiciones de temperatura, tiempo y vehículo característicos de los métodos de cocción modifican el contenido de compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante de la flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.).

V.OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

Evaluar el efecto de diferentes métodos térmicos de cocción en el contenido nutracéutico y capacidad antioxidante de la flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.).

5.2 Objetivos específicos:

5.2.1 Determinar el contenido de compuestos bioactivos de la flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) sometidas a diferentes tratamientos térmicos.

5.2.1.1 Determinar el contenido de fenoles totales en los extractos metanólicos obtenidos de las flores crudas y cocidas.

5.2.1.2 Determinar el contenido de carotenoides totales en los extractos hexánicos obtenidos de las flores crudas y cocidas.

5.2.1.3 Identificar y cuantificar por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) los ácidos fenólicos y flavonoides en las fracciones metanólicas.

5.2.1.4 Identificar y cuantificar por medio de HPLC los carotenoides presentes en las fracciones hexánicas.

5.2.2 Evaluar la capacidad antioxidante de la flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) sometidas a diferentes tratamientos térmicos.

5.2.2.1 Determinar la capacidad antioxidante de las fracciones metanólicas por medio de los ensayos DPPH, ABTS, FRAP y Capacidad quelante.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia General

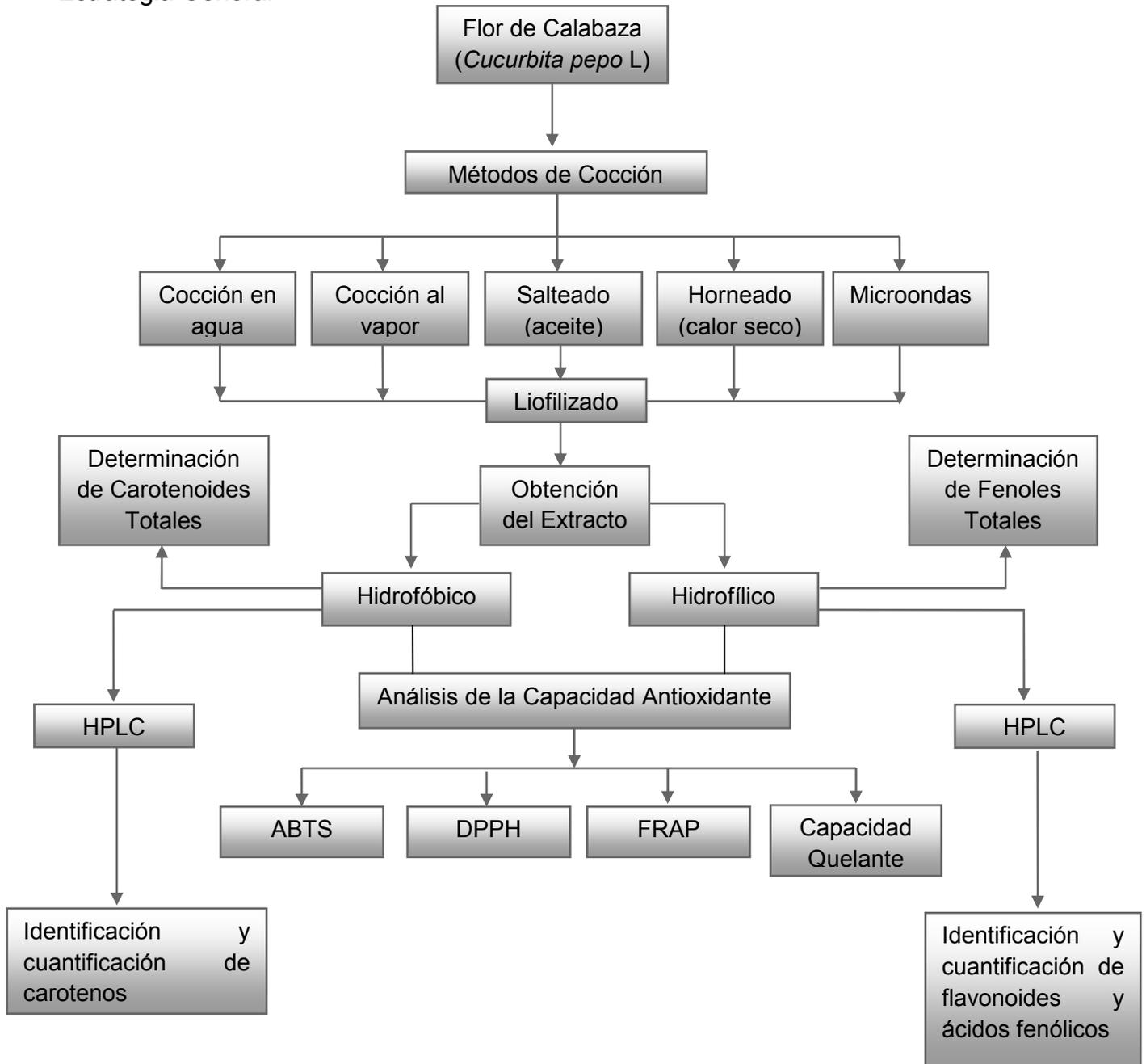


Figura 4. Diagrama de flujo de la estrategia general

6.1 Material Biológico

Las especies de flores de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) se obtuvieron de cultivos cosechados en el municipio de Tecozautla del estado de Hidalgo y se adquirieron en el mercado local de la Cd de Querétaro, Qro.

6.2 Métodos de cocción

Los métodos de cocción y conservación aplicados a las flores de calabaza fueron: cocción en agua, cocción al vapor, salteado, horneado y microondas. Una vez que se obtuvieron las flores, se eliminaron los sépalos y el tallo y se lavaron perfectamente con agua potable. Posteriormente, se mezclaron de manera homogénea y se dividieron en 5 porciones iguales de 100 gr cada una. Cinco de ellas se cocinaron y una porción se conservó en crudo.

Todos los métodos de cocción se realizaron por triplicado en el Instituto Gastronómico de Estudios Superiores (IGES S.C.). Posterior a su cocción todas las muestras se congelaron a -70°C por 24 hrs y posteriormente se liofilizaron durante 96 hrs (temperatura: -43°C y presión: 133×10^{-3} mbr). Finalmente las flores se trituraron en un mortero y se guardaron en recipientes herméticos conservándose en refrigeración hasta el momento de las determinaciones correspondientes. Es importante mencionar que previo a la cocción las flores fueron lavadas con abundante agua y se desinfectaron durante 10 min con una solución bactericida, cuyo ingrediente activo era la plata coloidal (0.08%). En la Figura 5 se muestra el diagrama general.

A) Cocción en agua

Las flores fueron sumergidas en aproximadamente 2 litros de agua (97°C) en una olla de acero inoxidable durante 8 min. Transcurrido este tiempo, las muestras se escurrieron y se dejaron enfriar para posteriormente ser almacenadas en bolsas de plástico.

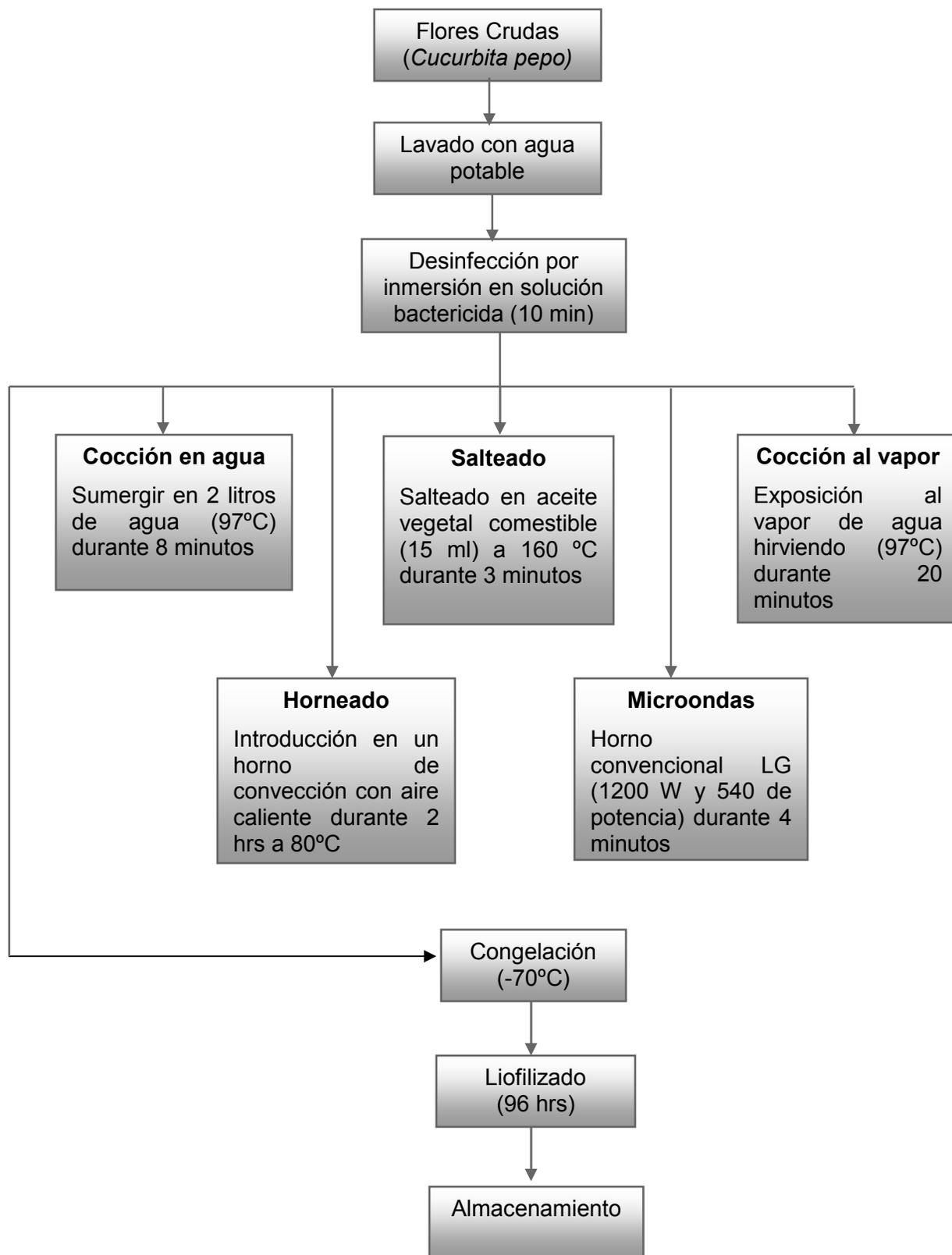


Figura 5. Diagrama de flujo de los métodos de cocción

B) Cocción al vapor

El proceso de cocción al vapor se llevó a cabo en una vaporera de aluminio con rejilla integrada con la finalidad de que las flores se cocieran al vapor. El proceso tuvo una duración de 20 minutos.

C) Salteado

Las flores fueron salteadas en una sartén de acero inoxidable de doble fondo (que conserva y distribuye uniformemente la temperatura) con 1 cucharada (15 ml) de aceite vegetal comestible a una temperatura aproximada de 160°C durante 3 minutos. Primeramente se utilizó fuego alto y a los 1.5 minutos se disminuyó el fuego para terminar la cocción.

D) Horneado

Por cuestiones culinarias, previo al secado fueron eliminados el cáliz y el pistilo a cada una de las flores. Se utilizó un horno de convección (Dobra) con circulación de aire caliente. El proceso se llevó a cabo durante a 80°C durante 2 hrs aprox. en charolas de aluminio perfectamente limpias donde se extendieron las flores entre 2 tapetes de teflón.

E) Microondas

Estos aparatos poseen un tubo llamado magnetrón que difunde ondas electromagnéticas de muy alta frecuencia (2450 MGh) en un recinto cerrado. Las microondas no atraviesan las paredes metálicas del horno, por lo que penetran los alimentos por todos lados generando una elevación de la temperatura lo que provoca la vibración de las moléculas de agua e iones presentes en los alimentos. Las flores fueron colocadas en un recipiente de cristal y se cocinaron en un horno de microondas convencional LG con 1200 W y 540 de potencia. La cocción se llevó a cabo durante 4 minutos y se detuvo al minuto transcurrido para mover la muestra.

6.3 Obtención de los extractos

6.3.1 Extracto hexánico

Se pesaron 1.5 mg de la flor de calabaza previamente liofilizada y molida. Se realizó una extracción por maceración agregando 30 ml de hexano y se agitó la solución a temperatura ambiente durante 2 hrs. Posteriormente la solución se filtró en papel Watman (num 4) realizando varios lavados al residuo con el mismo solvente.

Una vez obtenido el extracto, éste se concentró en un rotaevaporador (BÜCHI B490) bajo condiciones de obscuridad y en material cubierto con papel aluminio, llevándolo a sequedad a una temperatura de 30 °C. Cada extracto se conservó en congelación (-4 °C) hasta el momento de los análisis correspondientes.

6.3.2 Extracto Metanólico

El extracto metanólico se obtuvo mediante la técnica de extracción continua, donde el residuo del extracto hexánico se secó a temperatura ambiente y se colocó en un equipo Soxhlet a reflujo en durante 8 hrs aproximadamente, el solvente utilizado para la extracción fue metanol (200 ml) al 100%. De igual manera, los extractos se concentraron en un rotaevaporador (BÜCHI B490) bajo condiciones de obscuridad y en material cubierto con papel aluminio, se llevó a sequedad a una temperatura de 35 °C. Una vez obtenidos los extractos se conservaron en congelación (-4°C) hasta el momento de los análisis correspondientes.

6.4 Identificación de metabolitos secundarios:

6.4.1 Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó en los extractos metanólicos de acuerdo al método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Dewanto, 2002). Se agregaron 50 μ l del extracto obtenido previamente y se realizaron las diluciones apropiadas. Una vez obtenidas las soluciones, se hicieron reaccionar con 250 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y se colocaron en un baño sonicador durante 5 minutos, posteriormente se agregaron 1250 μ l de una solución de NaCO_3 al 20%. Después de 2 hrs de un periodo de incubación a temperatura ambiente y en un lugar exento de luz se midió la absorbancia 760 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Se incluyó la lectura de un blanco preparado. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico/gramo de masa seca y todos los experimentos se realizaron por triplicado.

6.4.2 Determinación de carotenoides totales

Los procedimientos de extracción de los pigmentos se llevaron a cabo bajo condiciones de obscuridad y en material cubierto con papel aluminio. Se pesaron 1.5 gr de flor de calabaza previamente liofilizada y se agregaron en un matraz Erlenmeyer con 30 ml de hexano hasta que se cubrió la muestra y posteriormente se puso en agitación durante 2 hrs. Una vez obtenida la solución se llevó a un volumen final de 50 ml. Alícuotas de 0.5 ml de la solución fueron tomadas y se agregó 0.5 ml de acetona y 3 ml de una mezcla de solventes acetona:hexano (50:50) para obtener un volumen final de 4 ml y determinar la concentración de los carotenoides, la cual fue medida a 440 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Lamda 2S Perkin Elmer.

6.4.3 Identificación y cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides mediante HPLC

El análisis del contenido de fenoles de los extractos hidrofílicos obtenidos de la flor de calabaza en crudo y sometida a diferentes procesos de cocción se llevó a cabo mediante un equipo de HPLC Waters (Waters Corporation, Milford, MA, USA), el cual consiste en una bomba cuaternaria (modelo 600), un detector de arreglo de diodo (modelo 996), un desgasificador de vacío en línea (MetaChem Technologies Inc.) y un inyector Rheodyne (4793). En el cual se inyectaron 20 μ l de la muestra (disuelta en metanol) por duplicado en una columna de fase reversa (C18 Prep-Nova Pack HR, 60 Å, 6 μ m, 3.6-300 mm).

El control del equipo, el proceso y el manejo de la información cromatográfica se realizó con el programa Millennium (Waters). Se realizaron curvas estándar para llevar a cabo la cuantificación y las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: el gradiente de la fase móvil consistió de ácido acético (0.0125 N) como disolvente A y acetonitrilo (CH₃CN) como solvente B. La señal fue monitoreada a λ máx. 280 nm y el gradiente de elución programado se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones del gradiente de elución para cuantificar ácidos fenólicos y flavonoides.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Acido acético (%)	Acetonitrilo (%)
0 – 2	1	95 %	5 %
2 – 5	1	95 – 85 %	5 – 15 %
5 – 20	1	85 – 50 %	15 – 50 %
20 – 25	1	50 – 95 %	50 – 5 %
25 – 35 min	1	95 %	5 %

6.4.4 Identificación y cuantificación de carotenos mediante HPLC

La determinación de carotenos se realizó por medio de HPLC (equipo con las mismas características y la fase estacionaria mencionadas en la metodología propuesta para el contenido de fenoles totales). La identificación de los carotenos se llevó a cabo por el tiempo de retención de los componentes eluidos y los estándares puros, mediante el método de estándar externo. Para lo anterior, se utilizaron los extractos hexánicos obtenidos anteriormente, se pesó la cantidad necesaria de cada extracto y se solubilizó en 100 μ l del disolvente (mezcla acetona:hexano 50:50), después éstos fueron filtrados antes de ser inyectados (20 μ l) a través de una membrana de filtración de 0.2 mm. El flujo para carotenos fue de 0.9 ml/min en gradiente y la elución fue monitoreada a 454 nm. Los estándares β -caroteno y zeaxantina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Se realizaron curvas estándar para llevar a cabo la cuantificación de los carotenos y xantofilas respectivamente y las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: el gradiente de la fase móvil consistió en: acetonitrilo (CH_3CN) como solvente A, metanol (CH_3OH) como solvente B, acetato de etilo (0.05 de trietilamina) como solvente C. El gradiente de elución programado se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5 .Condiciones del gradiente de elución para cuantificación de carotenoides.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Metanol (%)	Acetonitrilo (%)	Acetato de etilo (%)
0	0.9	10	85	5
10	0.9	20	60	20
30	0.9	40	20	40
40	0.9	40	20	40
45	0.9	10	85	5
55	0.9	10	85	5

6.5 Evaluación de la capacidad antioxidante

A) Ensayo de DPPH' (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

La actividad antiradical (RSA) fue determinada midiendo la capacidad del radical estable DPPH de reducirse, observando la decoloración del color púrpura de la solución. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Fukumoto y Mazza (2000). Todas las reacciones se realizaron en microplacas de 96 pozos. (Nalge Nunc International, N.Y., U.S.A.). Brevemente, las diluciones apropiadas de los extractos metanólicos obtenidos (20 μ l) se mezclaron con 200 μ l de DPPH y 20 μ l de metanol. Los controles consistieron de todos los reactivos excepto el extracto o las sustancias de control positivo (Trolox).

Después de un periodo de incubación por 30 min bajo condiciones de obscuridad y temperatura ambiente, se midió la absorbancia de las muestras a 520 nm en un lector de Microplaca Versa Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, U.S.A.). El porcentaje de inhibición del radical DPPH fue calculado con la siguiente ecuación: % de Inhibición = [(absorbancia del control – absorbancia de las muestras)/absorbancia del control] x 100 y los resultados fueron expresados en μ mol equivalentes de Trolox/g de flor seca (TEAC), todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

B) Ensayo de ABTS (azino-bis 2-2 (ácido-3-etilbenzthiazolins-6-sulfónico))

El ensayo se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Nenadis *et al.*, (2004) con algunas modificaciones. La solución ABTS fue preparada al reaccionar 5 ml de una solución acuosa de ABTS 7mM y 88 μ l de una solución de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) a 140 mM para obtener una concentración final de 2.45 mM, después de almacenarla en obscuridad durante 16 h, la solución que contiene el radical fue diluida en etanol hasta que el valor inicial de absorbancia alcanzado sea de 0.7 ± 0.5 a una λ de 734 nm.

Todas las reacciones se realizaron en microplacas de 96 pozos (Nalge Nunc International, N.Y., U.S.A.). Una alícuota de 20 μ l de una solución metanólica al 80% de los extractos a diferentes concentraciones se mezcló con 230 μ l de la solución preparada de ABTS^{••}, así mismo se midió un blanco y un control y los resultados fueron expresados en μ mol equivalentes de Trolox/g de flor seca (TEAC).

C) Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)

La habilidad de reducción de los extractos fue determinada usando el ensayo FRAP de acuerdo con la metodología descrita por Firuzi *et al.*, (2000). Brevemente, para obtener el reactivo de FRAP, se preparó una mezcla de 10 ml de buffer de acetato 300 mM (pH 3.6), 1 ml de FeCl₃ 20 mM, 1 ml de 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM, se disolvió en HCl 40 mM. 25 μ l de cada extracto (2.5 mg de extracto se disuelve en 1 ml de MeOH) y se colocaron por cuadruplicado en una microplaca de 96 pozos (Nalge Nunc International, N.Y., U.S.A.).

Después 175 μ l de la solución FRAP recién preparada y tibia (37°C) se agregó a tres pozos y el mismo volumen de la solución amortiguadora de acetato se añadió al cuarto. El control contenía 25 μ l de MeOH y 175 μ l de la solución FRAP. La absorbancia a 595 nm fue monitoreada por un lector de microplaca Versa Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, U.S.A.) a 0, 4, 10, 30 y 60 min. Se preparó el blanco y se obtuvo la curva estándar con FeSO₄. Los resultados fueron reportados como la media \pm error estándar de μ mol equivalentes de FeSO₄/g de flor seca y todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

D) Capacidad Quelante del hierro (II)

La capacidad quelante de Fe²⁺ se obtuvo de acuerdo con la metodología descrita por Hinneburg *et al.*, (2006). Brevemente a 30 μ l del extracto se añadieron 150 μ l de FeCl₂ acuoso 2 mM. Pasados 5 minutos, 60 μ l de ferrozina 5 mM fue añadida. La absorbancia se midió a 562 nm en un lector de microplaca Versa Max

(Molecular Devices Co., Sunnyvale, U.S.A.) después de 10 minutos. Se obtuvo una curva de calibración con EDTA, el cual se usó también como control, se incluyó un blanco dentro del procedimiento y los resultados fueron expresados como μmol equivalentes de EDTA/g de flor seca.

6.6 Diseño y análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía con un nivel de significancia del 5% a través de un diseño experimental unifactorial donde el factor fue el método de cocción realizando réplicas de cada tratamiento. Se compararon las medias de los tratamientos mediante una prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05, reportando las diferencias entre las medias \pm Error Estándar (EE) utilizando el programa estadístico JPM 5.0.1.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Identificación de metabolitos secundarios

7.1.1 Determinación de fenoles totales

Los polifenoles son la fuente más importante de compuestos bioactivos de la dieta e influyen directamente sobre la capacidad antioxidante de los extractos de las plantas. El método de Folin-Ciocalteu es ampliamente usado y provee una estimación del contenido de compuestos fenólicos presentes en el material vegetal. La cantidad total de dichos compuestos en el extracto metanólico de las flores crudas y cocinadas (cocción en agua, cocción al vapor, salteado, horneado y microondas) se expresó como equivalentes de ác. gálico/gr de flor seca.

a) Flores Crudas

En el Cuadro 6, se muestra el contenido de fenoles totales de las flores crudas y cocinadas, donde el valor para las flores crudas (8.76 mg eq. de ác. gálico/g) es superior al reportado para flores comestibles *Paeonia Section Mountain* originarias y consumidas en China, cuyos valores se encuentran entre 0.0385 a 0.1145 mg eq. de ác. gálico/g de flor seca, dependiendo el cultivar (Li *et al.*, 2009).

Por otro lado, en cuanto al valor de fenoles totales del extracto obtenido para la flor de calabaza (8.76 mg eq. de ác. gálico/g) en el presente estudio, es comparable con los valores obtenidos por Li *et al.* (2007) quienes evaluaron diferentes variedades en flores de *Marigold Chino* cuyos resultados para el cultivar *Chiyu* fueron de 22.9 mg eq. de ác. gálico/g de extracto y para el cultivar *Fanmei* se reportó un valor de 25.1 mg eq. de ác. gálico/g de extracto.

Cuadro 6. Contenido de fenoles totales de las flores crudas y cocidas.^a

Tratamiento	mg eq. de ác. gálico/g de flor seca	mg eq. de ác. gálico/g de extracto
Crudo	8.76 ± 0.64 ^{ab}	26.99 ± 1.48 ^{ab}
Cocción en agua	3.14 ± 0.12 ^c	10.78 ± 0.44 ^d
Vapor	6.71 ± 0.88 ^b	19.11 ± 1.38 ^{bc}
Salteado	5.59 ± 0.50 ^{bc}	15.85 ± 2.01 ^{cd}
Horneado	9.48 ± 0.19 ^a	28.05 ± 2.07 ^a
Microondas	7.49 ± 0.58 ^{ab}	22.27 ± 1.27 ^{abc}

^aLos valores son expresados en mg equivalentes de ác gálico/g de flor seca y presentados como la media ± EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos, usando la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

A pesar de que el consumo de las flores comestibles resurgió a finales de los años 80's, aún existen escasas investigaciones enfocadas a su estudio. De tal forma que en nuestro trabajo los resultados tuvieron que ser comparados con otros vegetales. Encontrando que la flor de calabaza posee un contenido superior comparado con zanahorias color naranja típico, las cuales presentaron un contenido de fenoles totales de 2.34 mg eq. de ác. gálico/g de peso seco y para las zanahorias amarillas un valor de 1.79 mg eq. de ác. gálico (Sun *et al.*, 2009). Así mismo, Dewanto *et al.*, (2006) reportan un menor contenido para el tomate crudo obteniendo valores de 0.1424 mg eq de ác. gálico/g de peso seco).

b) Flores cocinadas por el método de cocción en agua

En este estudio el método de cocción en agua fue el que disminuyó hasta en un 64.15% el contenido de fenoles totales en comparación con las flores crudas (Cuadro 6). La pérdida de compuestos por éste método o por el método de blanqueado reportado por otros autores (Ismail *et al.*, 2004; Sikora *et al.*, 2008), probablemente es debido a la lixiviación de los polifenoles en el agua de cocción.

En contraste, Turken *et al.*, (2005) encontraron que diversos métodos de cocinado (incluyendo la cocción en agua o hervido) causaban un incremento de 2 a 26% en el contenido de dichos compuestos. Bunea *et al.*, (2008) proponen que en el caso de llevarse a cabo la cocción en un medio acuoso (comúnmente el hervido de los vegetales) y exista un aumento de los compuestos fitoquímicos presentes, podría ser debido a un rompimiento de las estructuras supramoleculares propias del vegetal por efecto de la temperatura aplicada durante el tratamiento ya sea hervido o a presión, lo cual provoca la liberación del azúcar dejando la aglicona mucho más disponible provocando que ésta reaccione mejor con el reactivo de Folin Ciocalteau.

Ornelas-Paz *et al.*, (2010) evaluaron el efecto del cocinado sobre el contenido de fenoles totales y capsainoides en diferentes chiles mexicanos y observaron que el método de cocción o hervido y el cocinado a la parrilla incrementaban el contenido total de fenoles en todos los chiles evaluados, obteniendo un incremento de 7.4 a 137%, lo anterior lo atribuyen a la deshidratación que sufren los chiles al ser sometidos a dichos tratamientos térmicos.

c) Flores cocinadas por el método de cocción al vapor

Se puede considerar, que el método de cocción al vapor tuvo un efecto intermedio en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 6). El valor obtenido fue de 6.71 ± 0.88 34 mg eq. de ác. gálico/g de flor seca. Cabe destacar que hasta donde se sabe, estos son los primeros datos obtenidos al respecto.

d) Flores cocinadas por el método de salteado

El valor obtenido para las flores salteadas (5.59 mg eq. de ácido gálico/g de flor seca) es menor en comparación con el método de vapor y mayor al de cocción, a pesar de que la temperatura empleada en este método (160° C) fue mayor, de tal manera la razón de pérdida podría ser que los compuestos fueron

oxidados por la alta temperatura empleada. Se esperaría que hubiera la mayor pérdida de fenoles para las flores salteadas, sin embargo es importante resaltar que en este método se empleó para su preparación aceite comestible, el cual queda en las flores. Es importante destacar que este es probablemente el método más utilizado en la preparación de los guisos tradicionales con flor de calabaza.

e) Flores cocinadas por el método de horneado

De acuerdo a los valores obtenidos para las flores de calabaza cocinadas, en el Cuadro 6 se puede apreciar que el método de horneado fue el que preservó el mayor contenido de fenoles totales, incluso superando al valor reportado para el crudo, observándose una diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) en comparación con los demás tratamientos. Con respecto a lo anterior, diversos autores (Huffman *et al.*, 1978; Harrison y Harris., 1985; Lee y Howard., 1999; Schweiggert *et al.*, 2006) coinciden en que el incremento de fenoles totales en un vegetal por haberlo sometido a un tratamiento térmico de cocción, podría atribuirse a la deshidratación que sufre la matriz del alimento provocando que exista una concentración de los compuestos fenólicos, con un mayor rendimiento en la extracción.

f) Flores cocinadas por el método de microondas

Las flores cocinadas mediante el método de microondas presentaron un contenido de fenoles totales de 7.49 ± 0.58 mg eq. de ácido gálico/g de flor seca, dicho valor no presenta diferencia estadística significativa ($p \geq 0.05$) a comparación con el valor obtenido de las flores crudas, de tal forma que éste podría considerarse, el mejor método para preservar los compuestos presentes en la flor de calabaza en el presente estudio.

López-Berenguer, *et al.*, (2007) observaron los efectos del cocinado en microondas sobre los compuestos bioactivos presentes en inflorescencias de brócoli donde utilizaron agua como medio de cocción, reportando que existe una

pérdida de estos compuestos y de la vitamina C en todos los tratamientos realizados. Sin embargo, aseguran que el porcentaje de pérdida va a depender de las condiciones en las que se lleve a cabo la cocción del alimento, como lo son: el tiempo de cocción, la potencia del equipo y el medio de cocción. En sus resultados concluyeron que para este vegetal las mejores condiciones de cocción en microondas fueron: 700 W durante 2.5 min en 100 ml de agua.

En la Figura 6 se ilustra la tendencia de sensibilidad y aumento del contenido de fenoles debido a los tratamientos térmicos aplicados. Diversos autores coinciden en que existe una controversia en cuanto a los efectos que pueden provocar los métodos de cocción, si bien, se asegura que éstos inducen cambios en la composición química influenciando la concentración y biodisponibilidad de tales compuestos, los efectos positivos y negativos dependerán de las diferencias en las condiciones de los procesos y las características morfológicas y nutrimentales de las especies vegetales (Nicoli *et al.*, 1999; Lee y Krader., 2000; Ou *et al.*, 2002; Bernhardt y Schlich *et al.*, 2006 y Podsêdek, 2007).

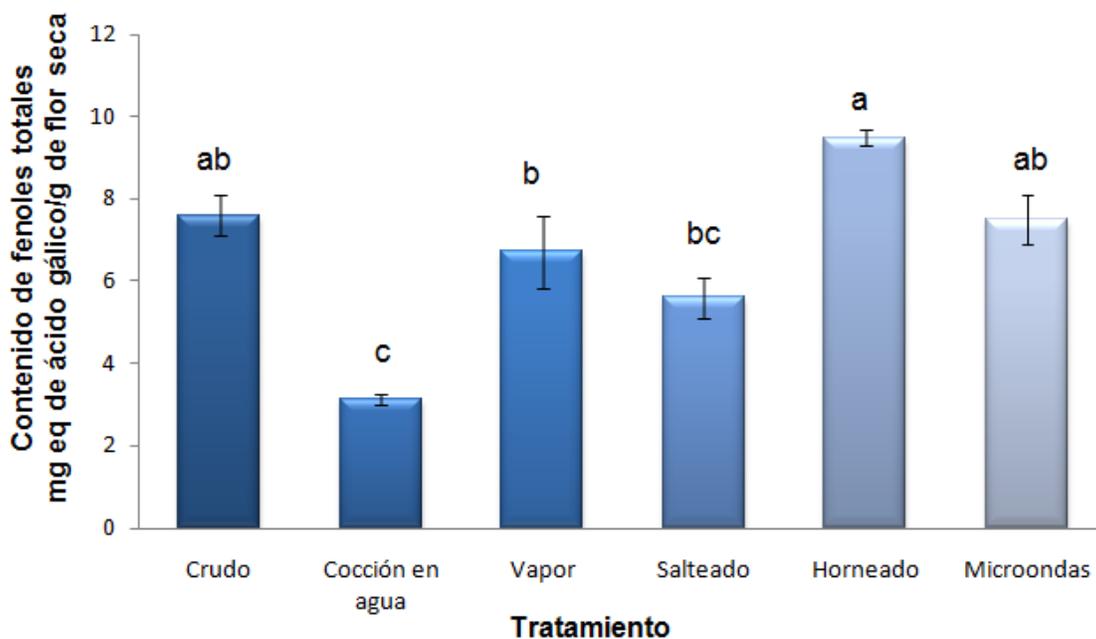


Figura 6. Efecto de los métodos de cocción en el contenido de fenoles totales de las flores de calabaza

7.1.2 Determinación de carotenoides totales

En general, los carotenoides son pigmentos liposolubles encontrados en muchos vegetales, los cuales proporcionan beneficios a la salud cuando se consumen en la dieta, específicamente actuando contra cáncer y enfermedades oculares. Éstos compuestos son los responsables de dar color a muchas plantas, frutas y flores. Más de 700 carotenoides han sido aislados de fuentes naturales (Al-Duais *et al.*, 2009).

a) Flores Crudas

El contenido total de carotenoides se presenta el Cuadro 7, donde, primeramente se puede observar que el valor para la flor de calabaza cruda fue de 1409.07 ± 68.71 μg de β -caroteno/g de flor seca, siendo un valor mayor comparado con el valor reportado para otras flores. Por ejemplo: la flor de *Capparis spinosa*, comúnmente conocida como alcaparra o capriola, flor que brota de un arbusto mediterráneo de hoja perenne, usado como un condimento durante 2,000 años en Europa (Tlili *et al.*, 2009), presenta un contenido de 142.5 ± 3.77 a 562.8 ± 5.85 μg de β -caroteno/gr de flor seca, de acuerdo a la localización geográfica de la planta, ya que muestra una fuerte resistencia a las condiciones ambientales.

Por otro lado, el contenido de carotenoides presente en la flor de calabaza es similar al de las zanahorias, 1334.7 ± 70.8 μg de β -caroteno/g peso seco (Sun *et al.*, 2009).

Aunque la literatura relacionada con la retención o pérdida de carotenoides durante el procesamiento y almacenamiento parece ser abundante, la mayoría de los trabajos implican mediciones del contenido de carotenoides totales. Considerándose, los valores totales como estimaciones burdas. Así mismo, se han informado resultados altamente contradictorios incluso para el

mismo alimento, tipo y condiciones de procesamiento y almacenamiento (Rodríguez-Amaya., 1997).

b) Flores cocinadas por el método de cocción en agua

Los métodos de cocinado tuvieron un efecto diferente sobre el contenido de carotenos totales, comparados con los compuestos fenólicos totales. La comparación de la concentración entre el total de carotenoides de la flor cruda y cocida se muestra en el Cuadro 7. Donde se hace notar que para el método de cocción en agua, se presenta un valor de $1635.28 \pm 78.99 \mu\text{g}$ de β -caroteno/g flor seca, siendo éste el método que preservó la mayor cantidad de carotenoides totales con diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$), presentando un aumento del 22%. Lo anterior podría deberse simplemente a la mayor facilidad con la cual se pueden extraer los carotenoides de muestras cocidas o procesadas en comparación con la extracción en alimentos frescos, donde los carotenoides están protegidos físicamente y/o están combinados con otros componentes de los alimentos que impiden la penetración de los solventes y la extracción (Rodríguez-Amaya, 1997).

Cuadro 7. Contenido de carotenoides totales de las flores crudas y cocidas.^a

Tratamiento	μg de β -caroteno/g de flor seca
Crudo	1334.77 ± 104.45^{ab}
Cocción en agua	1635.28 ± 78.99^a
Vapor	668.400 ± 111.56^d
Salteado	884.00 ± 95.77^{cd}
Horneado	1171.70 ± 129.76^{bc}
Microondas	702.88 ± 58.36^d

^aLos valores son expresados en mg equivalentes de β -caroteno/g de flor seca y presentados como la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos, usando la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

En un estudio donde se evaluó el efecto que provocaban las diferentes formas de cocinar las zanahorias, se concluyó que si el material vegetal se encuentra en contacto con el agua y el procedimiento se lleva a cabo en el menor tiempo y temperatura posibles, es mayor la retención de los carotenoides. Además se estableció que entre las distintas formas de cocinado evaluadas (cocción en agua, al vapor, cocidas a presión, trituradas, etc), la cocción en agua y sin presión resultó ser la que producía una mayor retención de los compuestos estudiados. (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004). Pinheiro *et al.*, (1998) concluyeron que la cocción en agua fue el método que determinó una alta estabilidad de α y β -caroteno en zanahorias comparado con la cocción a presión y a vapor (115-120°C). Estos autores afirman que la temperatura es el mayor factor que influencia la estabilidad de los carotenoides y no tanto la presencia de agua.

Ferracane *et al.*, (2008) reportan que las concentraciones de los carotenoides aumentan después del cocinado, particularmente en el método de cocción en agua en flores comestibles de alcachofa (*Cynara scolymus*) consumidas en ciudades del Mediterráneo. Dichos autores concluyen que tal incremento se debe a la ruptura térmica de la asociación no covalente entre carotenoides y proteínas presentes en las células de los cloroplastos, con la subsecuente extracción mejorada de los carotenoides libres (hidroxicarotenoides). Otros trabajos coinciden con lo anterior, reportando un aumento en la concentración de carotenoides en productos elaborados a base de tomate (Graziani *et al.*, 2003) o bien en espinaca cruda sometida a procesos de cocción convencionales (Van *et al.*, 1999). En éste mismo ámbito, Miglio *et al.*, (2008) observaron en brócoli (*Brassica Oleracea*, var. *botrytis caput* L.), que el contenido de carotenoides aumentaba de manera significativa comparado con las muestras crudas en un 32% al aplicar la cocción en agua y además un 19% cuando se sometían al vapor. Para este mismo vegetal la concentración de fitoeno y fitoflueno casi se triplicó (de 1.3 ± 0.0 a 3.1 ± 0.0 mg/100 g de peso seco, respectivamente) al ser tratadas con vapor.

c) Flores cocinadas por el método de cocción al vapor y microondas

De manera adicional en el presente estudio, los métodos de vapor y microondas, fueron los que presentaron pérdidas significativas, en comparación con el crudo, con contenidos de 668.400 ± 111.56 y 702.88 ± 58.36 μg de β -caroteno/g flor seca, respectivamente (Cuadro 7). Para el vapor se presentó una pérdida de 49%, lo cual podría deberse a la temperatura que se alcanzó durante la cocción (97°C), además de que para éste tratamiento se requirió de un tiempo 3 veces mayor en comparación con la cocción en agua, de tal manera que la prolongada exposición al oxígeno y al calor pueden explicar la baja recuperación de carotenoides. Es importante mencionar que durante la cocción al vapor se estuvieron constantemente moviendo las flores, con el objetivo de conocer el momento ideal en el que las flores se encontraban perfectamente cocidas y con una textura aceptable para su consumo. Con respecto a esto, existen reportes que indican que también el mezclado frecuente durante la cocción podría haber expuesto a los carotenoides a la oxidación atmosférica, provocando una ligera pérdida de los compuestos importantes (Rodríguez-Amaya 1993). Contrariamente a lo que se ha venido discutiendo, Reddy *et al.*, (1995) demostraron que al someter distintos alimentos a tratamientos térmicos, las pérdidas por ebullición son mayores, que cuando se someten a una cocción al vapor.

Con respecto al tratamiento en microondas las pérdidas que se observaron fueron de más del 50%. En relación a estos resultados, existen controversias y los reportes varían de acuerdo al vegetal y a la potencia utilizada en el microondas. Por ejemplo, Pellegrini *et al.*, (2003) estudiaron el efecto de diferentes métodos sobre el color, concentración fitoquímica y capacidad antioxidante en vegetales del género *Brassica* (brócoli, col y coliflor) tomando en cuenta dos variantes: crudos y congelados, concluyendo que hay un decremento de carotenos totales (particularmente de luteína y β -caroteno de 35 y 60 %, respectivamente). Sin embargo, reportaron que en cuanto a la conservación del color se refiere, éste fue el mejor método utilizado. En dicho estudio se concluye que el mejor método para cocinar los vegetales de este tipo es la cocción al vapor.

Por otro lado, Park (1987) concluyó que la cocción por microondas parece retener mejor el α y β -caroteno que la cocción convencional (hervido) en los vegetales de hojas verdes.

d) Flores cocinadas por el método de salteado y horneado

El salteado junto con el horneado, resultaron tener una retención intermedia (Cuadro 7), en comparación con los tratamientos restantes, observándose porcentajes de pérdida del 33 y 12%, respectivamente. Valores similares se observaron para la calabaza verdura (35%) cuando se sometió a un freído a 170°C (temperatura análoga utilizada en este estudio para la flor de calabaza), lo cual pudo deberse a la elevada exposición de la muestra a la luz, temperatura y oxígeno (Miglio *et al.*, 2008). Los valores obtenidos también podrían deberse a una humedad inicial de la verdura y a pérdidas de sólidos solubles, las cuales concentrarían y aumentarían los niveles de carotenoides por unidad de peso del alimento (Rodríguez-Amaya, 1997). Por otra parte, la absorción de aceite puede disolver las provitaminas y disminuir sus concentraciones por unidad de peso, es importante mencionar que específicamente para éste método los extractos obtenidos llevaban implícito el peso del aceite con que fueron salteadas las flores. De tal manera que realmente se observarían pérdidas mayores.

Finalmente para el horneado podría estar ocurriendo algo muy similar a lo expuesto al inicio de esta sección, con el método de cocción en agua en relación a que las flores perdieron en su totalidad el agua presente, con lo cual incremento el contenido de materia seca de la muestra analizada y por consecuencia la concentración de carotenoides incrementa lo cual no necesariamente significa una síntesis de los mismos. Rahman *et al.* (1995) evaluaron la retención de carotenos en dos vegetales con hojas durante el secado al horno y el secado al sol, donde obtuvieron una excelente retención (96 a 98%) con el secado al horno; sin embargo, este método no es factible de utilizar, ya que los hornos no se encuentran fácilmente disponibles. La más grande reducción de los carotenos

evaluados se observó en vegetales secados al sol en un contenedor sin tapa (retención entre 64 a 66 %).

En general se puede observar en la Figura 7 las diferencias en cuanto al contenido de carotenos totales al aplicar los diferentes tratamientos térmicos, donde es la cocción en agua el método que preserva el mayor contenido de estos compuestos y la cocción al vapor junto con el microondas los métodos que provocaron la mayor pérdida. Por su parte, el horneado y salteado, se consideraron tratamientos intermedios.

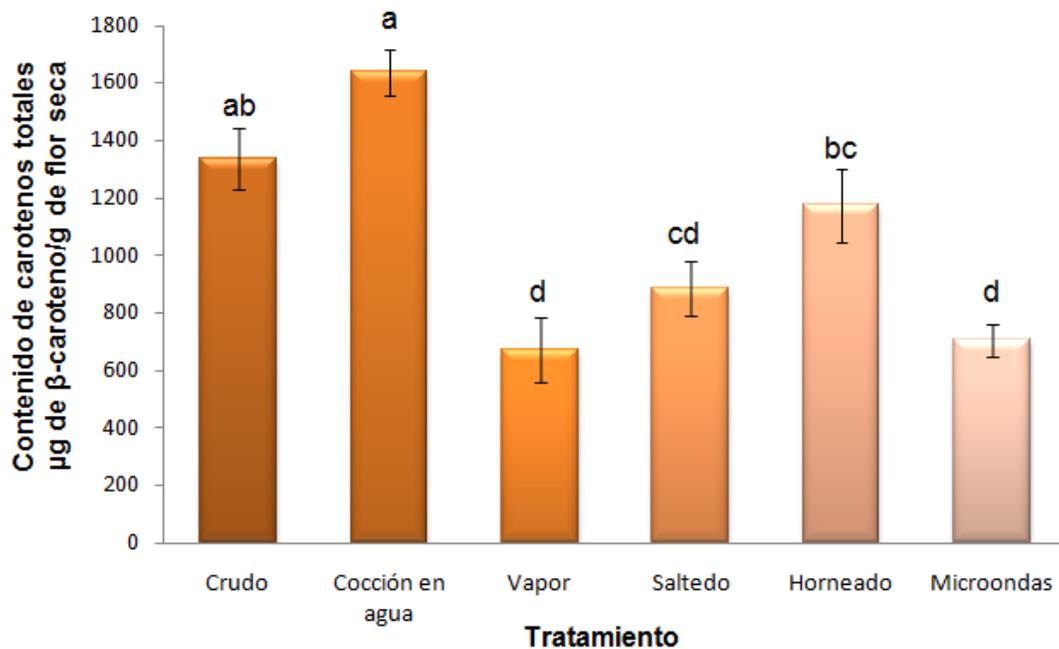


Figura 7. Efecto de los métodos de cocción en el contenido de carotenoides totales de las flores de calabaza

7.2 Identificación de ácidos fenólicos y flavonoides mediante HPLC

Las técnicas cromatográficas han permitido la separación, aislamiento, purificación e identificación de compuestos fenólicos, así como el estudio de la interacción entre los polifenoles y otros componentes de los alimentos.

Hoy en día, las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son las más empleadas para la separación y cuantificación de compuestos fenólicos. Existen distintos soportes y fases móviles que permiten el análisis de antocianinas, procianidinas, flavonas y ácidos fenólicos (Martínez-Valverde, 2000).

Como resultado del análisis cromatográfico, mediante la técnica estandarizada en HPLC, 15 estándares que incluían cinco ácidos fenólicos y diez flavonoides (Cuadro 8), fueron propuestos como compuestos de interés para su identificación y cuantificación en cada uno de los extractos metanólicos obtenidos.

Cuadro 8. Ácidos fenólicos y flavonoides a identificar en los extractos metanólicos de las flores crudas y cocinadas.

Ácidos fenólicos y flavonoides	
1.- Ácido gálico	9.- Miricetina
2.- Ácido protocatéuico	10.- Luteolina
3.- Catequina	11.- Quercetina
4.- Ácido caféico	12.- Apigenina
5.- Rutina	13.- Naringenina
6.- Ácido <i>p</i> -cumárico	14.- Kaempferol
7.- Hesperidina	15.- Hesperetina
8.- Ácido rosmarínico	

Se preparó una solución con los 15 estándares (1mg/ml) disueltos en metanol y se obtuvo el perfil cromatográfico, para identificar los picos y tiempos de retención de cada estándar (Figura 8).

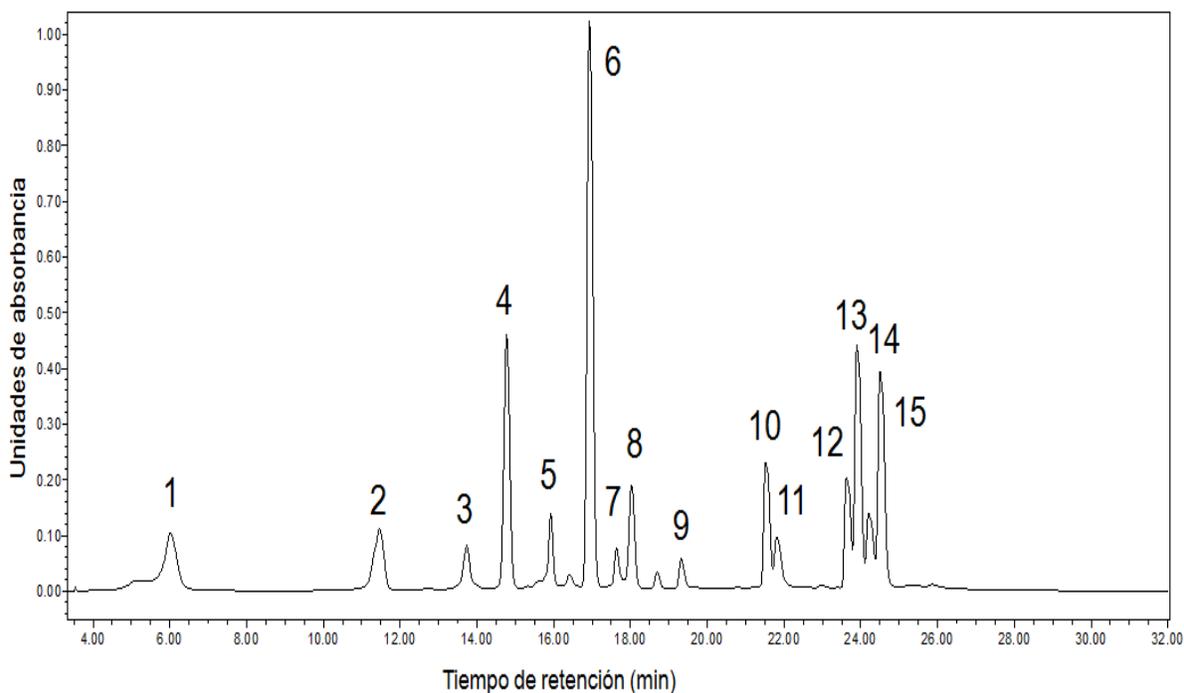


Figura 8. Cromatograma de estándares (flavonoides y ácidos fenólicos)

Una vez preparado el extracto metanólico correspondiente a la flor cruda, se pesaron 12 mg del extracto metanólico y se solubilizó en 100 μ l de MeOH, inyectándose 20 μ l en el sistema de HPLC para obtener el perfil cromatográfico (Figura 9). Como puede observarse, al comparar el perfil obtenido con el cromatograma de estándares (Figura 10) fueron identificados cuatro picos con el mismo tiempo de retención que los estándares de ácidos fenólicos, los cuales incluían: ácido gálico, ácido protocatéuico, ácido *p*-cumárico y ácido rosmarínico, a los tiempos de retención de 6.27, 11.41, 16.89 y 17.9 min, respectivamente. En la Figura 11 se pueden observar las estructuras identificadas que pertenecen a los derivados del ácido hidroxibenzóico (ácido gálico y ácido protocatéuico) los cuales son componentes de estructuras complejas como los taninos hidrolizables.

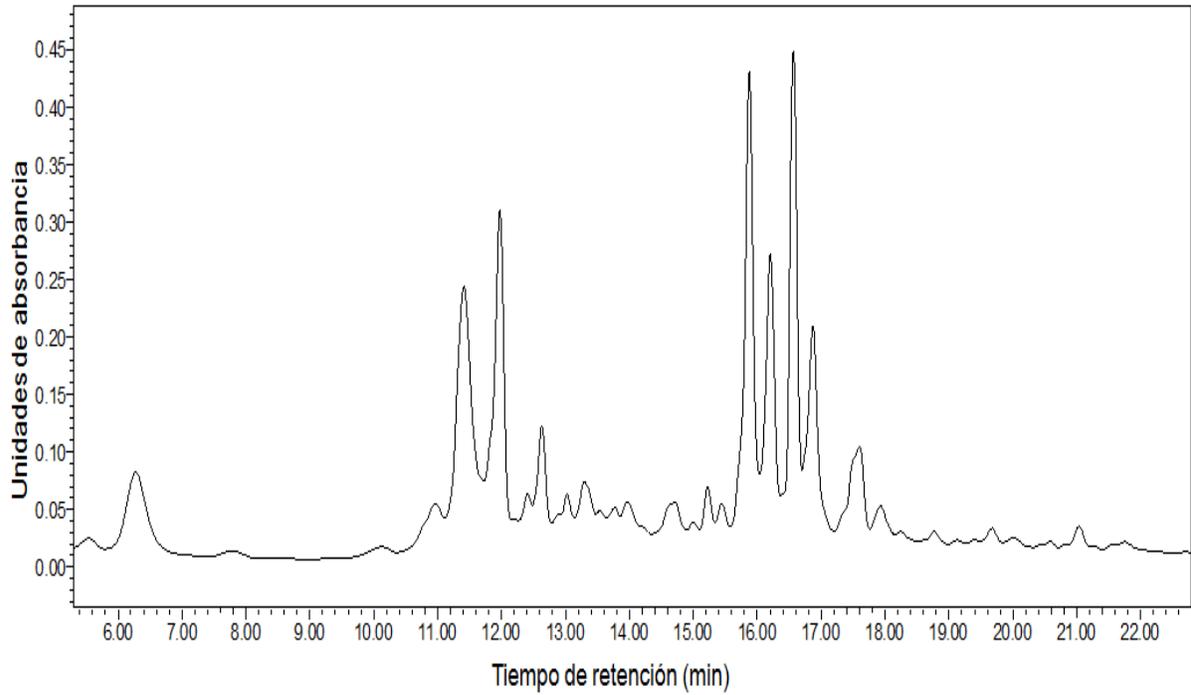


Figura 9. Cromatograma del extracto de la flor cruda

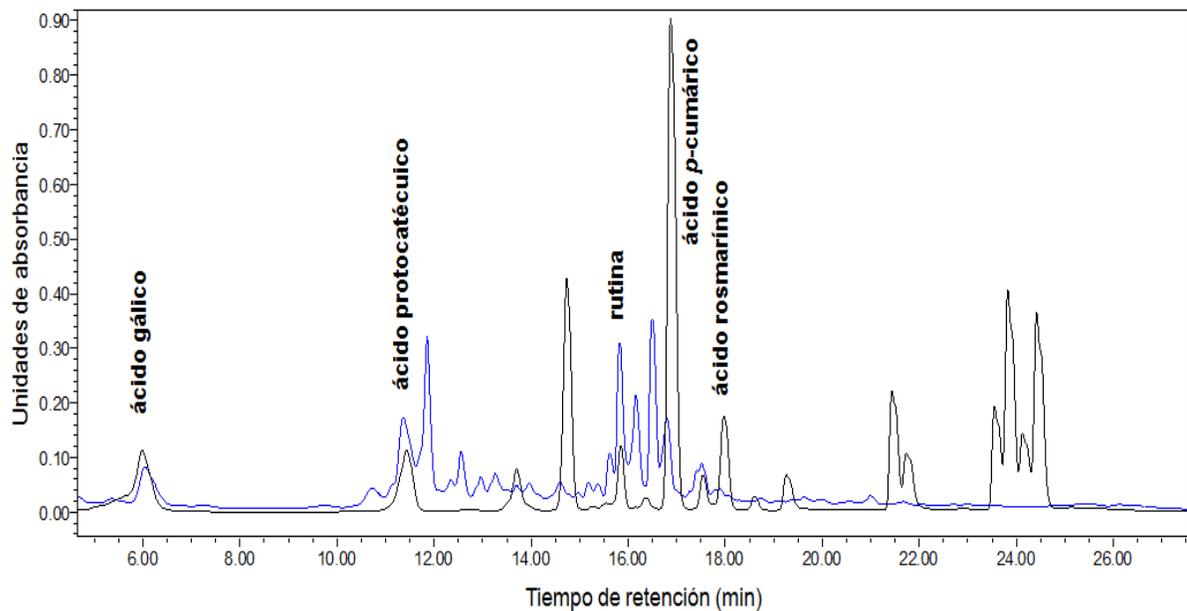


Figura 10. Cromatograma comparando el extracto metanólico de la flor cruda (en azul) con el cromatograma de estándares (en negro)

De igual forma se muestra la estructura del compuesto derivado del ácido cinámico (*p*-cumárico) y finalmente un derivado del ácido caféico y del alcohol 2-hidroxi-dihidrocaféico (ácido rosmarínico), los cuales son más comunes y consisten en radicales de ácidos. Además se identificó un flavonoide correspondiente al grupo de los flavonoles conocido como rutina a un tiempo de retención de 15.87 min., su estructura se muestra en la Figura 12 cuya glicona es el disacárido reductor glutinosa formado por una ramnosa (6-desoxi-L-manosa) unido a una glucosa mediante un enlace glucosídico del tipo (1 β -6). La aglicona o genina es un flavonol denominado quercetina.

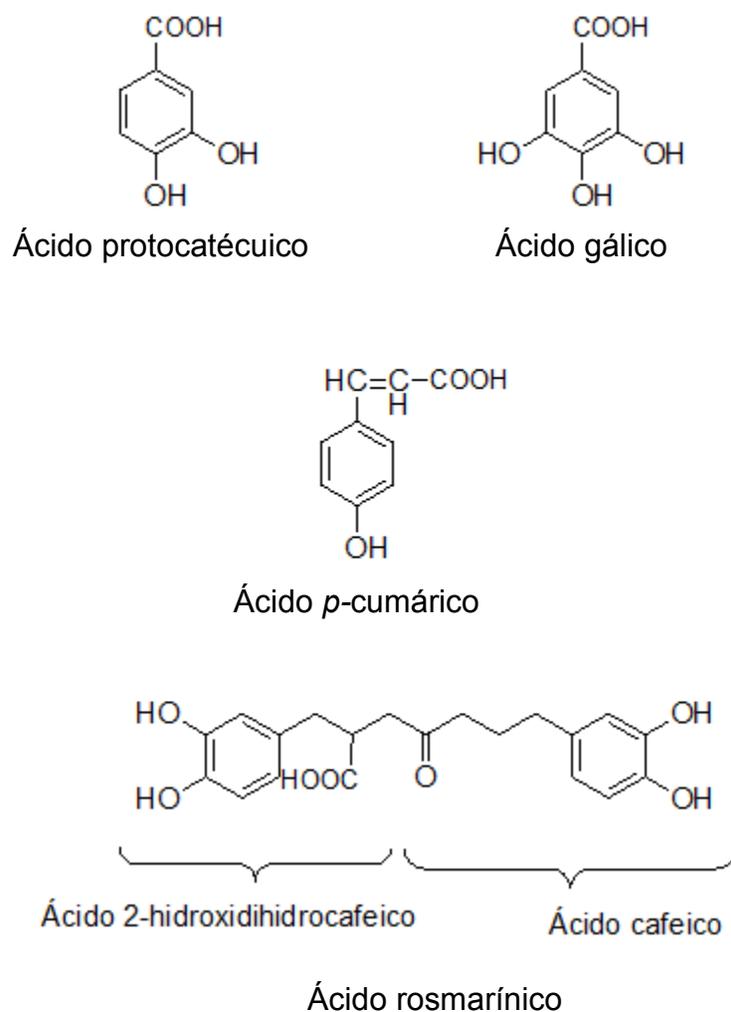


Figura 11. Estructura de los ácidos fenólicos identificados en la flor de calabaza (HPLC)

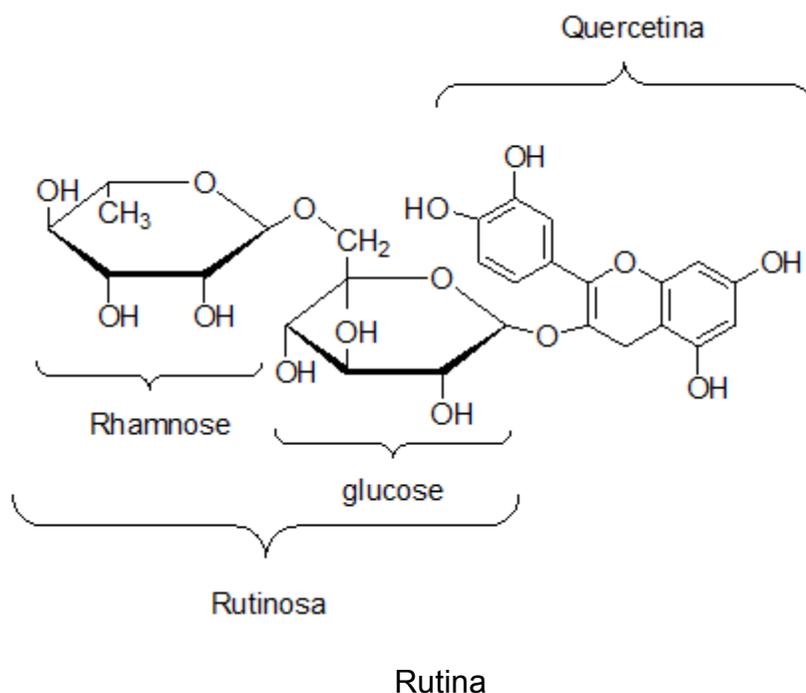


Figura 12. Estructura del flavonoide identificado en la flor de calabaza (HPLC)

Para confirmar la presencia de estos compuestos en el extracto se realizó una coelución, la cual consiste en inyectar una mezcla del estándar y de la muestra a la misma concentración, de manera que si se observaba un aumento en la absorbancia del pico de interés significaba que el estándar estaba presente en el extracto evaluado. De ésta forma, se confirmó la presencia de estos cinco compuestos.

Posteriormente se peso la cantidad necesaria del extracto obtenido de las flores sometidas a los cinco métodos de cocción (cocción, cocción al vapor, salteado, horneado y microondas) donde cada muestra se diluyó en 100 μ l de MeOH y se inyectaron 20 μ l en el cromatógrafo para obtener el perfil correspondiente de cada uno de los tratamientos. Posteriormente cada perfil se comparó con el cromatograma del extracto de la flor cruda para observar el efecto que provocaron los métodos de cocción (Figuras 13, 14, 15, 16 y 17).

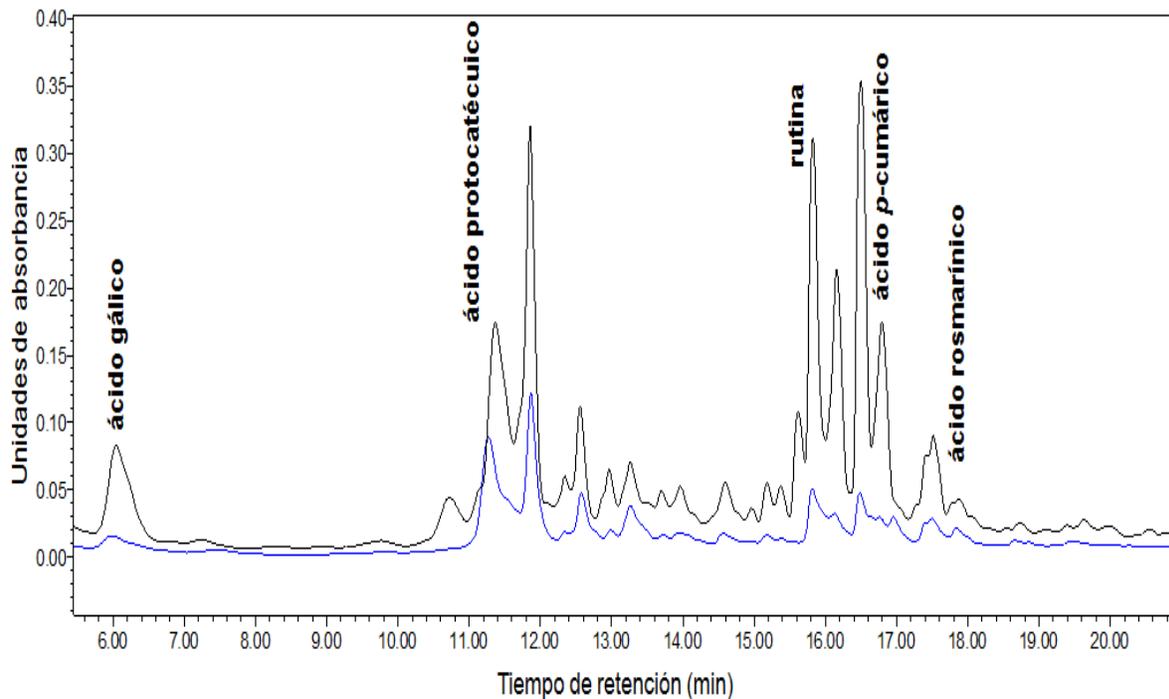


Figura 13. Cromatograma comparando el extracto de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor cocida (en azul)

Es importante mencionar que aunque el perfil de HPLC para todos los métodos de cocinado fue similar, la mayor diferencia se encuentra en sus concentraciones. Así mismo, cabe mencionar que no existen reportes en la literatura que hagan un análisis acerca de los compuestos fenólicos presentes en la flor de calabaza. En el presente trabajo, se puede observar en cada uno de los cromatogramas, que la concentración de la mayoría de los compuestos a excepción del ácido rosmarínico, es visiblemente menor únicamente en el método de cocción en comparación con la concentración que presenta la flor cruda. Sin embargo, en la mayoría de los compuestos la concentración se ve aumentada en los tratamientos restantes.

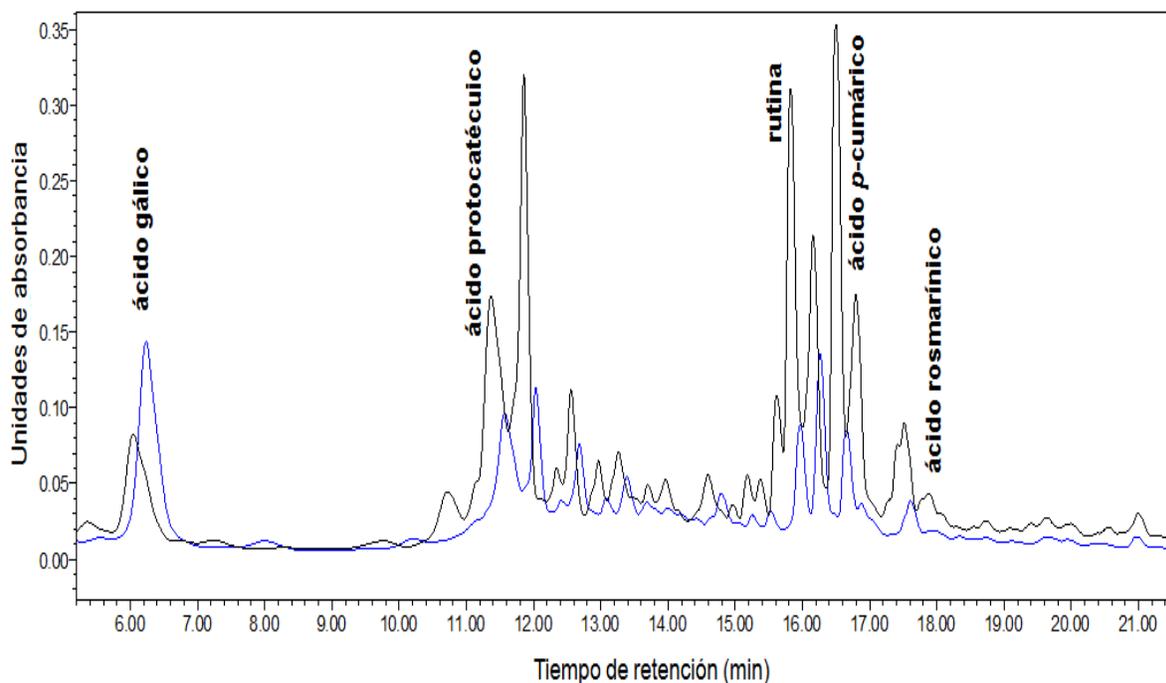


Figura 14. Cromatograma comparando el extracto de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor cocida al vapor (en azul)

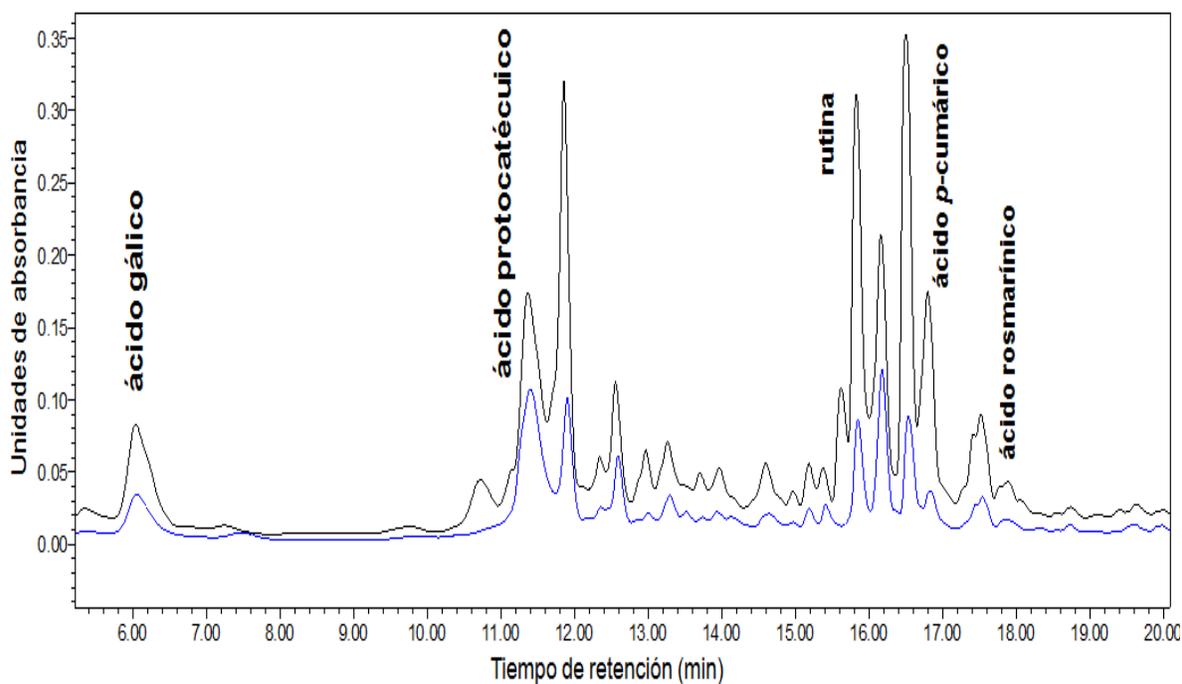


Figura 15. Cromatograma comparando el extracto de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto metanólico de la flor salteada (en azul)

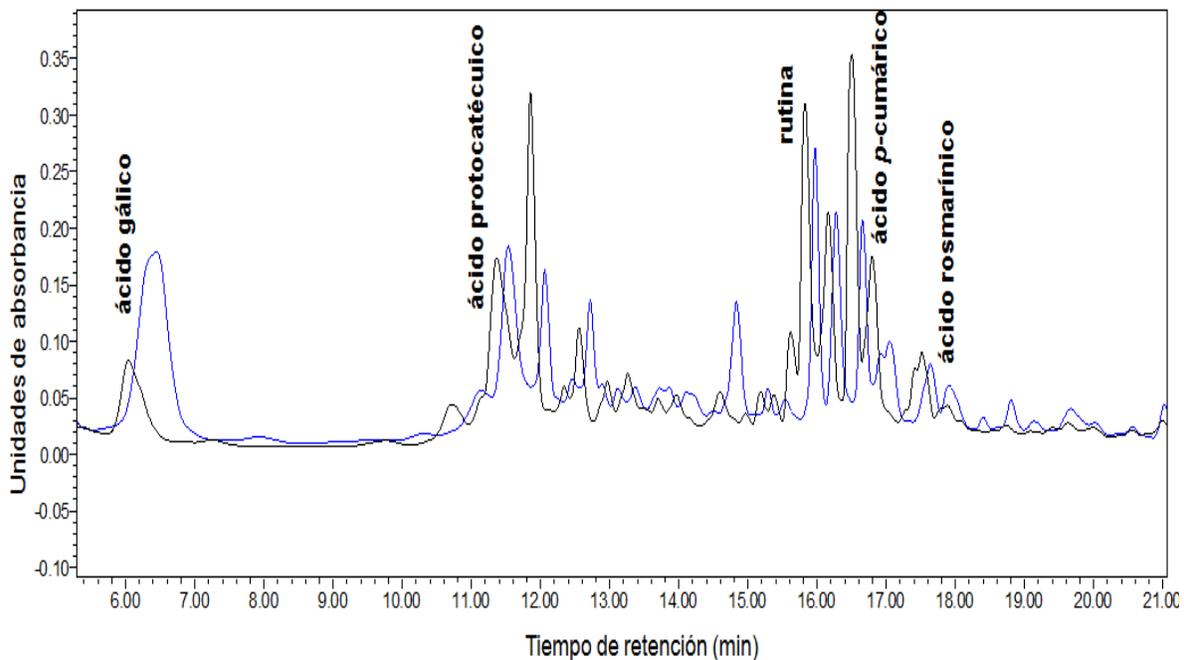


Figura 16. Cromatograma comparando el extracto de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor horneada (en azul)

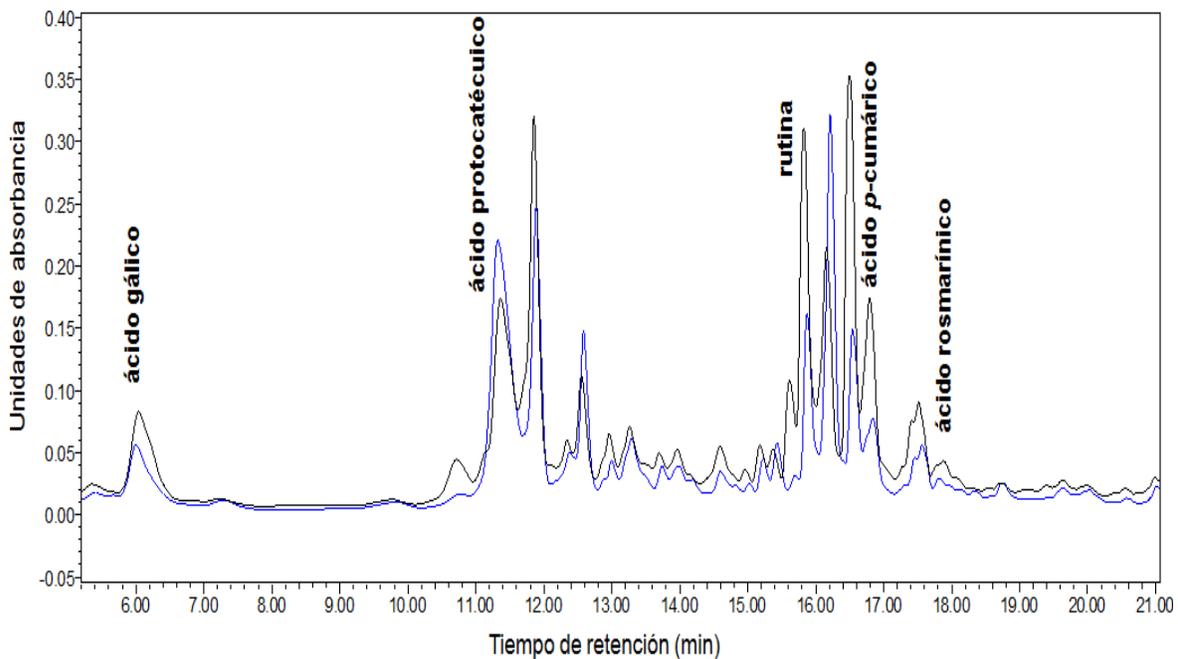


Figura 17. Cromatograma comparando el extracto de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor en microondas (en azul)

7.3 Cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides totales mediante HPLC

Una vez que se determinó el perfil cromatográfico de los extractos metanólicos de la flor de calabaza cruda y cocida, se realizaron las curvas de calibración correspondientes a los estándares identificados con el objetivo de cuantificar cada uno de ellos. En la flor cruda, el ácido protocatéuico fue el compuesto predominante ($347.96 \pm 9.80 \mu\text{g/g}$ de flor seca) seguido del flavonol rutina ($259.36 \mu\text{g/g}$ de flor seca). Así también únicamente se cuantificaron $2.86 \pm 0.26 \mu\text{g/gr}$ de flor seca de ácido rosmarínico, siendo dicho compuesto el que se presentó en menor cantidad.

Los efectos del cocinado sobre los compuestos presentes en cada extracto se muestran en el Cuadro 9 comparados con la muestra cruda, donde se puede observar que el contenido varió dependiendo del tratamiento térmico, aumentando en unos y disminuyendo en otros. Para el ácido gálico presente en el extracto metanólico de la flor cruda se obtuvo un valor de $90.35 \pm 9.93 \mu\text{g/g}$ flor seca, observándose que después de aplicar el método de cocción la concentración disminuyó significativamente obteniendo un valor de $3.63 \pm 0.53 \mu\text{g/g}$ flor seca presentado un porcentaje de pérdida del 95.97% de éste compuesto. Sin embargo, para el método de horneado los valores observados aumentaron de manera significativa obteniendo $613.06 \pm 61.23 \mu\text{g/g}$ de flor seca, superando al crudo en gran medida. Para los métodos restantes no hubo influencia estadística significativa ($p \geq 0.05$) en cuanto a la concentración de ácido gálico se refiere.

Por su parte, el ácido protocatéuico siendo el compuesto mayoritario en la flor cruda, después de someter ésta al tratamiento de cocción, presentó una pérdida del 82.74 % con un valor de $205.37 \pm 11.42 \mu\text{g/g}$ de flor seca. El microondas fue el método que aumentó la concentración en comparación con la flor cruda presentando $1568.04 \pm 108.67 \mu\text{g/g}$ de flor seca.

En cuanto al ácido *p*-cumárico se encontró en una concentración de $32.37 \pm 2.31 \mu\text{g/g}$ de flor seca. Éste se ha encontrado también en la zanahoria en una concentración de $68.8 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ de peso seco (Miglio *et al.*, 2008), valor que supera considerablemente al reportado para la flor de calabaza en este trabajo. Por otro lado, se puede apreciar que éste fue el compuesto menos resistente a la temperatura, debido a que se presentaron porcentajes de pérdida del 75, 50, 5 y 44 % en los métodos de cocción, vapor, salteado y microondas respectivamente, sin embargo para éstos valores únicamente la pérdida presentada en el método de cocción fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.005$).

Cuadro 9. Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides de los extractos metanólicos de la flor de calabaza cruda y cocida^a.

Tratamiento	μg de ácido gálico/g de flor	μg de ácido protocatéuico /g de flor	μg ácido de <i>p</i> -cumárico/g de flor	μg de ácido rosmarínico/g de flor	μg de rutina/grde flor
Crudo	90.35 ± 9.93^b	347.96 ± 9.80^{bc}	32.37 ± 2.31^{ab}	2.86 ± 0.26^b	259.36 ± 10.15^{ab}
Cocción en agua	3.63 ± 0.53^c	205.37 ± 11.42^c	7.81 ± 3.52^b	18.81 ± 4.62^b	22.63 ± 3.42^b
Vapor	151.57 ± 20.53^b	907.70 ± 201.12^b	15.94 ± 1.97^{ab}	6.10 ± 0.77^b	411.42 ± 35.31^a
Salteado	251.87 ± 4.57^b	1347.87 ± 107.36^b	30.41 ± 7.17^{ab}	4.51 ± 0.34^b	329.31 ± 63.08^{ab}
Horneado	490.90 ± 61.23^a	527.30 ± 83.58^{bc}	47.46 ± 11^a	46.71 ± 4.04^a	351.16 ± 141.03^{ab}
Microondas	163.20 ± 8.80^b	1568.04 ± 108.67^a	17.89 ± 9.96^{ab}	12.04 ± 2.06^b	325.50 ± 55.86^{ab}

^aLos valores son expresados en $\mu\text{g/gr}$ de flor seca y presentados como la media \pm E.E ($n=2$). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos, usando la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Como se mencionó al inicio de éste apartado, el ácido rosmarínico fue el compuesto que se observó en menor concentración de todos los estándares identificados. El método de horneado lo presentó en altas concentraciones comparado con los demás métodos con un contenido de $46.71 \pm 4.04 \mu\text{g/g}$ de flor seca, mientras que el método de salteado fue el que presentó el más bajo contenido de este compuesto, de apenas $4.51 \pm 0.34 \mu\text{g/g}$ de flor seca. Todos los

métodos presentaron un contenido en relación al valor reportado para la flor cruda ($2.86 \pm 0.26 \mu\text{g/g}$ de flor seca). Este compuesto fue el único que aumento su contenido incluso en el método de cocción, el cual previamente en los resultados anteriores se observó que no fue el mejor método para preservar los compuestos, ya que para la mayoría de éstos resultó ser el más perjudicial. Con respecto a esto, Turkmen *et al.*, (2005) encontraron que varios métodos de cocinado (incluyendo la cocción en agua) causaban un incremento en el contenido de fenoles totales en chiles, ejotes, brócoli, espinaca y otros vegetales.

Finalmente para el flavonoide rutina referido en los extractos metanólicos, se observó que la concentración también aumentó en los tratamientos de: cocción al vapor, horneado, salteado y microondas con contenidos de 411.42 ± 35.31 , 351.16 ± 141.03 , 329.31 ± 63.08 y $325.50 \pm 55.86 \mu\text{g/g}$ de flor seca respectivamente. El método de cocción provocó una pérdida significativa del 91.27 % presentando un valor de $22.63 \pm 3.42 \mu\text{g/g}$ de flor seca. En general puede observarse en la Figura 18 que la cocción en agua fue el método que preservó menos los polifenoles en la flor de calabaza resultando en una pérdida de más del 90 % de los compuestos identificados, probablemente debido a su difusión en el agua de cocción (Miglio *et al.*, 2008).

Múltiples asociaciones pueden presentarse en un sistema complejo. El agua y la temperatura son agentes hidrolizantes y por el efecto que provocan podrían romper los enlaces, de manera que el aumento del ácido protocatéuico pudo deberse a que éste es un ácido proveniente de la hidrólisis de un tanino ó como una consecuencia de la reducción del ácido gálico. En éste mismo ámbito, el aumento del ácido *p*-cumárico puede ser a partir del ácido rosmarinico, tomando en consideración las estructuras que ambos presentan. En la rutina, al observarse un aumento de su contenido en las flores al ser tratadas con el método de vapor, podría deberse a que es un compuesto de característica hidrosférica y muy polar, de tal forma que se pudo extraer de una mejor manera durante el proceso de éste tratamiento.

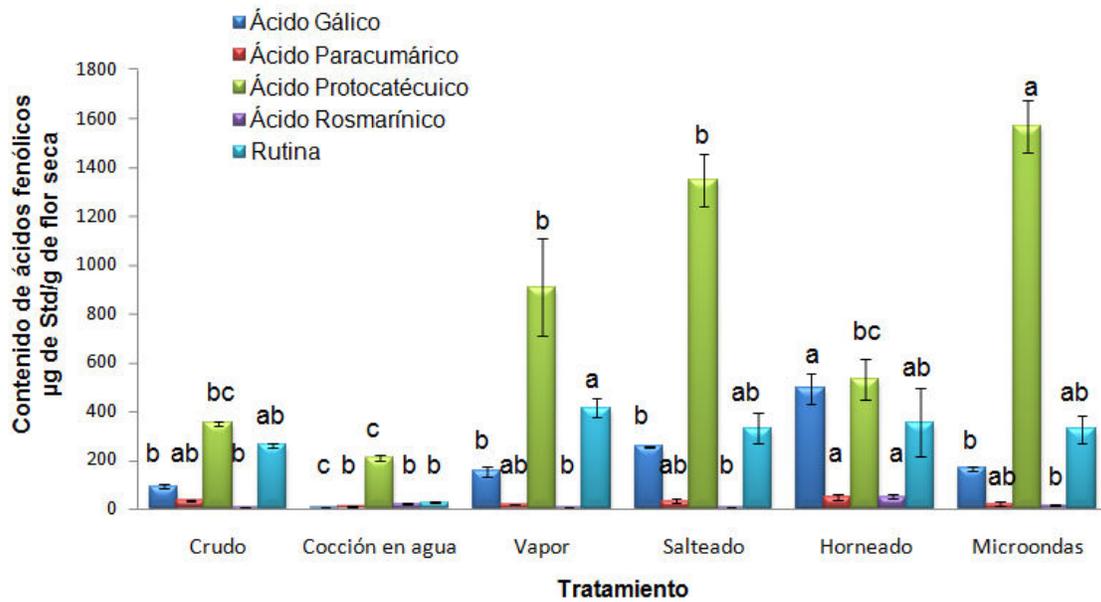


Figura 18. Efecto de los métodos de cocinado sobre el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides de flor de calabaza

7.4 Identificación de carotenoides totales mediante HPLC

Los carotenoides (terpenos de 40 carbonos) son una familia de fitoquímicos colorantes liposolubles que se encuentran principalmente en plantas, algas y bacterias fotosintéticas donde juegan un papel clave en los procesos de la fotosíntesis. La importancia de los carotenoides en los alimentos va más allá de su papel como pigmentos naturales debido a que funciones y acciones biológicas han sido atribuidas cada vez más a estos compuestos, actuando como antioxidantes biológicos, protegiendo a las células y a los tejidos del daño provocado por los radicales libres (Al-Duais *et al.*, 2009). Los terpenos son los compuestos más relevantes de las plantas y son producidos principalmente en las flores, pero también se encuentran en los frutos, tallos hojas y raíces (Chen *et al.*, 2004; Steeghs *et al.*, 2004). Breithaupt y Bamedi, (2001) identificaron en el fruto de *Cucurbita pepo* L. (calabacita) carotenoides como: luteína, zeaxantina y violaxantina, por lo que estos compuestos también podrían estar presentes en sus flores.

Los carotenoides fueron separados bajo condiciones isocráticas. Dos estándares disponibles de carotenoides (zeaxantina y β -caroteno) se usaron en la identificación y cuantificación de los compuestos en las flores crudas y cocinadas. El cromatograma de ambos compuestos se presenta en la Figura 19 cuyos picos aparecen en los tiempos de retención de 5 y 32 min respectivamente. Raju *et al.*, (2007) aislaron estos carotenoides de diferentes vegetales verdes con un tiempo de separación de 25 min utilizando también condiciones isocráticas, dichos autores identificaron a la zeaxantina en un tiempo de retención de 5.7 min y al β -caroteno a los 23.1 min, lo cual indica que los perfiles son comparables con los obtenidos en este estudio.

Para la muestra de flor de calabaza se pesaron aproximadamente 2 mg del extracto hexánico obtenido con anterioridad perteneciente a la flor cruda y éste se solubilizó en 100 μ l en la mezcla acetona/hexano (50:50), posteriormente se inyectaron 20 μ l en el sistema para obtener el perfil cromatográfico (Figura 20). Ambos perfiles fueron comparados con el objetivo de identificar los picos

presentes en las muestras, el cromatograma de la Figura 21 muestra la presencia de ambos carotenoides hidrocarbonados y xantofilas.

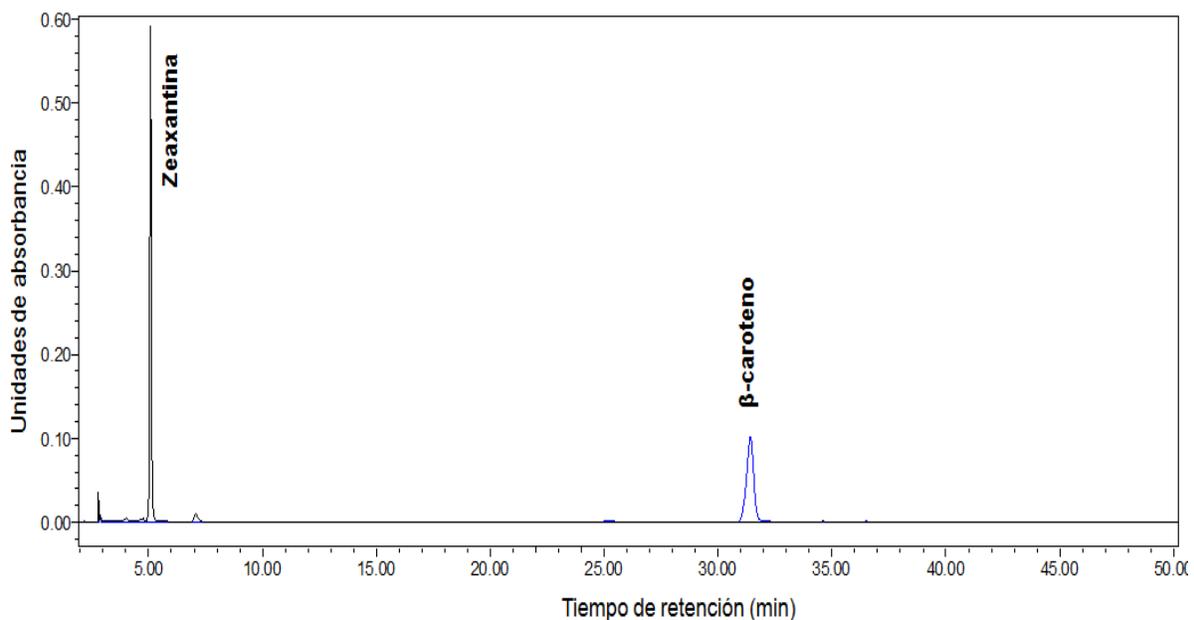


Figura 19. Cromatograma de estándares de los carotenoides identificados

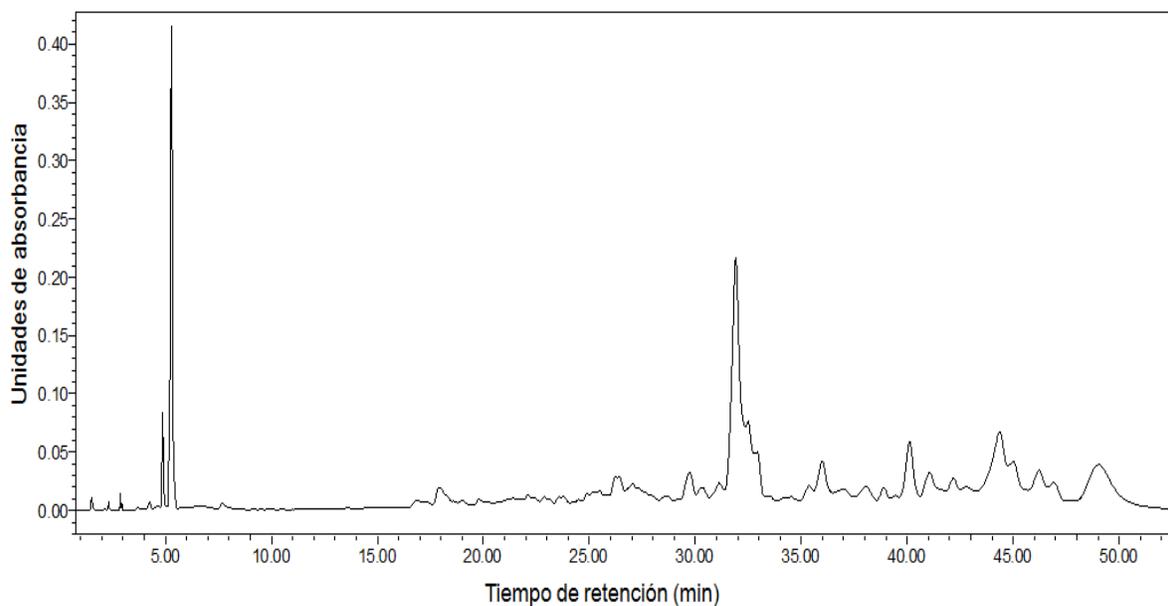


Figura 20. Cromatograma del extracto hexánico de la flor cruda

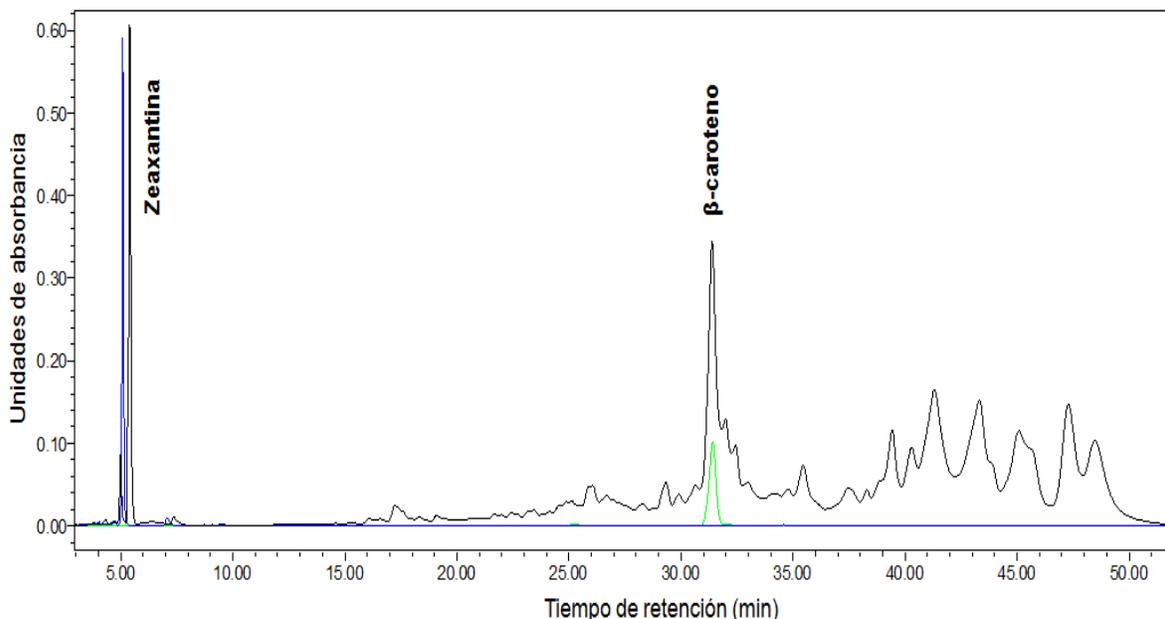


Figura 21. Cromatograma comparando el extracto hexánico de la flor cruda (en negro) con el cromatograma de zeaxantina (en azul) y β -caroteno (en verde)

La estructura característica de los carotenoides es un sistema extenso de dobles enlaces conjugados que consiste en alternar un doble enlace carbono y un enlace simple. Lo anterior usualmente refiere a una cadena de polieno. Esta porción de la molécula conocida como un cromóforo es la responsable de la habilidad de los carotenoides de absorber la luz en la región visible, consecuentemente su fuerte capacidad colorante. Por lo menos siete dobles ligaduras conjugadas son necesarias para impartir el color, así el fitoflueno con 5 dobles enlaces es descolorido, por lo cual el color va a depender de que el sistema conjugado sea extenso, así el licopeno es rojo (Rodríguez-Amaya *et al.*, 1997). En las siguientes figuras se pueden observar las estructuras de los compuestos identificados, primeramente a la zeaxantina (Figura 22) que pertenece al grupo de las xantofilas las cuales tienen la característica de poseer moléculas de oxígeno en su estructura seguida del β -caroteno del grupo de los carotenoides

hidrocarbonados presentado en la Figura 23, que también atrapa los radicales peróxido.

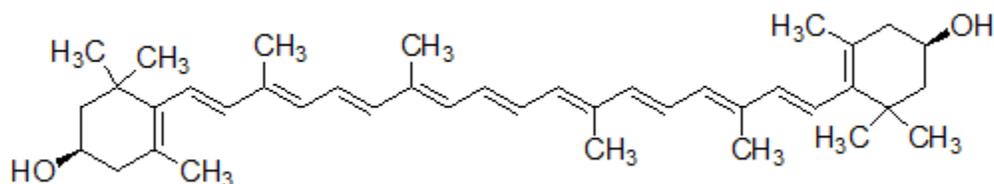


Figura 22. Estructura de la zeaxantina presente en la flor de calabaza cruda (Humpries y Khachick., 2003)

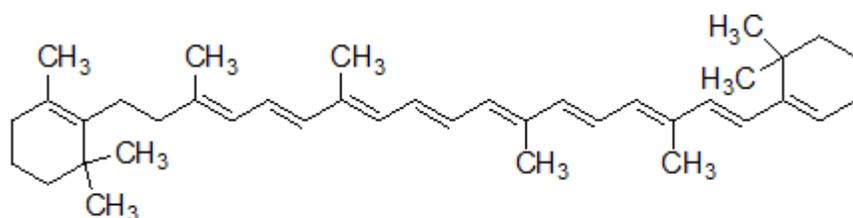


Figura 23. Estructura del β -caroteno presente en la flor de calabaza cruda (Humpries y Khachick., 2003)

De igual forma para confirmar la presencia de estos compuestos en el extracto evaluado se realizó la coelución correspondiente. Posteriormente, se peso la cantidad necesaria del extracto hexánico de cada uno de los tratamientos realizados y se diluyó en 100 μ l de la mezcla acetona/hexano (50:50) y se inyectaron 20 μ l en el equipo para obtener el perfil correspondiente de cada uno de los métodos evaluados. Finalmente cada perfil se comparó con el cromatograma del extracto de la flor cruda para observar el efecto que tuvieron los métodos de cocción en la flor cruda (Figuras 24, 25, 26, 27 y 28).

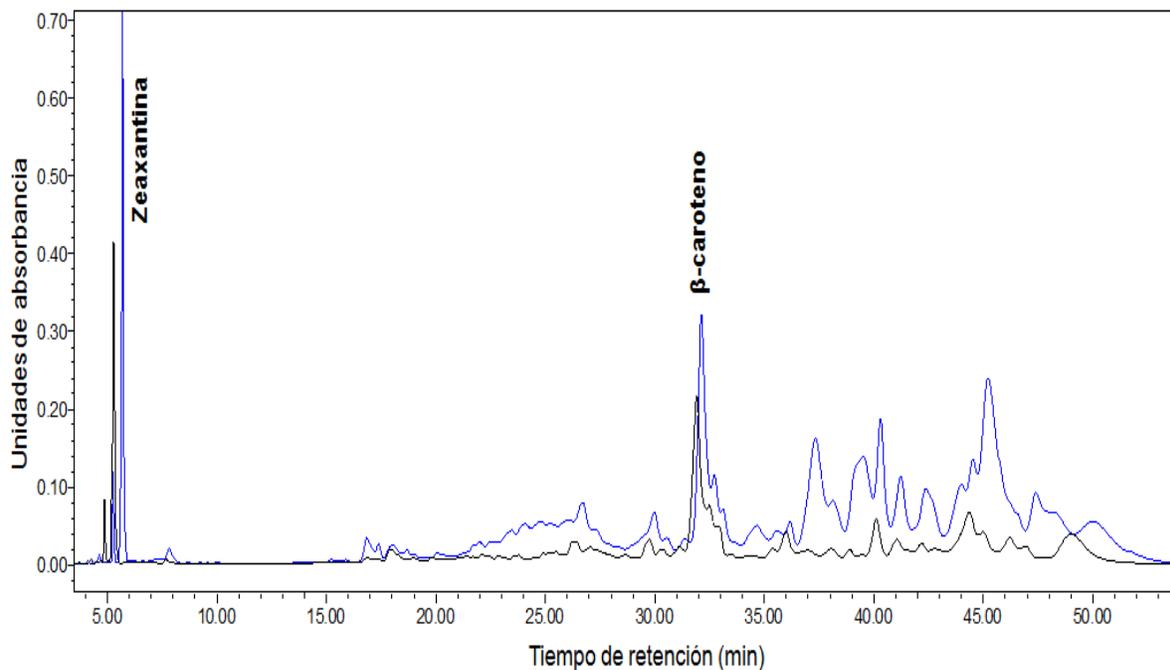


Figura 24. Cromatograma comparando el extracto hexánico de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor cocida con agua (en azul)

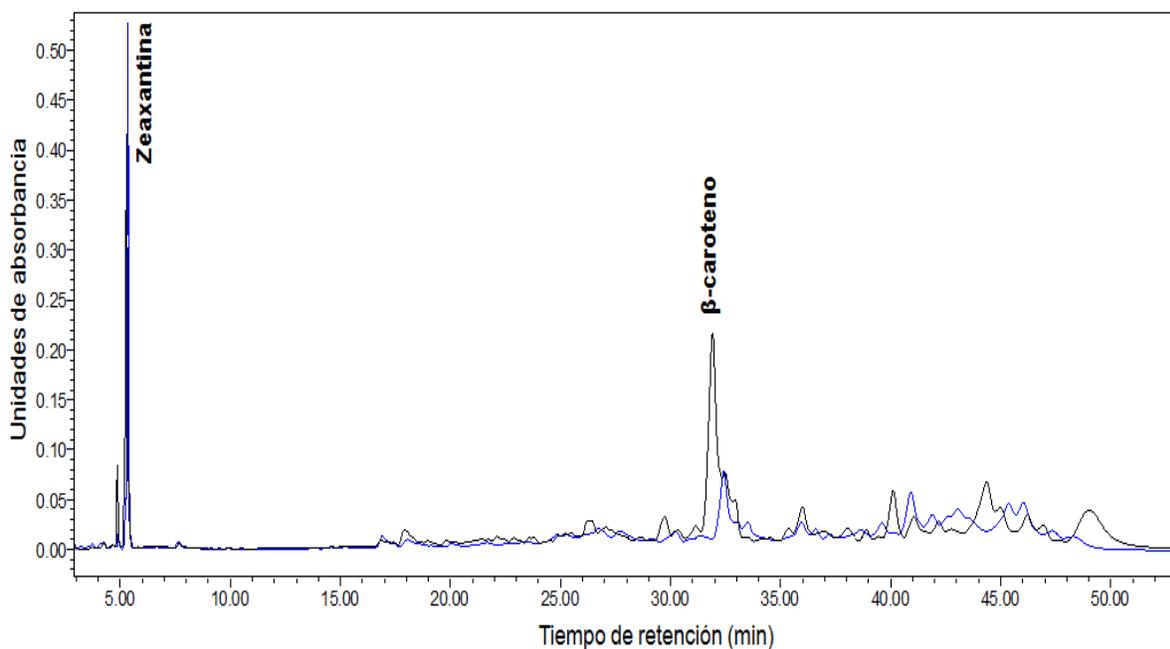


Figura 25. Cromatograma comparando el extracto hexánico de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor cocida al vapor (en azul)

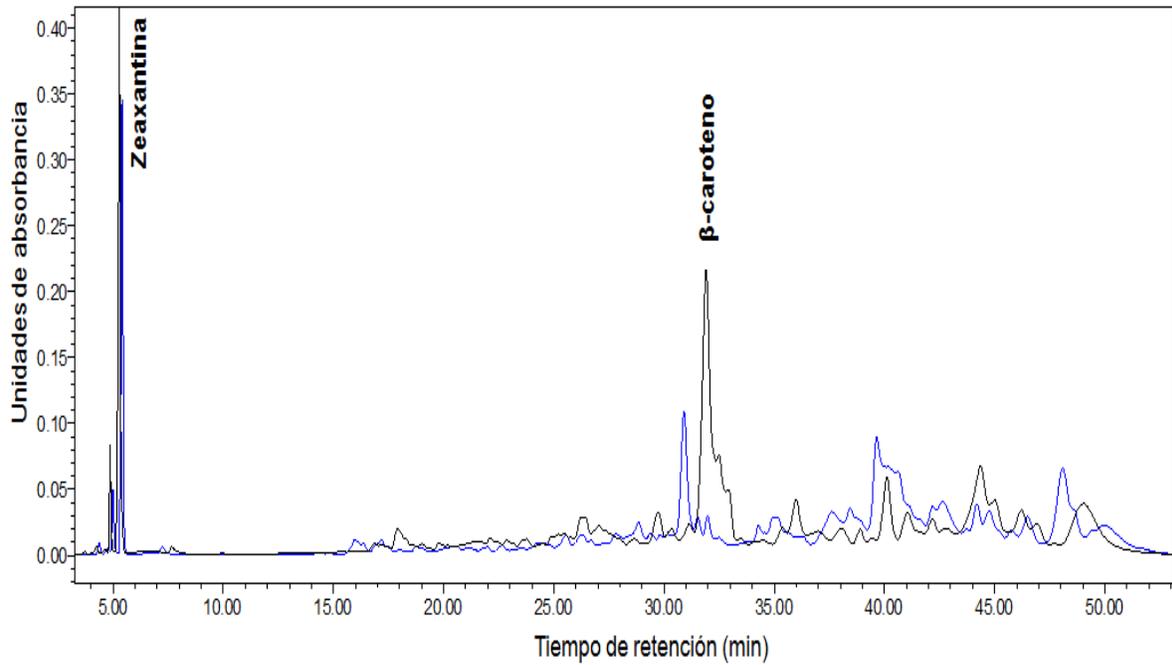


Figura 26. Cromatograma comparando el extracto hexánico de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor salteada (en azul)

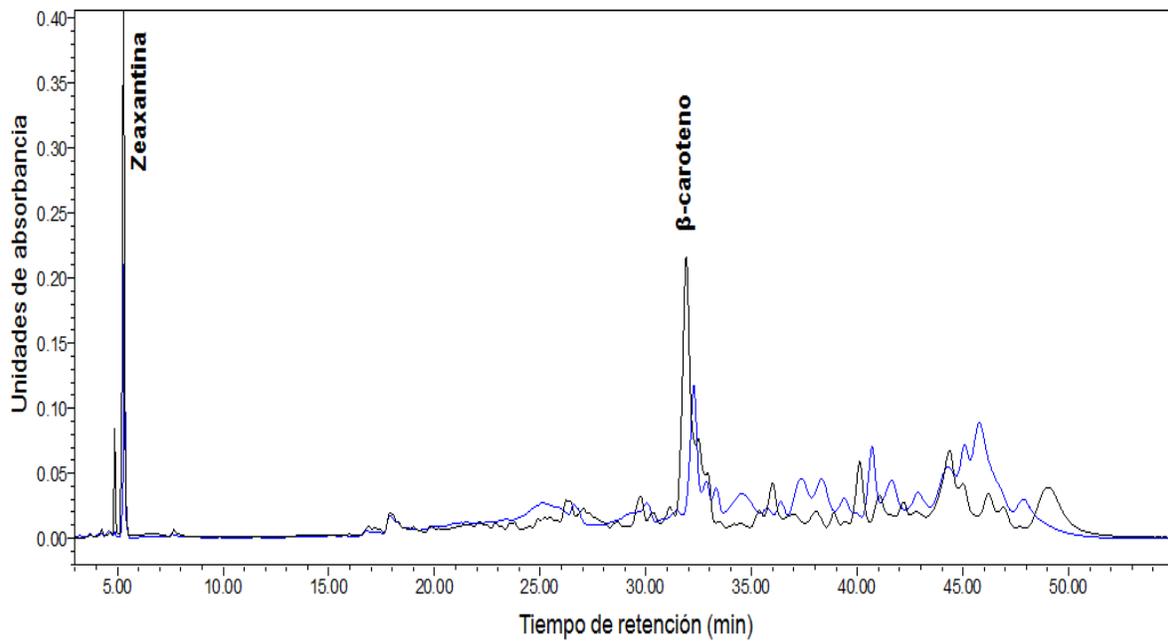


Figura 27. Cromatograma comparando el extracto hexánico de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor horneada (en azul)

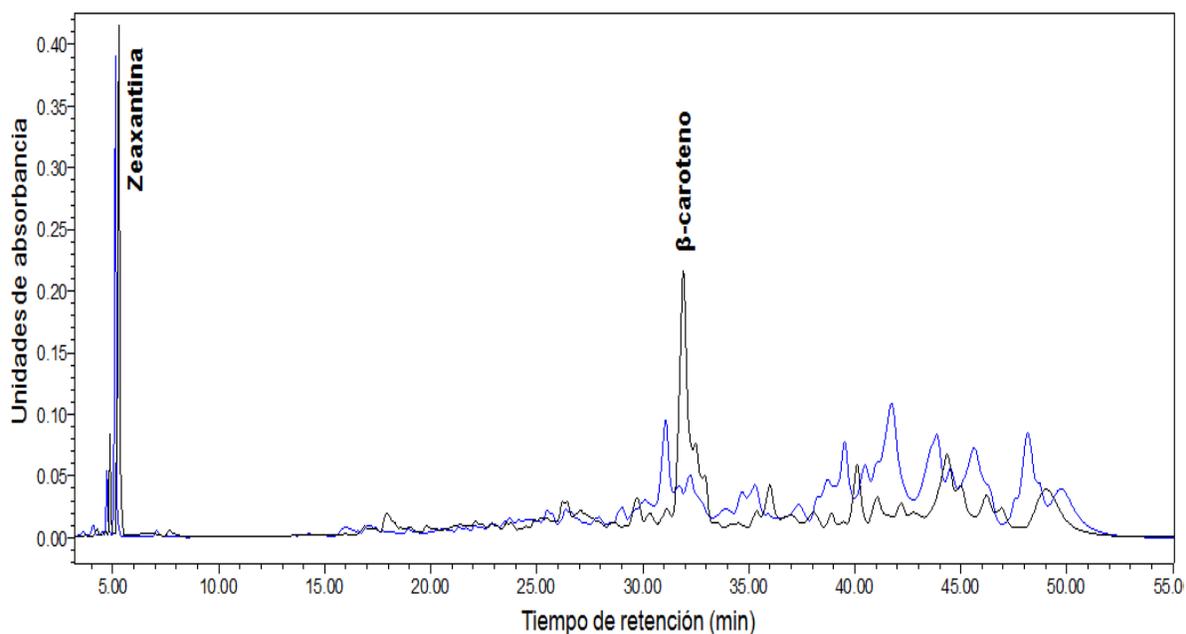


Figura 28. Cromatograma comparando el extracto hexánico de la flor cruda (en negro) con el cromatograma del extracto de la flor en microondas (en azul)

De acuerdo a Raju *et al.*, (2007) quienes estudiaron la distribución de la luteína, zeaxantina y la relación de sus isómeros geométricos en algunas frutas, vegetales, carnes y otros productos bajo condiciones similares de separación a las utilizadas en este trabajo, al comparar los perfiles cromatográficos que presentan con el correspondiente a la flor de calabaza es probable que el compuesto que aparece previo al pico correspondiente de la zeaxantina, sea su isómero llamado: luteína, de tal forma que es probable que la flor de calabaza también posea dicho compuesto. De acuerdo a la literatura, se reporta que los picos de ambos compuestos aparecen juntos diferenciándose en tiempos de retención, apareciendo primeramente la luteína y posterior a esta la zeaxantina (Niizu y Rodríguez-Amaya, 1997; Al-Duais., 2009).

Por otro lado, se ha establecido que la concentración de luteína en los vegetales es mucha más alta que para la zeaxantina (Raju *et al.*, 2007). La abundancia de la luteína sobre la zeaxantina ha sido atribuida al dominante rol de

ésta en la fotosíntesis en los vegetales verdes (Humphries y Khachik., 2003). Por otro lado, los únicos cromoplastos que realizan actividades fotosintéticas son los cloroplastos o plástidios verdes, tilacoides y estromas. Los otros tipos de cromoplastos que poseen otras coloraciones (azul, violeta, anaranjado, amarillo, etc) están destinados a dar la coloración vistosa a los pétalos florales para la atracción de los agentes polinizadores, poseen gran concentración de carotenos y xantófilas no sintetizan clorofila (Marín-Loaiza y Céspedes., 2007).

7.5 Cuantificación de carotenoides totales mediante HPLC

Se puede asumir que los carotenoides son los responsables del color que posee la flor de calabaza, debido a que previamente se realizaron pruebas del contenido de flavonoides totales, los cuales pudieran estar dando tal coloración, sin embargo, los valores correspondientes a las muestras crudas fueron mínimos (0.45 ± 0.03 mg eq. de catequina/g de flor seca). Estos datos se comprobaron en el apartado de identificación de fenoles y flavonoides en HPLC, identificando un solo flavonoide (rutina), por ello se decidió no incluir tal determinación en el trabajo realizado. Para conocer dicha concentración, se obtuvieron las curvas estándar correspondientes a los compuestos identificados con el objetivo de cuantificar cada uno de ellos tanto en la flor cruda como después de haberla sometido a los diferentes métodos de cocción y observar el efecto que provocaron. Los valores expresados en $\mu\text{g/g}$ de flor cruda se presentan en el Cuadro 10, donde se puede observar que el carotenoide mayoritario en todas las muestras fue la zeaxantina.

Cuadro 10. Contenido de zeaxantina y β -caroteno de los extractos hexánicos de la flor de calabaza cruda y cocida^a

Tratamiento	μg de zeaxantina/g de flor	μg de β -caroteno/g de flor
Crudo	$65.59 \pm 1.26^{\text{ab}}$	$25.04 \pm 0.29^{\text{a}}$
Cocción en agua	$82.55 \pm 1.32^{\text{a}}$	$21.06 \pm 2.80^{\text{a}}$
Vapor	$76.74 \pm 4.94^{\text{ab}}$	$9.85 \pm 0.27^{\text{bc}}$
Salteado	$82.55 \pm 1.19^{\text{a}}$	$18.04 \pm 1.29^{\text{ab}}$
Horneado	$34.15 \pm 0.06^{\text{b}}$	$18.43 \pm 2.94^{\text{ab}}$
Microondas	$36.54 \pm 5.771^{\text{b}}$	$7.06 \pm 0.09^{\text{c}}$

^aLos valores son expresados en $\mu\text{g/g}$ de flor seca y presentados como la media \pm E.E (n=2). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos, usando la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Dicha xantofila ha sido considerada desde hace tiempo como un componente principal en el tejido ocular humano (mácula) junto con la luteína (Bernstein *et al.*, 2001) y en los últimos años se ha reportado que posee un efecto protector contra la prevención de diversas enfermedades crónicas (Mares-Perlman *et al.*, 2002).

El valor obtenido para la zeaxantina en la flor cruda fue de 65.59 ± 1.26 $\mu\text{g/g}$ de flor seca, el cual es superior comparado con algunos vegetales como espinaca, perejil o col, ya que éstos presentan contenidos de 5.25, 5.02 y 2.40 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, respectivamente. Así mismo, en un estudio realizado sobre la composición de carotenoides y vitamina A en diversos vegetales de color verde, las concentraciones más altas las obtuvieron el amaranto (*Amaranthus viridis* L.), la zanahoria (*Daucus carota* L.) y la calabaza de invierno (*Cucurbita máxima* Duchesne) con 10.4, 5.9 y 2.5 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, respectivamente (Raju *et al.*, 2007) Lo anterior cobra importancia ya que las fuentes dietéticas de zeaxantina son limitadas, siendo pocos los vegetales que la contienen, aunado a esto, la mayoría de las tablas de composición de alimentos proporcionan escasa información acerca de la concentración presente en los alimentos. A pesar de ello, a la zeaxantina la podemos encontrar en altas concentraciones en el suero y la retina, de tal forma que su presencia en los alimentos no puede pasar inadvertida (Handelman *et al.*, 1992; Khachik *et al.*, 1997; Bernstein *et al.*, 2001).

Por otro lado, el β -caroteno es un carotenoide que representa más del 90% del total de carotenoides en los vegetales (Singh *et al.*, 2001) y es una fuente de vitamina A. El resultado de β -caroteno obtenido para la flor cruda (25.04 ± 0.29) es superior al reportado para flores de *Daylily* cuya concentración es 16.9 ± 0.24 $\mu\text{g/gr}$ de flor seca (Fu *et al.*, 2009). De igual forma, es comparable con las zanahorias de color amarillo las cuales presentan un contenido de 30.1 ± 8.1 $\mu\text{g/g}$ de flor seca (Sun *et al.*, 2009). No obstante, el valor reportado para zanahoria de color naranja es superior al reportado para la flor de calabaza en éste trabajo con 579.3 ± 79.5 $\mu\text{g/g}$ (Sun *et al.*, 2009), sin embargo es importante recordar que dicho

vegetal podría considerarse como el alimento más representativo de éste compuesto en cuanto contenido de β -caroteno se refiere.

En el mismo estudio realizado por Raju *et al.*, (2007) se reportan concentraciones de 38.5 $\mu\text{g/g}$ Brócoli (*Brassica oleracea* L. var. botrytis L.), que es ligeramente mayor que el obtenido para la flor de calabaza en este estudio.

Los carotenoides son pigmentos estables en su ambiente natural, pero cuando los alimentos se calientan, o cuando son extraídos en disolución en aceites o en disolventes orgánicos, se vuelven mucho más lábiles (Meléndez-Martínez., 2004). No todos los tipos de cocinado afectan en la misma medida a los carotenoides. En el Cuadro 10 se muestran también los efectos del cocinado sobre los carotenoides presentes en cada extracto, los cuales son comparados con la muestra cruda. La alta sensibilidad del β -caroteno a la luz y al calor están claramente identificados y su pérdida se espera durante el tratamiento térmico. En la Figura 26 se ilustra la tendencia de sensibilidad y aumento de cada uno de los compuestos a los tratamientos empleados.

En los resultados obtenidos, el contenido de zeaxantina se acentuó en los métodos de cocción con agua, salteado y vapor con 82.55 ± 1.32 , 76.74 ± 4.94 y $82.55 \mu\text{g/gr}$ de flor seca respectivamente, presentando porcentajes de aumento de 25.87, 17.01 y 26.44 % respectivamente. Como es bien sabido, los carotenoides, con algunas excepciones, son insolubles en agua y por lo tanto las pérdidas por lixiviación durante el lavado o algunos tratamientos térmicos que utilicen agua o aceite para su cocción son mínimas o en ocasiones éstos se preservan, lo cual está relacionado con el efecto que tuvieron los métodos de cocción con agua y salteado en la flor de calabaza. Por el contrario, se presentaron pérdidas estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) de la zeaxantina al aplicar el tratamiento de horneado con un porcentaje de pérdida de 47.92 % y para la cocción en microondas con 44.28 %. Lo anterior se debe a que los carotenos son degradados por los mecanismos de oxidación de radicales libres y tal grado de oxidación depende del tiempo y la temperatura a la que es sometida el alimento (Meléndez-

Martínez *et al.*, 2004), con respecto a esto es importante mencionar que en el caso del horneado, la temperatura y tiempo utilizados fueron 80 °C durante 2 hrs.

En el caso del β -caroteno, el método de cocción no tuvo una influencia estadística significativa ($p \geq 0.05$) sobre éste compuesto, a pesar de que el valor disminuyó, reportándose un contenido de $21.06 \pm 2.80 \mu\text{g/gr}$ de flor seca en comparación con el crudo ($25.04 \pm 0.29 \mu\text{g/gr}$ de flor seca), presentando un porcentaje de pérdida del 15.86 %, lo cual está relacionado directamente con las propiedades de solubilidad de los carotenoides, como se mencionó anteriormente.

Gayathri *et al.*, (2004) quienes usaron dos tratamientos térmicos de cocción (presión y hervido), para evaluar su efecto en zanahoria y calabaza, encontraron que el hervido provocaba menores pérdidas en la concentración del β -caroteno presente en ambos alimentos.

El efecto de las diferentes formas de cocinar en zanahorias sobre los niveles de α y β -caroteno ha sido evaluado, comprobándose que a menor tiempo y temperatura de cocinado y contacto con agua, mayor es la retención de carotenoides (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004)

Como se puede observar, en el Cuadro 10, con respecto a los valores presentados para los métodos de cocción restantes, las pérdidas fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) con concentraciones de 9.85 ± 0.27 , 18.04 ± 1.29 , 18.43 ± 2.94 , $7.06 \pm 0.09 \mu\text{g/gr}$ de flor cruda para el vapor, salteado, horneado y microondas, respectivamente. Con pérdidas del 17 al 44 %, dichos resultados son comparables con varios reportes que han documentado las pérdidas de β -caroteno de las verduras durante los procedimientos de cocción, tales como hervido, freído y la cocción a presión (Akapa-Punam, 1984; Park, 1987; Onayemi y Bafidu, 1987; Padmavathi; Bafidu *et al.*, 1995; Yadav y Sehgal, 1997). En la Figura 29 se aprecia la variación entre concentraciones de ambos carotenos cuantificados.

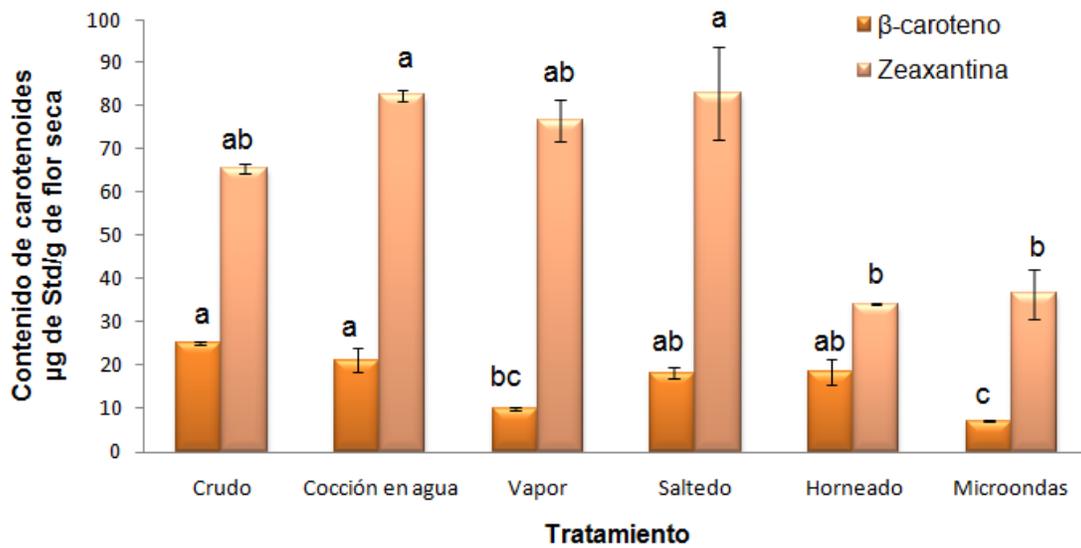


Figura 29. Efecto de los métodos de cocinado sobre el contenido de carotenos y xantófilas de flor de calabaza

7.6 Evaluación de la capacidad antioxidante

7.6.1 Ensayo de DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

Existen muchos métodos para estimar la eficacia de algunas sustancias que pueden actuar como antioxidantes. Un método muy usado es el que se basa en la estabilidad del radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazil (DPPH[•]), al cual se le atribuye la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción en solución metanólica centrada alrededor de los 520 nm. Cuando una disolución de DPPH[•] entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno u otra especie radical se produce la forma reducida con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia.

Debido a las diferencias en los tiempos de la reacción (que dependen de la naturaleza del antioxidante), se realizó la cinética de la capacidad para secuestrar el radical DPPH[•] con los extractos metanólicos de la flor cruda a: 0, 10, 30 y 60 min., evaluados a diferentes concentraciones (mg/mL). La cinética, se presenta en la Figura 30, donde se puede observar que el porcentaje de inhibición del extracto aumenta de la concentración de 5 a 10 mL. Por otro lado, para la concentración de 50 mg/ml, se observó una disminución importante en el porcentaje de inhibición.

Para poder asociar esta observación con un efecto prooxidante, es necesario realizar estudios posteriores. En este contexto, algunos compuestos pueden actuar como prooxidantes. Debido a sus características estructurales, estos metabolitos poseen bajos potenciales de oxidación (EP/2) que les permiten reducir al Fe³⁺ y al Cu²⁺ para sufrir autooxidación o incluso involucrarse en un proceso de reciclaje redox actuando de esta manera como agentes prooxidantes lo que explica los efectos mutagénicos y genotóxicos encontrados para algunos metabolitos secundarios en diversos sistemas experimentales.

Cuadro 11. Cinética de la capacidad para secuestrar el radical DPPH del extracto metanólico de la flor de calabaza cruda a diferentes concentraciones.

% de inhibición				
[mg/ mL]	Tiempo 0	Tiempo 10	Tiempo 30	Tiempo 90
5	16.16	26.68	34.56	39.44
10	51.45	77.44	89.05	91.24
25	56.35	83.16	89.12	84.16
50	74.86	68.88	55.80	41.78

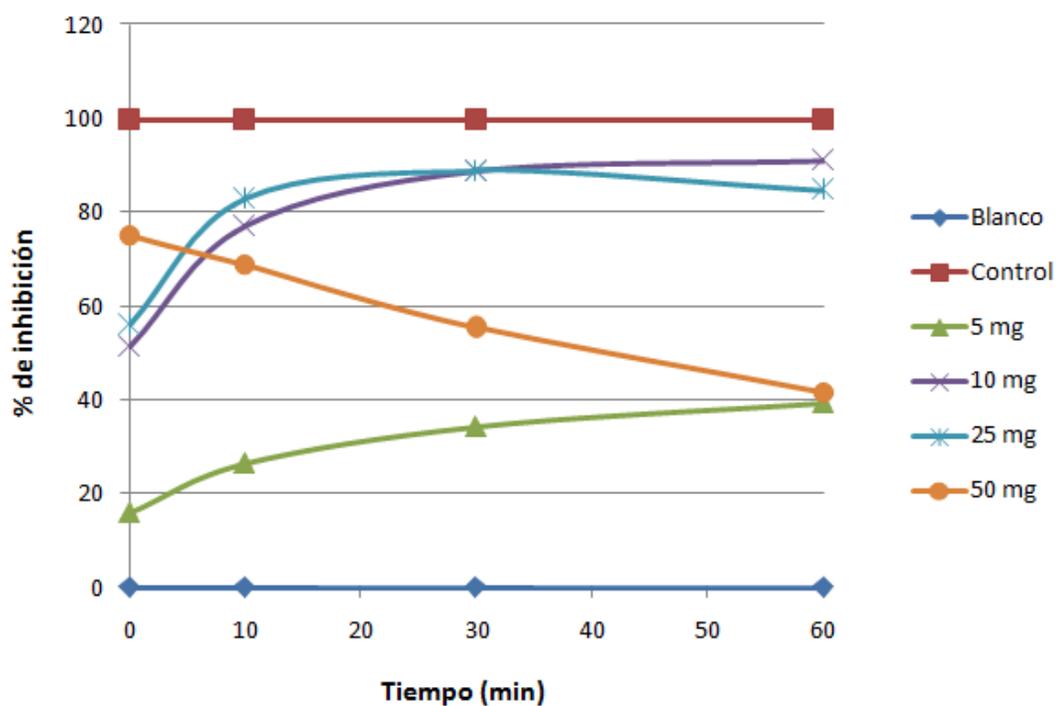


Figura 30. Cinética de DPPH para el extracto metanólico de la flor de calabaza cruda medido a diferentes concentraciones (10, 20, 50 y 100 mg)

Se ha establecido que algunos de los mecanismos a través de los cuales ejercen sus acciones prooxidantes incluyen la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I), la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), así como la afectación de las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante nuclear glutatión y glutatión S-transferasa (Pérez, 2003).

De esta manera, se estableció que la concentración que se utilizaría para los distintos ensayos de capacidad antioxidante sería de: 5 mg/ml a los 30 min, donde los extractos presentaron alrededor de 34.56 % de inhibición del radical (Cuadro 11).

Posterior a la determinación de la concentración de las muestras a utilizar, se realizó el ensayo para evaluar los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas, llevando a cabo de igual manera, la cinética de reacción (Figura 31).

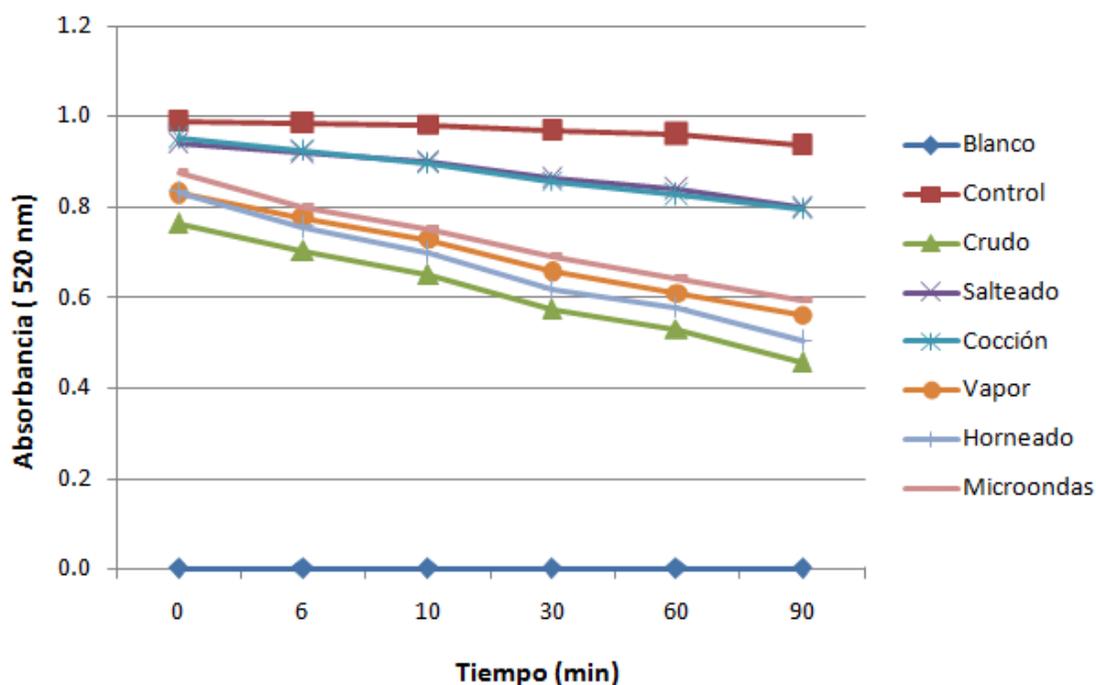


Figura 31. Cinética de DPPH para el extracto metanólico de las flores cruda y cocidas determinado a 520 nm

La capacidad antioxidante expresada como el porcentaje de inhibición de las muestras crudas y cocinadas al tiempo de 30 minutos se muestra en el Cuadro 11, donde se observa que la capacidad para secuestrar el radical disminuyó después de someter la flor de calabaza a los diferentes métodos de cocinado. Se aprecian diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre el método de cocción y el salteado con respecto a las flores crudas, lo cual podría deberse al bajo contenido de fenoles y flavonoides totales que estos dos tratamientos presentaron por efecto de la temperatura, tiempo y medio de cocción. En él mismo cuadro, se muestran también los contenidos expresados en μmol equivalentes de Trolox (Tx), otra forma de expresar la capacidad antioxidante de las flores contra un antioxidante sintético de referencia.

Cuadro 12. Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas determinada por el ensayo DPPH^a

Tratamiento	% de inhibición DPPH	μmol Eq. de Tx/g de flor seca
Crudo	35.71 \pm 0.96	17.96 \pm 2.78 ^a
Cocción en agua	11.59 \pm 0.10	4.91 \pm 0.19 ^b
Vapor	32.09 \pm 1.76	16.58 \pm 1.15 ^a
Salteado	10.68 \pm 1.98	6.41 \pm 1.51 ^b
Horneado	39.76 \pm 2.42	17.99 \pm 2.09 ^a
Microondas	28.76 \pm 0.85	15.87 \pm 1.46 ^a

^aLos valores son presentados como la media \pm EE. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos, usando la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

De manera general, el valor para la flor cruda fue de 17.96 \pm 2.78 μmol Eq de Tx/g de flor seca, este valor fue superior al valor reportado por Miglio *et al.*, (2008) para los extractos correspondientes de brócoli y calabacita con 11 y 8 μmol Eq de Tx/gr de peso seco. Por otro lado, la capacidad antioxidante de la flor cruda no presentó diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0.05$) al aplicar los métodos de vapor, horneado y microondas, cuyos contenidos fueron: 16.58 \pm 1.15,

17.99 ± 2.09 y 15.87 ± 1.46, respectivamente. Sin embargo, se observó que el contenido disminuyó de manera significativa hasta 4.91 ± 0.19 μmol Eq de Tx/g de flor seca al aplicar el método de la cocción. Yamaguchi *et al.*, (2001) atribuyen la disminución de la capacidad antioxidante en varios vegetales al aplicar dicho método debido a la destrucción de las paredes celulares y compartimentos subcelulares de los vegetales durante el transcurso del proceso de cocción en agua, lo que causa la liberación de los componentes que actúan como antioxidantes, de tal forma que estos pasan al medio de cocción donde se encuentren. Puupponen-Pimia *et al.*, (2003) reportaron que el valor de DPPH' de la coliflor disminuyó un 23% durante el blanqueado en agua, pero aumento un 9% en el caso de las calabacitas. La Figura 32 muestra el comportamiento del contenido de μmol Eq. de Tx de las flores crudas y cocinadas y su susceptibilidad a los tratamientos térmicos. Se puede apreciar que el método de cocción junto con el salteado fueron los tratamientos que disminuyeron mayormente la capacidad de secuestrar el radical empleado.

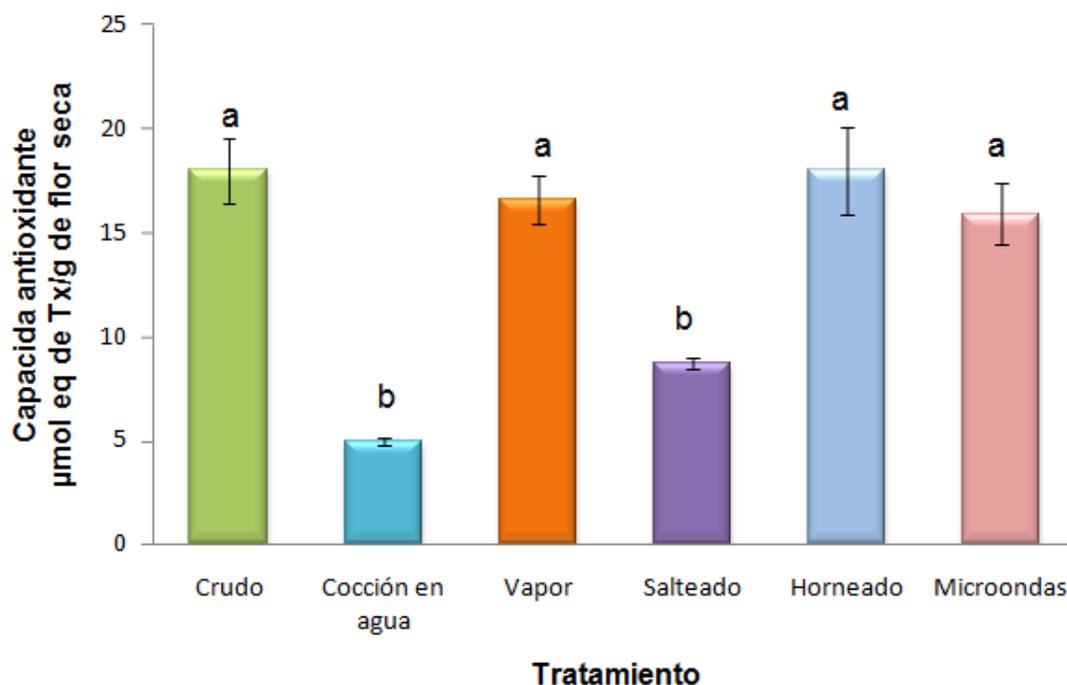


Figura 32. Efecto de los métodos de cocción en capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocinadas, determinada por el ensayo DPPH

7.6.2 Ensayo de ABTS (azino-bis 2-2 (ácido-3-etilbenzthiazolins-6-sulfónico))

El ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS^{•+} es relativamente reciente e implica la producción química del radical por una reacción de oxidación del ABTS (azino-bis 2-2 (ácido-3-etilbenzthiazolins-6-sulfónico)). Este método es utilizado para determinar la capacidad antioxidante de mezclas complejas, tales como extractos de plantas, bebidas y fluidos biológicos. Las excelentes características espectrales, la solubilidad tanto en medio acuoso como orgánico y la estabilidad en un intervalo de pH elevado del ABTS^{•+} ha causado interés en su aplicación para la estimación de la capacidad antioxidante de compuestos puros tanto lipofílicos, como solubles en agua (Nenadis *et al.*, 2004). Su fundamento se basa en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+} debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones.

La capacidad antioxidante expresada en equivalentes de Trolox (TEAC) usando el radical ABTS, fue evaluada en los extractos metanólicos obtenidos para la flor de calabaza cruda y para las flores sometidas a cada uno de los tratamientos térmicos. Se leyó el cambio en la absorbancia a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad respecto a la referencia del reactivo (control), llevándose a cabo la cinética de reacción la cual se muestra en la Figura 33. Se puede observar que las lecturas se realizaron en los minutos: 0, 6, 10, 30, 60 y 90, tomándose como la absorbancia obtenida a los 30 minutos para efecto de cuantificación (Cuadro 13). De acuerdo con la absorbancia que presentó cada tratamiento, se puede apreciar que la cocción y el salteado fueron los métodos que afectaron en mayor medida la capacidad antioxidante en comparación con el crudo, presentando intervalos de absorbancia mayores, en comparación con el crudo. Por otra parte, el método de horneado y microondas se consideran como los tratamientos que preservaron la mayor capacidad para secuestrar el radical, observando una mayor pérdida del color en las muestras y por consiguiente una menor absorbancia.

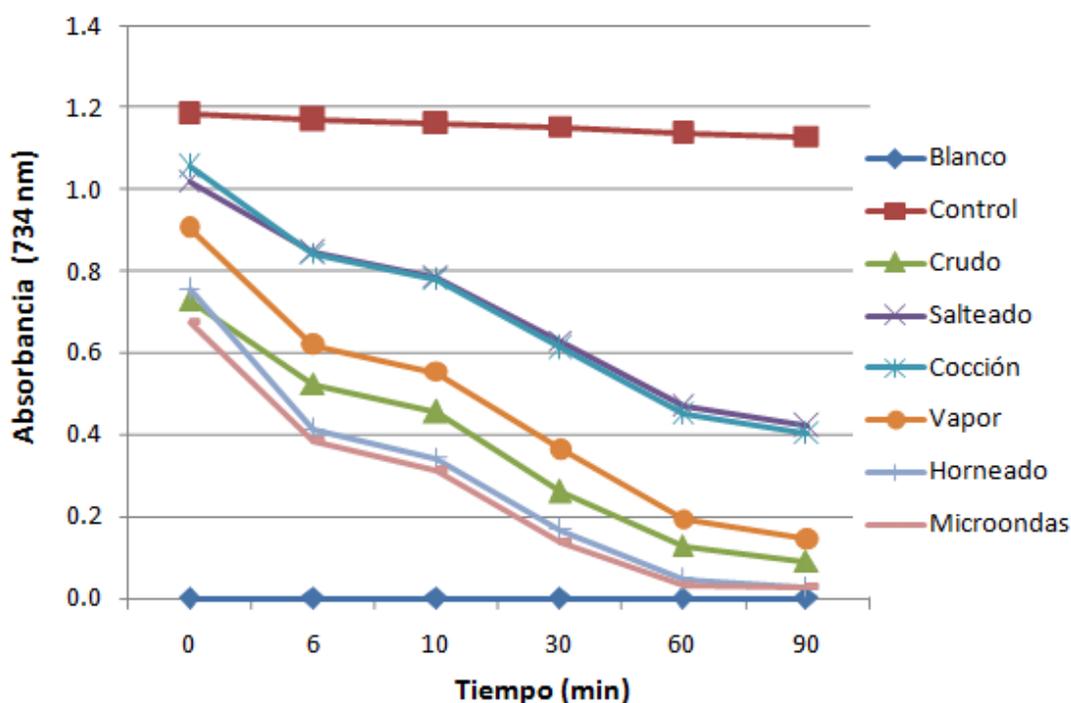


Figura 33. Cinética de ABTS para los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas determinada a 734 nm

Los resultados obtenidos reportados como $\mu\text{mol Eq de Tx/g}$ de flor seca se muestran en el Cuadro 13, así mismo en él se reporta el valor de porcentaje de inhibición que presentó cada extracto. La flor cruda presentó un contenido de $41.72 \pm 2.04 \mu\text{mol Eq de Tx/g}$ de flor seca, inhibiendo al radical en un 77.14%. Este valor al ser comparado con lo que se reporta en distintos vegetales, resultó ser superior en comparación con el ajo y la calabacita, los cuales presentan contenidos de: 12.5 ± 2.04 y $8.3 \pm 0.6 \mu\text{mol Eq de Tx/g}$, respectivamente (Murcia *et al.*, 2006). De igual manera, nuestros resultados son mayores a los obtenidos recientemente por Lazcano *et al.*, (2009) para las hojas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) con un valor de $6.47 \mu\text{mol Eq. de Tx/g}$ de hoja seca.

Cuadro 13. Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas, determinada por el ensayo ABTS^a.

Tratamiento	% de inhibición ABTS	µmol Eq. de Tx/g de flor seca
Crudo	77.14 ± 0.55 ^a	41.72 ± 2.04 ^a
Cocción en agua	46.33 ± 1.48 ^c	21.44 ± 0.19 ^c
Vapor	67.80 ± 2.32 ^b	37.04 ± 3.40 ^b
Salteado	49.27 ± 3.36 ^b	32.99 ± 1.69 ^b
Horneado	83.98 ± 2.09 ^b	42.97 ± 1.91 ^b
Microondas	87.96 ± 0.73 ^a	49.66 ± 3.50 ^a

^aLos valores son presentados como la media ± EE. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos, usando la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Sun *et al.*, (2009) determinaron la capacidad antioxidante y los fitoquímicos antioxidantes presentes en zanahorias biofortificadas de diferentes colores. Dichos autores reportaron que las muestras que exhibieron el mayor valor equivalente de Trolox fueron las de los colores: morado-amarillo y morado-naranja con 282.7 ± 23.4 y 71.2 ± 8.24 µmol Eq. de Tx/g de peso seco. Como puede observarse dichos valores destacan al ser comparados con los presentados en nuestro objeto de estudio. Sin embargo, es importante mencionar que la elevada capacidad antioxidante que presentaron las zanahorias, además de deberse a los compuestos fenólicos y carotenoides presentes, también se atribuye al contenido de antocianinas, responsables del color rojo y púrpura de estas zanahorias. En este mismo estudio, las zanahorias rojas y naranjas, presentaron contenidos de 16.2 ± 3.48 y 16.5 ± 0.54 µmol Eq. de Tx/g de peso, los cuales son casi 3 veces menores que los obtenidos en las flores de calabaza

De manera adicional, Pellegrini *et al.*, (2010) quienes evaluaron la capacidad antioxidante presente en especies del género *Brassica*, reportaron contenidos de 13 ± 0.0 , 19 ± 0.1 y 20 ± 0.1 µmol Eq. de Tx/g de peso seco para

coles de bruselas, coliflor y brócoli respectivamente, estos valores son menores a los reportados para la flor de calabaza en el presente estudio.

En el Cuadro 13 también se muestran los resultados para la flor una vez que fue sometida a los diferentes tratamientos térmicos. Donde se puede observar que los efectos variaron ampliamente, siendo reiteradamente la cocción en agua el método que provocó la mayor pérdida del poder antioxidante con diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0.05$), obteniendo valores de $21.44 \pm 0.19 \mu\text{mol Eq de Tx/g}$ de flor seca y presentando un porcentaje de pérdida del 48% con respecto a las muestras sin ningún tratamiento. Con respecto a lo anterior, Jiménez-Monreal *et al.*, (2009) observaron que la cocción en agua provocó una pérdida del 50 % de la capacidad antioxidante en ajos y 28.5% en calabacita, atribuyendo este hecho a que la concentración de los ácidos fenólicos es mayor en las capas externas de algunas verduras (Turkem *et al.*, 2005) y estos se encuentran muy expuestos al agua durante el proceso de cocción, reduciendo el poder antioxidante, por la lixiviación de los mismos. Lo anterior se ha reportado también en vegetales como: el ejote, la espinaca, la col y la coliflor (Sultana *et al.*, 2007)

Con lo que respecta al método del salteado, éste presentó una pérdida de la capacidad antioxidante del 20.93% reportando un contenido de $49.27 \pm 3.36 \mu\text{mol Eq de Tx/g}$ de flor seca. Lo anterior es comparable con lo reportado por Jiménez-Monreal *et al.*, (2009) quienes al someter a un proceso de freído, encontraron pérdidas estadísticamente significativas en coliflor y chile con 17.5 y 20.5% respectivamente. Por otra parte, el método de cocción al vapor presentó un contenido de $37.04 \pm 3.40 \mu\text{mol Eq de Tx/g}$ de flor seca con una pérdida de la capacidad antioxidante del 11.21%. Tal disminución en ambos métodos podría deberse al tiempo y temperatura empleados, ya que son factores que afectan los compuestos fenólicos o bien el tratamiento térmico puede inducir el asociaciones de las moléculas fenólicas con otras macromoléculas como carbohidratos o

proteínas, las cuales pueden ser solubles en otro solvente diferente al metanol empleado para la obtención del extracto analizado.

Las flores sometidas al proceso de horneado, presentaron un contenido de $42.97 \pm 1.91 \mu\text{mol Eq de Tx/g}$ de flor seca y aunque este resultado es ligeramente mayor (2%) que para el valor obtenido en la flor cruda, no se presentaron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) para ambos métodos. Al respecto, Jiménez-Monreal *et al.*, (2009) reportaron un incremento del valor TEAC en zanahorias del 11.1%, en apio del 49.6% y en ejotes del 57.8% después del proceso de horneado. En contraste, para el ajo observaron una pérdida de más del 50%.

Finalmente, nuestros resultados indican que al someter las flores a un tratamiento de cocción en microondas, el porcentaje de inhibición aumenta de manera significativa ($p \leq 0.05$) un 19% en relación a los resultados obtenidos para la flor cruda. Jiménez-Monreal *et al.*, (2009) observaron que en ajos sucedía algo similar, pero con porcentajes de aumento aún mayores (53%) al someterlos al mismo método.

Yamaguchi *et al.*, (2001) propusieron que el calentamiento por microondas conserva los componentes activos en el tejido de los vegetales. Nuestros resultados coinciden con lo anterior expuesto, y estos autores aseguran que el calentamiento por microondas, a la plancha y el horneado no estimulan la liberación de algunos antioxidantes de los tejidos cocidos, como lo hacen otros tratamientos como la cocción en agua. En contraste, Pellegrini *et al.*, (2010) para vegetales del género *Brassica*: Brócoli, col y coliflor, observaron que el método de microondas tenía un efecto perjudicial en dichos vegetales observando una disminución en los valores TEAC reportados. La Figura 34 ilustra la tendencia de la disminución de la capacidad antioxidante al radical ABTS^{•+} como sigue: cocción en agua > salteado > vapor. Y el aumento en horneado < microondas.

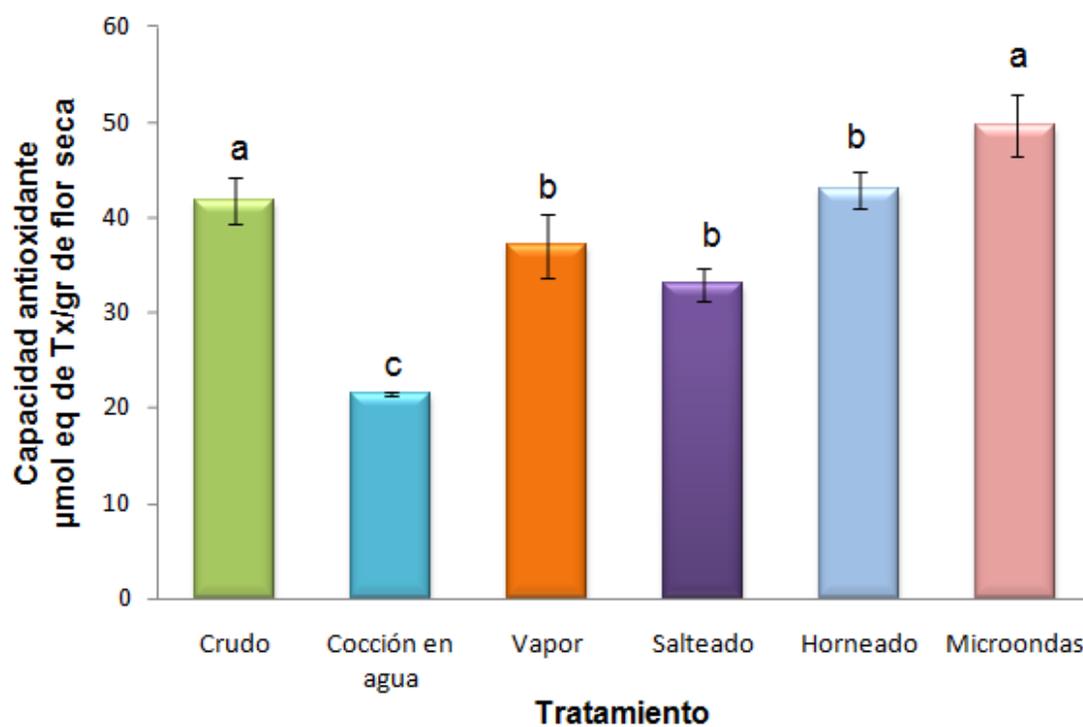


Figura 34. Efecto de los métodos de cocción en capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas, determinada por el ensayo ABTS

7.6.3 Método de FRAP (Poder antioxidante de reducción férrica)

Este método evalúa la capacidad antioxidante que presenta una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el Fe^{3+} presente en un complejo con la 2,4,6-tri (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{2+}) que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590 y 595 nm.

Después de llevar a cabo el ensayo de FRAP con las flores crudas y cocinadas, se evaluó la cinética de reacción de las muestras y el reactivo de FRAP durante 0, 4, 10, 30, 60 y 90 minutos, tomando las absorbancias a 90 minutos para fines de cuantificación (Figura 35). Como se puede apreciar al minuto 90 las muestras alcanzan un máximo de respuesta (Figura 35). Se puede observar que el tratamiento de la flor cruda mostró el mejor poder reductor y que una vez que ésta se sometió a los diferentes tratamientos térmicos, el poder disminuyó de manera significativa ($p \leq 0.05$).

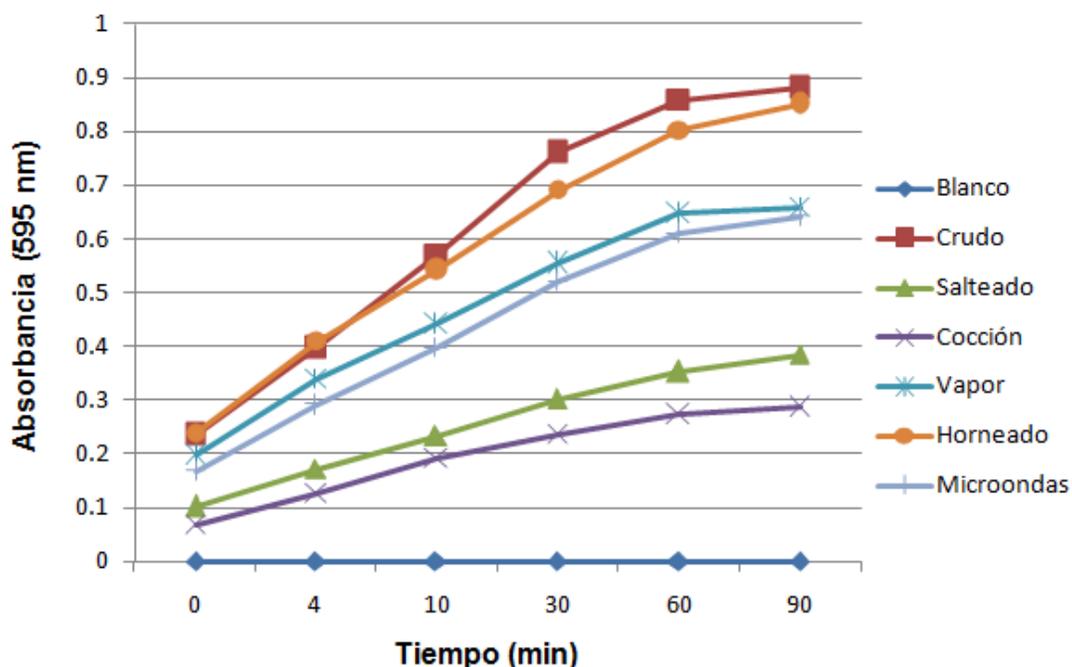


Figura 35. Cinética de FRAP para los extractos metanólicos de las flores crudas y cocinadas determinada a 595 nm

Los datos presentados en el Cuadro 14 muestran los valores obtenidos para la flor de calabaza antes y después de ser cocida. El extracto de la flor cruda ($71.83 \pm 6.76 \mu\text{mol Eq. de FeSO}_4/\text{g}$ de flor seca) mostró ser un buen reductor comparado con otras fuentes naturales, en el Cuadro 15 se presentan los valores comparados con la literatura.

Cuadro 14. Capacidad reductora de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas, determinada por el ensayo FRAP^a.

Tratamiento	$\mu\text{mol Eq. de FeSO}_4/\text{g}$ de flor seca
Crudo	71.83 ± 6.76^a
Cocción con agua	22.65 ± 1.80^c
Vapor	50.86 ± 4.94^{ab}
Salteado	37.64 ± 3.58^{bc}
Horneado	63.16 ± 3.33^{ab}
Microondas	45.64 ± 5.00^{ab}

^aLos valores son presentados como la media \pm EE. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos, usando la prueba Tukey ($\alpha=0.05$).

Cuadro 15. Capacidad reductora determinada por el ensayo FRAP de diferentes vegetales en estudios publicados.

Vegetal	$\mu\text{mol Eq. de FeSO}_4/\text{g}$ de peso seco	Referencia del estudio
Espinaca	26.94 ± 1.0	Pellegrini <i>et al.</i> , 2003
Alcachofa	56.9 ± 1.0	Ferracane <i>et al.</i> , 2008
Brócoli	52.3 ± 5.60	Miglio <i>et al.</i> , 2008
Calabacita	27.9 ± 1.10	Miglio <i>et al.</i> , 2008
Zanahorias	6.8 ± 0.30	Miglio <i>et al.</i> , 2008
Brócoli	57 ± 2.0 ,	Pellegrini <i>et al.</i> , 2010
Coliflor	34 ± 10.0	Pellegrini <i>et al.</i> , 2010
Col	32 ± 10.0	Pellegrini <i>et al.</i> , 2010

Después de someter la flor de calabaza al método de cocción en agua, el contenido fue de 22.65 ± 1.80 $\mu\text{mol Eq. de FeSO}_4/\text{g}$ de flor seca, observando un decremento que se vio reflejado en una diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al crudo y a los demás tratamientos, dando lugar a que éste método fuera el más perjudicial para las flores con un porcentaje de pérdida del 68.46%.

En general se pudo observar que los contenidos de $\mu\text{mol Eq. de FeSO}_4/\text{g}$ disminuyeron en todos los tratamientos realizados. Durante el salteado en las flores existió un decremento en el contenido, obteniendo un valor final de 37.64 ± 3.58 $\mu\text{mol Eq. de FeSO}_4/\text{g}$ de flor seca presentando un porcentaje de pérdida del 47.59%. Así mismo, los métodos de microondas, vapor y horneado provocaron una disminución estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) en el poder para reducir el Fe^{3+} con valores de, 45.64 ± 5.00 , 50.86 ± 4.94 y 63.16 ± 3.33 $\mu\text{mol Eq. de FeSO}_4/\text{g}$ de flor seca respectivamente, provocando pérdidas de 12.06 a 36.35%. Nuestros resultados no coinciden con otros trabajos realizados, ya que en ellos se ha reportado un aumento en los valores de FRAP para diversos vegetales estudiados (Miglio *et al.*, 2008; Pellegrini *et al.*, 2010; Ferracane *et al.*, 2008), sin embargo es importante mencionar que dicha capacidad variará dependiendo del tipo de vegetal, el tiempo empleado en el proceso, así como los compuestos fitoquímicos presentes en el alimento. En la Figura 36 se presenta la tendencia de disminución de poder de reducción férrica de los diferentes extractos donde se puede observar que el intervalo del contenido es de 22.65 ± 1.80 a 63.16 ± 3.33 , con un orden ascendente de flores cocidas en agua < salteadas < microondas < vapor < horneadas.

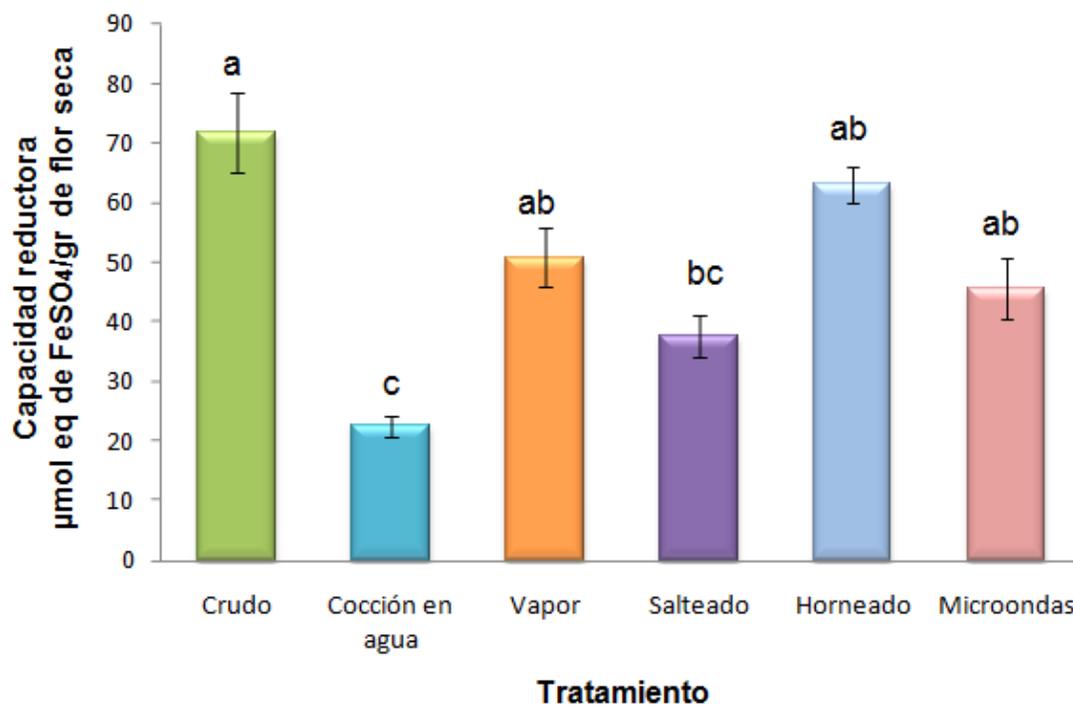


Figura 36. Efecto de los métodos de cocción en capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas, determinada por el ensayo de FRAP

7.6.4 Capacidad Quelante del hierro (II)

La transición bivalente de iones metálicos juega un papel muy importante en la catálisis de los procesos oxidativos destacando, la formación de radicales hidroxilo y reacciones de descomposición de hidroperóxidos, vía química Fenton (Kehrer, 2000), estos procesos se pueden aplazar por la quelación del hierro. Los grupos fenoxi de un compuesto fenólico desprotonado, poseen una alta densidad de carga, que se unen a los cationes cargados tales como los iones metálicos (hierro y cobre) y pueden catalizar la producción de radicales libres.

Por lo tanto, la habilidad de los extractos para quelar los iones hierro (II) se presenta en el Cuadro 16 el cual contiene los valores expresados en $\mu\text{mol eq. de EDTA/g}$ de flor seca. Donde el método de salteado y la cocción en agua, mostraron tener la mayor habilidad para quelar el hierro (II), observándose una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) aumentando la capacidad de quelación en comparación con el crudo. Sin embargo, lo anterior podría deberse al aceite absorbido por las flores durante el tratamiento (en el caso del salteado), ya que los compuestos presentes en el aceite (vitamina E, omega 6), podrían exhibir dicha capacidad. O bien, por éste hecho, la formación de nuevos compuestos como productos de la reacción de Maillard con capacidad antioxidante, pudieron haberse presentado en éste caso. Por otro lado, para la cocción, tal efecto podría deberse a los diferentes tipos de compuestos fenólicos y sus interacciones entre éstos y otros fitoquímicos de las estructuras celulares. Estas interacciones son modificadas por efecto de la temperatura y pueden resultar en una mejor disponibilidad de sitios que estructuralmente son necesarios para la asociación con el metal (Jeong *et al.*, 2004).

La capacidad quelante menor, fue para los tratamientos de horneado, microondas y vapor, presentando valores de: 14.89 ± 0.92 , 16.25 ± 1.42 y 16.46 ± 1.04 $\mu\text{mol eq. de EDTA/gr}$ de flor seca, respectivamente, en comparación con las flores de calabaza crudas, observándose en los tres tratamientos una disminución significativa.

Cuadro 16. Capacidad quelante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas, determinada por la capacidad de quelación del hierro (II)^a

Tratamiento	μmol Eq. de EDTA/g de flor seca
Crudo	23.03 ± 1.54 ^{bc}
Cocción en agua	28.10 ± 0.18 ^{ab}
Vapor	16.46 ± 1.04 ^c
Salteado	30.82 ± 2.91 ^a
Horneado	14.89 ± 0.92 ^c
Microondas	16.25 ± 1.42 ^c

^aLos valores son presentados como la media ± EE. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos, usando la prueba Tukey ($\alpha=0.05$).

Se han propuesto dos mecanismos para explicar las interacciones que ocurren entre los polifenoles, responsables de la capacidad antioxidante, y los polisacáridos. La primera sugiere la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo en el fenol y los átomos de oxígeno del azúcar de la pared celular de polisacáridos. Esta interacción puede entonces formar geles de dextrano, que son capaces de encapsular a los polifenoles, provocando que no estén disponibles para poder secuestrar radicales libres y/o quelar metales. El segundo se basa en la capacidad de algunos polisacáridos para desarrollar estructuras secundarias, como nanotubos, que crean cavidades hidrofóbicas capaces de encapsular complejos polifenólicos (Pinelo *et al.*, 2006). La Figura 37 muestra el comportamiento de los extractos para proteger contra el daño oxidativo mediante la quelación de metales de transición (hierro II).

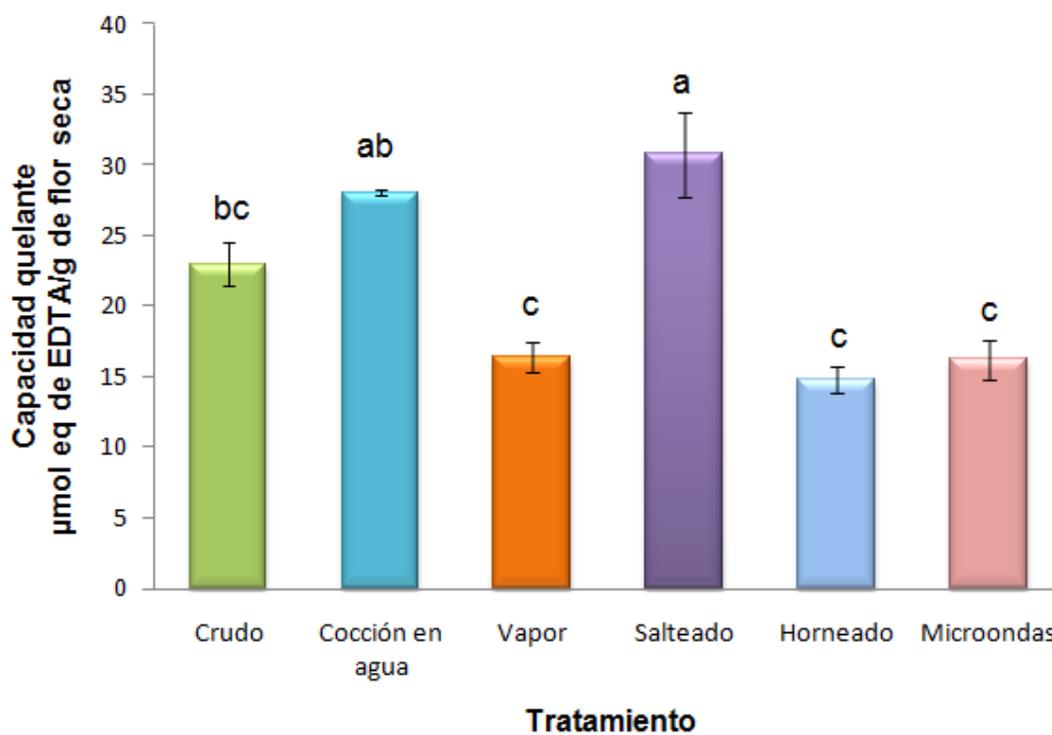


Figura 37. Efecto de los métodos de cocción en capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las flores crudas y cocidas, determinada por la capacidad de quelación de hierro (II)

7.7 Comparación de los ensayos utilizados de capacidad antioxidante (Fenoles totales, DPPH, ABTS y FRAP)

Múltiples mecanismos de reacción son usualmente involucrados en las mediciones de la capacidad antioxidante de un alimento. Por consiguiente, un método universal y simple que mida la capacidad antioxidante total de manera exacta, no existe, de tal forma que diferentes métodos han sido usados para determinar el poder antioxidante de un alimento.

La capacidad antioxidante fue determinada únicamente en la fracción metanólica obtenida, la cual representaba el contenido de los compuestos fenólicos (polares) presentes en la flor de calabaza.

El Cuadro 16 muestra las correlaciones existentes usando el coeficiente de correlación de Pearson, que es un índice que mide la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas y que es independiente de la escala de medida de las variables. Es un índice cuyos valores absolutos oscilan entre 0 y 1. Cuanto más cerca de 1 mayor será la correlación y menor cuanto más cerca de cero se encuentren los valores. Los antioxidantes pueden responder de diferente manera a distintos radicales o fuentes oxidantes, por ejemplo los carotenoides no son buenos atrapadores de radicales peroxilo en relación a los compuestos fenólicos y otros antioxidantes, sin embargo, los carotenoides son excepcionales para atrapar el oxígeno singlete.

Se puede observar que los múltiples ensayos utilizados en éste trabajo para medir la capacidad antioxidante basados en la transferencia de electrones en un medio ácido (FRAP), neutro (TEAC) o básico (Fenoles totales), presentaron una correlación positiva en nuestros resultados.

Cuadro 17. Coeficiente de correlación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante determinada por los diferentes métodos.

	Fenoles totales	ABTS	DPPH	FRAP
Fenoles totales	1.0000	0.7678	0.8679	0.8686
ABTS	0.7678	1.0000	0.7863	0.8174
DPPH	0.8679	0.7863	1.0000	0.9255
FRAP	0.8686	0.8174	0.9255	1.0000

Una fuerte correlación positiva fue observada entre los ensayos DPPH y FRAP ($r= 0.9255$) (Figura 38).

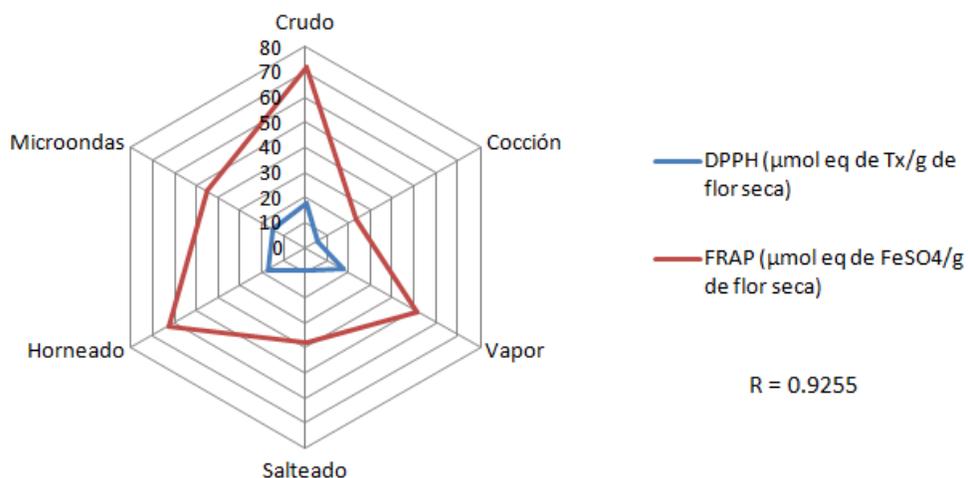


Figura 38. Gráfico radial de comparación entre la capacidad antioxidante determinada por el ensayo de DPPH y el método de FRAP, de los extractos metanólicos de la flor de calabaza sometida a diferentes métodos de cocción.

Es importante recordar que los ensayos de ABTS y DPPH reflejan la habilidad que tiene un antioxidante para donar electrones en un medio fisiológico a pH de 7.4 ó en un medio metanólico. Mientras que el ensayo de FRAP mide la reducción Fe^{3+} hasta hierro ferroso (Fe^{2+}) en presencia de antioxidantes. Sin

embargo los tres métodos están basados en la reacción de transferencia de electrones (TE) los cuales detectan la habilidad de un antioxidante potencial para transferir un electrón y reducir un compuesto incluyendo metales, carbonilos y radicales. La reactividad relativa en los métodos de TE está basada primeramente en una deprotonación (Lemanska *et al.*, 2001) y un potencial de ionización (PI) (energía que hay que suministrar a un átomo neutro, gaseoso y en estado fundamental, para arrancarle el electrón más débil retenido) del grupo funcional reactivo. En general los valores de PI disminuyen cuando incrementa el pH, reflejando un incremento en la capacidad de donación de electrones con una consecuente deprotonación. Una correlación entre el potencial redox (reacciones de oxidación-reducción) y los métodos de transferencia de electrones ha sido sugerida (Ou *et al.*, 2005)

Las reacciones de transferencia de electrones son usualmente lentas y requieren largos tiempos de reacción, la capacidad antioxidante calculada está basada sobre el porcentaje de disminución del producto (Prior *et al.*, 2005). Una correlación positiva también fue observada entre los ensayos DPPH y ABTS ($r=0.7863$), cuya característica es que ambos radicales pueden ser reducidos a través de la donación de electrones. Aunque el segundo tiene la capacidad de reaccionar de manera más rápida que el primero (Figura 39). De igual forma se aprecia finalmente una correlación entre los ensayos ABTS y FRAP ($r=0.8174$) (Figura 40), por que el potencial redox Fe (III)-Tptz/Fe (II).Tptz es comparable con el del $ABTS^{*+}$ (0.68V), similares compuestos reaccionan en ambos ensayos a pesar de que las condiciones de reacción difieren en cuanto a que: ABTS es llevado a cabo en un pH neutro y el ensayo de FRAP se conduce en pH ácido de 3.7 para mantener la solubilidad del hierro (Prior *et al.*, 2005)

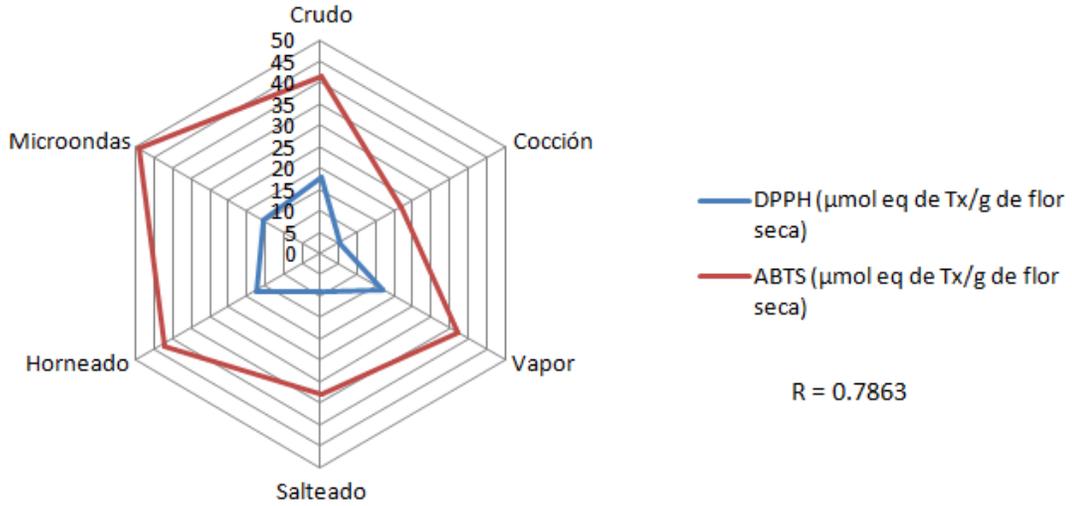


Figura 39. Gráfico radial de comparación entre la capacidad antioxidante determinada por los ensayos de DPPH y ABTS, de los extractos metanólicos de la flor de calabaza sometida a diferentes métodos de cocción.

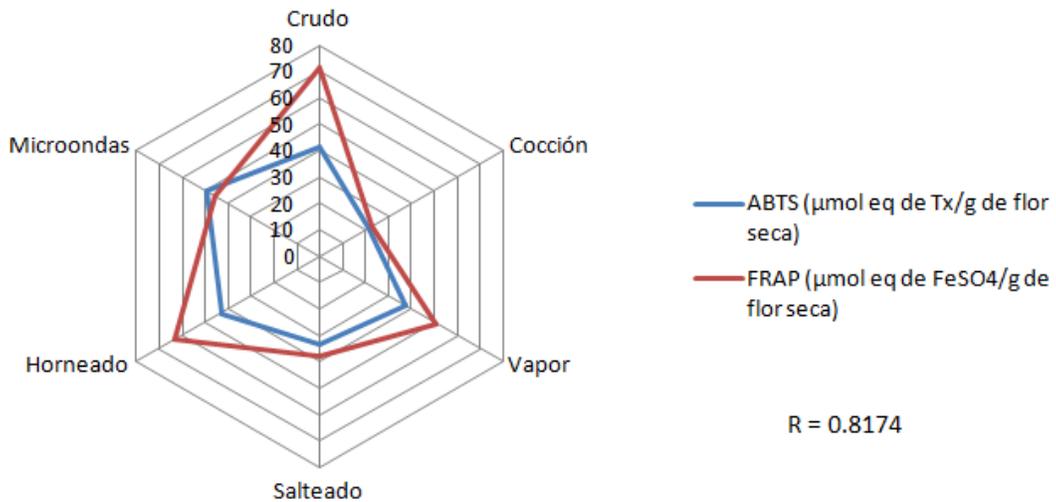


Figura 40. Gráfico radial de comparación entre la capacidad antioxidante determinada por el ensayo de ABTS y el método de FRAP, de los extractos metanólicos de la flor de calabaza sometida a diferentes métodos de cocción.

7.8 Comparación entre métodos de cocción en relación a los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante

En el presente apartado se realizó la comparación entre los métodos de cocción evaluados en este trabajo, con la finalidad de poder observar cual fue el tratamiento que preservó la mayor cantidad de compuestos o presentó una mejor respuesta a los ensayos de capacidad antioxidante aplicados. Los resultados obtenidos se basan en la utilización de los valores de todos los experimentos que se llevaron a cabo. Los gráficos radiales muestran cambios de los valores determinados en relación a un punto central. Donde se puede observar en las Figuras 42 y 45, para los métodos de cocción en agua y horneado, presentan mayores valores y las estrellas representadas se ven más pronunciadas, lo cual está directamente asociado con todos los resultados anteriores, mostrando que estos dos métodos podrían considerarse como los más sobresalientes en nuestro estudio. Por su parte los métodos de vapor, salteado y microondas (Figuras 43, 44 y 46) presentan estrellas menos pronunciadas y por lo tanto valores menores.

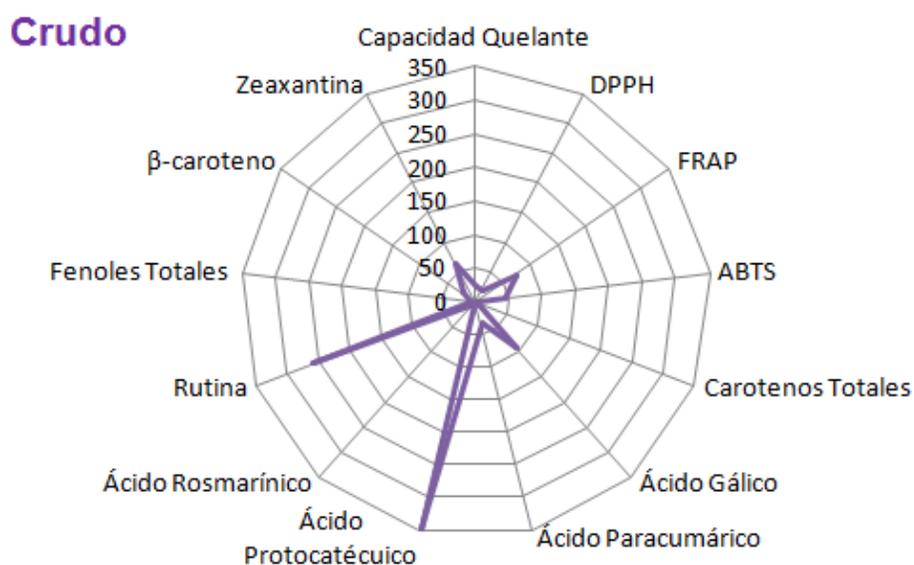


Figura 41. Gráfico radial de los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante en los extractos metanólico y hexánico de la flor de calabaza cruda

Cocción en agua

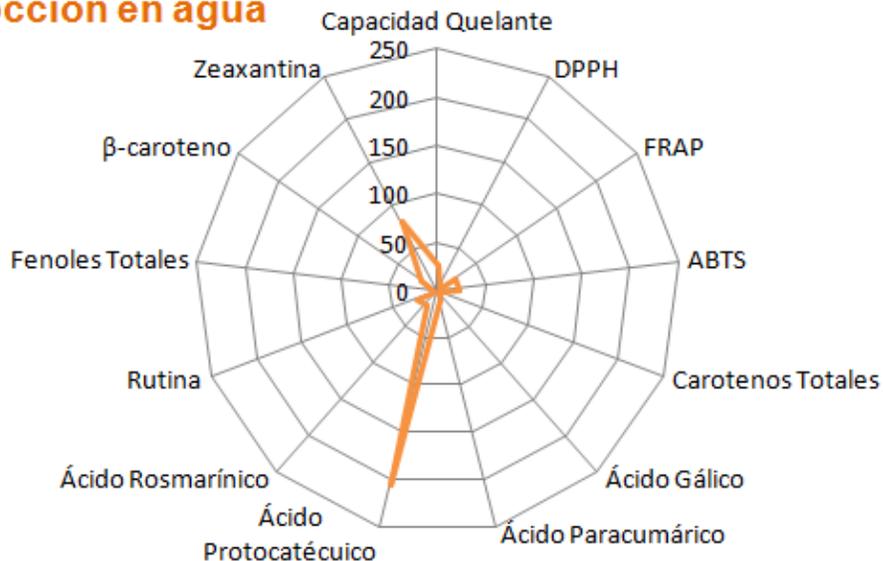


Figura 42. Gráfico radial de los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante en los extractos metanólico y hexánico de la flor de calabaza sometida al método de cocción en agua

Vapor

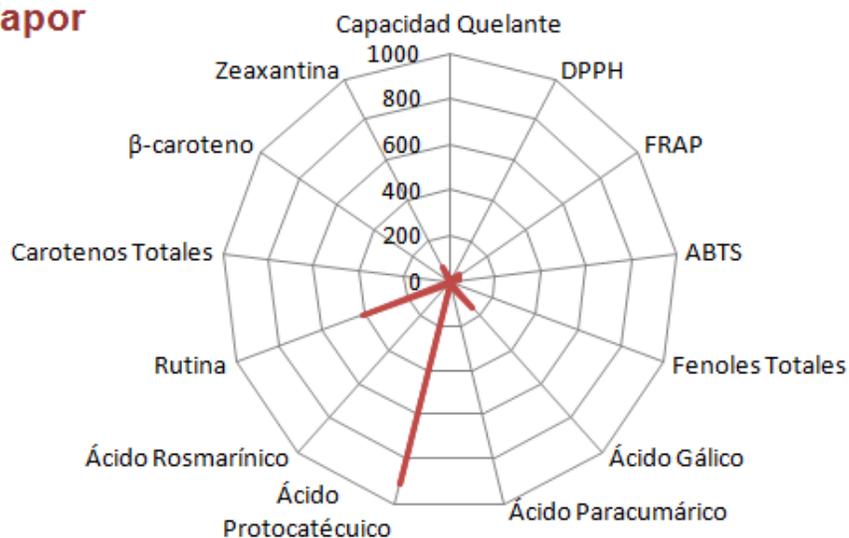


Figura 43. Gráfico radial de los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante en los extractos metanólico y hexánico de la flor de calabaza sometida al método de vapor

Salteado

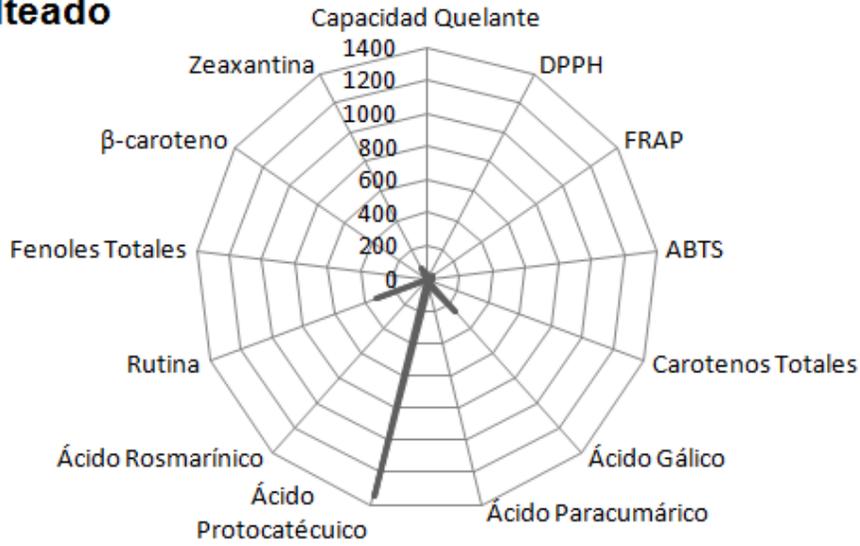


Figura 44. Gráfico radial de los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante en los extractos metanólico y hexánico de la flor de calabaza sometida al método de salteado

Horneado

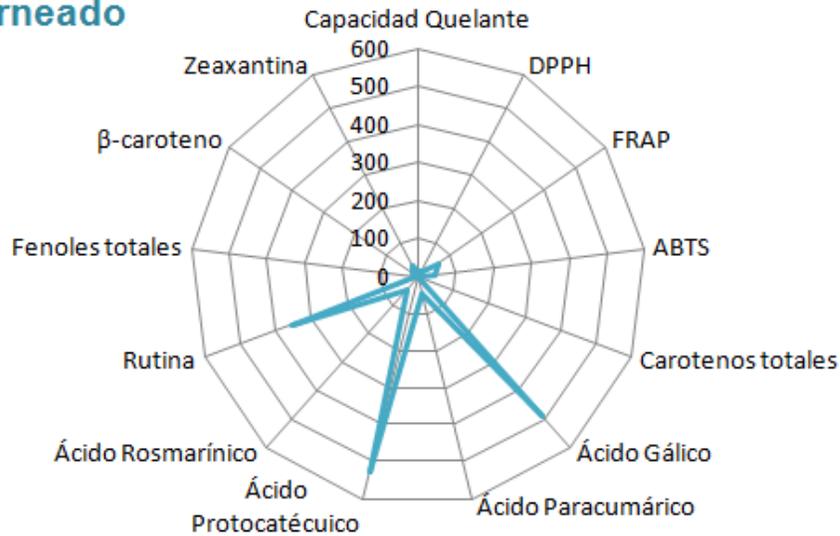


Figura 45. Gráfico radial de los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante en los extractos metanólico y hexánico de la flor de calabaza sometida al método de horneado

Microondas

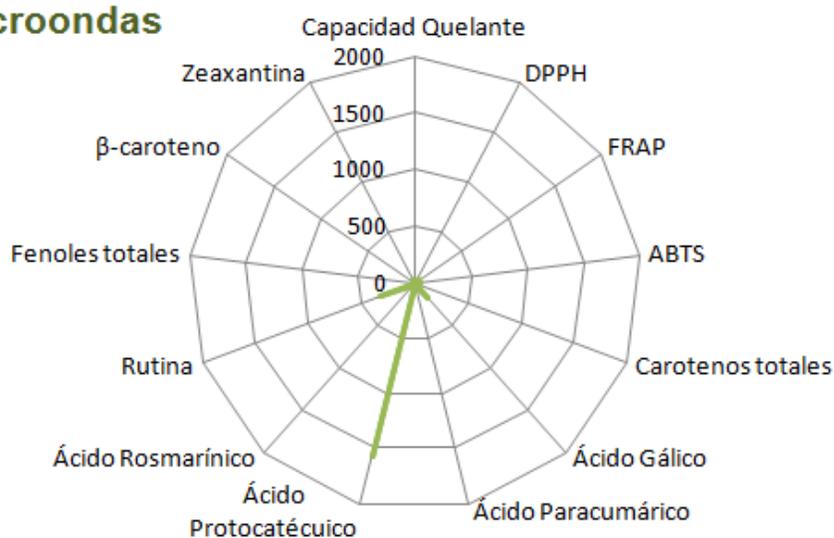


Figura 46. Gráfico radial de los compuestos nutraceuticos y la capacidad antioxidante en los extractos metanólico y hexánico de la flor de calabaza sometida al método de microondas

VIII. CONCLUSIONES

Hasta el momento no se puede asegurar cuál es el mejor método de cocción para lograr que no existan pérdidas de los compuestos nutraceuticos presentes en la flor de calabaza, tanto de carácter polar como los de no polar, sin embargo podría concluirse lo siguiente:

- El método de cocción en agua fue un método sobresaliente, ya que éste logró conservar los compuestos carotenoides presentes en la flor de calabaza debido a la insolubilidad que presentan dichos compuestos en un medio acuoso.
- En el método de cocción existieron pérdidas de los compuestos de carácter fenólico en cantidades elevadas debido a la destrucción de las paredes y subcompartimentos celulares. Es probable que dichos compuestos pasaron al medio de cocción (agua).
- Es recomendable consumir el agua de cocción con la que son elaborados diversos platillos con flor de calabaza (sopas, cremas o caldos), debido a que seguramente a ella migraron algunos de los componentes importantes.
- El método de horneado fue también uno de los métodos que preservó la mayor cantidad de compuestos (tanto lipofílicos como hidrofílicos) e incluso en algunos casos se observó un aumento de estos. Lo cual podría deberse a la producción de antioxidantes más fuertes por las reacciones químicas que se presentan debido a la temperatura empleada.
- El método de horneado es una posible alternativa de cocción, la cual podría contemplarse para el desarrollo de nuevos productos ya que las características (de sabor y textura) que presentaron las flores al ser cocidas por éste método, podrían ser aptas para la elaboración de botanas.

- Los resultados con respecto al método de salteado, el cual tuvo efectos intermedios podría deberse a la supresión de la capacidad de oxidación por la inactivación de enzimas oxidativas, la producción de nuevos antioxidantes no nutrientes o la formación de nuevos compuestos como productos de la reacción de Maillard con capacidad antioxidante.
- Para el método de salteado es recomendable evitar largos periodos de exposición al oxígeno, procurando cocinar la planta entera y posteriormente triturarla si es necesario.
- Los métodos de microondas y vapor los cuales causaron la mayor pérdida de carotenoides podría deberse al efecto que provocó la temperatura como acelerador de la reacción de degradación. Para estos tratamientos es importante evitar largos tiempos de exposición al calor.
- Las variaciones en la capacidad antioxidante presente en la flor de calabaza podrían deberse a diferentes factores: (1) la estructura bioactiva que se presente en el vegetal, (2) el método de cocción, (3) la disponibilidad de los compuestos, (4) la temperatura, (5) la localización de las estructuras en los vegetales, (6) la estabilidad de la estructura al calentamiento, (7) la actividad sinérgica de las estructuras y (8) los sistemas de reacción de cada ensayo utilizado.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akapa-Punam, M. A. 1984. Effects of wilting, blanching and storage temperatures on ascorbic acid and total carotenoids content of Nigerian fresh vegetables. *Plant Foods Hum. Nutr.* 34:177–180.
- Al-Duais, M., Hohbein, J., Wernwe, S., Böhm, V. and Jetschke, G. 2009. Contents of vitamina C, carotenoids, tocopherols and tocotrienols in the subtropical plant species *Cyphostemma digitatum* as affected by processing. *J. Agric. Food Chem.* 57:5420-5427.
- Bafidu, G. I. O., Akapapunam, M. A., and Mybemere, V. N. 1995. Fate of β -carotene in processed leaves of fluted pumpkin (*Telfaria occidentalis*), a popular vegetable in Nigerian diet. *Plant Foods for Human Nutrition*, 48:141–147.
- Barash, C. W. 1997. *Edible Flowers: Desserts and Drinks*. Fulcrum Publishing. Golden, Colorado.
- Bernhardt, S. and Schlich, E. 2006. Impact of different cooking methods on food quality: Retention of lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables. *J. Food Eng.* 77:327–333.
- Bernstein, P. S., Khachik, F., Carvalho, L. S., Muir, G. J., Zhao, D.-Y., Katz, N. B. 2001. Identification and quantitation of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye. *Exp. Eye Res.* 72: 215-223.
- Breithaupt, D. E. and Bamedi, A. 2001. Carotenoid Esters in Vegetables and Fruits: A Screening with Emphasis on α -Cryptoxanthin Esters. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2064-2070.
- Bunea, A., Andjeldkovic, M., Socaciu, C., Bobis, O., Neacsum, V. R., Vam, C. J. 2008. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chem.* 108:649–56.
- Castelló, T. and Piña-Luján I. 1987. *Presencia de la comida prehispánica*. México City, pp 55–58.
- Chen, F.D.K., R.O., Petri J. G., Bolhman J., Pichersky E., Tholl D. 2004. Characterization of root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8 cineole. *Plant Physiol.* 135: 1956-1966.

- Clifford, M.N. 1996. Anthocyanins in foods. Symposium on polyphenols and anthocyanins as food colourants and antioxidants, brussels., Belgium, pp. 1–19, EU.
- Crews, H., Alink, G., Andersen, R. 2001. A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. *Br J Nutr.* 86:S5–S35.
- De Menézes, C. B., Wilson, R. M., De Azevedo, S. M., Faria, V. M., Nascimento, R. I., Nogueira, W. D., Gomes, A. A. L. and Bearzoti, E. 2005. Inheritance of parthenocarpy in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Genet. Mol. Res*, 4, 1: 39-46.
- Delgado, G. 2005. Origen Químico de los productos Naturales Orgánicos. *Revista de la Academia Mexicana de las Ciencias.* Vol 56. Num 2. pp 6-16.
- Dewanto, V., Xianzhong, W. Fafui, K. A. and Rui, H.L. 2006. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50:3010-3014.
- Esuoso, K., Lutz, H., Kutubuddin, M. and Bayer, E. 1998. Chemical composition and potential of some unterutilized tropical biomass. I: fluted pumpkin (*Telfaria occidentalis*). *Food Chem.* 61: 487–492.
- FAO, 1993. Valor nutritivo y usos en la alimentación humana de algunos cultivos autóctonos subexplotados de Mesoamérica. Santiago, Chile.
- Ferracane, R., Pellegrini, N., Visconti, A., Graziani, G., Chiavaro, E., Miglio, C. and Fogliano, V. 2008. Effects of different cooking methods on antioxidant capacity, and physical characteristics of artichoke. *J. Agric. Food. Chem.* 56: 8601-8608.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L. 2000. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “Ferric Reducing Antioxidant Power” assay and cyclic voltammetry. *Biochim. Biophys. Acta* 1721: 174-184.
- Free, J.B. 1992. *Insect Pollination of Crops.* Academic Press, London, England.
- Fu, C., Shi, H. and Li, Q. 2006. A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant Foods Hum. Nutr.* 61: 70–77.
- Fu, Marorun., He, Z., Zhao, Y., Yang, J., Mao, L. 2009. Antioxidant properties and involved compounds of daylily flowers in relation to maturity. *Food Chem.* 114:1192-1197.
- Fukumoto, L. R., Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant Activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48(8):3597-3604

- García, N. and Villarubia, A. 2003. Pétalos comestibles. *Entrepreneur.com*.
- García-Mateos, R., Lucas, B., Zendejas, M., Soto-Hernández, M., Martínez, M., Sotelo, A. 1996 Variation of total nitrogen, nonprotein nitrogen content, and types of alkaloids at different stages of development in *Erythrina americana* seeds. *J Agric Food Chem.* 44:2988–2991.
- Gayathri, G. N., Platel, K., Prakash J., Srinivasan K. 2004. Influence of antioxidant species on the retention of β -carotene in vegetables during domestic cooking processes. *Food Chem.* 84:35-43.
- Gillaspy, G., Bem-David H. and Gruissem, W. 1993. Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell.* 5:1439-1451.
- Glew, R. H., Vanderjagt, D. J., Lockett, C., Grivetti, L. E., Smith, G. C., Pastuszyn, A., Millson, M. 1997. Amino acid, fatty acid and mineral composition of 24 indigenous plants of Burkina Faso. *J. Food Comp Anal.* 10:205–217.
- Glyszczyńska-Świgło, A., Ciska, E., Pawlak-Lemanska, K., Chmielewski, J., Borkowski, T., Tyrakowska, B. 2006. Changes in the content of health promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. *Food Addit. Contam.* 23:1088–1098.
- Graziani, G., Pernice, R., Lanzuise, S., Vitaglione, P., Anese, M., Fogliano, V. 2003. Effect of peeling and heating on carotenoid content and antioxidant activity of tomato and tomato-virgin olive oil systems. *Eur. Food Res. Technol.* 216:116–121.
- Handelman, G. J., Snodderly, D. M., Adler, A. J., Russett, M. D., Dratz, E. A. 1992. Measurement of carotenoids in human and monkey retinas. *Methods Enzymol.* 213:220-230.
- Harrison, M. and Harris, N. D. 1985. Effects of processing treatments on recovery of capsaicin in jalapeno peppers. *J Food Sci.* 50:1764-1765.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. and Van de Putte, B. 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in tea infusions, wine and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 41:1242–1246.
- Hinneburg, I., Dorman, H. J. D., Hiltunen, R. 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.* 97: 122-129.
- Howard, L. A., Wong, A. D., Perry, A. K. and Klein, B. P. 1999. β -carotene and ascorbic acid retention in fresh and processed vegetables. *J. Food Sci.* 64:929–936.

- Huffman, V. L. Shadle, E. R., Villavon. B., E. E. 1978. Volatile components and pungency in fresh and processed jalapeno peppers. *J Food Sci.* 43:1809-1811.
- Huggle, S., Hunsaker, J. C., Coyne, C. M., Sparks, D.L. 1996. Oxidative stress in sudden infant death syndrome. *J. Child Neurol.* 11:433-438, 1996.
- Humphries, M. J. and Khachik, F. 2003. Distribution of lutein, zeaxanthin and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat and pasta products. *J. Agric. Food Chem.* 51:1322-1327.
- Ismail, A., Marjan, Z. M., and Foong, C. W. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem.* 87:581-586.
- Jeong, S., Kim, S., Kim, D., Jo S., Nam, K., Ahn, D., Lee, S. 2004. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J. Agric. Food Chem.* 52:3389-3393.
- Jiayi, S., Jinyan, G., Ji'er, L., Xiaoqin, W., Ying, Z. 2009. Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *LWT - Food Sci Technol.* 42:477-482.
- Jiménez-Monreal, A. M., García-Díaz, L., Martínez-Tomé, M., Marical, M. and Murcia M. A. 2009. Influence of cooking methods on antioxidant activity of vegetables. *J Food Sci.* 74:3,H97-H103.
- Kalt, W. 2005. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *J Food Sci.* 70:11–19.
- Kehrer, J. P. 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicol.* 149:43-50.
- Khachik, F., Bernstein, P. S., Garland, D. L. 1997. Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. In *Vest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 38:1802-1811.
- Khachik, F., Carvalho L., Bernstein P. S., Muir G. J., Zhao D. Y. and Katz N. 2002. Chemistry, distribution and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp Biol. Med.* 227: 845-851.
- Kislichenko, V. S. and Vel'ma, V. 2006. Amino acid composition, of flowers, leaves and extract of *Sambucus nigra* flowers. *Chem Nat Comp.* 42:125–126.
- Lauderdale, C. and Evans, E. 2007. Edible flowers. Horticulture information leaflet 8513, NC State University. College of Agriculture and Life Sciences.

- Lazcano-Peralta, A. L., Mendoza-Díaz, S. O., Castaño-Tostado, E., Ortíz, G. G., Loarca-Piña, G. F. Efecto de los métodos de cocinado en la calidad nutricional, metabolitos secundarios y capacidad antioxidante de las hojas de *Amaranthus hypochondriacus* L. variedad revancha. Universidad Autónoma de Querétaro, México, Tesis de Maestría.
- Lee, S. K. and Kader, A. A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.* 20:207–220.
- Lee, Y. and Howard, I. 1999. Firmness and fitochemical losses in pasteurized yellow banana peppers (*Capsicum annuum*) cultivars. *J Food Sci.* 47:700–703.
- Leman, T., Hulya, A., Kayaly and Raziye, O. U. 2007. *In Vitro* antioxidant properties of *Cucurbita pepo* L. male and female flowers extracts. *Plants Foods Human Nutr.* 62:49-51.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Softer., A. E. M. F. 2001. The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxiflavones. *Free Radical Biol. Med.* 31:869-881.
- Lentz, D. L., De Land, P. M., Alvarado, J. A, Tarighat, S., and Bye, R. 2007. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticate in Mexico. *The National Academy of Sciences of the USA. PNAS* 105 (17): 6232–6237.
- Li, W., Gao, Y., Zhao, J. and Wang, Q. 2007. Phenolic, flavonoid, and lutein ester content and antioxidant activity of 11 cultivars of chinese Marigold. *J. Agric. Food Chem.* 55:8478-8484.
- Li, C., Du. H., Wang. Liangsheng., Shu Q., Zheng. Yuanrun, X., Jingjing Y., Zhang., R. Y. and Yuxuan G. 2009. Flavonoid Composition and antioxidant activity of tree Peony (*Paeonia Section Mountan*) yellow flowers. *J. Agric. Food Chem.* 57:8496-8503.
- Link, L. B. and Potter, J. D. 2004. Raw versus cooked vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13:1422–1435.
- López-Berenguer, C., Carvajal, M., Moreno, A. D. and Viguera, G. C. 2007. Effects of microwave cooking conditions on bioactive compounds present in broccoli inflorescences. *J. Agric. Food Chem.* 55:10001–10007
- Lynn, Smythe. 2007. Hystory of edible flowers. Assiated Content.

- Marín, Loaiza, J. C. and Céspedes, C. L. Compuestos volátiles de las plantas: origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones. 2007. Revista Fitotecnia Mexicana., Vol. 30, Num. 004. Chapingo México. pp: 327-351.
- Mares-Perlman, J., Millen, A. E., Ficek, T. L., Hankinson, S. E. 2002. Symposium: Can lutein protect against chronic disease? The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. J. Nutr. 132:518S-524S.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J. Ros, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Latinoamericanos de nutrición., Unidad Docente de Bromatología e Inspección de Alimentos., Universidad de Murcia., España., vol. 50., No. 1.
- Matus, Z. P., Molnar and Szabo, L. G. 1993. Main carotenoids in pressed seeds (Cucurbitae semen) of oil pumpkin (*Cucurbita pepo* convar. *pepo* var. *styriaca*). Acta Pharm. Hung. 63:247-56.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. L., Heredia, F. J., 2004. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla- Sevilla, España. Archivos Latinoamericanos de Nutrición., 54:2.
- Middleton, Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacol. Rev. 52:673-839.
- Miglio, C., Chiavaro, E., Visconti, Attilio., Flogliano, Vincenzo and Pellegini Nicoletta. 2008. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. J. Agric. Food. Chem. 56:139-147.
- Murcia M. A, Jiménez A. M, Parras P, Martínez-Tomé M. 2006. Fruits and vegetables as source of antioxidants to prevent diseases. In: Aranceta J, Pérez-Rodrigo C, Editors. Fruits, vegetables and health. Barcelona, Spain: Elsevier. 99-125.
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidow M., Zhang H. Y. 2004 Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS assay. J. Agric. Food Chem. 52:4669-4674.
- Nepi, M. and Pacini, E. 1993. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. Ann. Bot. 72:527-536.

- Nicoli, M. C., Anese, M., Parpinel, M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 94-100.
- Niisu, P. Y. and Rodríguez-Amaya D. B. 2005. Flowers and Leaves of *Tropaeolum majus* L. as rich sources of Lutein. *Sensory Nutr Food.* 70: 9:S605-S609.
- Onayemi, O., and Bafidu, G. I. O. 1987. Effect of blanching and drying methods on nutritional and sensory quality of leafy vegetables. *Plant Foods Hum. Nutr.* 37:291–298.
- Órnelas-Paz, J. J., Martínez-Burrola, J. M., Ruíz-Cruz S., Santana-Rodríguez V., Ibarra-Junquera V., Olivas, I. G., and Pérez-Martínez J. D. 2010. Effect of cooking on the capsaicinoids and phenolics contents of mexican peppers. *Food Chem.* 119:1619-1625.
- Ou, B., Priot, L., Huang, D., 2005. The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53:1841-1856.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. Deemer, E. K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity ORAC and ferric reducing antioxidant power FRAP assays. A comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 50:3122–3128.
- Padilla de Ortiz, M. G. 2004. Flores para el mal de amores: Delicias Gastronómicas. Fondo de Cultura Económica. Colección tezontle, Bogotá Colombia, pp: 12-14 y 111.
- Padmavathi, K., Udipi, S. A. and Rao, M. 1992. Effect of different cooking methods on b-carotene content of vegetables. *J Food Sci Techn.* 29:137–140.
- Paiva, R. A. S. and Russell, M.R. 1999. β -Carotene and other carotenoids as antioxidants. Review Series: Antioxidants and their Clinical Applications *Journal of the American College of Nutrition.* Vol. 18, No. 5, 426–433.
- Park, Y. W. 1987. Effect of freezing, thawing, drying and cooking on carotene retention in carrots, broccoli, spinach. *J Food Sci.* 52:1022–1025.
- Pellegrini, N., Chiavaro, E., Gardana, C., Mazzeo, T., Contino, D., Gallo, M., Rizo, P., Flogliano V. and Porrini N. 2010. Effect of different cooking methods on color, phytochemical concentration and antioxidant capacity of raw and frozen *Brassica* vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 58:4310-4321.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del rio D., Salvatore, S. Bianchi, M. and Brighenti, F. 2003. Total antioxidant capacity of plants foods, beverages and

- oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* 2813-2819.
- Pietra, F. 2002. Biodiversity and natural product diversity, *Pergamon Tetrahedrom organic series.*, Vol. 21.
- Pinheiro, San'Ana, H. M.; Stringheta, P. C.; Cardoso Brandão, S. C.; Cordeiro de Azeredo, R. M. 1998. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot *Daucus carota* L. prepared by food service. *Food Chem.* 61:145–151.
- Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A. 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Food Sci. Technol.* 17:579-590.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods of the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 53:4290-4302.
- Podsêdek, A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. *Lebensm-Wiss. Technol.* 40:1–11.
- Puupponen-Pimia, R., Hakkinen, S. T., Aarni, M., Suortti, T., Lampi, A. M., Eurola M., 2003. Blanching-long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *J Agric Food Chem.* 83:1389-1402.
- Rahman, M. M., M. A. Wahed, D. Mahalanabis and R. B. Sack. 1995. "Preparing and preserving green leafy vegetables for poor communities in Bangladesh." In *Empowering Vitamin A Foods*. Eds. E. Wasantwisut and G. A. Attig. Bangkok: Institute of Nutrition. 61- 68.
- Raju, M., Varakumar, S., Lakshminarayana, R., Pharthasarathy T. K, Baskaran, V. 2007. Carotenoid composition and vitamin A activity of medicinally important green leafy vegetables. *Food Chem.* 102:1598-1605.
- Reddy, V., K. Vijayaraghavan, K. Bhaskarachary and M. Rani. 1995. "Carotene rich foods: The Indian experience." In *Empowering Vitamin A Foods*. Eds. NE. Wasantsvisut and G. A. Attig. Bangkok: Institute of Nutrition. 15-28.
- Rickman, J. C., Barret, D. M. and Bruhn, M. C. 2007. Review. Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *J Sci Food Agric.* 87: 930-944.
- Rodríguez-Amaya, D. B 1997. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin carotenoids in prepared, processed and stored foods. Departamento de Ciências de Alimentos Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campina.

- Rodríguez-Amaya, D. B. 1993. "Stability of carotenoids during the storage of foods." In Shelf Life Studies of Foods and Beverages. Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects. Ed. by G. Charalambous. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 591-628.
- Ruíz, M. and Sotelo, A. 2001 Chemical composition, nutritive value, and toxicology evaluation of Mexican wild lupins. *J Agric Food Chem.* 49:5336–5339.
- Salunhke, K. D. and Kadam, S. S. 1998. Handbook vegetable science and technology. Pumpkins, squashes and gourds. MNarcel Dekker. Inc. New York. 273:278.
- Sandberg, A. S. and Anderine, R. 1986. HPLC method for determination of inositol, tri, tetra, penta and hexafosfatos in food and intestinal contents. *J Food Sci.*, 51: 447-450.
- Scalbert, A. and Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130:2073S-2085S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C. and Rémésy. 2005. Dietary polyphenols and prevention of diseases. *Critical Review in Food Science and Nutrition*; 45:287-306.
- Schweiggert, U., Schieber., A. and Carle, R. 2006. Effects of blanching and storage on capsaicinoid stability and peroxidase activity of hor chili peppers (*Capsicum frutesces* L.) *Inn Sci Emerging Techn.* 7:217-224.
- Singh, G., Kawatra, A., and Sehgal, S. 2001. Nutritional composition of selected green leafy vegetables, herbs, and carrots. *Plant Foods Hum. Nutr.* 56:359–364.
- Sikora, E., Cieslik, E., Leszcynska, T., Filipiak-Florkiewicz, A. and Pisulewski, P. 2008. The antioxidant activity selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chem.* 107:55-59.
- Skinner, J.A. and Lovett, G. 1992. Is one visit enough? Squash pollination in Tennessee. *Am. Bee J.* 132: 815.
- Smrkolj, P., Stibil, V., Kreft, I. and Kapolna, E. 2005. Selenium species determination in selenium-enriched pumkin (*Cucurbita pepo* L.) seds bye HPLC UV-HC- AFS. *Anal Sci.* 21: 1501-1504.
- Somsub, W., Kongkachuichai, R., Sungpuag, P., Charoensiri, R. 2008. Effects or three convencional cooking methos on vitamin C, tannin, myo-inositol phosphates contents in selected Tahi vegetables. *J Food Comp Anal.* 21:187-197.

- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruona, O. I., Bahorun, T. 2005. Phenolics as potent antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*. 200:213.
- Sotelo, A. 1996. The nutritive value of wild Mexican legumes with a potential for nutritional use. In: Nwokolo E, Smartt J (eds), *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*. London, pp 33–45
- Sotelo, A. 1997. Constituents of wild food plants. In: Johns and Romeo (eds) *Functional Food Phytochemistry*. New York., pp 89–106.
- Sotelo, A., López-García, S., Basurto-Peña, F. 2007. Content of nutrient and antinutrient in edible flowers of wild plants in México. *Plants Foods Hum. Nutr.* 62: 133-138.
- Steeghs, M., Bais, H. P. Gouw J., Goldan, P., Kuster, W., Northway, M., Fall, R. Vivanco, J. M. 2004. Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) as a new tool for a real time analysis of root-secreted volatile organic compounds (VOCs) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 135; 47-58.
- Sultana, B, Anwas, F, Iqbal, S. 2007. Effect of different cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. *Int J Food Sci Technol* doi: 10.1365-2621.
- Sun, Philipp, W. Simon. and Sherry, A. Tanumihardjo. 2009. Antioxidant phytochemicals and antioxidant capacity of biofortified carrots (*Daucus carota* L.) of various colours. *J. Agric. Food Chem.* 57:4142-4147.
- Tangvarasittichai, S., Sriprang, N., Hamroongroj, T. and Changbumrung, S. 2005. Antimutagenic Activity Of *Sesbania Javanica* Miq. Flower DMSO extract and its major flavonoid glycoside southeast Asian. *J Trop Med Public Health Thailand.* 36 (6):1543-1551.
- Tapiero, H., Townsend, D. M., Tew, K. D. 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother.* 58:100.
- Tlili, N., Nasri, N., Saadaoui, E., Khaldi, A. and Triki, S. 2009. Carotenoid and tocopherol composition of leaves, buds, and flowers of *Capparis spinosa* Grown Wild in Tunisia. *J. Agric. Food. Chem.* 57:5381-5285.
- Turkmen, N., Sari, F., Velioglu S. 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem* 93:713–8.

- Turkmen, N., Poyrazoglu, E. S., Sari, F., Velioglu, Y. S. 2006. Effects of cooking methods on chlorophylls, pheophytins and colour of selected green vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41:281–288.
- Van, Het Hof, K. H.; Tijburg, L. B. M.; Pietrzik, K.; Weststrate, J. A. 1999. Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix. *Br. J. Nutr.* 82:203–212.
- Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J. and Rissanen, HT. 2006. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J. Clin Nutr.*, 83:1265-1271.
- Wildman, C. 2001. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. CRC Series in modern Nutrition. pp7 y 8.
- Winkler, C., Wirleitner, B, Harald, S. K., Schennach and Fuchs, D. 2005. Extracts of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds suppress stimulated peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Am J Immun.* 1 (1): 6-1.
- Wolfenbarger, D. D. 1965. Honey bees increase squash yields. *Am. Bee J.* 105: 52.
- Yadav, S. K. and Sehgal, A. 1997. Effect of home processing on ascorbic acid and b-carotene content of spinach (*Spinacia oleracea*) and amaranth (*Amaranthus tricolor*) leaves. *Plant Foods Hum. Nutr.* 47:125–131.
- Yamaguchi, T., Mizobuchi, T., Kajikawa, R., Kawashima, H., Miyabe, F., Terao, J., Takamura, H., Matoba, T. 2001. Radical scavenging activity of vegetables and the effect of cooking on their activity. *Food Sci Technol Res.* 7:250–257.
- Zhang, Y. J., Cichewicz, R. H, Nair, M. G. 2004. Lipid peroxidation inhibitory compounds from daylily (*Hemerocallis fulva*) leaves. *Life Sci.* 75: 753-763.