Caracterización y evaluación de las propiedades nutricionales y aplicaciones biomédicas de especies de flores comestibles: *Rosa x hybrida*, *Tagetes erecta* y *Antirrhinum majus*

LARA CRESPO ANTOLÍN

DIRECTORES: DR. LORENZO RIVAS GARCÍA Y DRA. CRISTINA SÁNCHEZ GONZÁLEZ

PROGRAMA DE NUTRICIÓN Y CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Lara Crespo Antolín
ISBN: 978-84-1195-609-3
URI: https://hdl.handle.net/10481/97714

El trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral, titulada “caracterización y evaluación de las propiedades nutricionales y aplicaciones biomédicas de especies de flores comestibles: *Rosa x hybrida, Tagetes erecta y Antirrhinum majus*” ha sido financiado por FEDER/Junta de Andalucía-Consejería de Economía y Conocimiento, Grants BAGR-193-UGR 18, B-AGR-652-UGR20, y P20_00336.

Dª. Cristina Sánchez González. Catedrática de Universidad, departamento de Fisiología, facultad de Farmacia de la universidad de Granada

Dr. Lorenzo Rivas García. Investigador postdoctoral programa PAIDI, departamento de Fisiología. Facultad de Farmacia de la universidad de Granada.

Directores de la Memoria de Tesis Doctoral de título , Caracterización y evaluación de las propiedades nutricionales y aplicaciones biomédicas de especies de flores comestibles: *Rosa x hybrida, Tagetes erecta y Antirrhinum majus,* realizada por la doctoranda Lara Crespo Antolín, autorizan sus presentación ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman la presente a 8 de mayo de 2024.

Fdo: Cristina Sánchez González Fdo. Lorenzo Rivas García

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de varias personas a la que quiero mostrar mi agradecimiento.

En primer lugar, al Dr. Lorenzo Rivas García, por tu labor como director y amigo, has demostrado una paciencia infinita, una compresión y una empatía incomparable, gracias, sin ti esto hubiera sido imposible.

A la Catedrática Cristina Sánchez González, gracias por compartir tus conocimientos, por tu apoyo incondicional y por siempre cumplir tu palabra, gracias.

A mi tío favorito, gracias por darme la posibilidad de estudiar en Granada, sin tu ayuda no estaría aquí ahora.

A mis padres, gracias por enseñarme que siempre se puede más,

A mi marido, gracias por aguantarme, sobre todo estos últimos meses, sé que no te lo he puesto fácil,

A mi Eli, gracias por darme las fuerzas para no dejar esto a medias,

A todos, otra vez, y siempre, gracias,

ABREVIATURAS

C. elegans	Caenorhabditis elegans
CAT	Capacidad antioxidante total
CGC	Caenorhabditis Genetics Center
E. A:	Enfermedad de Alzheimer
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FRAP	Proceso Antioxidante Reductor Férrico
HPLC/QTOF-MS/MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas cuadrupolar y de tiempo de vuelo, hay que definirlo la primera vez que salga en el texto (pero que no sea en un título)
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC_{50}	Concentración Inhibitoria Media
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a masas
REDECAN	Red Española de registros de Cáncer
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
SBF	Suero bovino fetal
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
UE	Unión Europea
UHD	Ultra High Definition

ÍNDICE

Resumen 16

1.-Justificación y Objetivos: 18

2.-Introducción 19

2.1. Nuevas aplicaciones de especies de flores comestibles 19

2.1.1. Las flores como alimento 19

2.1.2 Nuevos Alimentos 20

2.1.3 Comercialización de flores para aplicaciones en humanos 25

2.1.4. Interés nutricional de las flores comestibles 26

2.1.5 Composición fitoquímica de las flores comestibles y su interés en biomedicina 28

2.1.6. Identificación de ciertas especies de flores destacadas 31

2.2. Interés biomédico de especies de flores en enfermedades asociadas al envejecimiento 36

2.2.1. Cáncer 36

2.2.2. Enfermedad de Alzheimer 40

2.3. Modelos experimentales preclínicos para la evaluación de la efectividad de extractos de flores 42

2.3.1. Ensayos in vivo: nematodo *C. elegans* 43

3.- Material y métodos 46

3.1. Flores 47

3.1.1. Preparación del extracto 47

3.2 Análisis nutricionales 47

3.3. Caracterización del extracto de flores 49

3.3.1 Contenido total de Fenoles 49

3.3.2 Contenido Total de Flavonoides 50

3.3.3. Capacidad Antioxidante del extracto 50

3.3.4. Identificación y cuantificación de metabolitos mediante HPLC/QTOF-MS/MS 51

3.4. Ensayos en líneas celulares 53

3.4.1. Células y condiciones 53

3.4.2. Metabolización de MTT 53

3.4.3. Apoptosis/necrosis mediante citometría de flujo 54

3.4.4. Determinación de ROS 55

3.4.5. Inducción de autofagia 55

3.5. Ensayos en *C. elegans* 56

3.5.1 Cepas y mantenimiento 56

3.5.2. Ensayo de letalidad 57

3.5.3. Viabilidad 57

3.5.4 Parálisis 58

3.5.5. Producción de ROS 58

3.5.6. Producción de ROS mitocondrial 59

3.6. Análisis estadístico 59

4.- Resultados y discusión 61

4.1- Análisis nutricional..... 61

4.2. Evaluación en de la actividad antioxidante e identificación y cuantificación de metabolitos mediante HPLC/MM..... 64

4.4 Evaluación de la capacidad antitumoral *in-vitro* 81

4.5. Ensayos en *Caenorhabditis elegans* 94

5.- Conclusiones 106

6.- Bibliografía 108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición en macronutrientes de flores comestibles (g/100 g peso seco). 27

Tabla 2. Composición en algunos minerales de flores comestibles (mg/100 g peso seco). 28

Tabla 3. Clasificación de polifenoles y ejemplos de flores ricas en estos. 29

Tabla 4. Determinación de energía y macronutrientes de las tres flores sujeto de estudio. 63

Tabla 5: Parámetros antioxidantes determinados en los extractos de flores. DPPH FRAP. ET. Error Típico 65

Tabla 6. Compuestos identificados y cuantificados en el extracto de Tagetes erecta. 69

Tabla 7: Compuestos identificados y cuantificados en el extracto de Antirrhinum majus 70

Tabla 8. Compuestos identificados y cuantificados en el extracto de Rosa x Hybrida 73

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Incidencia de cáncer de ovario en España. Casos por cada 100.000 habitantes. 37

Figura 2. Evolución de nuevos casos de cáncer de ovario en España. Datos expresados en casos por 100.000 mujeres. 38

Figura 3. Mortalidad por tipo de cáncer en España. Valores por cada 100.000 habitantes. 38

Figura 4: Representación esquemática de la metodología llevada a cabo en la presente tesis doctoral 46

Figura 5: Cromatograma de las especies de flores estudiadas (A) Tagetes erecta; (B) Rosa x hybrida; (C) Antirrhinum majus 67

Figura 6: Distribución de los tipos de metabolitos encontrados según los grupos químicos en los extractos de Rosa x hybrida, Tagetes erecta y Antirrhinum majus .. 75

Figura 7: Composición esquemática de los metabolitos encontrados en el extracto de Rosa x hybrida. 77

Figura 8: Composición esquemática de los metabolitos encontrados en el extracto de Tagetes erecta. 77

Figura 9: Composición esquemática de los metabolitos encontrados en el extracto de Antirrhinum majus. 79

Figura 10: Viabilidad celular de la línea A2780 tras el tratamiento de los extractos de flores durante 48h. A) Rosa x hybrida; B) Tagetes erecta; C) Antirrhinum Majus. Letras diferentes refieren a diferencias significativas entre grupos. $p<0.05$. One-way AN .. 83

Figura 11: Distribución de células A2780 tras el tratamiento de IC50 de los extractos de pétalos de flores según los resultados obtenidos mediante citometría de flujo para el test de apoptosis/necrosis mediante Anexina V/IP. A) Extracto de Tagetes erecta.... 87

Figura 12: Producción de ROS en células A2780 tras el tratamiento de IC50 de los extractos de pétalos de Tagetes erecta y Rosa x hybrida. Letras diferentes son cambios significativos entre grupos. One-way ANOVA. P<0,05. Control H2O2 89

Figura 13: Inducción de autofagia en las células A2780 tras el tratamiento con los extractos de Rosa x hybrida y Tagetes erecta durante 72h. Letras diferentes significan diferencias entre grupos. p<0,05. One-way ANOVA..... 92

Figura 14: Inducción de autofagia por el extracto de Rosa x hybrida en células A2780 mediante microscopía de fluorescencia 93

Figura 15: Letalidad en gusanos N2 tras la incubación con dosis creciente de los extractos evaluados. A) Antirrhinum majus; B) Tagetes erecta; C) Rosa x hybrida. Letras diferentes significan diferencias estadísticas entre grupos. *<0,05. 96

Figura 16:. Viabilidad de C. elegans tratados con 100 µg/mL con los extractos de flores. Letras diferentes significan diferencias entre grupos. p<0,05. 96

Figura 17: Parálisis tras la exposición a 100 µg/mL de extracto en gusanos CL4176. A) Rosa x hybrida; B) Tagetes erecta; C) Anthrrinum majus. Letras diferentes indican diferencias entre grupos. p<0,05..... 100

Figura 18: Contenido intracelular de ROS en gusanos jóvenes y envejecidos..... 103

Figura 19: Contenido mitocondrial de ROS en gusanos jóvenes y envejecidos tratados con 100 µg/mL del extracto de Tagetes erecta. El contenido de ROS mitocondrial. Letras diferentes significan diferencias significativas entre grupos (p < 0,05). 105

Resumen

Las flores comestibles constituyen un nuevo nicho de mercado y una fuente emergente de compuestos bioactivos. Su interés radica no solamente en sus aplicaciones en cocina como alimento decorativo que aporta aromas y texturas características, sino en las posibles aplicaciones de estas flores como agentes terapéuticos en múltiples enfermedades crónicas no transmibles cuya incidencia está aumentado exponencialmente en los países desarrollados. El presente trabajo se centra en el estudio de la composición química y nutricional de tres especies de flores comestibles ampliamente extendidas en el mercado español: *Rosa x hybrida, Tagetes erecta* y *Antirrhinum majus*. Además, esta tesis doctoral tiene como objetivo la evaluación de las posibles actividades biológicas de estas flores en modelos de experimentación preclínica como cultivos celulares y nematodos.

En primer lugar, se evaluó la composición en macronutrientes de estas flores. En la mayoría de los parámetros estudiados estas flores tienen valores similares en macronutrientes. Sin embargo, los pétalos de *Tagetes erecta* reportaron un contenido mayor en grasa que el resto.

A continuación, se sintetizó un extracto etanólico a partir de los pétalos de estas flores; la realización de extractos permite una mejor evaluación de estos pétalos como posibles agentes terapéuticos ya que posibilitan el control de la dosificación y la facilitan su manipulación. Se cuantificó la capacidad antioxidante de estos extractos por lo métodos más habituales (DPPH y FRAP) y se determinó la cantidad total del flavonoides y polifenoles. Los resultados obtenidos muestran que el extracto de *Tagetes erecta* contiene más cantidad de polifenoles que el resto; sin embargo, el extracto de *Rosa x hybrida* reportó una mayor cantidad de flavonoides. En ambos casos, el resultado de estos

parámetros fue inferior para el extracto de *Antirrhinum majus*. Posteriormente, se cuantificaron e identificaron los metabolitos de estos extractos mediante HPLC; al igual que en las medidas de capacidad antioxidante, el extracto de *Antirrhinum majus* reportó valores inferiores que las otras dos flores estudiadas, es destacable que la composición cuali/cuantitativa de las flores era variable; así, las antocianinas fueron mayoritarias para el extracto de *Rosa x hybrida*, mientras que en el extracto de *Tagetes erecta* destacó el contenido de flavones, especialmente de patulitrin.

Finalmente, se evaluó la implicación biológica de los extractos empleando modelos celulares y modelos de nematodo. Los tres extractos estudiados reportaron la ausencia de toxicidad en el test de letalidad y viabilidad para los gusanos *Caenorhabditis elegans*. Respecto a la evaluación como potencial agente terapéutico, el extracto de *Antirrhinum majus* no presentó actividad antitumoral ni actividad en la reducción de parálisis mientras que el resto de extractos sí la reportaron. Además, el extracto de *Tagetes erecta* mostró actividad antitumoral contra células tumorales de ovario mediante la activación de apoptosis, mientras que el de *Rosa x hybrida* lo hizo a través de la inducción de autofagia. Estas actividades diferentes pueden deberse a la diferente composición química reportada para estos extractos de flores.

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que los extractos de *Rosa x hybrida* y *Tagetes erecta* tienen actividad biológica y posibles aplicaciones potenciales, sin embargo, estos resultados son preliminares y necesitan más ensayos relativos a los parámetros farmacoterapéuticos de estos extractos para su posterior inclusión como agentes terapéuticos.

.

1.-Justificación y Objetivos:

Las flores ornamentales constituyen una atractiva matriz vegetal que, en base a los datos disponibles en la literatura, proporcionarían una fuente de nutrientes y compuestos de interés biomédicos muy relevante. Si bien esta matriz vegetal ha tenido tradicionalmente más interés ornamental, se propone el estudio nutricional y biomédico de las especies de *Rosa x hybrida*, *Tagetes erecta* y *Antirrhinum majus* para su uso alimentario y su potencial aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales

- **Objetivo general**: El objetivo principal de la presente tesis doctoral es la caracterización tres especies de flores comestibles y sus posibles implicaciones nutricionales y biomédicas.
- **Objetivos específicos**

a) Evaluación nutricional de las especies de flores

b) Caracterización del color de los pétalos de flores, y su asociación con la composición química de las flores.

c) Estudio del perfil metabolómico de los pétalos de flores

d) Síntesis y caracterización de un extracto obtenido a partir de los pétalos de flores

e) Evaluación de la actividad antitumoral de los extractos de flores en un modelo in-vitro, así como el estudio de los mecanismos de muerte celular

f) Ensayos de *Caenorhabditis elegans* de toxicidad y efectos sobre modelos de Alzheimer

2.-Introducción

2.1. Nuevas aplicaciones de especies de flores comestibles

Las flores han sido consideradas como un ejemplo de impactante belleza pero gran fragilidad, han desempeñado un papel fundamental en la historia y cultura de diversas sociedades alrededor del mundo. Así, las flores han ejercido una rica trama simbólica en las interacciones sociales, religiosas y políticas de diferentes comunidades a lo largo de la historia [12]. Sin embargo, las flores hoy día exhiben un fuerte potencial como fuente de nutrientes y compuestos bioactivos con incuestionable interés por sus propiedades saludables y como fuente de moléculas de interés en biomedicina para la prevención y el tratamiento de patologías, principalmente las asociadas al envejecimiento.

2.1.1. Las flores como alimento

La industria alimentaria busca continuamente nuevas fuentes para desarrollar nuevos productos, el reclamo más importante es promover la relación entre salud y nutrición a través del alimento [3]. Bajo este concepto de alimentos saludables, han proliferado líneas de alimentos bajos en grasas, altos en fibra o formulados con otros componentes relacionados con las propiedades saludables. La composición de flores comestibles no es diferente de otros alimentos de origen vegetal, siendo alimentos bajos en calorías y ricos en moléculas saludables y nutrientes. Su componente principal es el agua (70-90%) y proporciona un interesante aporte de carbohidratos y una baja cantidad de grasas y proteínas. Algunos ácidos grasos esenciales como los ácidos linoleico (C18: 2) y linolénico (C18: 3) están fuertemente presentes en la composición de flores comestibles [4] . Además, las flores comestibles se han propuesto como una buena fuente de minerales, particularmente potasio, fósforo y calcio [5], aunque su contenido en elementos traza no ha

sido suficientemente explorado [6.] Por lo tanto, los datos disponibles sugieren el uso de flores comestibles en la nutrición humana, y sus derivados se proponen como potenciales componentes para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales. Los alimentos funcionales son aquellos, bien diseñados, o bien existentes como tales, que cumplen una función específica más allá de la puramente nutritiva, tal como la mejora de la salud o la reducción del riesgo de contraer enfermedades. Esto puede lograrse mediante la agregación de componentes biológicamente activos a alimentos normales [7] .

Así, durante los últimos años la gastronomía moderna ha empezado a utilizar ingredientes novedosos como los pétalos de flores para crear nuevos sabores y colores [8]. Sin embargo, debido a su reciente incorporación a este tipo de gastronomía, hay limitados estudios que respalden el consumo humano de muchas de las especies de flores con interés gastronómicos, y por ello, no existe un profundo conocimiento acerca de las propiedades biomédicas y nutricionales de estos alimentos. En ciertas especies de flores se encuentran sustancias tóxicas que podrían afectar a sus propiedades nutricionales, como los inhibidores de la tripsina, o que incluso puedan causar graves daños a los consumidores; por ejemplo, algunas especies contienen hemaglutininas, ácido oxálico, glucósidos cianogénicos o alcaloides [5,9]. Esto conduce a la necesidad de llevar a cabo amplios estudios de toxicidad que aseguren que las especies de flores comestibles puedan ser consumidas de forma segura y den respaldo la actividad económica de las empresas productoras.

2.1.2 Nuevos Alimentos

Aunque algunas especies de flores han sido consumidas tradicionalmente, como es el caso de los estambres de azafrán (*Crocus sativus*) en las regiones mediterráneas [10], o las flores de calabaza en las regiones asiáticas, muchas especies de flores están siendo introducidas

recientemente. La UE adoptó la terminología de “nuevos alimentos” y “nuevos ingredientes alimentarios” por primera vez en 1997, en el reglamento 258/97. Un nuevo alimento es aquel que no se consumió en cantidades significativas en la Unión Europea antes de mayo de 1997, cuando entró en vigor la primera normativa. También pueden ser alimentos innovadores de reciente desarrollo, alimentos producidos utilizando nuevas tecnologías y procesos de producción, así como alimentos que se consumen o se han consumido tradicionalmente fuera de la UE. Los nuevos alimentos se rigen actualmente por el reglamento (UE) 2015/2283.

Los nuevos alimentos solo deben ser comercializados o utilizados como alimentos para el consumo humano si están incluidos en una lista de la comisión europea de nuevos alimentos autorizados (https://ec.europa.eu/food/safety/novel_food/catalogue_en). Esta autorización se concede cuando existen bases científicas que respaldan su seguridad alimentaria.

Existen listas de productos vegetales con historial de consumo previo a 1997 elaboradas por organismos oficiales de la UE o de los países miembros. En concreto: Novel Food Catalogue de la UE, Reglamento CE 396/2005, la lista BELFRIT, la lista EuroFIR-NETTOX

Como todo alimento, las flores se deben ajustar al marco legal. Al ser algunas de ellas productos novedosos, no están contempladas en el catálogo de la Comisión Europea de nuevos alimentos ni en los listados de plantas consumidas antes de 1997. Sin embargo, se siguen considerando aptas para consumo porque en el Artículo 3 del Reglamento 2015/2283 se excluyen de ser considerados nuevos alimentos "si el alimento tiene un historial de uso alimentario seguro en el mercado de la Unión y consiste en una planta o una variedad de la misma especie, o ha sido aislado esta o producido a partir de esta" y todas ellas pertenecen a alguna planta con historial de consumo seguro.

Dada esta circunstancia, el estatus legal puede ser alguno de los contemplados como sigue:

-Existe historial de consumo en la Unión Europea previo a 1997 o figura como flor comestible en Reglamento 396/2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y, por tanto, no requiere autorización como nuevo alimento.

-No se ha aprobado el uso de la flor como alimento en la UE ni en ningún estado miembro pero la planta a la que pertenece tiene historial de consumo previo a 1997 o figura como comestible en Reglamento 396/2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos.

-No está contemplado como alimento en una ley europea pero sí lo está en la legislación de algún estado miembro.

-No se ha aprobado su uso como alimento en la UE ni en ningún estado miembro.

Calidad y seguridad alimentaria. Evaluación de riesgos.

Se entiende por Seguridad Alimentaria "el valor máximo de riesgos tolerables desde la perspectivas sanitaria e industrial (inocuidad, alterabilidad), nutricional, informativa (idoneidad, autenticidad, cumplimiento de las especificaciones reglamentarias o recomendadas) y comercial, aplicable a los ámbitos de la elaboración, conservación, distribución, venta, expedición y consumo de alimentos para el colectivo consumidor definido por especificaciones globales o para los colectivos vulnerables, en su caso". El Códex Alimentarius, proporciona referencias internacionales de los estándares en nutrición. Las evaluaciones de riesgo permiten a los legisladores determinar y minimizar el índice de peligrosidad inmanente a la cadena alimentaria. Con el fin de proporcionar la base para asegurar un nivel elevado de protección de la salud de las personas y de los intereses de los consumidores en relación con los alimentos, se elaboró el Reglamento

(CE) nº 178/2002 que define conceptos como “riesgo”, “factor de peligro”, etc. En base a dicho reglamento se establece que: 1) No se comercializarán los alimentos que no sean seguros, 2) Se considerará que un alimento no es seguro cuando sea nocivo para la salud o no sea apto para el consumo humano; 3) A la hora de determinar si un alimento no es seguro, deberán tenerse en cuenta las condiciones normales de uso del alimento por los consumidores y la transformación y distribución en cada fase de la producción; 4) A la hora de determinar si un alimento es nocivo para la salud, se tendrán en cuenta los posibles efectos inmediatos y a corto y largo plazo de ese alimento, no sólo para la salud de la persona que lo consume, sino también para la de sus descendientes los posibles efectos tóxicos acumulativos y la sensibilidad particular de orden orgánico de una categoría específica de consumidores, cuando el alimento esté destinado a ella.

Con el fin de contribuir a lograr un nivel elevado de protección de la vida y la salud entre las personas, las autoridades europeas crearon la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (o EFSA de su nombre en inglés European Food Safety Authority) mediante el reglamento (CE) nº 178/2002. Dicho organismo facilitará asesoramiento y apoyo científico técnico en temas de nutrición humana en relación con la legislación comunitaria. Además, también se encargará de velar por que se apliquen los requerimientos necesarios para el diseño y comercialización de los nuevos alimentos. Junto con otros organismos, la EFSA está ya desarrollando un papel fundamental en el desarrollo de nuevos productos. Bajo las mismas motivaciones, diferentes países han creado también sus correspondientes Agencias Nacionales. En el caso de España, se creó en 2002 la Agencia Española de Seguridad Alimentaria.

Especialmente relevante en el caso de las flores, al igual que en el té y la miel, en alimentación es el análisis de los alcaloides pirrolizidínicos. Los alcaloides de la pirrolizidina (PAs) son toxinas naturales, producto del metabolismo secundario de las

plantas, para defenderlas frente a insectos y depredadores. Aproximadamente 6000 especies de plantas en todo el mundo pueden contener PAs, lo que representa el 3% de todas las plantas con flores. El 95% de estos PAs se encuentran principalmente en cinco familias de plantas angiospermas: Orchidaceae, Asteraceae, Apocynaceae, Boraginaceae, Fabaceae. Hasta la fecha, se conocen aproximadamente 600 PAs diferentes. No son tóxicos por sí mismos, sino sus metabolitos. El contenido depende de un gran número de factores (especie, órgano de la planta, cosecha, almacenamiento, procedimientos de extracción). Se han encontrado contenidos de PAs variables desde un nivel traza hasta un 19% del peso en seco de la planta. La estructura química de estos alcaloides está basada en un anillo de pirrolizidina, que consiste en dos anillos fusionados con un átomo de nitrógeno como puente. Existen dos grupos principales, los PAs 1,2-insaturados y los PAs 1,2-saturados, dependiendo de la existencia o no de un doble enlace entre las posiciones 1 y 2 del anillo. Los PAs tiene un perfil común de toxicidad, los principales signos comprenden diversos grados de daño hepático (necrosis hepatocelular centrolobular) y enfermedad venooclusiva. Además, el Centro de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado los PAs como "posiblemente carcinógenos para el ser humano" (grupo 2B). Durante la recolección de productos vegetales pueden presentarse contaminaciones cruzadas debidas a la presencia de plantas no deseadas en los cultivos y que no hayan sido correctamente separadas durante la cosecha. En 2014 el Codex Alimentarius publicó una norma internacional para prevenir los riesgos de los PAs: "Código de prácticas para el control de malezas a fin de prevenir y reducir la contaminación de los alimentos y los piensos con alcaloides de pirrolizidina (CAC-RCP 74-2014)". Como continuación a los estudios llevados a cabo por la Comisión desde 2007, en 2017 EFSA publicó un dictamen en el que evaluaba los riesgos para la salud humana por la presencia de PAs en miel, té, infusiones de hierbas y complementos alimenticios. Tras las evaluaciones del riesgo

publicadas por EFSA, a nivel de la UE se está debatiendo la fijación de límites máximos de PAs en aquellos alimentos que más contribuyen a su exposición a través de la dieta. Actualmente no hay valores límite legales para los PAs en piensos y alimentos. Sin embargo, el Instituto Federal de Evaluación de Riesgos (BfR), con autoridad en la materia, llegó a la conclusión, sobre la base de los datos disponibles, de que la exposición general de los consumidores a los PAs, posibles genotóxicos y carcinógenos, procedentes de diversos alimentos debe mantenerse lo más baja posible [11].

2.1.3 Comercialización de flores para aplicaciones en humanos

Un factor importante para la aplicación de flores comestibles en alimentos funcionales es la aceptación del consumidor de estos productos. Rodrigues y colaboradores evaluaron la percepción de flores y alimentos comestibles en un país económicamente emergente como Brasil [7], encontrando que los participantes asociaron los alimentos que contenían flores comestibles con palabras y sentidos como "cuidado de la salud", "propiedades sensoriales" y "hedonismo", incluso para los alimentos procesados.

Actualmente, la mayor producción de flores comestibles se realiza en Asia; sin embargo, los principales consumidores se encuentran en algunos países europeos como Portugal y Reino Unido [12]. Los países situados en el sur de la eurozona tales como España, Italia o Portugal son unos candidatos muy buenos para empezar a producir estos cultivos debido principalmente a sus características climáticas y a su amplio arraigo agrícola, lo que podría ayudar a la especialización y al desarrollo económico del sector.

Los alimentos desconocidos suelen captar la atención de los consumidores basándose en la inducción de la curiosidad gracias a su aspecto exótico y su carácter desconocido [13] . Un ejemplo es el uso de insectos y flores en la dieta de algunas culturas. Para ciertas culturas como la mexicana o la china, los insectos y las flores forman parte de la dieta

diaria, mientras que en otras culturas son completamente extraños y desconocidos [14]. Un estudio reciente reveló qué factores influyen en la actitud hacia las flores comestibles y estos fueron: la curiosidad específica, el aroma y la conciencia sanitaria [14]. Este último suscitó el mayor interés ya que la principal razón de consumir flores se debe a su demostrada capacidad saludable [13].

La falta de estudios sobre su composición en nutrientes limita su aprovechamiento para desarrollar nuevos productos. Actualmente, se sabe que existe una relación directa entre nutrición y salud [15]. Gracias a esto se han desarrollado muchas nuevas líneas de producción como alimentos bajos en azúcares, altos en fibra o alimentos formulados con otros componentes relacionados con propiedades saludables.

2.1.4. Interés nutricional de las flores comestibles

La composición de las flores comestibles no es muy distinta a la de otros alimentos vegetales siendo estos habitualmente bajos en grasas y ricos en agua. Actualmente, los datos disponibles sobre su composición nutricional son escasos y los que hay están centrados en unas flores concretas, por lo que la caracterización en macronutrientes (proteínas, grasas y carbohidratos) y micronutrientes (minerales y vitaminas) es esencial para mejorar el desarrollo del nicho económico de las flores comestibles y su posible utilización en la formulación de alimentos funcionales y otras industrias tales como la farmacéutica y la cosmética.

El agua es el principal componente presente en las flores comestibles y representa entre el 70 y el 90%. Tras el agua, los hidratos de carbono son el macronutriente más abundante; en este caso, los azúcares libres presentes en las flores comestibles incluyen fructosa, glucosa y sacarosa, siendo mayoritariamente la fructosa (50% del total), seguido de

glucosa y sacarosa. Ejemplo de flores con alto contenido en fibra son *Tagetes erecta* (55,4%) y *Antirrhinum majus* (50,9%) (Tabla 1).

En general, el contenido en lípidos de las flores comestibles varía dependiendo del tipo de flor y su localización geográfica. Generalmente, oscilan entre el 0,1 y el 15% del peso seco de la flor [16] aunque hay excepciones como *Tropaeolum majus* que tiene más de un 30%. Respecto a los carbohidratos también existen grandes variaciones, hay flores como *Rose* con más de un 85% (86,12 ± 0,8) de estos y flores como *Viola wittrockiana* con menos de un 7% (6,53± 0,23) de carbohidratos. La tabla 1 recoge la composición cuantitativa en macronutrientes de una muestra representativa de flores comestibles.

Tabla 1 Composición en macronutrientes de flores comestibles (g/100 g peso seco).

Flor	***Carbohidratos***	***Grasa***	***Proteína***	***Referencia***
Antirrhinum majus	8,16 ± 0,55	0,52 ±0,01	1,87 ±0,01	[17]
Rose (Rosa damascena and R. gallica draft in R. canina)	86,12 ± 0,8	2,01 ±0,04	7,58 ±0,84	[18]
Tagetes erecta	14,15±1,24	0,30,022±	1,32±0,01	[9]
Viola wittrockiana	6,53± 0,23	0,44±0,05	2,11±0,01	[17]
Tropaeolum majus	7,14±0,87	30,33± 0,03	1,99±0,06	[9]
Calendula officinalis	81,32± 0,75	5,33±0,45	6,43±0,68	[19]

En cuanto a micronutrientes, en general, el contenido mineral de las flores comestibles es mayor que el de las frutas y verduras que se consumen habitualmente, contienen una buena proporción de potasio, calcio y sodio [5]. Los resultados disponibles muestran gran diversidad en el contenido de cada mineral entre las distintas especies estudiadas, destacando ampliamente el contenido de minerales como el calcio o el potasio en especies

como *Rose spp*, *Viola wittrockiana* o *Calendula officinalis*, donde se encontraron niveles de dichos elementos muy superiores a los encontrados en otras especies vegetales de elevado uso alimentario como *Lactuca sativa*. Por su parte, *Antirrhinum majus* mostró niveles semejantes a *Lactuca sativa*, siendo el contenido de otras especies como *Tagetes erecta* o *Tropaeolum majus* notablemente inferior a dicho alimento vegetal [20].

Tabla 2. Composición en algunos minerales de flores comestibles (mg/100 g peso seco).

	Ca (mg/100 g)	***Na (mg/100 g)***	***K (mg/100 g)***	***Referencias***
Antirrhinum majus	67.9 ± 6.5	5.72 ± 0.54	223 ± 1.3	[17]
Rose spp.	118.8 ± 6.6	79.5 ± 7.1	2948 ± 160	[18]
Tagetes erecta	0.11 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.22 ± 0.01	[9]
Viola wittrockiana	123.9 ± 32	70.9 ± 20.7	278.6 ± 17.1	[17]
Tropaeolum majus	0.055 ± 0.0	0.01 ± 0.0	0.22 ± 0.01	[9]
Calendula officinalis	188.7 ± 7.2	649.2 ± 12.3	7639 ± 401	[19]

Las flores comestibles son una rica fuente de componentes minerales, lo que las convierte en una materia prima ideal para la formulación de diversos productos alimenticios y nutracéuticos con mayor valor nutritivo [16].

2.1.5 Composición fitoquímica de las flores comestibles y su interés en biomedicina

Además de los nutrientes, en los últimos años ha sido creciente el interés de los investigadores en moléculas presentes en matrices vegetales marinas y terrestres, como los compuestos fenólicos con potencial bioactivo [18], que revelan prometedoras aplicaciones biomédicas en los últimos años. Este interés se ha extendido también a las

flores. Por tanto, el consumo de ciertas flores comestibles proporcionaría beneficios para la salud del consumidor, ya que son una buena fuente de fitoquímicos, incluyendo polifenoles [18]. Los polifenoles son unos metabolitos secundarios de la plantas responsables de numerosas acciones, tales como la quelación de metales y los mecanismos de eliminación de radicales libres [21]. Se trata de un grupo heterogéneo con más de 600 compuestos individuales que se caracterizan por la presencia de múltiples grupos fenólicos en su estructura química. Son responsables del color en las plantas y de algunas acciones beneficiosas para la salud debido principalmente a sus propiedades antioxidantes [22]. Se ha sugerido que su consumo regular podría estar asociado con la prevención de enfermedades crónicas, como enfermedades cardíacas, obesidad y ciertos tipos de cáncer a través de la inhibición de su inicio y progresión mediante la modulando la expresión de genes implicados en procesos clave de regulación [18,23].

En la siguiente tabla se detallan los polifenoles que se han encontrado en diferentes especies de flores comestibles en la literatura.

Tabla 3. Clasificación de polifenoles y ejemplos de flores ricas en estos.

Flavonoides	Flavanoles	*Quercus sp*. [24]
	Flavanonas	*Viola wittrockiana* [25]
	Flavonas	*Primula spp* [26]
	Antocianinas	*Hibiscus sabdariffa* [27]
	Isoflavonas	*Trifolium pratense* [27]
No-flavonoides	Alcoholes mono-fenólicos	*Olea europaea* [28]
	Ácidos fenólicos simples	*Cinnamomum zeylanicum Blume* [29]
	Estilbenos	*Vitis vinifera*

Ejemplo de alguna de las especies con interés biomédico es, por ejemplo, extracto de *Rose rugosa*, mostró efectividad bactericida de amplio espectro [30]. Otras especies de la misma familia de diferentes países asiáticos contienen hiperina, isoquercitrina y quercetina [31], que podría proporcionar un nuevo enfoque para su uso como purgante. Otro aspecto explorado ha sido el efecto antioxidante, detectado en diversas especies de flores. Este efecto es en gran parte atribuible a la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos, por ejemplo, las antocianinas en *Hibiscus sp*. en sus pétalos [32], así como a minerales antioxidantes [33] . Incluso, algunos autores han demostrado en modelos in vitro la inhibición de algunas enzimas como la α-amilasa y α-glucosidasa, lo que está relacionado con la reducción del índice glucémico [34]. Además, el estudio sobre nuevos compuestos con aplicación en terapia contra el cáncer es una de las estrategias que han aumentado en los últimos años. El extracto de *Rose damascene* ha mostrado resultados prometedores inhibiendo el crecimiento de algunas líneas celulares tumorales como la hepática, cervical o pulmonar. Sin embargo, el extracto de otras flores como Centaura cyanus. o Calendula officinalis no exhibió dicha capacidad [9]. Otros autores han propuesto la asociación de la actividad antiproliferativa del extracto de *Rhododendron arboretum* con algunos compuestos químicos como quercetina, rutina, ácido protocatéquico, esteroles y ésteres metílicos como responsables de la actividad anticancerígena [34]. Sin embargo, estos estudios no llegaron a asociar el efecto antitumoral del extracto con el mecanismo de muerte responsable de la acción antiproliferativa. Muchos aspectos deben aun ser esclarecidos para garantizar la seguridad y eficacia de flores y sus extractos.

Como se ha indicado anteriormente, existen muy pocos estudios científicos que describan en profundidad la presencia en las flores que consumimos de compuestos con efectos perjudiciales o beneficiosos para la salud. Existen nuevos hallazgos sobre los efectos en

la salud de las flores comestibles desde 2015 como el antioxidante, antiinflamatorio, anti-cancerígeno, hepatoprotector, neuroprotector, anti-diabético, anti-osteoporosis, anti-obesidad, y antihipertensivo [35–37] .

2.1.6. Identificación de ciertas especies de flores destacadas

Las especies de flores actualmente en producción y comercialización para consumo humano en el país resultan de interés para el estudio según la siguiente clasificación: a) Existe historial de consumo en la UE previo a 1997 o figura como flor comestible en normativa europea (el Reglamento 396/2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos) y, por tanto, no requiere autorización como nuevo alimento (*Rosa x hybrida y Tagetes erecta*). Estas especies se proponen para su estudio con la finalidad de aportar evidencias científicas que refuercen en el consumidor la percepción alimento seguro y saludable, y la caracterización de su potencial bioactivo; y b) otras de extendido uso popular en los últimos años en España que, no está contemplado como alimento en una norma europea pero sí lo está en la legislación de algún estado miembro (*Antirrhinum majus*).

1.1.6.1. *Rosa x hybrida*

Rosa x hybrida pertenece a la familia Rosaceae, que comprende más de 200 especies, ampliamente distribuidas por el hemisferio norte [38] y es una de las especies mejor estudiadas. Su consumo ha sido tradicionalmente extendido en tés, pasteles y extractos aromáticos por su palatabilidad, además de ser un remedio tradicional para tratar problemas circulatorios y por sus propiedades antiproliferativas frente al cancer [38,39]. *Rosa x hybrida* y *Rosa damascena* Mill L (rosa de Damasco), conocida como Gole Mohammadi, son unas de las especies más importantes de la familia Rosaceae [39,40] . Esta se cultiva para la industria alimentaria [41]. Además, esta planta también se utiliza con fines

medicinales en la medicina tradicional [42] ya que se han visto efectos beneficiosos de sus extractos para el tratamiento de la diabetes [43], mejoría de la salud cardiovascular a través de la mejora de la contractilidad miocárdica [44] y problemas digestivos [41].

Desde un punto de vista nutricional, los pétalos de rosa son fuentes ricas en carbohidratos y compuestos ricos en antioxidantes como polifenoles, carotenoides y antocianinas [45]. El contenido total de carbohidratos oscila entre 60% y 86% del peso seco (p.s.), siendo la glucosa, la fructosa y la sacarosa los azúcares metabólicos predominantes. Los carbohidratos son la principal fuente de energía entre los ingredientes alimentarios y el contenido total de carbohidratos de las flores de rosas se acercaba más al del plátano, una de las fuentes más ricas en carbohidratos. Además, el metilglucósido, la xilosa y el mioinositol son otros constituyentes importantes de carbohidratos solubles en las flores de rosas [46,47] . Entre las flores comestibles, la rosa posee una cantidad importante de proteínas que oscilan entre el 2,5% p.s. y 12,2% p.s., más que muchas flores comestibles comúnmente consumidas, como el hibisco y el girasol [32,47] .La rosa es una flor naturalmente baja en grasa con un contenido total de grasa inferior al 4% p.s. Los ácidos grasos predominantes fueron palmítico (C-16:0), esteárico (C-18:0), linoleico (C-18:2, ω-6), linolénico (C-18:3, ω-9) y ácido araquídico (C-20:0) [47] . Entre los minerales, el potasio, el fósforo y el calcio fueron los componentes principales [5,44,48] . Además de los macro y micronutrientes, en los pétalos de rosa se encuentran muchos ácidos orgánicos como el cítrico, málico, quínico, tartárico, shikímico, oxálico, fumárico y succínico [49] .La comparación de la calidad nutricional de los pétalos de rosa con fuentes alimenticias convencionales puso de manifiesto una composición muy beneficiosa con gran potencial en la preparación de productos alimenticios a base de rosas. La abundancia de fitoquímicos y moléculas bioactivas como antocianinas (flavonoides), ácidos fenólicos y

carotenoides hacen de los pétalos de rosa un ingrediente atractivo para el enriquecimiento de los alimentos.

Las flores de rosas comestibles se componen de una enorme cantidad de fitoquímicos bioactivos como carotenoides y flavonoides. Los carotenoides desempeñan un papel importante en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), cataratas, enfermedades cardiovasculares (ECV), cáncer, y en mantemimmieto del equilibrio redox [50] .Algunos de los carotenoides encontrados en la especie *Rosa spp* son luteína, β-caroteno, violaxantina, zeaxantina, epóxido de luteína, luteoxantina, anteraxantina, neoxantina [51]. Los flavonoides Los flavonoides han mostrado ser efectivos en situaciones como el estrés oxidativo, el cáncer y la inflamación, y también modulan funciones enzimáticas celulares clave, el Alzheimer y la aterosclerosis [52]Entre las antocianinas más abundantes encontradas destacan la cianidina 3,5-di-O-glucósido (375 mg 100 g−1) seguida de pelargonidina 3,5-di-O-glucósido (31,2 mg 100 g−1). Por otro lado, los flavonoles identificados en las flores de rosa son quercetina, quercetina 3,4-di-O-glucósido, quercetina 3-O-glucosil-xilósido, quercetina 3-O-ramnósido, quercetina-3-O-rutinósido, miricetina 3,5-di- O-glucósido, kaempferol 3,4-di-O-glucósido, kaempferol 3,7-di-O-ramnósido, isorhamnetina 3-O-glucósido [53]. Entre los flavonoles detectados se encuentran la catequina y epicatequina y sus derivados como galato de epicatequina, galato de epigalocatequina [54]. Finalmente, entre los ácidos fenólicos más abundantes se ha detectado el ácido cafeico y el ácido clorogénico seguidos del ácido protocatequiico, p-cumárico y gálico [55].

Todos estos fitoquímicos confieren a los extractos de rosa efectividad como agente antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, antimicrobiano, antienvejecimiento, antialérgico, antiobesidad, antidiabético, hepatoprotector, neuroprotector y muchas otras

actividades terapéuticas [56–60] .Estos fitoquímicos hacen de las rosas, de nuevo, una adecuada fuente para la obtención de nutrientes y compuestos bioactivos [61] .

1.1.6.2. *Tagetes erecta*

Tagetes erecta , comúnmente llamada “tagete” pertenece a la familia Asteraceae [62]. Es una variedad que se encuentra de forma silvestre en la zona de bosque de pino-encino de México, en un clima cálido y poco húmedo[62]. Actualmente se utiliza cultiva mayoritariamente para la extracción de colorante alimentario y hay estudios que demuestran su alto contenido en carotenoides [63]. El principal carotenoide encontrado es la xantofila [63], también llamado luteína, que se presenta libre o esterificado en uno o dos ácidos grasos [64]. Los ácidos grasos predominantes son el ácido linoleico (<26,41%), ácido palmítico (<24,22%) y el ácido oleico (<20,12%) [65]. La cantidad de estos ésteres de luteína varían desde los 4,0 mg/g en flores amarillo verdoso a 800 mg/g en flores marrón anaranjado [66]. El contenido en carotenoides varía en función del color del pétalo siendo si es naranja de 2.130 μg/g de peso fresco y si es amarillo es de 48,4 μg/g [67]. Numerosas condiciones como el tipo de extracción y secado condicionan la cantidad final de carotenoides en el extracto; así, se ha estimado que se pueden perder hasta el 50% de los carotenoides durante la extracción [62].

Se ha descrito que existe una actividad inhibitoria de extractos hidrofílicos liofilizados de *Tagetes erecta* contra la enzima α-glucosidasa 98,51 % de inhibición [68]. También se ha observado que *Tagetes erecta* tiene además actividad inhibitoria contra la actividad lipasa (41,61%) [68].

Además, se ha puesto de manifiesto la capacidad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *T. erecta*, que fue capaz de inhibir completamente el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Trichophyton mentagrophytes* [62]. También, los extractos de raíz de *T. erecta*

mostraron una actividad antimicrobiana significativa contra tres cepas bacterianas gram-positivas y dos gram-negativas [69].

El extracto de hoja de *T. erecta* mostró una significativa actividad antibacteriana *in vitro* contra *Propionibacterium acnes* y *Acinetobacter baumannii*; actividad moderada frente a *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Erysipelothrix* rhusiopathiae, *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y baja actividad contra *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enteritidis* [70].

Se ha informado que la luteína, el principal carotenoide que se encuentra en la flor de *Tagetes. erecta*, tiene un efecto protector contra la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) [71] la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares [72] cáncer [73] y estrés oxidativo [74] · Además, la flor y su extracto mostraron propiedades antimicrobianas [75] antimutagénicas [76] antiinflamatorias, antivirales, antiinmunoestimulantes, antitumorales y analgésico [77] · Además, recientemente se descubrió que el extracto hidroalcohólico de esta flor reduce la gravedad de la colitis ulcerosa en ratones [78] .

También se ha descrito la actividad hepatoprotectora de esta flor mediante la administración por vía oral en ratas. En este caso, la administración de un extracto de *Tagetes erecta* rico en flavonoides disminuyó significativamente los niveles enzimas relativas a daño hepático y la bilirrubina total en un grupo de ratas con un daño hepático severo [79].

1.1.6.3 *Antirrhinum majus*

Mucho menos estudiada es *Antirrhinum majus* o “boca de dragón” pertenece a la familia Plantaginaceae y es originario del norte de África y el sur de Europa [80]. Surgió como

organismo modelo durante los primeros estudios de herencia y mutación debido a su herencia diploide, facilidad de cultivo y variación en morfología y color de la flor [81].

Se ha utilizado con fines medicinales, como diurético y astringente, para el tratamiento del escorbuto, trastornos hepáticos, tumores en los que debido a sus propiedades antiinflamatorias, mediante la elaboración de cataplasmas [82].

La literatura muestra que *Antirrhinum majus* contiene un 2,79-5,69% de aminoácidos libres, un 2,15-4,69% de azúcares solubles y un 0,22-0,27% de carotenoides [80], además de antocianinas, flavonoles, flavonas, auronas, flavanonas y ácidos cinámicos [83].

Estudios recientes han demostrado que inhibe el crecimiento celular y las propiedades metastásicas en líneas celulares de cáncer de pulmón y colon humano [82] .

2.2. Interés biomédico de especies de flores en enfermedades asociadas al envejecimiento

2.2.1. Cáncer

El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbi-mortalidad del mundo. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer informó que en el año 2020 se diagnosticaron aproximadamente 18,1 millones nuevos casos de cáncer en el mundo y que el número de casos nuevos aumentará en las dos próximas décadas a 28 millones de casos nuevos al año en 2040 [83]. En España, la estimación es que en 2040 la incidencia de cáncer alcance los 341.000 casos [83].

El cáncer de ovario es un tipo de cáncer en el que solo alrededor de 20% de los casos se detectan en un estadio temprano [84]. Existen tres tipos de cánceres de ovario aunque entre el 85 % y el 90 % de estos cánceres comienzan en las células que recubren la superficie externa del ovario, estos son: a) Carcinoma epitelial: son el tipo más común de cáncer de

ovario. En casi el 70 % de las mujeres con este tipo de cáncer de ovario el diagnóstico se hace en las fases avanzadas [85]; b) Tumores de células germinativas: representan menos del 2 % de todos los cánceres de ovario. El 90 % de las pacientes con tumores de células germinativas sobreviven unos cinco años después del diagnóstico. Las adolescentes y las mujeres de 20 a 30 años son más propensas a tener este tipo de cáncer de ovario [85]; c)Tumores de células estromales: representan alrededor del 1 % de todos los cánceres de ovario. Se forman en los tejidos que sostienen los ovarios. Este tipo de cáncer se suele detectar en las etapas tempranas [85]. Respecto a la incidencia de cáncer de ovario, este se coloca en el séptimo puesto en mujeres de 45 a 49 años (figura 1). Como se aprecia en la figura 2, la incidencia ha subido progresivamente en los últimos diez años y es el cuarto tipo de cáncer con más letalidad en mujeres de 45 a 49 años (figura 3).

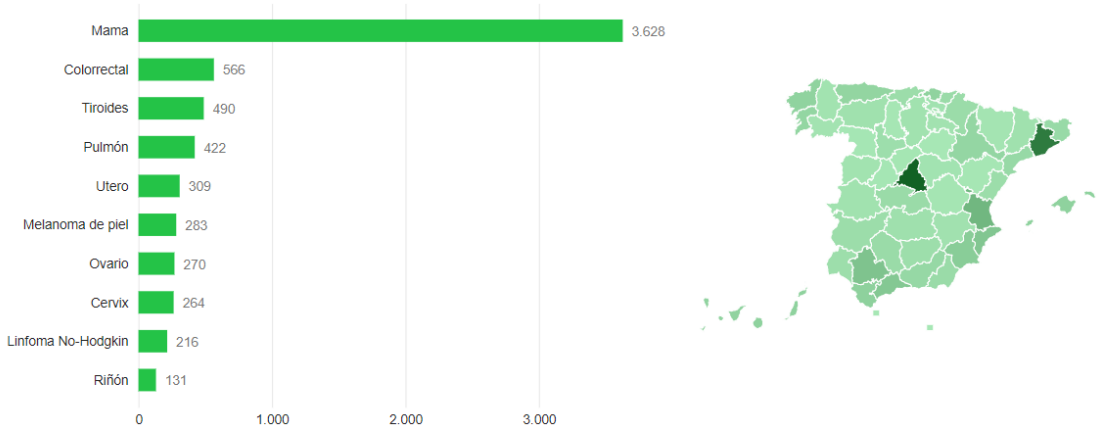


Figura 1. Incidencia de cáncer de ovario en España. Casos por cada 100.000 habitantes. Rango por edad 45-49 años. Fuente: Asociación Española Contra el Cáncer.

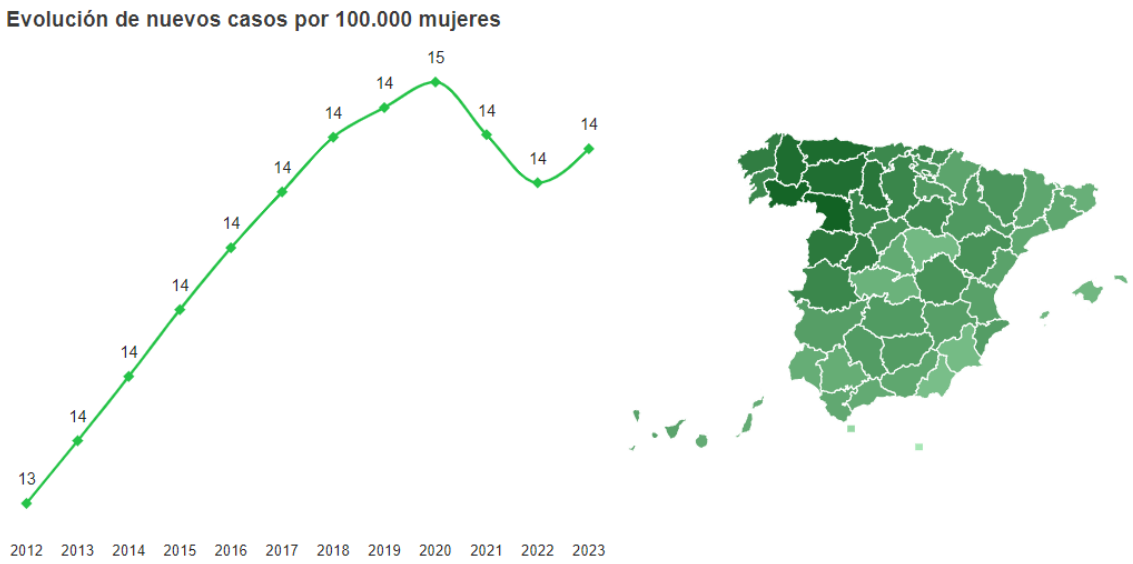


Figura 2. Evolución de nuevos casos de cáncer de ovario en España. Datos expresados en casos por 100.000 mujeres.

Fuente: Asociación Española Contra el Cáncer.

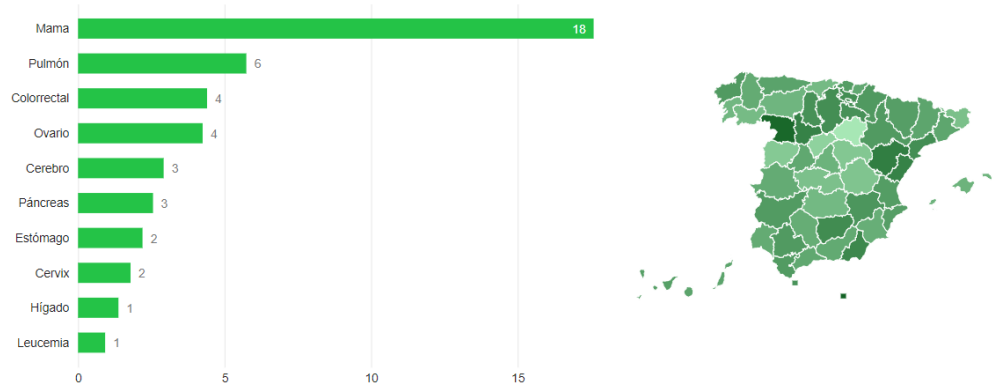


Figura 3. Mortalidad por tipo de cáncer en España. Valores por cada 100.000 habitantes.

Franja de edad 45-49 años. Fuente: Asociación Española Contra el Cáncer.

2.2.1.1 Cáncer y flores

Los estudios demuestran que la dieta es responsable de aproximadamente un tercio de los casos de cáncer [86]. Los hábitos dietéticos están significativamente asociados con la

prevención de enfermedades crónicas como cardiopatías, el cáncer, la diabetes y la enfermedad de Alzheimer [87].

Casi todos los agentes quimioterapéuticos son muy tóxicos y causan graves efectos secundarios en las células normales [88]. Los nuevos fármacos contra el cáncer provenientes de plantas medicinales tienen menos efectos secundarios que la quimioterapia y radioterapia y se consideran importantes debido a sus múltiples efectos terapéuticos, como la inhibición de enzimas y hormonas activadoras del cáncer, además estimulan el mecanismo de reparación del ADN, promueven la producción de células protectoras, e inducen la apoptosis, la detención del ciclo celular y la inmunidad [89,90]. Realmente aproximadamente el 70% de los fármacos existentes derivan de fuentes naturales, y muchos agentes anticancerígenos de origen vegetal, como el taxol, la vinblastina, vincristina, topotecan e irinotecan, se utilizan clínicamente en todo el mundo [88,91].

Algunos autores han demostraron que los extractos de *Rosa Damascena* detienen el ciclo celular y promueven la apoptosis de las células tumorales en el cáncer de cuello de útero [41], un cáncer muy común sobre todo en países en vías de desarrollo [92], aunque concluyen que son necesarios más estudios para saber el mecanismo específico de muerte de células cancerosas. Otros autores describieron los efectos antiproliferativos y proapoptosis de la *Rosa canina* en cánceres de pulmón y próstata. La *Rosa canina* o también llamada rosa silvestre es un arbusto espinoso de hoja caduca cuyo fruto pomáceo es el escaramujo que es muy rico en vitamina C.

Se ha visto una actividad antiproliferativa significativamente representativa (IC_{50} mg/ml) de extractos de *Tagetes erecta* contra células HT-29 (adenocarcinoma colorrectal), células de AGS (adenocarcinoma gástrico) y contra células Bl-13 (cáncer de vejiga) [83].

2.2.2. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es definida por la Organización Mundial de la Salud como una patología de etiología desconocida pero que cursa con un deterioro progresivo de la memoria y de la función cognitiva [93]. Además representa entre el 50 y el 75% de todos los casos de demencia . Existen factores de riesgo asociados como el sexo femenino, la edad, el nivel bajo de educación, el tabaquismo la obesidad y la diabetes mellitus [83,94]. Con la mejora del nivel de vida, la esperanza de vida ha aumentado y la prevalencia de esta enfermedad ha aumentado en consecuencia año tras año.

En el año 2006, el número de pacientes con EA era 26,6 millones en todo el mundo y las predicciones apuntan que en 2050 el número de enfermos llegará a 106,8 millones. Por lo tanto es de vital importancia para su prevención temprana conocer su epidemiología.

Aunque la causa exacta sigue siendo desconocida, se cree que es el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales, siendo los factores ambientales los que más contribuyen a su desarrollo [95] .

Se caracteriza por dos eventos histopatológicos: la agregación de placas seniles formadas por péptidos β-amiloide (Aβ) en el sistema nervioso central y la formación de ovillos neurofibrilares (NFT) asociados a la acumulación de proteína tau en el hipocampo, neocortical. área y amígdala [96] . Las placas seniles consisten en un núcleo compuesto por depósitos extracelulares de Aβ, un péptido formado por 40-42 aminoácidos, que son dos subproductos de la proteína precursora de amiloide (APP). La APP puede procesarse siguiendo dos vías diferentes: la no amiloidogénica, cuando actúan las enzimas alfa y gamma-secretasa dando lugar a polipéptidos solubles que pueden descomponerse y reciclarse; o el amiloidogénico, en el que intervienen las beta- y gamma-secretasas produciendo el péptido insoluble Aβ que forma agregados extracelulares [97] .La

acumulación de agregados más abundante en la EA corresponde a Aβ42, debido a su insolubilidad y mayor tasa de fibrilación. Por otro lado, las NFT están formadas por agregados intracelulares insolubles de una proteína tau hiperfosforilada, que normalmente se asocia con microtúbulos. Estos depósitos de proteínas están rodeados de restos neuronales, apolipoproteínas, microglía activada y astrocitos reactivos. Esto conduce a la activación de la microglía y la astroglía, lo que resulta en la liberación de citocinas inflamatorias y la generación de radicales libres de oxígeno, lo que promueve el estrés oxidativo. Los mediadores inflamatorios y el estrés oxidativo provocan lesión neuronal y alteran la homeostasis neuronal metálica, desencadenando la hiperfosforilación de la proteína tau, la acumulación de Aβ42 y la formación de NFT y placas seniles [98] .

De la misma manera, la acumulación de oligómeros de Aβ42 y la formación de NFT conduce a una disfunción neuronal, lo que resulta en una hiperactividad de la acetilcolinesterasa (AChE) [99] favoreciendo la degradación de la acetilcolina (ACh), y promoviendo que los pacientes con EA desarrollen una deficiencia severa de ACh en el cerebro. Este déficit cerebral de ACh se ha asociado con pérdida de memoria y otros síntomas cognitivos relacionados con la EA.

Los síntomas y manifestaciones clínicas en los distintos tipos de EA no son del todo iguales. La presentación clásica de la EA ocurre típicamente en la población de edad avanzada y se caracteriza por un deterioro cognitivo leve amnésico. Esto se debe a una acumulación de tau y Aβ en la corteza del lóbulo temporal medial, específicamente en la corteza entorrinal y el hipocampo. A medida que avanza la enfermedad aparecen alteraciones cognitivas más intensas, junto con un aumento de la dependencia, cambios de conducta, deterioro de la memoria y otros síntomas. Una vez establecida la EA seni [100] , la esperanza de vida de los pacientes es de 8,5 años. Por el contrario, la variante AD atípica presenta características diferentes. La memoria no se ve tan afectada como en la

EA senil, sobre todo porque la concentración de proteínas tau se deposita principalmente en los lóbulos parietooccipital, lo que provoca alteraciones visuales y motoras, preservando relativamente la memoria. Sin embargo, la esperanza de vida de los pacientes con esta variante de EA, una vez iniciados los síntomas, es de 2,8 años [101] .

El tratamiento farmacológico es limitado y se centra principalmente en la inhibición de la hiperactividad de la acetilcolinesterasa (AChE) para prolongar el tiempo de transmisión colinérgica y aumentar la señalización colinérgica, aunque esto no previenen el daño cerebral. Sin embargo, debido a los importantes efectos secundarios, el uso de estos fármacos AChEI es limitado [102] ·Por otra parte, las intervenciones nutricionales preventivas y/o terapéuticas contra la EA han ido ganando interés en los últimos años. Se sabe que el 35% de las demencias podrían ser causadas por factores de riesgo modificables asociados al estilo de vida, incluido el tipo de dieta [103] . El alto consumo de legumbres, verduras, frutas, vitaminas y aceite de oliva virgen, y el bajo consumo de carnes rojas, parece reducir la incidencia de EA. Un alto aporte de sustancias bioactivas como los compuestos fenólicos, han demostrado ejercer un efecto neuroprotector mediante la modulación de mecanismos como el estrés oxidativo y la neuroinflamación, además de reducir el depósito y la toxicidad de las proteínas mal plegadas. [104–108] .También se han propuesto otras terapias, como la administración de fármacos antiinflamatorios no esteroides y la quelación del hierro que están dando resultados esperanzadores [102,109] .

2.3. Modelos experimentales preclínicos para la evaluación de la efectividad de extractos de flores

Son bien conocidos los modelos experimentales *in vitro* para evaluar conceptos como toxicidad o bioactividad de ciertos compuestos o extractos naturales. Actualmente existe

un creciente interés en el uso de compuestos bioactivos procedentes de la industria agroalimentaria con el objetivo de valorar su eficacia en la prevención de distintas enfermedades. Para esto, el modelo experimental *C. elegans* ofrece una potente herramienta para el estudio in vivo de los efectos de dichos productos y así poder estudiar los mecanismos moleculares subyacentes que expliquen los posibles efectos en la salud humana, con especial énfasis en la detección de propiedades antienvejecimiento y antineurodegenerativas.

2.3.1. Ensayos in vivo: nematodo *C. elegans*

El modelo experimental *C. elegans*, constituye un extendido modelo para estudios genéticos y biólogicos del desarrollo, y muestra un extraordinario potencial para estudios toxicológicos. Su uso ha sido continuado para la investigación de la neurodegeneración provocada por sustancias químicas [110–113], y su uso actualmente sigue en aumento.

C. elegans presenta un ciclo reproductivo de 2,5 a 4 días a temperatura ambiente, con una vida útil promedio de aproximadamente 18 a 20 días cuando se cultivan en medios sólidos a 20 °C. Al eclosionar, *C. elegans* puede progresar a través de cuatro estadios larvarios (L1-L4) o ingresar a un estadio larvario dauer después del estadio L2, sin pasar por el estadio L3. La etapa larvaria dauer es una fase de desarrollo suspendida que se utiliza para sobrevivir en condiciones desfavorables. Tras el alivio de las condiciones adversas, *C. elegans* puede recuperarse y pasar a la etapa L4 para reanudar el desarrollo normal [114].

Los nematodos viven a temperaturas que oscilan entre 12 y 25 ºC, aumentando el crecimiento dos veces por cada aumento de 10 ºC. El crecimiento a temperaturas superiores a 25ºC no es posible porque los gusanos se vuelven estériles. Se puede sincronizar la edad de los animales mediante una solución de blanqueamiento a la que solo los huevos resisten debido a la cáscara de quitina que los recubre.

C. elegans, se ha descrito como un intermediario entre los modelos in vitro y de mamíferos. De hecho, los ensayos de toxicidad que evalúan los sistemas endocrino, reproductor, neuromuscular y sensorial realizados en *C. elegans* predijeron consistentemente puntuaciones de toxicidad en mamíferos [115]. Además, debido a su gran tasa de vías homólogas y concordantes, así como al rápido desarrollo, también se utiliza para la detección de nuevos fármacos [116] .Por lo tanto, el uso de *C. elegans* en ambas áreas biomédicas permite dilucidar los efectos de las comunicaciones celulares, las interacciones tisulares, así como describir el mecanismo de acción de muchos compuestos determinados en un lapso de tiempo corto.

El sistema nervioso de *C. elegans* es pequeño pero complejo. En la fase adulta de *C. elegans*, el número de neuronas varía según el sexo específico, observándose 383 neuronas en los machos y 302 en los hermafroditas. Estas neuronas están organizadas en ganglios distintos a lo largo del cuerpo, que abarcan la cabeza, el cordón ventral y la cola. Las neuronas de *C. elegans* pueden marcarse con fluorescencia in vivo mediante modificaciones genéticas, lo que convierte al nematodo en un modelo excepcional para investigar trastornos neurodegenerativos. *C. elegans* emplea una amplia gama de neurotransmisores que se encuentran en el sistema nervioso de los mamíferos, incluida la dopamina, el ácido γ-aminobutírico, la serotonina, el glutamato y la acetilcolina [117,118] .

Además, es de extraordinario interés la capacidad de generar nematodos transgénicos que expresan proteínas humanas relacionadas con la neurodegeneración. Esta capacidad ha facilitado estudios que contribuyen a nuestra comprensión de las enfermedades humanas Se han ideado cepas transgénicas que expresan proteínas humanas Aβ y tau, actores centrales con efectos neurotóxicos asociados con enfermedades como la EA. Varias cepas de *C. elegans* expresan el péptido Aβ, ubicado en el músculo esquelético o en las neuronas, y factores ambientales como la temperatura pueden modular esta expresión. La

parálisis observada en los tejidos musculares en cepas específicas sirve como un fenotipo valioso para cuantificar el impacto de los tratamientos sobre la toxicidad de los oligómeros y validar posibles terapias para la EA [119–123] .En particular, la expresión neuronal de Aβ produce un fenotipo distinto, marcado por defectos de quimiotaxis, alteración del movimiento de fluidos y déficits en la preferencia de olores, conductas de aprendizaje asociadas y aprendizaje dependiente de la experiencia. La proteína tau humana, cuando se expresa panneuronalmente, provoca movimientos descoordinados y neurodegeneración dependiente de la edad. Cuando se expresa en neuronas táctiles, produce deficiencias mecánicas y sensoriales.

También se han investigado las disfunciones relacionadas con las mitocondrias y la producción de ROS [124,125] .

3.- Material y métodos

Figura 4: Representación esquemática de la metodología llevada a cabo en la presente tesis doctoral

3.1. Flores

Los pétalos fueron proporcionados por la empresa Innoflower S.L. (Zaragoza, España), acompañados de su ficha técnica donde se recoge el nombre científico de la la especie proporcionada. Estos pétalos fueron conservados a -80ºC hasta su análisis.

3.1.1. Preparación del extracto

Para la preparación del extracto etanólico, se añadieron 500 mg de pétalos a 1 mL de la solución de extracción, compuesta por etanol/agua Milli-Q/ácido fórmico concentrado (80:20:0.1, v/v/v), y se homogeneizaron utilizando un homogeneizador Ultraturrax T25 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) a velocidad media-alta durante 2 minutos. La extracción se maximizó agitando la suspensión a 22×g (agitador magnético ARE, VELP Scientifica, Usmate, Italia) durante 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 2400×g durante 15 minutos en dos ocasiones consecutivas, con el fin de sedimentar los sólidos. Los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro Minisart de 0.45 μm (PBI International, Milán, Italia) y se transfirieron a un frasco de vidrio ámbar de 5.0 mL. Para los procedimientos experimentales subsiguientes, el extracto etanólico se concentró y secó mediante un evaporador rotatorio, resultando en 1.6 g de material seco. La muestra se almacenó en alícuotas a -80 °C

3.2 Análisis nutricionales

Los análisis para la determinación de la composición nutricional de los pétalos de flores se realizaron en la unidad de análisis de alimentos del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

3.2.1 Humedad

Se calculó la humedad para flores frescas, en este caso, 3- gramos de las muestras se depositaron en bolsas de plástico y se liofilizaron empleando un liofilizador (Telstar, Madrid, España). A continuación, las muestras se enfriaron en un desecador. La humedad fue determinada mediante gravimetría.

3.2.2 Determinación de proteínas.

La determinación proteica se realizó mediante la metodología Kjeldahl con algunas modificaciones. [126] 1 g de los pétalos liofilizados se hidrolizaron con una disolución de ácido sulfúrico concentrado (ITW Reagents, Monza, Italia) que contenía 10 g de sulfato potásico como catalizador. La solución fue mantenida durante 1 hora a 420C. A continuación, se diluyó la mezcla empleando agua y NaOH (ITW Reagents, Monza, Italia). En este caso, el amonio liberado durante la digestión reacciona con el NaOH para formar amoníaco (NH_3). Seguidamente, el NH_3 destilado se capturó con ácido sulfúrico (ITW Reagents, Monza, Italia) y se realizó la titulación. Finalmente, la cantidad de nitrógeno determinada se multiplicó por el factor de conversión habitual (6,25).

3.2.3 Determinación de grasas

El contenido de grasa se determinó mediante hidrólisis y extracción utilizando el método Soxhlet. En primer lugar, se hidrolizaron 2 g de pétalos liofilizados con 100 ml de ácido clorhídrico(ITW Reagents, Monza, Italia) 4M durante 30 minutos. Tras este paso, la muestra se filtró y los filtros se neutralizaron con H_2O y se secaron en una estufa con circulación de aire. A continuación, las grasas se extrajeron siguiendo el método de extracción de grasa Soxhlet según Weibull–Stoldt. Las cápsulas de extracción se colocaron en la cámara de extracción Soxhlet y se llenaron con éter de petróleo. Las

muestras se extrajeron durante 2 horas. Se obtuvo el peso de los matraces antes y después de la extracción.

3.2.4 Determinación de cenizas

La determinación de la ceniza total se analizó siguiendo el método propuesto por Llopis, J et al. [127]. En resumen, las muestras fueron calcinadas en un horno de mufla bajo una campana de ventilación a una temperatura de incineración de 550°C durante al menos 48 horas. Posteriormente, las muestras se enfriaron en el desecador. La ceniza total se determinó mediante gravimetría

3.2.5 Estimación de hidratos de carbono

Los carbohidratos fueron calculados mediante diferencia.

3.3. Caracterización del extracto de flores

3.3.1 Contenido total de Fenoles

Para determinar el contenido total de fenoles, se suspendieron 100 mL del extracto en 500 µL de solución de Folin-Ciocalteu y se mantuvo a 4 °C en oscuridad. Posteriormente, la mezcla se incubó durante 1 a 8 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se le añadió 400 µL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 0,7 M (ITW Reagents, Monza, Italia). La solución fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y la absorbancia se midió a 760 nm utilizando un lector de microplacas Synergy Neo2 (Biotek, Winooski, VT, EE. UU.) y se extrapolaron los valores. Se utilizaron soluciones de ácido gálico en un rango de 0,5 a 3,0, mM como estándar. El experimento se realizó por triplicado.

3.3.2 Contenido Total de Flavonoides

El contenido total de flavonoides se midió mediante un método colorimétrico. 250 µL del extracto resuspendido en agua se combinaron con 1n25 mL de agua Milli-Q, y se agregó una solución de 75 µL de nitrato de sodio ($NaNO_2$) (ITW Reagents, Monza, Italia) al 5%. Después de una incubación de 6 minutos, se añadieron 150 µL de una solución al 10% de cloruro de aluminio hexahidratado ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$), (ITW Reagents, Monza, Italia) a la solución y se dejó mezclar durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 500 µL de hidróxido de sodio (NaOH) (ITW Reagents, Monza, Italia) 1M, llevando el volumen total a 2,5 mL con agua Milli-Q. La absorbancia fue determinada a 510 nm utilizando un lector de microplacas Synergy Neo2 (Biotek, Winooski, VT, EE. UU.). Soluciones de (+)-catequina en un rango de concentración de 0,0125 a 0,1 mg/mL se emplearon como estándar. El experimento se realizó por triplicado.

3.3.3. Capacidad Antioxidante del extracto

La capacidad antioxidante total (CAT) de las fracciones de pétalos se determinó utilizando dos metodologías diferentes: la determinación del Proceso Antioxidante Reductor Férrico (FRAP) y la metodología del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Ambas han sido descritas previamente [128]. Para la determinación de DPPH, se mezclaron 3 mL de la solución de trabajo de DPPH (formada por 24 mg de DPPH en 100 mL de metanol) con 100 µL del extracto. Como estándar, también se preparó una solución de 3 mL que contenía DPPH en 100 µL de metanol. Posteriormente, los tubos se colocaron en completa oscuridad durante 15 minutos, y la absorbancia se midió a 515 nm.

3.3.4. Identificación y cuantificación de metabolitos mediante HPLC/QTOF-MS/MS

Todos los productos químicos utilizados para este ensayo fueron de grado LC-MS y el agua utilizada fue del tipo Milli-Q obtenida del equipo de purificación de Millipore. El acetonitrilo, metanol, etanol y ácido fórmico utilizados fueron adquiridos de Fisher Scientific (Hampton, USA) y Fluka (Sigma-Aldrich, San Luis, USA). Los estándares analíticos para la cuantificación fueron p-cumárico, ácido gálico, luteolina, luteolina 7-glucósido, quercetina, quercetina-3-glucósido, ácido quínico, sacarosa y ácido siríngico. Todos los estándares fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, San Luis, USA). La solución de referencia de espectrometría de masas para ESI de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA.) se utilizó para la calibración diaria de masas. La muestra se analizó utilizando las metodologías descritas previamente en la bibliografía. [9,59,129,130]. En resumen, el extracto se analizó en triplicado utilizando un cromatógrafo líquido Agilent 1260 equipado con un desgasificador microvacío, bomba binaria, autodispensador termostático y compartimento de columna, y detector de matriz de diodos. Para separar los componentes de la muestra, se utilizó una columna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 con dimensiones de 4.6 × 150 mm y un tamaño de partícula de 1.8 μm. Las fases móviles utilizadas fueron agua con 0.1% de ácido fórmico como fase A y acetonitrilo como fase B, con el siguiente gradiente: 0 min, 5% de fase B; 20 min, 50% de fase B; 28 min, 95% de fase B; 29 min, 5% de fase B, y finalmente, un ciclo de acondicionamiento de 7 min con las condiciones iniciales del análisis para equilibrar el sistema. La velocidad de flujo utilizada fue de 0.5 mL/min, la temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C, y el autodispensador se mantuvo a 4 °C. El volumen de inyección fue de 5 μL. La detección de compuestos se realizó con un detector Agilent 6540 Ultra High Definition (UHD) Accurate Mass Q-TOF equipado con una interfaz dual ESI Jet

Stream. La detección por QTOF se realizó en modo de ionización negativa en un rango de masas de 50–1700 m/z. Se utilizó N2 ultrapuro como gas de ionización y secado a temperaturas de 325 °C y 400 °C, respectivamente, y flujos de 10 y 12 L/min, respectivamente. Otros parámetros fueron los siguientes: voltaje de capilar, 4000 V; presión de N2 en el nebulizador, 20 psig; voltaje de Q1, 130 V; voltaje de la boquilla, 500 V; skimmer, 45 V; octopolo 1 RF, 750 V. El análisis se realizó con ionización continua de anión trifluoroacetato (112.985587 m/z) y un aducto de hexakis (1H,1H,3H-tetrafluoropropoxi) fosfazina (1033.988109 m/z) con el objetivo de recalibrar cada espectro de masas adquirido durante el análisis. Además, se realizaron análisis de MS/MS en modo de fragmentación automática, aislando y fragmentando los dos picos de masas más intensos, con los siguientes valores de energía de colisión: 10 eV, 20 eV y 40 eV. Los datos de MS/MS se adquirieron en modo centrado a una velocidad de 2.5 espectros/s en modo de rango dinámico extendido (2 GHz). Todas las operaciones de adquisición de datos fueron controladas con el software Masshunter Workstation versión B.06.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Los principales compuestos en el extracto fueron detectados automáticamente utilizando un algoritmo de extracción de compuestos basado en la detección de características moleculares, y los picos resultantes fueron filtrados con un umbral de volumen relativo del 0.2%, además de aquellos que aparecían en blanco de solvente. Siempre que fuera posible, los compuestos detectados por este algoritmo fueron identificados tentativamente con la ayuda de bases de datos de compuestos (Scifinder, HMDB, Metlin, etc.) y literatura científica relacionada con *Tagetes erecta,* , basándose en la fórmula molecular obtenida a partir de los datos de masa exacta y distribución isotópica, tiempos de retención y patrones de fragmentación registrados. Los compuestos identificados se cuantificaron en función de la detección de

MS y utilizando estándares sustitutos, mientras que se empleó el Cromatograma de Iones Extraídos (EIC) de cada metabolito individual.

3.4. Ensayos en líneas celulares

3.4.1. Células y condiciones

En los ensayos in vitro se empleó la línea celular tumoral ovárica A2780. Estas células fueron proporcionadas por el servicio de Cultivos Celulares y Banco Celular del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Para su crecimiento y mantenimiento se empleó el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, enriquecido con 2 mM de L-glutamina, 10% de suero bovino fetal (SBF), penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, San Luis, USA). Las células fueron mantenidas a 37ºC y 5% de CO_2, una vez llegaron a confluencia fueron subcultivadas previa separación enzimática mediante el uso de tripsina.

3.4.2. Metabolización de MTT

Para estimar la viabilidad celular se empleó el ensayo de MTT, que se basa en la reducción metabólica del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (MTT) (Sigma-Aldrich, San Luis, USA) por las mitocondrias celulares hasta formazán y su posterior cuantificación mediante colorimetría [131]. Para la realización del ensayo, se sembraron las células en placas de 96 pocillos (VWR, Radnor, USA) a una densidad de $1x10^4$ células/mL. Tras 24 horas, el medio fue reemplazado y las células fueron tratadas con las concentraciones de los extractos de 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL durante 48 horas de incubación. A continuación, el medio de sustituyó por MTT (0,5 mg/mL) preparado en el medio sin rojo fenol. A continuación, las células se incubaron durante 1

hora a 37ºC y oscuridad; seguidamente, se retiró la disolución de MTT y los cristales se solubilizaron empleando dimetilsulfóxido (DMSO) (ITW Reagents, Monza, Italia). Finalmente, las células fueron agitadas durante 5 minutos y se midió la absorbancia a la longitud de onda de 550 nm empleando la absorbancia a 690 nm como referencia empleando un lector de multiplaca (Biotek, Winooski, USA). Para determinar el valor de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) el paquete "drc" de R (versión 4.0.5, https://www.r-project.org). Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.4.3. Apoptosis/necrosis mediante citometría de flujo

Para determinar la distribución celular en apoptosis/necrosis se empeló un protocolo basado en la combinación de anexina V e ioduro de propidio (IP). Este se basa en la capacidad de la anexina V de unirse a la fosfatidilserina al comienzo de la apoptosis y que el IP se une al ácido nucleico una vez que las células han perdido la integridad de su membrana. Las células se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/mL en una placa de 6 pocillos (VWR, Radnor, USA), tras 24 horas de incubación, las células fueron tratadas con la dosis IC_{50} de cada extracto y fueron incubadas durante 48 horas. Tras la finalización del tiempo de incubación, las células se separaron mediante el uso de tripsina (Sigma-Aldrich, San Luis, USA) y se centrifugaron a 100 rpm, 4ºC durante 5 minutos, a continuación fueron lavadas con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich, San Luis, USA). Seguidamente, se añadió 100 µL of buffer de Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 1x, 5 µL of anexina V-FITC y 2 µL of IP (Thermo, Waltham, USA). La cuantificación de las células en apoptosis y necrosis se determine mediante citometría de flujo empleando el citómetro Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) y el software Attune Cytometric

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts), mediante la evaluación de 10000 células por muestra. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.4.4. Determinación de ROS

Para la estimación de la producción de ROS, las células se sembraron en una densidad de 1×10^5 células/mL en una placa de 6 pocillos (VWR, Radnor, USA), tras 24 horas de incubación, las células fueron tratadas con la dosis IC_{50} de cada extracto y fueron incubadas durante 48 horas. Tras esto, las células fueron recogidas mediante centrifugación e incubadas con 2′-7'dichlorofluorescein (DCF) 50 µM, (Sigma-Aldrich, San Luis, USA). A continuación, se lavaron con PBS. La inducción de ROS se cuantificó mediante citometría de flujo empleando el citómetro Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) y el software Attune Cytometric (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts), mediante la evaluación de 10000 células por muestra. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.4.5. Inducción de autofagia

La inducción de autofagia se realizó mediante citometría de flujo empleando el kit CYTO-ID ENZKIT175 Autophagy Detection Kit 2.0 (Enzo Life Sciences, Lausen, Suiza). Las células fueron sembradas a una concentración de 1×10^5 células/mL en una placa de 6 pocillos (VWR, Radnor, USA), tras 24 horas el medio fue cambiado y las células fueron expuestas a la dosis IC_{50} de cada extracto y durante 48 horas. Además, se empleó la rapamicina (0,5 µmol/L) durante 12 horas como control positivo. A continuación, las células se separaron mediante el uso de tripsina (Sigma-Aldrich, San Luis, USA) y se recogieron mediante centrifugación a 1000 rpm, 5 minutos y 4ºC. Las células fueron lavadas dos veces con PBS suplementado con SBF al 5% y se con Green Stain solution

diluido en RPMI 1640 durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con Assay Buffer 1 × y se resuspendieron en este mismo buffer para la cuantificación mediante mediante citometría de flujo empleando el citómetro Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) y el software Attune Cytometric (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts), mediante la evaluación de 10000 células por muestra. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Finalmente, se corroboró la inducción de autofagia para el extracto de *Rosa x hybrida* mediante microscopía de fluorescencia, en este caso las células se tiñeron empleando el Green Detection Reagent and Hoechst 33342 Nuclear Stain siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las muestras se prepararon con glicleron y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon, Tokio, Japan), empleando el software Nis-Elements microscope imaging software (versión 4.13).

3.5. Ensayos en *C. elegans*

3.5.1 Cepas y mantenimiento

Las cepas de *C. elegans* utilizadas en este trabajo fueron N2 Bristol y CL4176. N2 se mantenía a 20ºC en la incubadora (VELP Scientifica FOC 120 E, Usmate, Italia) y CL4176 a 16ºC. Todos los gusanos se mantuvieron en placas con medio de crecimiento de nematodos (NGM) (0.75 g de NaCl, 4.25 g de agar, 0.625 g de peptona en 250 mL de agua Milli-Q). *E. coli* OP50 se esparció sobre ese medio y se incubó durante la noche a 37 °C para obtener una suspensión que pueda ser usada por los gusanos como alimentos. Los gusanos y las bacterias se obtuvieron del Caenorhabditis Genetics Center (CGC) (Minneapolis, MI, EE. UU.). Todos los experimentos, se llevaron a cabo comenzando

con nematodos sincronizados por edad obtenidos de adultos hermafroditas tratados (0.5 N de NaOH en 20% de lejía).

3.5.2. Ensayo de letalidad

Para determinar la letalidad aguda se realizó una curva de respuesta de concentración. Los gusanos N2 Bristol sincronizados por edad en larvas L4 fueron expuestos a concentraciones crecientes de las cinco matrices alimenticias: 0, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg/mL para cada uno de los extractos. Después de 24 horas a 20 °C en ausencia de alimento, los animales se clasificaron como vivos o muertos utilizando un microscopio de disección Motic (Motic Inc., LTD., Hong Kong, China). Se consideró que un gusano había muerto cuando no respondía al estímulo mecánico generado con un alambre de platino. Cada ensayo independiente incluyó al menos tres placas de NGM con, al menos, diez gusanos en cada una. La letalidad se expresó como un porcentaje total de supervivencia de los gusanos.

3.5.3. Viabilidad

Para evaluar la posible toxicidad de los extractos en la viabilidad de los huevos, se sembraron huevos de la cepa tipo salvaje (al menos 40 por grupo) en placas que contenían solo *E. coli* OP50 o la bacteria más los tratamientos (100 µg/mL para cada uno de los extractos). Al día siguiente, se contó el número de larvas en un microscopio de disección (Motic Inc., Hong Kong, China). Los resultados se presentaron como el porcentaje de huevos eclosionados por grupo en comparación con el grupo de control.

3.5.4 Parálisis

Este ensayo se llevó a cabo para determinar la tasa de parálisis de la cepa transgénica CL4176. Los nematodos CL4176 en el estadio L3 fueron con 100 µg/mL de los extractos (grupo control sin tratar). Después de 48 horas de incubación a 16 °C, los gusanos fueron transferidos a una incubadora a 23 °C. Tras 20 horas de incubación, se realizó el recuento de gusanos paralizados cada 2 horas hasta que el último nematodo quedó paralizado. Se asumió la parálisis cuando no hubo respuesta al estímulo mecánico generado con un alambre de platino. Se llevaron a cabo al menos tres experimentos diferentes para cada concentración con diez gusanos en cada uno. Los resultados se expresan como porcentaje de gusanos no paralizados (%). El experimento se realizó por triplicado. El control negativo fueron nematodos N3 sin tratar.

3.5.5. Producción de ROS

El contenido intracelular de ROS de los gusanos se midió utilizando la técnica DCFDA. El siguiente protocolo se aplicó para determinar el contenido de ROS en diferentes situaciones: en estado basal y daño oxidativo inducido por AAPH (protección contra el estrés oxidativo) en gusanos jóvenes (de 5 días) y durante el envejecimiento (de 12 días). Gusanos sincronizados en la etapa L3 de la cepa N2 tipo salvaje se colocaron en placas con o sin los tratamientos (100 µg/mL para el extracto de *Tagetes erecta*) y se incubaron durante 48 horas a 20 °C. Después de ese tiempo, todos los grupos fueron lavados con medio M9 y expuestos (protección contra el estrés oxidativo) o no (condiciones basales) a 2.5 mM de AAPH durante 15 minutos. Luego, se realizaron tres lavados con M9 para eliminar el AAPH y los gusanos se incubaron durante 2 horas con 25 µM de DCFDA a 20 °C. El DCFDA permite la cuantificación intracelular de ROS, ya que este colorante puede penetrar a través de la membrana celular y emite fluorescencia cuando reacciona

con radicales libres. La intensidad de fluorescencia se midió utilizando un citómetro de flujo de partículas grandes de rango múltiple Biosorter (Union Biometrica. Massachusetts, EE. UU.). Se utilizaron al menos 300 gusanos por grupo. Los resultados se expresan como porcentaje de control utilizando la media de la intensidad de fluorescencia amarilla, que está relacionada con el contenido de ROS.

3.5.6. Producción de ROS mitocondrial

El contenido de ROS mitocondrial se midió utilizando el colorante Mitotracker Red CM-H2 XRos. El siguiente protocolo se aplicó a gusanos jóvenes (de 5 días) y envejecidos (de 12 días) en una situación basal. Gusanos sincronizados en la etapa L3 de la cepa N2 tipo salvaje se colocaron en placas con o sin los tratamientos (100 µg/mL el extracto de *Tagetes erecta*) y se incubaron durante 48 horas a 20 ℃. Después de ese tiempo, todos los grupos fueron lavados con medio M9 y transferidos a placas NGM que contenían 10 µM de Mitotracker mezclado con *E. coli* OP50 muertos como fuente de alimento. Los gusanos se incubaron con el colorante durante 2 horas a 20 ℃ y luego, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un citómetro de flujo de partículas grandes de rango múltiple Biosorter (Union Biometrica. Massachusetts, EE. UU.). Se utilizaron al menos 300 gusanos por grupo. Los resultados se expresan como porcentaje de control utilizando la media de la intensidad de fluorescencia roja, que está relacionada con el contenido de ROS.

3.6. Análisis estadístico

Los resultados se describen como valores medios y desviación estándar o error típico. Todos los ensayos han sido realizados por triplicado. Previamente se ha comprobado si los grupos cumplían el criterio de normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

Si las muestras eran no paramétricas la comparación de grupos se realizó mediante un t-test; si eran paramétricas se compararon mediante un test de ANOVA (previa confirmación de los criterios de homocedasticidad y normalidad). Para la realización los test estadísticos se empleó el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, versión 26, licencia UGR). También se emplearon los software Graphad Prism 8 y R R (version 4.0.5, https://www.r-project.org) empleando los paquetes ‘ggstatplot2‘, ‘voronoiTreemap‘ y ‘drc‘.

4.- Resultados y discusión

4.1- Análisis nutricional

La tabla 4 muestra los resultados obtenidos en el análisis nutricional de las especies de flores estudiadas en esta tesis doctoral. Todas las flores estudiadas reportan un aporte calórico similar y su nutriente mayoritario es el agua, constituyendo aproximadamente el 80% del total para las tres especies de flores. Estos resultados concuerdan con lo propuesto por otros autores, que señalan las flores comestibles como un alimento con contenido calórico bajo y con un contenido alto en agua que varía entre el 70-90% [27]. El segundo componente mayoritario fueron los carbohidratos, suponiendo aproximadamente el 15% del total y sin reportar diferencias significativas entre estas flores. Aunque previamente se ha sugerido que la especies de Rosa sp. son las flores que más contenido en carbohidratos tienen [27], en este caso fue *Rosa x hybrida* la especie que menos contenido tuvo de las estudiadas. Para las especies estudiadas en esta tesis, *Antirrhinum majus* fue la flor que tuvo un valor más alto de carbohidratos (aunque con pocas diferencias con respecto a las otras flores), y este coincide con lo propuesto previamente para esta flor [17].

Al igual que para el contenido en hidratos de carbono, los valores obtenidos en proteínas fueron similares entre las tres flores estudiadas. Estas tres flores muestran un valor intermedio proteico comparadas con el resto de flores comestibles disponibles en el mercado, quedando lejos de las que más contenido han mostrado como *Calendula officinalis* [47] o *Tropaeolum majus* [9]. Además, los valores obtenidos de proteínas concuerdan con los reportados por otros autores para estas mismas flores [9,17,132].

Sin embargo, es en el parámetro de grasas donde hay diferencias entre las flores estudiadas. En este caso, los pétalos de *Tagetes erecta* reportaron un mayor contenido en

grasas que el resto. No obstante, el contenido en grasas de las flores estudiadas es inferior a lo reportado por otros autores. Por ejemplo, Navarro-González *et al* describió un valor de grasas de más del doble para los pétalos de *Tagetes erecta* y de seis veces superior para los pétalos de *Antirrhinum majus.* Aunque el contenido en general de las flores comestibles en grasas es bajo (entre 1-2%), recientemente se ha reportado que su contenido en ácidos grasos esenciales es superior a otros alimentos vegetales [4].

Además, se evaluó el contenido en ceniza ya que las flores comestibles pueden suponer una fuente elevada de algunos minerales con propiedades biomédicas, en este caso, el contenido en cenizas fue inferior para los pétalos de *Rosa x hybrida* y similar a lo previamente reportado por otros autores para este tipo de alimentos.

Tabla 4. Determinación de energía y macronutrientes de las tres flores sujeto de estudio.

	Energía (kcal)	Energía (kJ)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Hidratos de carbono (%)
Antirrhinum majus	71	295	81,58	1,06	1,78	0,22	15,36
Rosa x hybrida	63	264	83,73	0,68	1,96	0,16	13,47
Tagetes erecta	68	283	82,56	1,12	1,70	0,50	14,13

4.2. Evaluación en de la actividad antioxidante e identificación y cuantificación de metabolitos mediante HPLC/MM

En los últimos años, el contenido en compuestos bioactivos, especialmente polifenoles, en ciertos alimentos como té, frutos rojos y diversas vegetales han demostrado una especial relevancia en la mejoría de la salud [133]. En general, estos compuestos son conocidos por sus propiedades antioxidantes, que ayudan a combatir el estrés oxidativo y reducir el riesgo de enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer. También, consumo de estos metabolitos presentes en los alimentos fortalecen el sistema inmune, influyendo positivamente en diversos procesos biológicos, como la regulación del metabolismo y la mejora de la función vascular. [134] La inclusión de una dieta rica en polifenoles y otros nutrientes antioxidantes puede desempeñar un papel clave en la prevención de enfermedades y la promoción de un envejecimiento saludable, destacando la importancia de adoptar hábitos alimenticios que favorezcan la obtención de estos valiosos compuestos para mantener y mejorar la salud a lo largo del tiempo [135,136].

Para abordar el potencial antioxidante de los extractos de flores estudiados en presente tesis doctoral, en primer lugar, se estudió la capacidad antioxidante *in-vitro* de estos 3 extractos mediante las metodologías de referencia. Para tal fin, se midió la actividad antioxidante mediante las metodologías FRAP y DPPH, estos ensayos han sido ampliamente empleados y aceptados para medir esta actividad a partir de extractos de origen vegetal. Los extractos obtenidos a partir de *Rosa x hybrida* tienen unos valores de FRAP y DPPH significativamente más elevados que los obtenidos para *Antirrhinum majus* y *Tagetes erecta.* Así, el valor de *Antirrhinum majus* fue unas 20 veces inferior al obtenido para *Rosa x hybrida* en el ensayo de DPPH y unas 10 veces más bajo en el ensayo de FRAP. También *Rosa x hybrida* tiene unos valores más elevados que los

obtenidos por *Tagetes erecta*, siendo unas 4 veces superior el valor de FRAP y 3 veces más elevado para DPPH. Los valores obtenidos para los pétalos de *Tagetes erecta* son consistentes con los que han sido reportados previamente para esta flor [25,68]. Los valores reportados por *Tagetes erecta* son ligeramente inferiores a la media de los obtenidos para otras especies de flores comestibles, por ejemplo, a los descritos previamente para *Viola cornuta* [25] o *Tulbaghia violacea*. [37] Sin embargo, *Rosa x hybrida* mostró resultados muy superiores al resto de los descritos previamente para flores comestibles [137], mostrando una gran capacidad antioxidante, lo que puede estar asociado a múltiples actividades biológicas. Por otra parte, *Antirrhinum majus* mostró los resultados más bajos en todos los parámetros medidos, lo que concuerda con el único estudio previo realizado [17]. En general, la capacidad antioxidante de este tipo de flores comestibles es especialmente baja.

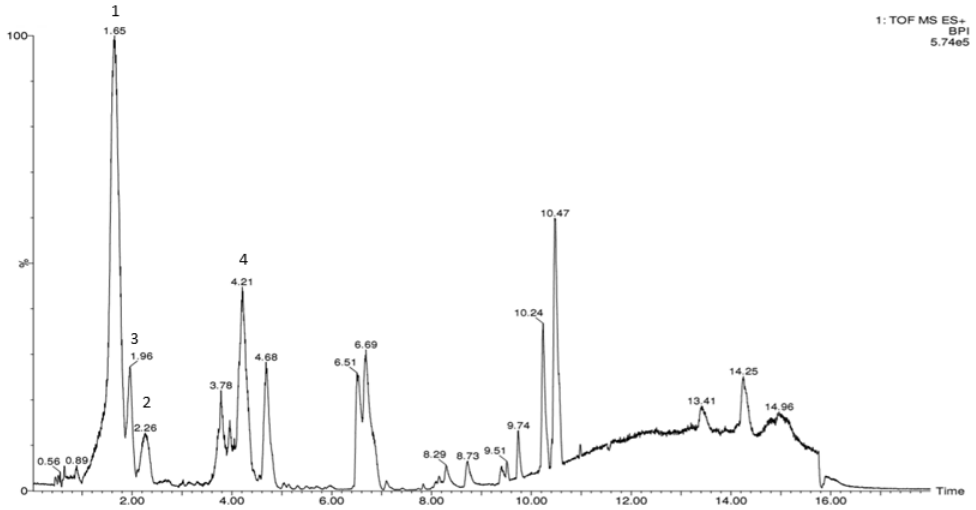
Parámetro (Media ±ET)	*Rosa x hybrida*	*Tagetes erecta*	*Antirrhinum majus*
Total phenolic content (mg Gaeq/g extracto seco)	1,07 ± 0,04	81,1 ± 10,6	0,31 ± 0,05
Total Flavonoids (mg CATeq/g extracto seco)	39,67 ± 2,57	23,17 ± 4,26	14,42 ± 0,52
DPPH (μM trolox/g extr)	7640 ± 47	1950,3 ± 211,1	351,7 ± 43,9
FRAP (μM trolox/g extr)	4330 ± 34	977,7 ± 62,4	457,6 ± 13,2

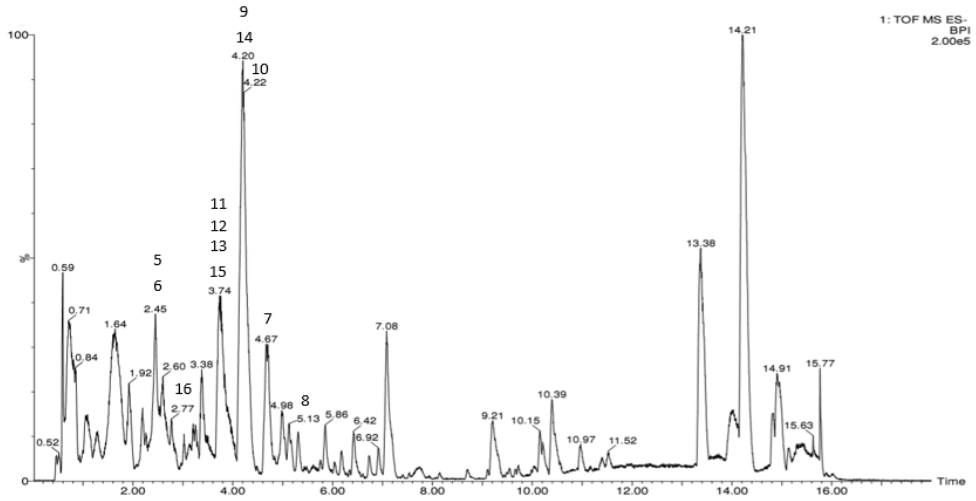
Tabla 5: Parámetros antioxidantes determinados en los extractos de flores. DPPH FRAP. ET. Error Típico

A continuación, se estimó el contenido en flavonoides y polifenoles. En este caso, al igual que en los parámetros antioxidantes, el extracto obtenido a partir de los pétalos de *Antirrhinum majus* mostró los resultados más bajos comparados con las otras dos flores. Los resultados de flavonoides totales fueron similares entre las flores de *Tagetes erecta* y

Rosa x hybrida, mientras que el contenido de compuestos fenólicos fue más elevado para el extracto de *Tagetes erecta* respecto a los otros. Esto indica que la composición individual de estas flores difiere entre ellas; para mejorar el conocimiento y sus posibles aplicaciones se determinó de forma cualitativa y cuantitativa la composición individual de cada extracto empleando HPLC/MM. La Figura 5 muestra los distintos cromatogramas de los 3 extractos estudiados.

A





B

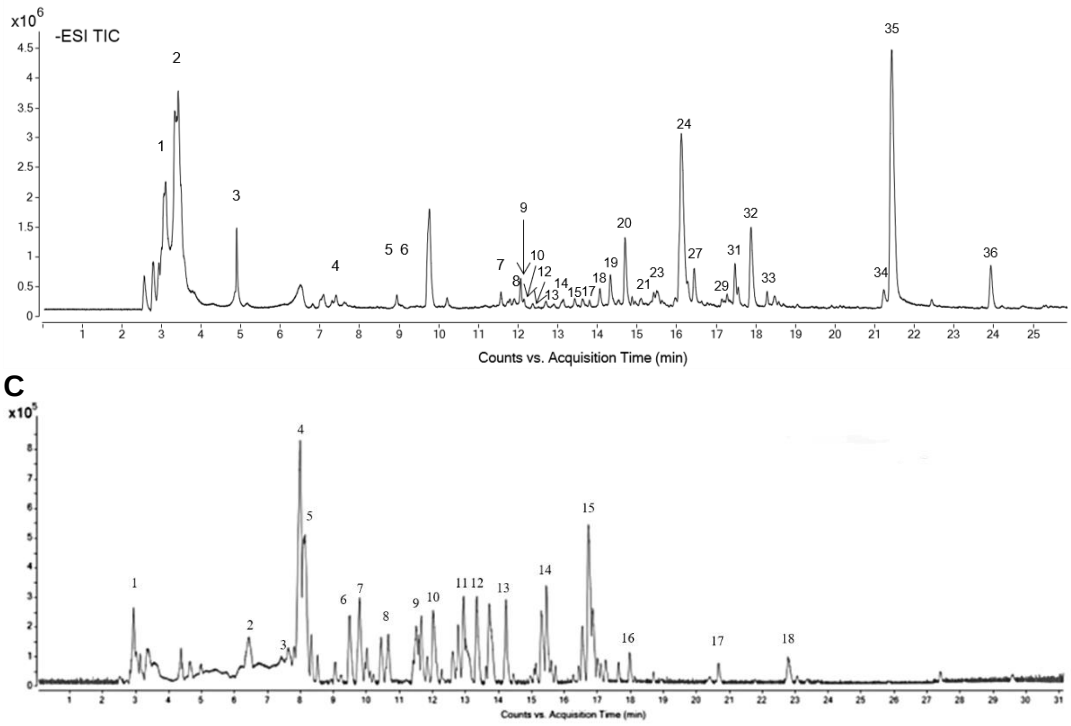


Figura 5: Cromatograma de las especies de flores estudiadas (A) *Tagetes erecta*; (B) *Rosa x hybrida*; (C) *Antirrhinum majus*

En todos los casos, la cantidad de metabolitos determinados en todos los extractos de pétalos fue similar; se identificaron hasta 36 compuestos individuales para los pétalos de *Antirrhinum majus* y *Tagetes erecta* y 35 para la los pétalos de *Rosa x hybrida*. Sin embargo, tanto el valor cuantitativo como la composición en grupos químicos fue diferente según la especie. Los pétalos de *Antirrhinum majus* tuvieron un valor bajo en casi todos los metabolitos identificados, destacando el contenido en ácido lamalbidico, ácido glucónico y ácido glucogálico, para el resto el contenido fue bajo (inferior a 5,00 mg/g extracto). Sin embargo, para los pétalos de *Tagetes erecta* se cuantificaron hasta 6 metabolitos con una cantidad superior a 5,00 mg/g de extracto, incluyendo el ácido quínico, fructofuranosil dideoxi-xilo-hexopiranósido, Ácido metoxi-oxo-benzopiranil glucopiranosidurónico, patulitrin, hexósido de isorhamnetina y metoxiquercetina. Es destacable que fructofuranosil dideoxi-xilo-hexopiranósido y patulitrin se obtuvieron

concentraciones por encima de 75,0 mg/g extracto. Para *Rosa x hybrida* destacan los derivados de cianidina (cyanidin 3,5-O-diglucoside y cyanidin 3-O-glucoside) con valores superiores a 20 mg/g extracto.

Tabla 6. Compuestos identificados y cuantificados en el extracto de Tagetes erecta.

Formula	RT (min)	[M-H]-, m/z	Massa	Compuesto propuesto	Concentración (mg eq estándar/g extracto ± DE)	Pico in Fig. 5A
$C_7H_{12}O_6$	3,42	191,0569	192,0641	Ácido quínico [a]	5,49 ± 0,02	1
$C_{13}H_{22}O_{11}$	3,55	707,2265	354,1168	Isómero hexósido del ácido quínico 1 [a]	0,20 ± 0,01	2
$C_{13}H_{22}O_{11}$	4,9	707,2267	354,1176	Isómero hexósido del ácido quínico 2 [a]	0,16 ± 0,01	3
$C_{14}H_{16}O_{10}$	7,47	343,0676	344,0749	Isómero de teogalina 1 [b]	0,3 ± 0,002	4
$C_{14}H_{16}O_{10}$	9,06	687,1427	344,0749	Isómero de teogalina 2 [b]	0,22 ± 0,01	5
$C_{12}H_{22}O_9$	9,94	309,1201	310,1273	Deoxi-fructofuranosil deoxi-glucopiranósido / fructofuranosil dideoxi-xilo-hexopiranósido c	76,0 ± 3,00	6
$C_{26}H_{30}O_{19}$	11,69	645,1322	646,1393	Digaloil-dihexósido [b]	0,51 ± 0,01	7
$C_{21}H_{20}O_{14}$	11,95	495,0793	496,0864	Ácido digaloilquínico [b]	0,29 ± 0,003	8
$C_{20}H_{20}O_{14}$	12,09	483,0785	484,0857	Digaloil-hexósido [b]	0,08 ± 0,001	9
$C_{19}H_{26}O_{12}$	12,12	445,1359	446,1428	ácido [(xilopiranosil-glucopiranosil)oxi]bencenoacético d	0,92 ± 0,01	10
$C_{33}H_{34}O_{23}$	12,2	797,1436	798,1506	Trigalloil-dihexósido b	0,53 ± 0,01	11
$C_{28}H_{32}O_{18}$	12,31	655,1525	656,1596	Gentiobiosido de patuletina	0,63 ± 0,02	12
$C_{16}H_{18}O_9$	12,9	353,0884	354,0956	Ácido cafeoilquínico	0,26 ± 0,004	13
$C_{24}H_{28}O_{15}$	13,15	555,1363	556,1435	Ácido siríngico-(dihidroxidimetoxibenzoico)-hexósido isómero 1	1,8 ± 0,1	14
$C_{24}H_{28}O_{15}$	13,39	555,1366	556,1438	Ácido siríngico-(dihidroxidimetoxibenzoico)-hexósido isómero 2	4,0 ± 0,1	15
$1C_{20}H_{28}O_{12}$	13,66	459,1514	460,1586	Apiopaeonósido / paeonólido	1,35 ± 0,04	16
$C_{20}H_{16}O_{13}$	13,77	463,0522	464,0594	Ácido elágico-hexósido	0,07 ± 0,002	17
$C_{15}H_{14}O_{10}$	14,59	353,0524	354,0596	Ácido cumaroilhidroxicítrico	2,5 ± 0,1	18
$C_{28}H_{32}O_{18}$	14,72	655,1519	656,1591	Patuletina 3-gentiobiosida	0,55 ± 0,01	19
$C_{21}H_{20}O_{13}$	14,88	959,1753	480,0919	Quercetagetina-3-O-hexósido	4,0 ± 0,04	20
$C_{28}H_{24}O_{17}$	15,13	631,0946	632,1017	Quercetagetina-7-O-(galloil-hexósido)	0,5 ± 0,01	21
$C_{24}H_{28}O_{14}$	15,32	539,1412	540,1484	Hexósido de ácido di-sirínico isómero 1	2,25 ± 0,04	22
$C_{24}H_{28}O_{14}$	15,66	539,1409	540,1481	Hexósido de ácido di-sirínico isómero 2	3,3 ± 0,1	23
$C_{22}H_{22}O_{13}$	16,24	987,2069	494,1079	Patulitrina isómero 1	76,0 ± 1,0	24
$C_{14}H_6O_8$	16,36	300,9996	302,0068	Ácido elágico	0,12 ± 0,004	25
$C_{29}H_{26}O_{17}$	16,45	645,1109	646,1180	Cafeoil-digaloil-glucopiranosa	0,298 ± 0,005	26
$C_{16}H_{16}O_{10}$	16,71	367,0682	368,0754	Ácido metoxi-oxo-benzopiranil glucopiranosidurónico	12,4 ± 0,3	27
$C_{29}H_{26}O_{16}$	16,95	629,1151	630,1223	Cumaroil-digaloilglucosa / cumaroil-digaloil-glucopiranósido	0,336 ± 0,1	28

$C_{22}H_{22}O_{13}$	17,45	493,0994	494,1066	Patulitrina isómero 2	4,3 ± 0,1	29
$C_{24}H_{22}O_{14}$	17,51	533,0941	534,1013	Luteolina (malonilglucósido) / apigenina (malonilglucósido) / kaempferol (malonilglucósido)	1,6 ± 0,1	30
$C_{22}H_{22}O_{12}$	17,65	477,1048	478,1120	Hexósido de isorhamnetina	22,6 ± 0,2	31
$C_{15}H_{10}O_8$	18,08	317,0312	318,0384	Quercetagetina	22,0 ± 1,0	32
$C_{22}H_{22}O_{13}$	18,1	493,0992	494,1064	Patulitrina isómero 3	4,2 ± 0,1	33
$C_{15}H_{10}O_6$	21,38	285,0415	286,0487	Luteolina	0,45 ± 0,02	34
$C_{16}H_{12}O_8$	21,58	331,0469	332,0542	Metoxiquercetina	47,0 ± 1,0	35
$C_{16}H_{12}O_7$	24,06	315,0519	316,0591	Isorhamnetin	0,98 ± 0,04	36

Tabla 7: Compuestos identificados y cuantificados en el extracto de Antirrhinum majus

Formula	**RT (min)**	**[M-H]-, m/z**	**Massa**	**Compuesto propuesto**	**Concentración (mg eq estándar/g extracto ± DE)**	**Pico in Fig. 5C**
$C_6\ H_{12}\ O_7$	2,91	195,0501	196,0574	Ácido glucónico	5,9±0,1	1
$C_{13}\ H_{16}\ O_{10}$	6,32	331,0647	332,0719	Ácido glucogálico/ Galloilglucosa	7,7±0,3	2
$C_{13}\ H_{16}\ O_8$	7,7	299,0774	300,0844	Metilcatecol glucurónido	0,30±0,02	
$C_{28}\ H_{38}\ O_{18}$	7,85	661,1992	662,2064	7-[(O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil)oxi]-4-metil-2H-1-benzopiran-2-ona	0,86±0,04	3
$C_{16}\ H_{24}\ O_{12}$	7,87	407,1275	408,1275	Ácido lamalbídico	19,8±0,5	
$C_{26}\ H_{24}\ O_{10}$	7,91	495,1281	496,1352	4-[(4-hidroxi-2-metoxi-6-metilbenzoil)oxi]-2-metoxi-6-metilbenzoato de carboxi-3-hidroxi-5-metilfenilo	0,26±0,01	4
$C_{24}\ H_{28}\ O_{13}$	8,01	1047,3276	524,1674	Verminósido (sinónimo Catalpol 6-cafeato)	0,035±0,001	5
$C_{22}\ H_{20}\ O_{10}$	9,42	443,0957	444,103	Hidroxi-metoxiisoflavona-glucurónido	1,82±0,03	6
$C_{28}\ H_{30}\ O_{15}$	9,97	605,1497	606,1569	Acetilapiina / Pseudobaptigenina-gentiobiosido	0,009±0,000	7
$C_{15}\ H_{22}\ O_9$	10,4	345,1204	346,1276	Tetrahidro-5-hidroxi-7-(hidroximetil)ciclopenta[c]pirano-1-il β-D-glucopiranósido (sinónimo Aucubin)	0,93±0,03	8
$C_{31}\ H_{48}\ O_{20}$	11,4	739,2699	740,277	Kaempferol-rhamnopiranosil-rhamnopiranosil-glucopiranósido	0,106±0,002	
$C_{19}\ H_{26}\ O_{12}$	11,41	445,1367	446,1457	2-[(6-O-α-L-arabinopiranosil-β-D-glucopiranosil)oxi]benzoato de metilo / (αR)-α-[(6-O-β-D-Xilopiranosil-β-D-glucopiranosil)oxi]ácido bencenoacético	0,22±0,01	
$C_{20}\ H_{30}\ O_{13}$	11,51	477,1631	478,1703	2-(3,4-Dihidroxifenil)etilglucopiranosil-β-D-glucopiranósido	0,94±0,03	

$C_{33}H_{40}O_{20}$	11,67	755,2073	756,2143	Kaempferol glucosyl-rhamnosyl-glucoside/ Quercetin rhamnosyl-rutinoside	1±0,02	
$C_{27}H_{30}O_{16}$	11,72	609,148	610,1552	Kaempferol-gentiobiósido / Luteolina-gentiobiósido	0,069±0,001	
$C_{30}H_{36}O_{16}$	11,83	651,1952	652,2024	Trimetoxitricetina [ramnosil-glucósido]	0,070±0,002	9
$C_{28}H_{32}O_{17}$	12	639,1592	640,1663	Isorhamnetina-diglucósido / Isorhamnetina-soforósido	0,028±0,003	10
$C_{21}H_{20}O_{12}$	12,03	463,0901	464,0973	Quercetina-glucósido	7,3±0,1	
$C_{15}H_{18}O_{8}$	12,11	325,0941	326,1013	Cumaroil-glucosa	0,13±0,01	
$C_{27}H_{30}O_{15}$	12,28	593,153	594,1602	Kaempferol-rutinoside / Kaempferol-neohesperidoside	0,053±0,001	
$C_{21}H_{22}O_{11}$	12,61	449,1099	450,1171	Pentahydroxychalcone-glucopyranoside (synonym Marein)	0,32±0,01	
$C_{30}H_{38}O_{17}$	12,78	669,2041	670,2113	Cumarilmelitósido	0,82±0,01	
$C_{20}H_{30}O_{11}$	12,96	445,1723	446,1806	2-Feniletil 2-glucopiranosil-β-D-glucopiranósido / 2-(4-Hidroxifenil)etil 2-O-(6-deoxi-α-L-manopiranosil)-β-D-glucopiranósido	1,90±0,02	
$C_{21}H_{32}O_{13}$	12,96	491,1778	492,185	Sinuatol / Dimetoxi-4-metilfenil 6-glucopiranosil-glucopiranósido	1,36±0,02	11
$C_{27}H_{26}O_{17}$	13,09	1243,2291	622,1182	Diglucurónido de genisteína / Diglucurónido de apigenina	3,53±0,05	12
$C_{21}H_{22}O_{12}$	13,36	465,1039	466,1111	Catequina-glucurónido/Epicatequina-glucurónido	2,35±0,03	
$C_{21}H_{28}O_{12}$	13,65	471,15	472,157	Cinamoil-gentiobiosa isómero 1	0,058±0,02	
$C_{43}H_{50}O_{25}$	13,75	965,2552	966,2623	3-feruloil-triglucósido de kaempferol	0,01±0,001	
$C_{28}H_{30}O_{15}$	13,83	605,1497	606,1569	Acetilapiina / Pseudobaptigenina-gentiobiosida	0,009±0,000	
$C_{27}H_{40}O_{15}$	14,28	603,2373	604,2373	Glucopiranósido, [(6-(acetiloxi)-7-[(acetiloxi)metil]-hexahidro-7-hidroxi-1-(3-metil-1-oxobutoxi)ciclopenta[c]piran-4-il]metil, 2-acetato	0,51±0,02	13
$C_{21}H_{20}O_{12}$	15,16	463,0845	464,0917	Quercetina-glucósido	0,56±0,04	
$C_{43}H_{36}O_{16}$	15,22	807,1927	808,1998	5-(benzoiloxi)-2-[4-(benzoiloxi)fenil]-7-hidroxi-6-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4H-1-benzopiran-4-ona	0,120±0,003	
$C_{21}H_{20}O_{11}$	15,29	447,0907	448,0979	Kaempferol-3-O-glucósido	0,0010±0,002	
$C_{27}H_{30}O_{15}$	15,54	593,1474	594,1545	Kaempferol-rutinoside / Kaempferol-neohesperidoside	1,49±0,03	14
$C_{27}H_{32}O_{14}$	15,81	579,169	580,1761	Naringina	0,092±0,001	
$C_{21}H_{22}O_{11}$	16,52	449,1066	450,1138	Cianidina-glucopiranósido	0,54±0,02	
$C_{21}H_{20}O_{10}$	16,65	431,0962	432,1033	Apigenina-glucósido	0,30±0,02	
$C_{19}H_{20}O_{12}$	16,94	879,1842	440,0955	Dihidroxifenil 1-(6-galloil-glucopiranósido)	1,70±0,1	15

$C_{21}H_{22}O_{10}$	17,01	433,1111	434,1182	Dihidrogenistina isómero 1	0,95±0,02	
$C_{21}H_{22}O_{10}$	18,1	443,111	434,1181	Dihidrogenistina isómero 2	0,093±0,003	16
$C_{15}H_{12}O_6$	19,03	287,052	288,0593	Hidroxinaringenina	0,0010±0,0003	
$C_{15}H_{10}O_5$	22,73	269,047	270,0543	Apigenina	0,14±0,01	17
$C_{15}H_{12}O_5$	23,2	271,0627	272,0699	Naringenina / Dihidrogenisteína	0,045±0,004	18
$C_{15}H_{10}O_6$	23,5	285,0421	286,0493	Luteolina	0,017±0,003	
$C_{16}H_{12}O_5$	27,52	283,0592	284,0664	Dihidroxi-metoxiflavona / metilgenisteína	0,030±0,01	

Tabla 8 Compuestos identificados y cuantificados en el extracto de Rosa x Hybrida

Formula	RT (min)	[M-H]-, m/z	Massa	Compuesto propuesto	Concentración (mg eq estándar/g extracto ± DE)	Pico in Fig. 5B
				Antocianinas		
$C_{27}H_{31}O_{16}$	1,65	612,1690	449.1081, 287,0550	Cianidina 3,5-O-diglucósido	26,0±0.02	1
$C_{21}H_{21}O_{11}$	2,26	450,1162	287,0547	Cianidina 3-O-glucósido	22,0±0.102	2
$C_{27}H_{31}O_{15}$	1,96	596,1741	449,1083	3-O-rutinósido de cianidina	4,0±0.036	3
				Flavanoles		
$C_{15}H_{14}O_6$	2,45	289,0712	245.0800, 169.0126	(+)-Catequina	0,464±0.025	5
$C_{15}H_{14}O_6$	2,45	289,0712	245.0801, 169.0125	(-)-Epicatequina	1,261±0.07	6
$C_{27}H_{30}O_{16}$	4,03	609,1456	447,0941	Kaempferol 3,7-O-diglucósido	0,1365±0.016	8
$C_{29}H_{32}O_{16}$	5,13	635,1612	285,0395	Kaempferol 3-O-(6"-acetil-galactósido) 7-O-ramnósido	0,125±0.035	9
$C_{21}H_{20}O_{11}$	4,20	447,0927	285,0385	Kaempferol 3-O-galactósido	0,26±0.035	
$C_{27}H_{30}O_{15}$	4,44	593,1506	447,0936	Kaempferol 3-O-galactósido 7-O-ramnósido	4,01±0.058	
$C_{21}H_{20}O_{11}$	4,20	447,0927	285,0385	Kaempferol 3-O-glucósido	3±0.102	10
$C_{27}H_{30}O_{15}$	4,44	593,1506	285,0386	Kaempferol 3-O-rutinósido	0,00025±0.0001	
$C_{15}H_{10}O_7$	4,21	303,0505	191,0542, 137,0228	Quercetina	4,1±0.206	4
$C_{29}H_{32}O_{17}$	4,70	651,1561	447,0928	Quercetina 3-O-(6"-acetil-galactósido) 7-O-ramnósido	0,365±0.0347	
$C_{20}H_{18}O_{11}$	4,11	433,0771	300,9975	Quercetina 3-O-arabinósido	0,364±0.0103	
$C_{21}H_{20}O_{12}$	3,74	463,0877	301,0349	Quercetina 3-O-galactósido	0,3621±0.047	12
$C_{27}H_{30}O_{16}$	4,03	609,1456	301,0340	Quercetina 3-O-galactósido 7-O-ramnósido	0,362±0.058	
$C_{21}H_{20}O_{12}$	3,74	463,0877	301,0349	Quercetina 3-O-glucósido	0,654±0.058	13
$C_{21}H_{20}O_{11}$	4,20	447,0927	300,0259	Quercetina 3-O-ramnósido	0,03659±0.014	14
$C_{27}H_{30}O_{16}$	4,03	609,1456	300,9977	Quercetina 3-O-rutinósido	0,362±0.025	
$C_{20}H_{18}O_{11}$	4,11	433,0771	300,9975	Quercetina 3-O-xilósido	0,00155±0.00047	

Ácidos fenólicos / Ácidos hidroxibenzoicos						
$C_{14}H_6O_8$	3,74	300,9984	257,0098	Ácido elágico	1,25±0.02	15
$C_{19}H_{14}O_{12}$	4,11	433,0771	300,9976	Arabinósido de ácido elágico	0,362±0.0365	16
$C_7H_6O_5$	1,33	169,0137	125,0236, 123,0083	Ácido gálico	4,0±0.258	
$C_9H_8O_3$	2,77	163,0395	119,0485	Ácido p-cumárico	1±0.0147	

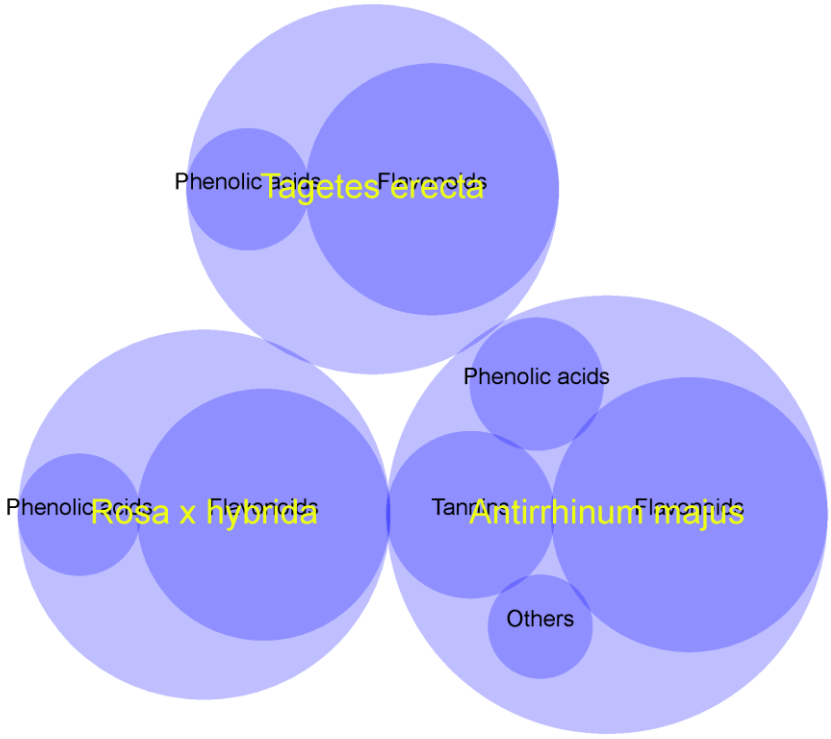


Figura 6: Distribución de los tipos de metabolitos encontrados según los grupos químicos en los extractos de *Rosa x hybrida, Tagetes erecta* y *Antirrhinum majus*

Posteriormente, para realizar un análisis más detallado de la composición química de los extractos, estos se clasificaron en función de las categorías reflejadas en la base de datos phenol-explorer.eu [138] , una base de datos integral sobre fenoles y polifenoles naturales que incluye composición de alimentos, procesamiento de alimentos y metabolitos de polifenoles en humanos y que es ampliamente empleada. En relación a la clase de metabolitos identicados los mayoritarios fueron flavanoides (flavonoids) y ácidos fenólicos (phenolic acids) en las 3 especies de flores. Además, en el extracto de *Antirrhinum majus* se identificaron otros dos grupos adicionales: taninos (tannins) y otros (Figura 6). Estos compuestos son mayoritarios en otras especies de flores y de otros extractos vegetales [27].

A continuación, se evaluó la composición y agrupamiento en función de la categoría subclase recogida en la base de datos phenol-explorer.eu [139]. En este caso, se aprecian diferencias significativas entre los distintos extractos de flores. El extracto sintetizado a partir de los pétalos de *Rosa x hybrida* contiene principalmente antocianinas y en menos proporción flavonoles. Es destacable que este es el único extracto que contiene alta proporción de antocianinas, estos son pigmentos vegetales pertenecientes al grupo de los flavonoides, responsables de los colores azules, púrpuras y rojos en numerosas frutas y flores [140]. Por tanto, esta diferencia en la composición puede deberse a la diferencia de coloración de los pétalos de las flores estudias; mientras que los pétalos de *Rosa x hybrida* tienen colores cercanos al rojo/rosa, los pétalos de las otras tienen color amarillo/naranja principalmente.

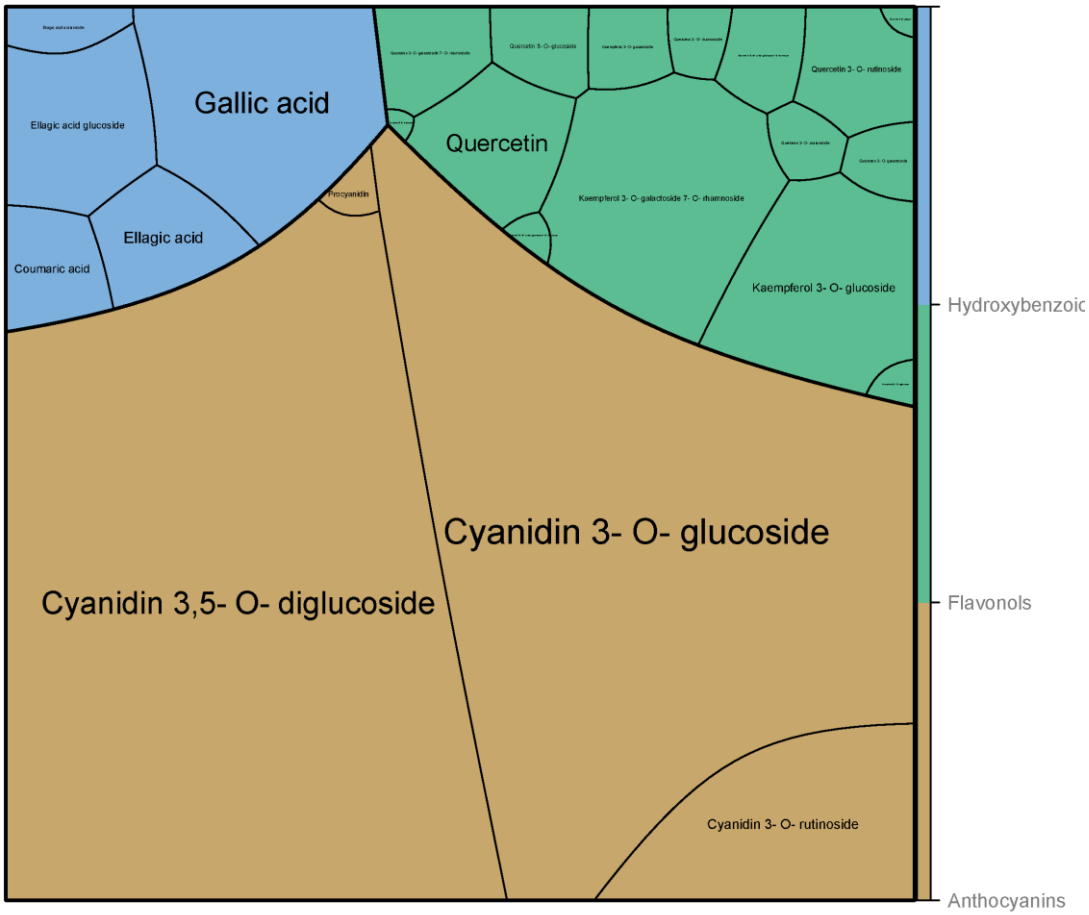


Figura 7: Composición esquemática de los metabolitos encontrados en el extracto de *Rosa x hybrida.*

Además, 2 antocianinas (cyanidin3-O-glucoside y cyanidin 3,5-O-diglucoside) son las mayoritarias en este extracto. Previos estudios han destacado que estos compuestos tienen el potencial de neutralizar los radicales libres, moléculas inestables que pueden dañar las células y contribuir al desarrollo de enfermedades, por lo que pueden ser los responsables de la actividad biológica del extracto [141].

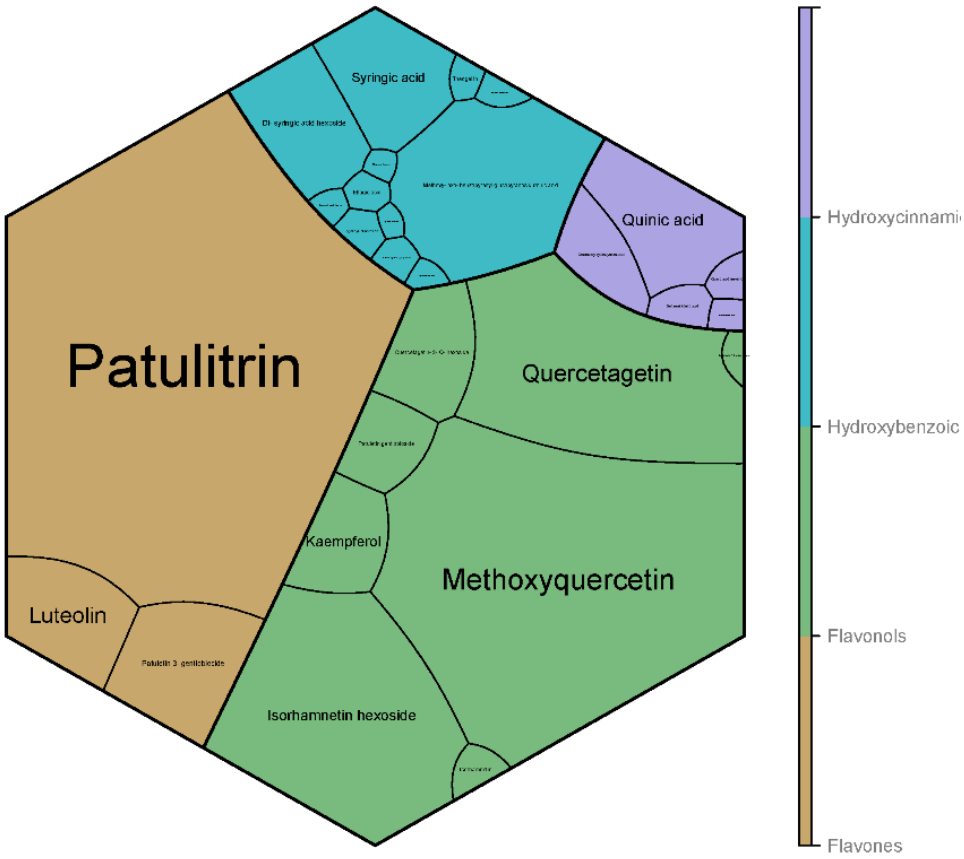


Figura 8: Composición esquemática de los metabolitos encontrados en el extracto de *Tagetes erecta.*

En el caso de los extractos obtenidos a partir de *Tagetes erecta*, se han encontrado 4 subclases de metabolitos: flavonoles, flavones, ácido hidroxicinámico y ácido hidroxibenzoico. En este caso, los componentes mayoritarios fueron los flavonoles y las los flavones en proporción similar. Además, es destacable el alto contenido reportado por

el metabolito individual pautlitrina, con una concentración superior a 80 mg/g de extracto incluyendo todas sus isoformas. El extracto de *Tagetes erecta* ha sido caracterizacdo previamente y los que han demostrado actividad biológica tienen una composición muy similar a la reportada en esta presente tesis doctoral. Así, Alvarado-Sansininea JJ *et al* asociaron la actividad antitumoral de estos extractos al alto contenido de los mismos en quecetagetin y patulitrin [142], dos de los principales compuestos identificados en nuestro extracto. Además, es reseñable que que la eficacia de la extracción de polifenoles de los pétalos de *Tagetes erecta* puede verse influida significativamente por la elección de los disolventes y su polaridad. Los polifenoles presentan diversos grados de polaridad, y la selección de disolventes con la polaridad adecuada es crucial para una extracción eficaz [143]. En general, los disolventes polares como el etanol o el metanol suelen ser eficaces para extraer una amplia gama de polifenoles debido a su capacidad para interactuar con grupos funcionales polares. Por ejemplo, Burlec identificó hasta 57 compuestos individuales en un extracto metanólico de *Tagetes erecta* utilizando metanol como disolvente [59], mientras que cuando el disolvente de extracción estaba formado por una mezcla de etanol y agua en diferentes proporciones, el número de polifenoles individuales identificados se redujo. Los resultados obtenidos para el extracto de *Tagetes erecta* coinciden parcialmente con los descritos por otros autores. Algunos compuestos, como la laricitrina, la isorhamnetina y el ácido elágico, ya se habían descritos en otros extractos obtenidos de esta planta [9,68]. Sin embargo, su distribución difiere parcialmente de la que se obutivo para el extracto empleado en esta tesis. Por ejemplo, algunos autores identificaron la miricetina y el ácido sinápico como dos de los componentes principales de los extractos de pétalos y propusieron el ácido gálico elágico como componente minoritario [68,144]. Sin embargo, en las condiciones estudiadas, no se identificaron la miricetina ni el ácido gálico. Esta discrepancia podría atribuirse al disolvente utilizado en

el procedimiento de síntesis del extracto. Por el contrario, la mayoría de los estudios concluyeron que la lacritirina es el componente predominante en los pétalos de *Tagetes erecta* [9], y éste es también el principal constituyente en el extracto del presente estudio (Tabla 6). Por lo tanto, las propiedades biomédicas notificadas de esta flor podrían atribuirse principalmente a este polifenol.

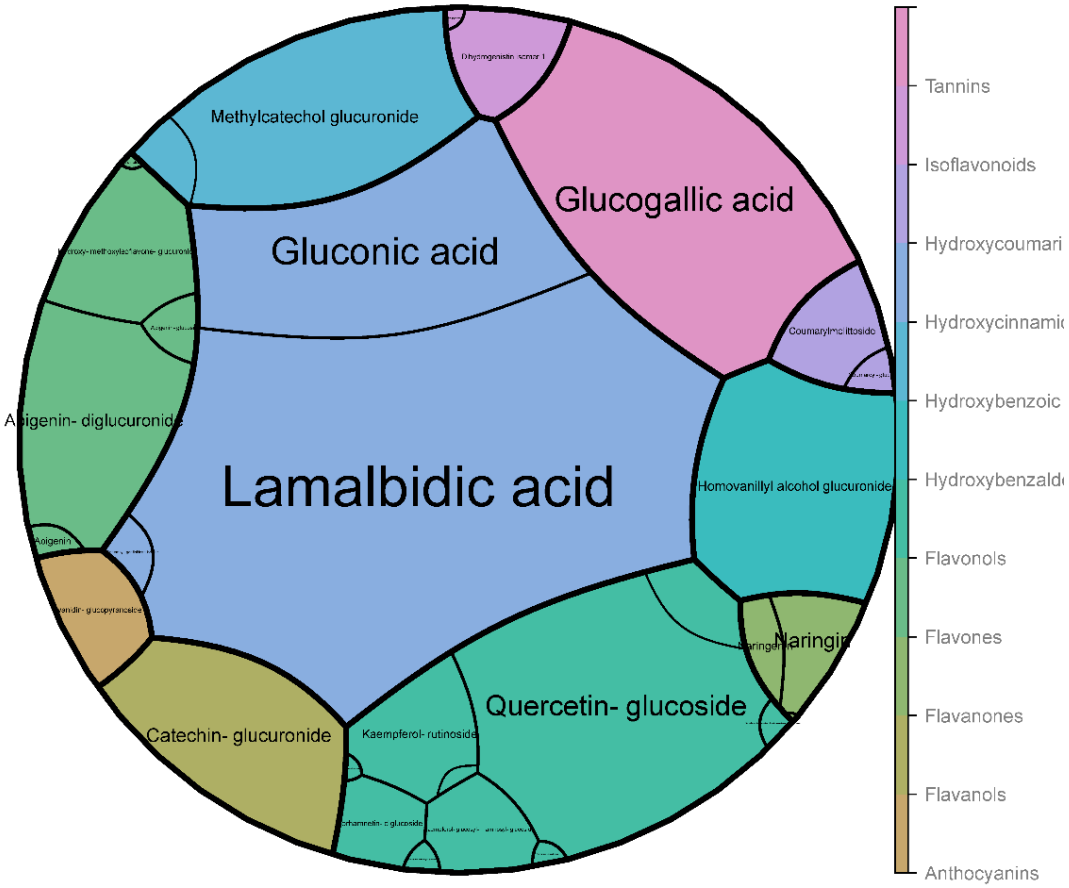


Figura 9: Composición esquemática de los metabolitos encontrados en el extracto de *Antirrhinum majus.*

La Figura 9 representa la distribución de componentes individuales y subclases reportadas para el extracto de *Antirrhinum majus*, en este caso y al contrato que en las otras dos

espcies de flores se han reportado hasta 10 subclases diferentes de metabolitos, que incluyen: antocianinas, flavanoles, flavonones, flavones, flavonoles, hidroxibenzaldehidos, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinamicos y isoflavonoides y taninos. Los principales compuestos corresponden a ácidos hidroxibenzóicos como el ácido glucónico, ácido lamabidico y taninos como el ácido glucogalico. Esta presente tesis doctoral reporta evidencias acerca de la composición química de pétalos de *Antirrhinum majus*, que no ha sido previamente estudiada. Sin embargo, la composición cuantitativa de este extracto es inferior a la de los otros dos estudiados, lo que puede condicionar su posible actividad biológica.

4.4 Evaluación de la capacidad antitumoral *in-vitro*

A continuación, se procedió a la evaluación de la capacidad antitumoral de los extractos de flores empleando cultivos celulares de cáncer de ovario (línea celular A2780). Para la realización de estos en primer lugar se evaluó la capacidad de metabolización del reactivo MTT. Este método se basa en la formación de formazán a partir del reactivo MTT por las mitocondrias celulares y es ampliamente utilizado en la evaluación de potenciales agentes terapéuticos [145]. Para tal fin, se eligió el tiempo de exposición de 48h ya que es el más empleado en los test antitumorales para productos naturales y las células fueron tratadas con concentraciones crecientes del extracto.

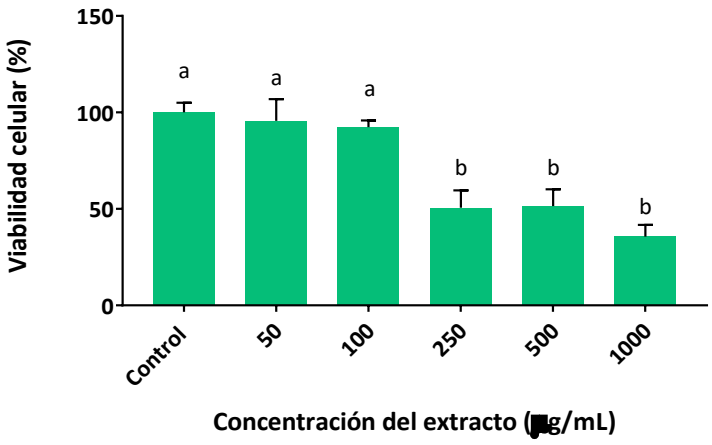
En este caso, se apreció un efecto dosis-respuesta para los extractos de *Rosa x hybrida* y *Tagetes erecta*, mientras que para el extracto de *Antirrhinum Majus* no se produjo este efecto. Es decir, al aumentar la dosis de los extractos de *Tagetes erecta* (Figura 10B) y *Rosa x hybrida* (Figura 10A) se redujo la capacidad para metabolizar MTT en las células A2780, por lo que la viabilidad celular de las células tumorales de ovario decreció; sin embargo, a pesar de aumentar la dosis del extracto de *Antirrhinum Majus* (Figura 11 C) este efecto no se produjo. Por tanto, en las condiciones evaluadas, se deduce que los extractos de *Rosa x hybrida* y *Tagetes erecta* mostraron capacidad potencial antitumoral, mientras que los de *Antirrhinum Majus* no.

Cabe destacar que para el extracto de *Rosa x hybrida* el descenso de la viabilidad celular comenzó en la dosis de 200 µg/mL y fue especialmente acusada a partir de las dosis más altas (a partir de 500 µg/mL se reportó un descenso de más del 80% (Figura 10A). Sin embargo, en el extracto de *Tagetes erecta* el descenso es más gradual (Figura 10B). A continuación, se calculó el valor de IC_{50} para ambos extractos, siendo de 289.5 µg/mL para el extracto de *Rosa x hybrida* y de 144.5 µg/mL para el extracto de *Tagetes erecta*.

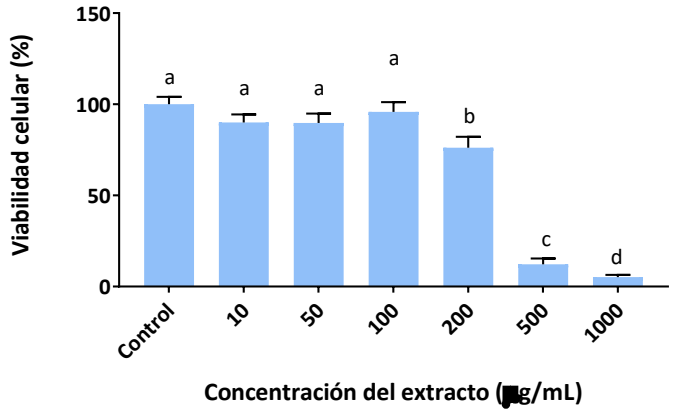
De entre estos extractos, el de *Tagetes erecta* es el más estudiado como potencial antitumoral. Así, la actividad antitumoral de extractos obtenidos a partir de esta flor *Tagetes erecta* han sido previamente elucidada contra otros tipos de tumores como las células de cáncer de mama tiple-negativo [146], células de hepatocarcinoma [147], células de cáncer de pulmón [148], modelos *in-vitro* de cáncer tumorales colorrectal, cáncer gástrico [149] y cáncer de próstata [150]. Sin embargo, los resultados incluidos en la presente tesis doctoral muestan por primera vez la capacidad antitumoral de un extracto de *Tagetes erecta* en células de cáncer de ovario, un tipo de tumor con cada vez más incidencia en los países desarrollados. En el caso de los extractos obtenidos con *Rosa x hybrida*, las evidencias de su actividad antitumoral en literatura son más limitadas. No obstante, algunas especies han mostrado actividad antitumoral; así, los extractos obtenidos a partir de *Rosa damascena* son capaces de reducir el crecimiento de líneas tumorales hepáticas y de cérvix [151].

El valor de IC_{50} obtenido para estos extractos está en concordancia con otros estudios descritos (normalmente el IC_{50} oscila entre 150 y 400 µg/mL, dependiendo de la línea celular de cáncer y la parte de la planta utilizada).

A



B



C

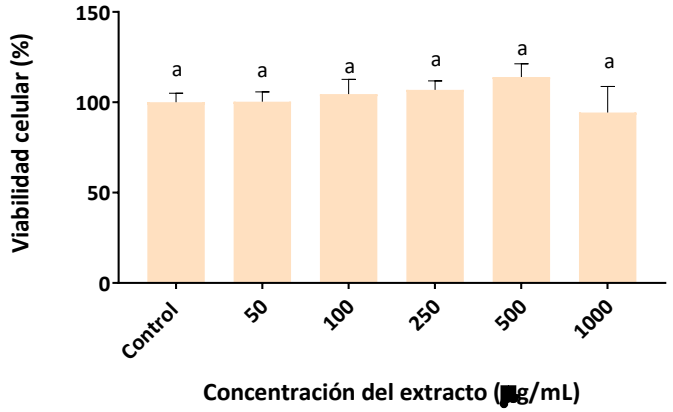


Figura 10: Viabilidad celular de la línea A2780 tras el tratamiento de los extractos de flores durante 48h. A) *Rosa x hybrida*; B) *Tagetes erecta*; C) *Antirrhinum Majus*. Letras diferentes refieren a diferencias significativas entre grupos. $p<0.05$. One-way AN

El reseñable que el extracto de *Tagetes erecta* mostró en las condiciones estudiadas un valor de IC_{50} de los más bajos contra células tumorales de ovario, siendo uno de los más bajos relativos a flores comestibles. Por ejemplo, este extracto tuvo un IC_{50} ocho veces menor que el de *Tulbaghia violacea* [37].

Seguidamente se estudiaron los mecanismos de muerte implicados en las células tumorales. Para llevar a cabo esta tarea en primer lugar se midió la inducción de apoptosis/necrosis mediante citometría de flujo y se seleccionó el valor de IC_{50} para los

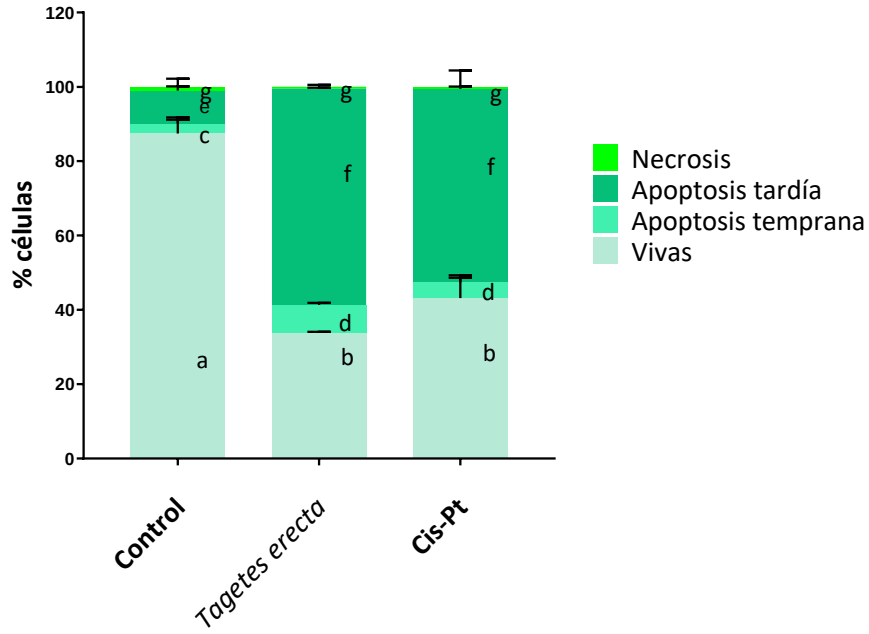
dos extractos que habían mostrado actividad antitumoral dosis-respuesta en el ensayo MTT (*Rosa x hybrida* y *Tagetes erecta*).

La Figura 10 muestra el resultado obtenido tras la incubación de las células A270 durante 48h con la dosis IC_{50} del extracto de *Tagetes erecta* (Figura 10B) y *Roxa x hybrida* (Figura. 10A). El tratamiento con los pétalos de *Tagetes erecta* indujo en las células ováricas la apoptosis en aproximadamente el 50% de ellas (Figura 10B), en este caso la distribución mayoritaria fue en células en el estadio de apoptosis tardía y siguió una distribución muy similar a la obtenida para el control positivo (cis-Platino). Esto sugiere que el efecto antitumoral atribuido al extracto de *Tagetes erecta* se debe a la inducción de apoptosis. Sin embargo, cuando las células de ovario fueron tratadas con *Rosa x hybrida* aunque se aprecia cierta inducción de apoptosis (principalmente mediante apoptosis temprana), el % de células en este estadio celular es significativamente inferior al de *Tagetes erecta*, lo que sugiere que en este caso hay otros mecanismos de muerte implicados diferentes a la inducción de apoptosis.

La activación de la apoptosis emerge como un componente crucial en la eficacia de agentes antitumorales y representa un aspecto de gran relevancia en la investigación oncológica [152]. La apoptosis, o muerte celular programada, desempeña un papel esencial en la regulación del crecimiento celular y la eliminación de células dañadas o potencialmente malignas [153]. En el contexto de agentes antitumorales, la capacidad para inducir la apoptosis se considera un marcador significativo de su efectividad contra células cancerosas [152]. La activación controlada de este proceso permite la eliminación selectiva de células tumorales, contribuyendo así a la reducción del tamaño del tumor y al control de la progresión del cáncer. Así, la modulación de los mecanismos que gobiernan la apoptosis se ha convertido en un enfoque central para el desarrollo de

terapias antitumorales más efectivas y selectivas, destacando la importancia de este fenómeno biológico en la lucha contra el cáncer [154].

A


120
100
80
60
40
20
0
% células
g
g
c
a
g
f
d
b
g
f
d
b
Necrosis
Apoptosis tardía
Apoptosis temprana
Vivas
Control
Tagetes erecta
Cis-Pt

B

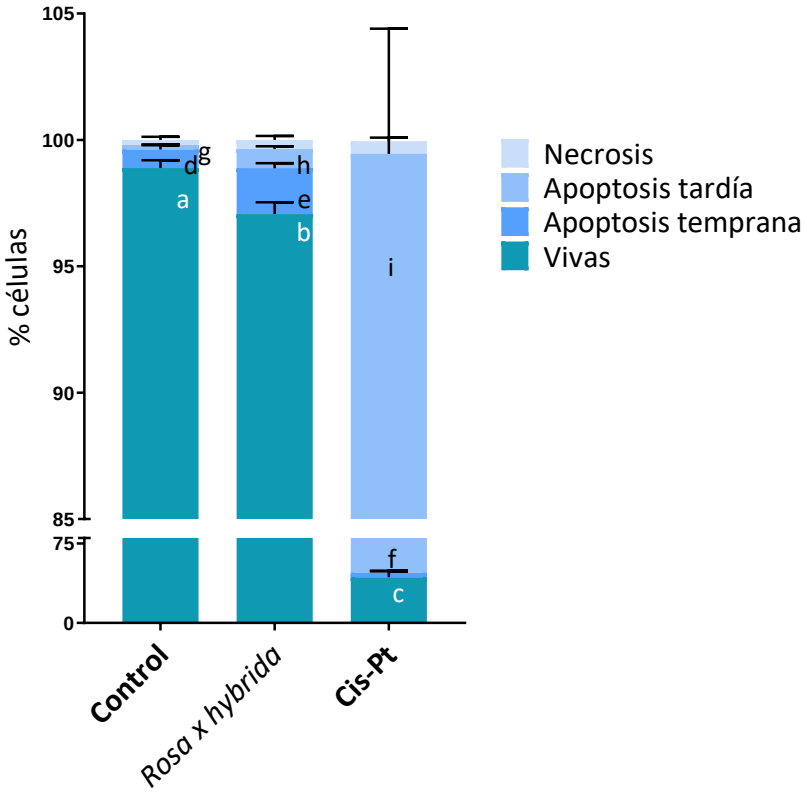


Figura 11: Distribución de células A2780 tras el tratamiento de IC_{50} de los extractos de pétalos de flores según los resultados obtenidos mediante citometría de flujo para el test de apoptosis/necrosis mediante Anexina V/IP. A) Extracto de *Tagetes erecta*

La capacidad de los extractos de *Tagetes erecta* para inducir la apoptosis ha sido reportada parcialmente por otros autores. Así, Gansukh et al. evidenciaron que la luteína extraída de estas flores fue capaz de activar la apoptosis en un modelo de carcinoma cervical humano, aumentando la actividad de la caspasa-3, reduciendo la expresión de la proteína Bcl-2 (antiapoptótica) y aumentando la expresión proteica de BAX (proapoptótica [73]). En el presente caso, la luteína no es uno de los metabolitos principales del extracto obtenido de *Tagetes erecta*. No obstante, uno de los competentes principales, el ácido elágico ha mostrado un rol fundamental en la Ciclina 6 [155], una enzima que desempeña un papel clave en la progresión del cáncer y que podría utilizarse como objetivo farmacológico en

terapias anticancerígenas [156]. Por tanto, se puede asociar el contenido en este metabolito con la actividad apoptótica encontrada en este extracto.

Sin embargo, para *Roxa x hybrida* no hay evidencias bibliográficas que se relacionen con la inducción de apoptosis y la diferencia en el perfil de composición manifiesta que es este hecho el que condiciona que la actividad antitumoral sea diferente entre cada uno de los extractos.

Adicionalmente, se midió la capacidad del extracto para producir la generación de ROS en las células tumorales. En este caso, el tratamiento de las células A2780 con los extractos de *Rosa x hybrida* produjo un aumento estadísticamente significativo en la generación de ROS mientras que para el tratamiento con *Tagetes erecta* no produjo cambios significativos con respecto al grupo control. Además, el tratamiento con *Rosa x hybrida* produjo un aumento de producción de ROS superior al grupo del control positivo, por lo que fue extremadamente elevado (Figura 11).

La inducción ROS ha sido reconocida como un mecanismo crucial en la regulación de procesos celulares, incluida la apoptosis y la senescencia. Numerosos estudios han destacado el papel central de ROS en la respuesta celular frente a diversas condiciones, incluyendo el cáncer. En este contexto, se ha observado que extractos naturales provenientes de plantas y otros organismos contienen compuestos bioactivos capaces de modular la generación de ROS y, por ende, ejercer efectos antitumorales. Los ejemplos que relacionan la producción de ROS con el efecto antitumoral en productos de origen natural se dan en resveratrol y curcumina. El resveratrol, un polifenol presente en el vino tinto, ha sido objeto de investigaciones que sugieren su capacidad para inducir la generación de ROS en células cancerosas, desencadenando apoptosis y deteniendo la proliferación celular. Además, estudios sobre curcumina, un componente activo de la cúrcuma, han revelado su capacidad para incrementar la producción de ROS, lo que

contribuye a su efecto antitumoral mediante la inhibición de la angiogénesis y la inducción de apoptosis en células cancerosas. En el caso de flores comestibles la inducción de ROS como responsable de la actividad antitumoral ya ha sido previamente descrita. Así, el extracto metanólico de *Tulbhagia violacea* ha evidenciado la producción elevada de ROS y se ha correlacionado con su capacidad antitumoral en líneas de cáncer de ovario [37].

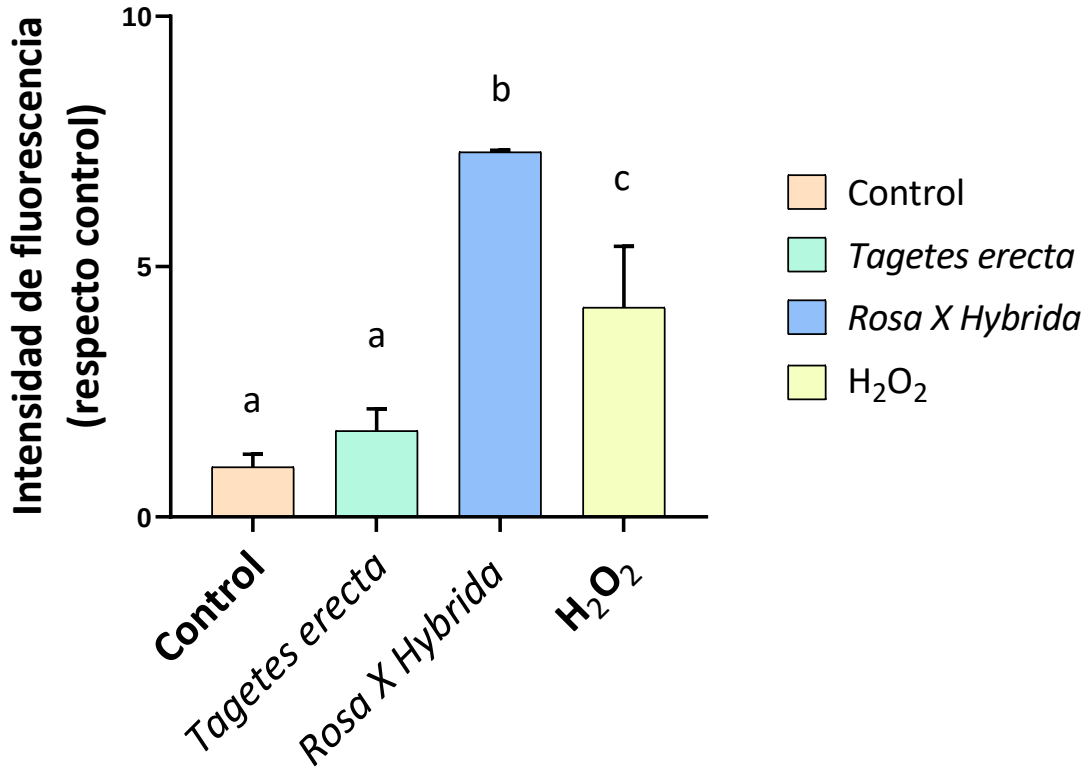


Figura 12: Producción de ROS en células A2780 tras el tratamiento de IC_{50} de los extractos de pétalos de *Tagetes erecta* y *Rosa x hybrida*. Letras diferentes son cambios significativos entre grupos. One-way ANOVA. P<0,05. Control H_2O_2

La relación entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la inducción de apoptosis ha sido objeto de intensa investigación en el campo de la biología celular y molecular. En condiciones normales, las células mantienen un equilibrio redox, regulando

la generación y eliminación de ROS para prevenir daños celulares. Sin embargo, la inclusión de algunos agentes terapéuticos la homeostasis redox puede perturbarse, llevando a un aumento en la producción de ROS y a continuación la inducción de apoptosis. En primer lugar, altos niveles de ROS pueden dañar las estructuras celulares, incluyendo las membranas y el ADN, lo que activa las vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis. Además, las ROS pueden modular directamente las enzimas implicadas en la regulación de la apoptosis, como las caspasas, desencadenando así el inicio de la muerte celular programada.

Extractos naturales ricos en compuestos bioactivos, como los mencionados anteriormente, han demostrado su capacidad para inducir la producción de ROS en células cancerosas. Estos compuestos pueden actuar como agentes prooxidantes, desencadenando la acumulación de ROS y activando vías de señalización que finalmente conducen a la apoptosis de las células tumorales. Esta estrategia se ha considerado prometedora en el desarrollo de terapias anticancerígenas al aprovechar el desequilibrio redox para inducir la muerte selectiva de las células cancerosas. En este caso, los resultados obtenidos concuerdan parcialmente con la literatura científica. Para el caso de *Tagetes erecta*, el extracto aumentó el proceso apoptótico, por lo que se esperaba que también aumentase la generación de ROS; sin embargo, esto no ocurre. Previamente se ha descrito que la relación entre ROS y apoptosis es un proceso secuencial, en el caso del tratamiento con los extractos de *Tagetes erecta* la proporción de apoptosis generada es la relativa a la apoptosis tardía por lo que sugiere que a las 48 de tratamiento la generación de ROS ya acabó y por ello no son detectadas. En este caso, los resultados obteniendo en estas condiciones sugieren que a tratamientos más cortos sí deberían encontrarse la generación de ROS, en el caso de Gansukh et al, estos autores describen el aumento de ROS con el tratamiento de luteína derivada de *Tagetes erecta* a tiempos más cortos de

incubación [73]. Al contrario, el caso de *Rosa x hybrida* la generación de ROS no concuerda con la generación de apoptosis, ya que, aunque el efecto de este extracto se debiese a la inducción de apoptosis en tiempo más tardía se esperaría una ratio de células en apoptosis mayor al obtenido. En este caso se aprecia que otro mecanismo de muerte celular subyace con el extracto de *Rosa x hybrida*. Para aclarar este este caso se estudió la inducción de autofagia. La autofagia, un proceso celular altamente conservado que desempeña un rol dual en el contexto del cáncer [157]. En este caso, la autofagia actúa como un mecanismo de supervivencia y, paradójicamente, como un regulador clave de la muerte celular. Así, en condiciones de estrés, como en el caso de hipoxia o la privación de nutrientes, la autofagia se activa para degradar componentes celulares dañados o innecesarios, proporcionando así una fuente alternativa de nutrientes y energía para la célula [158]. Este aspecto pro-supervivencia de la autofagia puede favorecer el mantenimiento y la proliferación de células tumorales. Sin embargo, la autofagia también puede desencadenar la muerte celular programada, especialmente cuando se produce de manera excesiva o desregulada [158]. En este contexto, la autofagia actúa como un mecanismo de control de calidad celular, eliminando células dañadas de manera selectiva y previniendo la formación de tumores [159]. La interferencia con la maquinaria de autofagia ha sido identificada como un factor contribuyente en la tumorogénesis y la progresión del cáncer.

En las condiciones estudiadas, los resultados fueron similares a los obtenidos en el experimento de ROS. En este caso, el tratamiento con TE no produjo cambios significativos en la inducción de autofagia, mientras que el tratamiento con RH incrementó la formación del autofagosoma y la inducción de este proceso biológico (Figura 13).

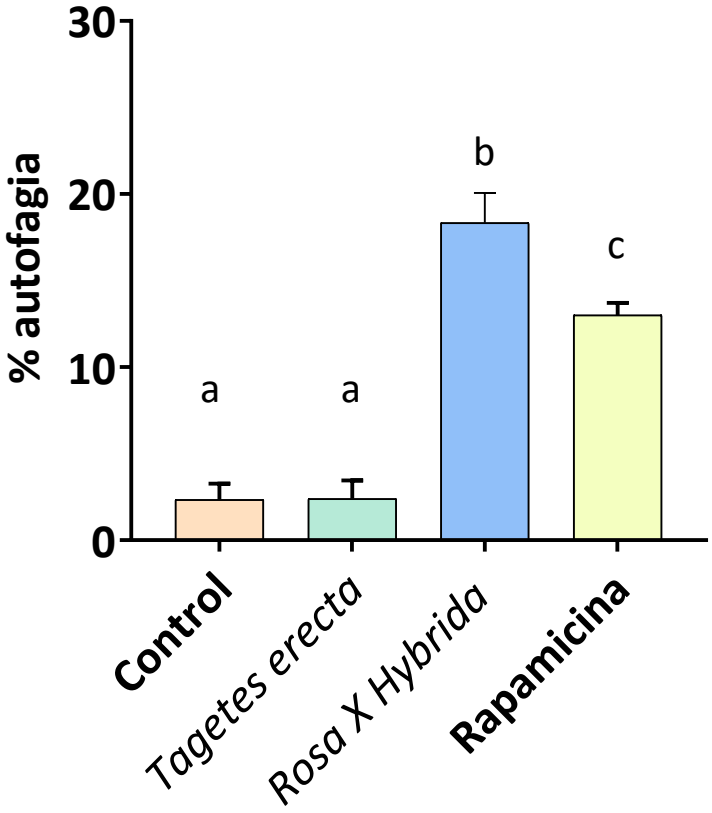


Figura 13: Inducción de autofagia en las células A2780 tras el tratamiento con los extractos de *Rosa x hybrida* y *Tagetes erecta* durante 72h. Letras diferentes significan diferencias entre grupos. p<0,05. One-way ANOVA.

Este hecho puede deberse al mayor contenido en quercetina del extracto de RH. Así, numerosos estudios han sugerido que la quercetina puede potenciar la autofagia al modular diferentes vías celulares. Se ha observado que esta sustancia influye en la activación de proteínas clave, como la AMPK (proteína quinasa activada por AMP [160]) y la mTOR (diana de rapamicina en mamíferos [161]), ambas vinculadas a la regulación de la autofagia. Al activar estos mecanismos, la quercetina favorece la inducción del proceso autofágico y la actividad antirumoral del extracto de *Rosa x hybrida*. Finalmente, para confirmar que el proceso autofágico era el responsable del mecanismo de acción del extracto de *Rosa x hybrida*, se realizó una visualización de la formación del autofagosoma

tras el tratamiento con el extracto de *Rosa x hybrida* mediante microscopía de fluorescencia (Figura 14).

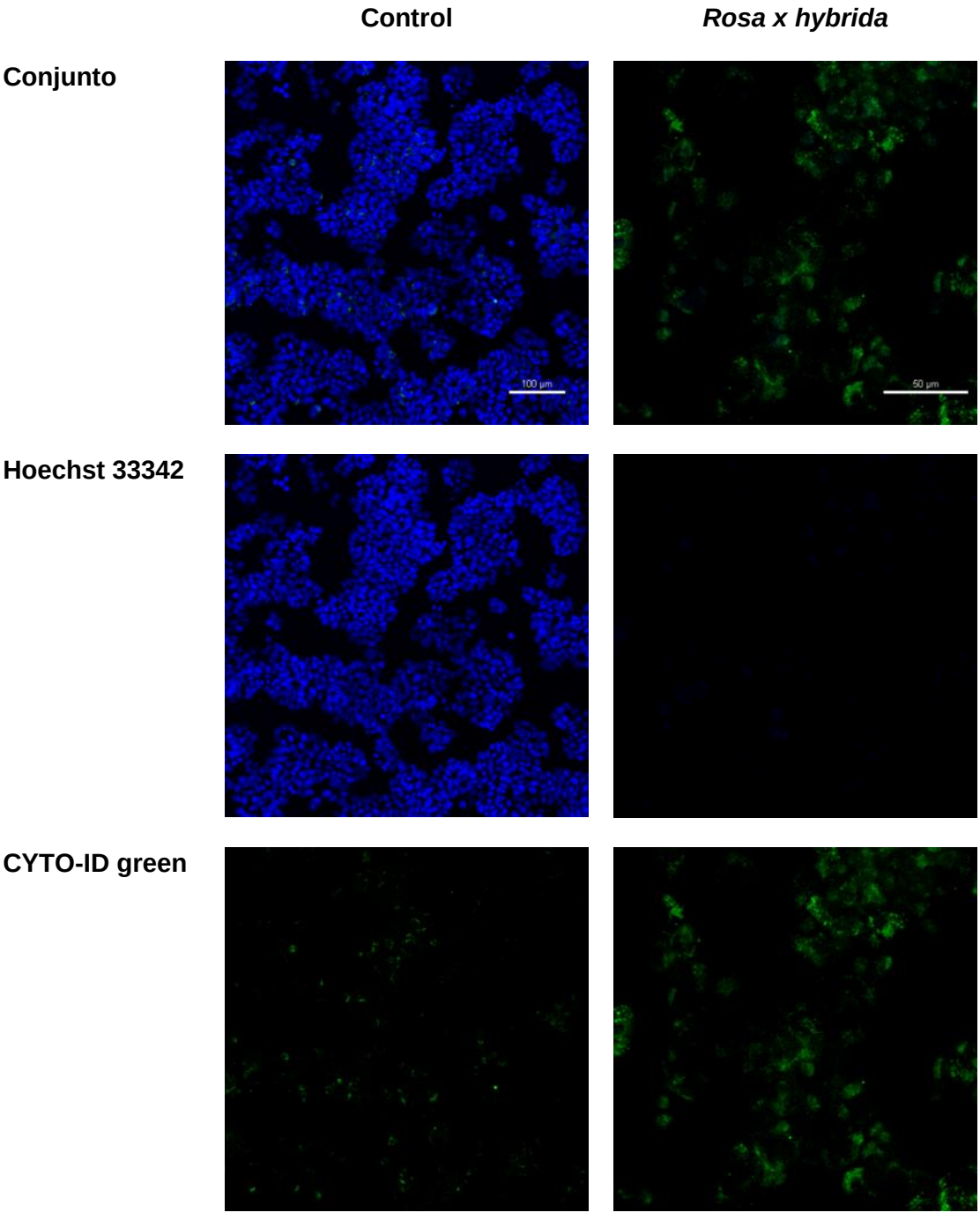


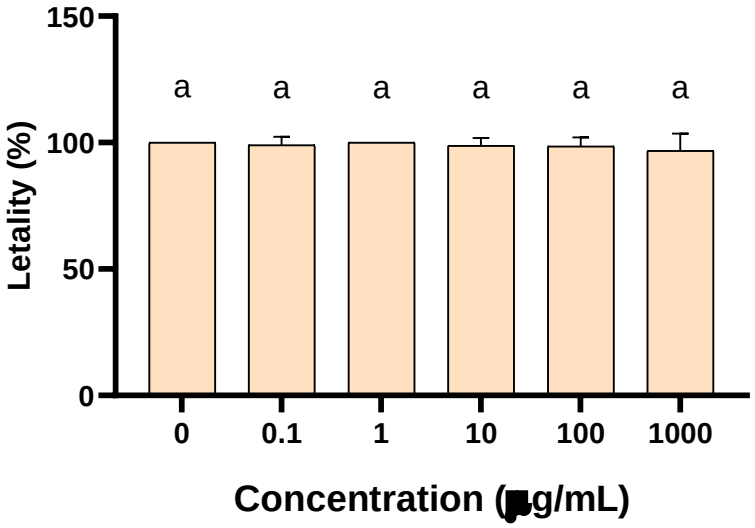
Figura 14: Inducción de autofagia por el extracto de *Rosa x hybrida* en células A2780 mediante microscopía de fluorescencia

4.5. Ensayos en *Caenorhabditis elegans*

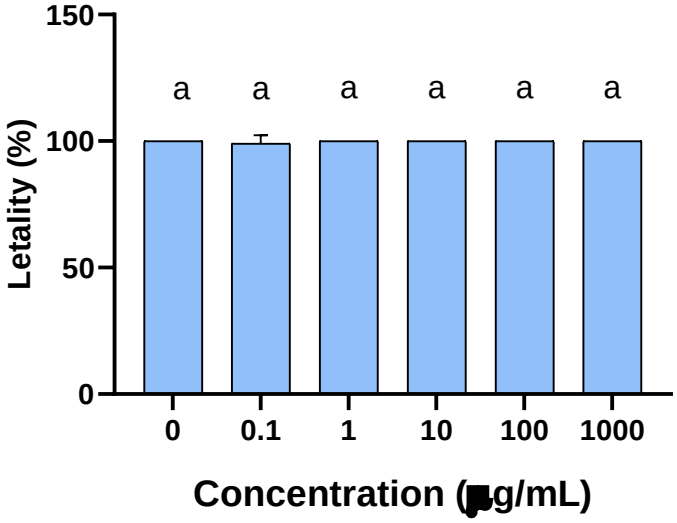
Finalmente, se empleó el modelo de *Caenorhabditis elegans* con una doble finalidad; por un lado, para testar la toxicidad de los extractos y por otra parte para estimar la capacidad terapéutica de estos extractos de flores en unas cepas de gusano que son capaces de expresar péptido β amiloide y proteína tau, ambas proteínas tienen un rol fundamental en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. [162] *C. elegans* es un nematodo de aproximadamente 1 mm de longitud y su uso en investigación científica ha aumentado en los últimos años debido a varias ventajas que ofrece. En primer lugar, debido a su pequeño tamaño, los nematodos *C. elegans* son fáciles de manejar en el laboratorio. Estos nematodos tienen un ciclo de vida completo muy corto, de aproximadamente 3 días, lo que permite observar cambios asociados al envejecimiento [163].

En primer lugar, para el fin de evaluar la toxicidad de los extractos, una cepa wild-type de gusano (N2) fue expuesta a concentraciones crecientes de estos (desde 0 a 1000 µg/mL). En todos los casos estudiados, este tratamiento no disminuyó la viabilidad de los gusanos, siendo las pérdidas de viabilidad cercanas al 0% para todos los extractos y todas las dosis (Figura 14). De las especies de flores estudiadas únicamente la especie *Tagetes erecta* ha sido evaluada previamente en un modelo de gusanos; los resultados obtenidos en nuestro caso concuerdan con los reportados por otros autores para esta flor. [144]. Además, otras especies de flores comestibles como *Tulbaghia violacea* o *Viola cornuta* han demostrado la ausencia de toxicidad en este ensayo de gusanos[25,37]. Por tanto, los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral evidencian que la mayoría de especies de flores comestibles no presentan toxicidad aguda, lo que permitirá el desarrollo de nuevas aplicaciones en la fabricación de alimentos funcionales y otros productos.

A


150
100
50
0
Letality (%)
a a a a a a
0 0.1 1 10 100 1000
Concentration (µg/mL)

B


150
100
50
0
Letality (%)
a a a a a a
0 0.1 1 10 100 1000
Concentration (µg/mL)

C

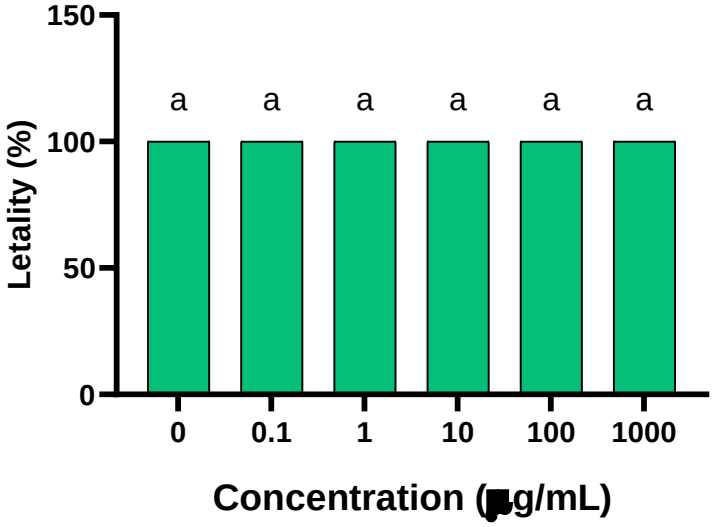

150
100
50
0
Letality (%)
a a a a a a
0 0.1 1 10 100 1000
Concentration (µg/mL)

Figura 15: Letalidad en gusanos N2 tras la incubación con dosis creciente de los extractos evaluados. A) *Antirrhinum majus*; B) *Tagetes erecta*; C) *Rosa x hybrida*. Letras diferentes significan diferencias estadísticas entre grupos. *<0,05.

A continuación, para completar los estudios realizados de toxicidad en gusanos, se procedió a evaluar la viabilidad de larvas expuestas a la dosis inmediatamente inferior a la dosis máxima que no reportó toxicidad (en este caso 100 µg/mL, Figura 15). En este caso, al igual que en el anterior, no hubo diferencias en la viabilidad de las larvas tratadas con el extracto de las larvas control (no tratadas). Esto corrobora la ausencia de toxicidad de estos extractos en un modelo experimental sano como es la cepa de gusano N2. Previamente, otros autores también proponen la ausencia de toxicidad en estos ensayos [25,37,123].

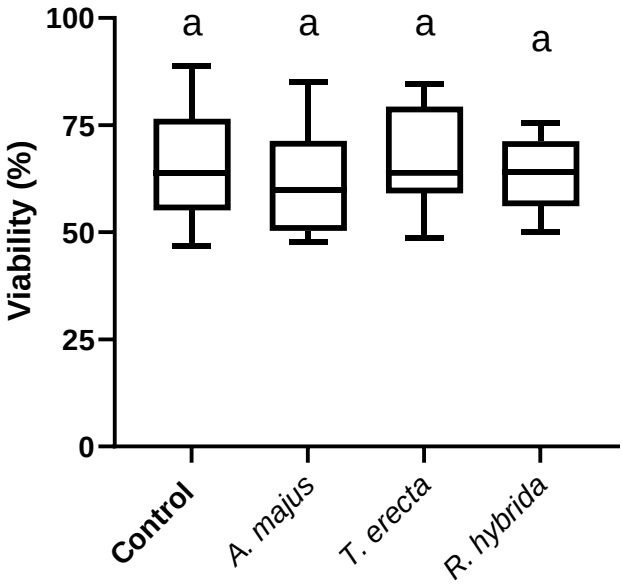


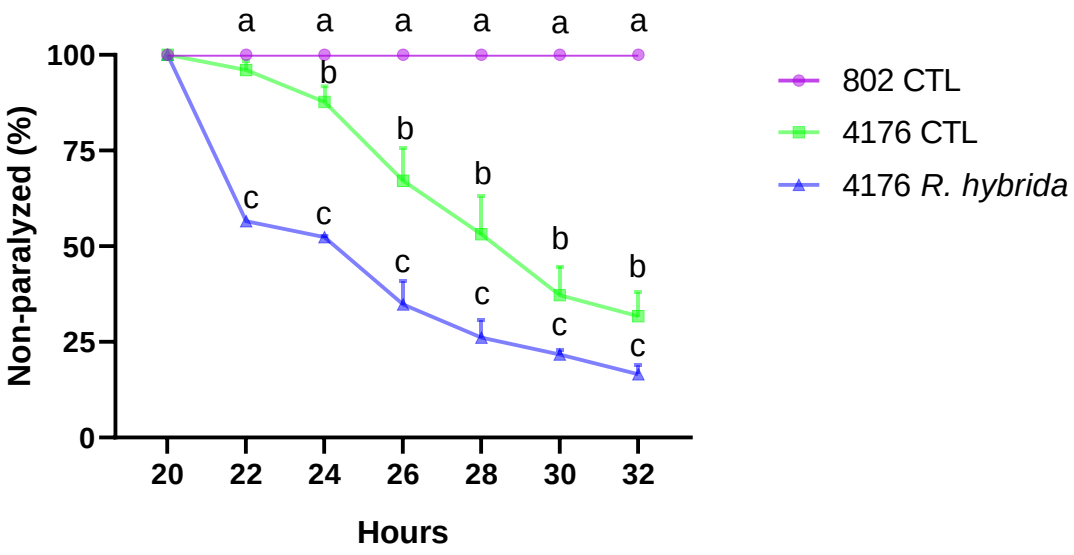
Figura 16:. Viabilidad de *C. elegans* tratados con 100 µg/mL con los extractos de flores. Letras diferentes significan diferencias entre grupos. p<0,05.

Por último, se evaluó la aplicación de estos extractos como posibles agentes terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer, para ello se midió la capacidad de los extractos para reducir la parálisis en una cepa de gusanos que expresan péptido β amiloide (CL4176).

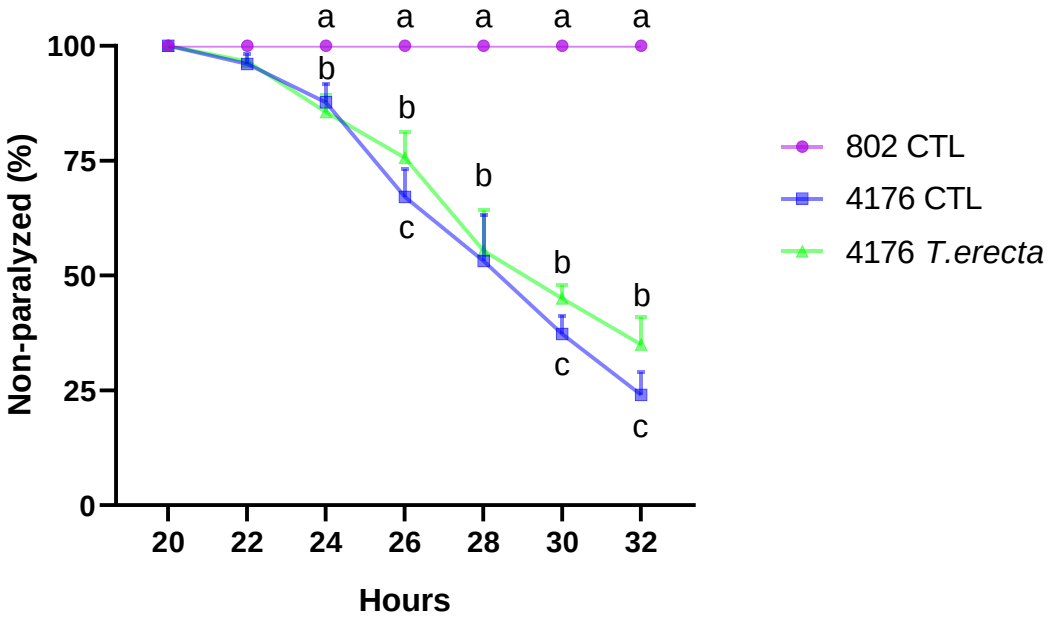
En el caso de *Roxa x hybrida*, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral ponen de manifiesto que el contenido de antocianinas de este extracto mejora la parálisis en esta cepa de gusanos. La enfermedad de Alzhéimer se caracteriza por la acumulación de placas de péptido β amiloide en la región cerebral. Recientemente, se ha demostrado que el consumo de alimentos ricos en antocianinas puede mejorar la memoria y el aprendizaje, así como una reducción en la degeneración neuronal [164,165]. Esto se debe a que estas sustancias poseen propiedades antiagregantes que interfieren en la formación de las placas de péptido β amiloide en un modelo *in-vitro* de células neuronales [166]. Además, se ha puesto de manifiesto que las antioxidantes y antiinflamatorias de las antocianinas pueden proteger a las células nerviosas frente al estrés oxidativo y la inflamación, factores implicados en el desarrollo y progresión de la enfermedad de Alzhéimer Por tanto, los resultados obtenidos pueden deberá la sumatoria de la capacidad de las antocianinas del extracto para reducir la acumulación de péptido β amiloide en el extracto y la alta capacidad antioxidante del extracto en los parámetros de FRAP y DPPH. Para *Tagetes erecta* también se evidenció la capacidad para reducir la parálisis en el modelo de péptido β amiloide; esto ya ha sido reportado por otros autores[144] , y los resultados obtenidos son idénticos, reflejando que la capacidad antioxidante del extracto de *Tagetes erecta* puede reducir la acumulación de péptido β amiloide y mejorar el parámetro de parálisis en los gusanos. La alta capacidad antioxidante de los extractos de *Tagetes erect*a ha sido demostrada previamente. Por ejemplo, el extracto de *Tagetes erecta* puede proteger a *C.elegans* del estrés oxidativo causado por la juglona (un potente agente pro-oxidante [144]). Incluso, patuletin aislado a partir de flores de *Tagetes erecta* pueden corregir el daño provocado en marcadores de estrés oxidativo por microcystic-LR en este modelo de nematodo [167]. Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral evidencian una gran cantidad de este metabolito en el extracto de *Tagetes erecta*, por lo que se puede asociar

que la mejoría en la parálisis de los nematodos se debe a esta capacidad. Así, para aportar más evidencias de la capacidad del extracto de *Tagetes erecta*, en la presente tesis doctoral se estudió el efecto de este extracto en una cepa de gusano que presenta una alteración en la fosforilación y agregación de la proteína tau (la cepa BR5706). La proteína tau desempeña un papel crucial en la enfermedad de Alzheimer y está estrechamente asociada con las características neuropatológicas de la enfermedad [168]. En condiciones normales, la proteína tau estabiliza y proporciona soporte a los microtúbulos en las células nerviosas. Sin embargo, en la enfermedad de Alzheimer, la proteína tau sufre modificaciones y se acumula en forma de ovillos neurofibrilares dentro de las células cerebrales [168]. Estos ovillos interrumpen la función normal de las células y, eventualmente, contribuyen a su muerte. Además, estos ovillos pueden interferir en la comunicación entre las células cerebrales, dando lugar a la disfunción cognitiva asociada con la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, comprender los roles de la proteína tau y su participación en la enfermedad de Alzheimer permitirá desarrollar tratamientos específicos que mitiguen sus efectos perjudiciales [169].

A


Non-paralyzed (%)
100
75
50
25
0
20
22
24
26
28
30
32
Hours
a a a a a a
b b b b b
c c c c c
802 CTL
4176 CTL
4176 R. hybrida

B


Non-paralyzed (%)
100
75
50
25
0
20
22
24
26
28
30
32
Hours
a a a a a
b b b b b
c c c
802 CTL
4176 CTL
4176 T.erecta

C

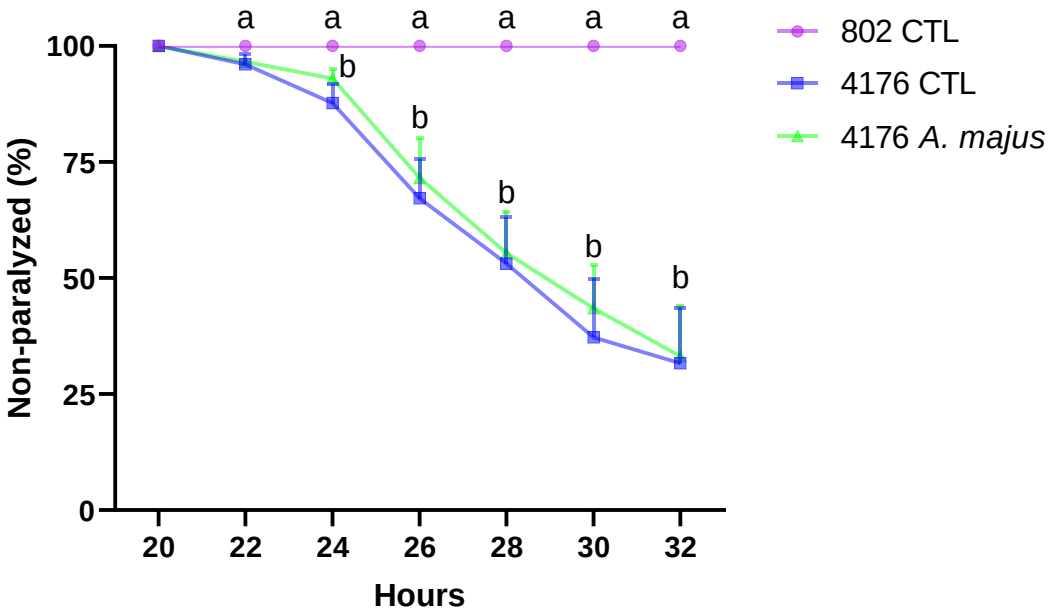
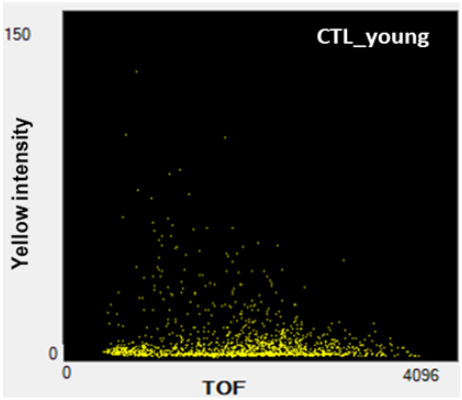
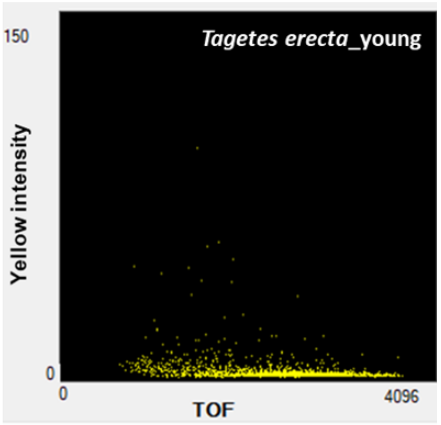


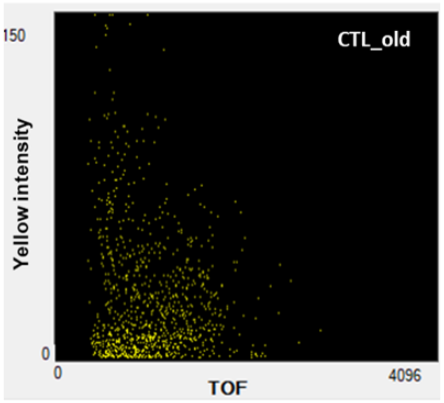
Figura 17: Parálisis tras la exposición a 100 µg/mL de extracto en gusanos CL4176. A) *Rosa x hybrida*; B) *Tagetes erecta*; C) *Anthrrinum majus*. Letras diferentes indican diferencias entre grupos. p<0,05

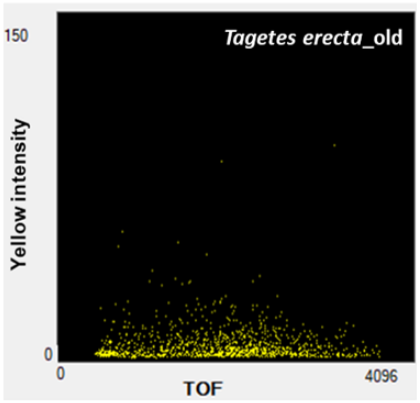
El estrés oxidativo y la acumulación anormal de la proteína tau son dos fenómenos interrelacionados que desempeñan un papel crucial en el desarrollo y progresión de la enfermedad de Alzheimer. El estrés oxidativo surge cuando hay un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad del sistema antioxidante del organismo para neutralizarlos. En el contexto de la enfermedad de Alzheimer, este desequilibrio puede contribuir a la alteración de la estructura y función de la proteína tau. La proteína tau, que normalmente estabiliza los microtúbulos en las células nerviosas, experimenta modificaciones que la llevan a acumularse en forma de ovillos neurofibrilares. Esta acumulación, exacerbada por el estrés oxidativo, conduce a disfunciones celulares y un empeoramiento en la patogénesis del Alzheimer. Por tanto, para evaluar el efecto del extracto de *Tagetes erecta* la cepa de gusanos BR5706 fue tratada ton 100 µg/mL del extracto y la medición de ROS se realizó mediante fluorescencia. Esta medición fue realizada en dos condiciones fisiológicas (gusanos

jóvenes, gusanos de 5 días y gusanos envejecidos, que fueron representados por gusanos de 12 días). En ambos casos, el tratamiento con el extracto previno la generación de ROS, indicando el efecto protector de este extracto y corroborando los resultados previamente obtenidos por otros autores [167].


CTL_young
150
Yellow intensity
0
0
4096
TOF


Tagetes erecta_young
150
Yellow intensity
0
0
4096
TOF


CTL_old
150
Yellow intensity
0
0
4096
TOF


Tagetes erecta_old
150
Yellow intensity
0
0
4096
TOF

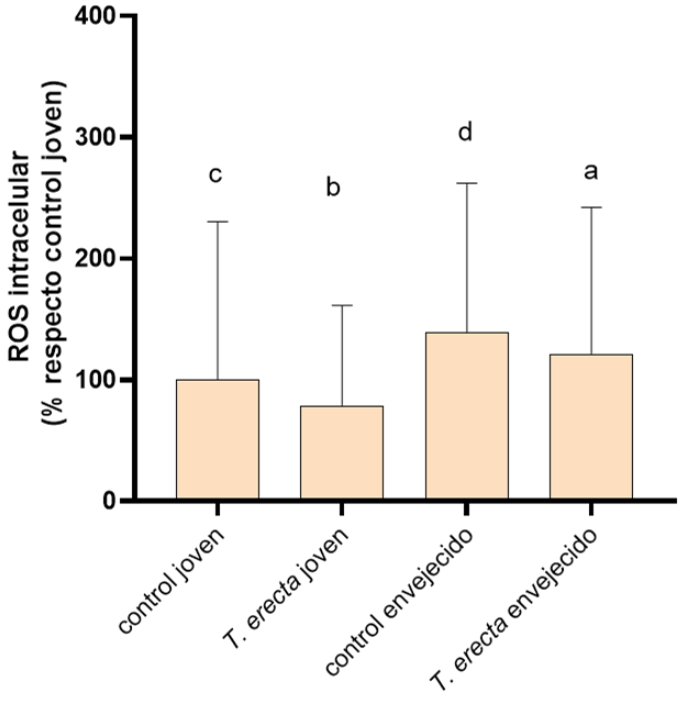
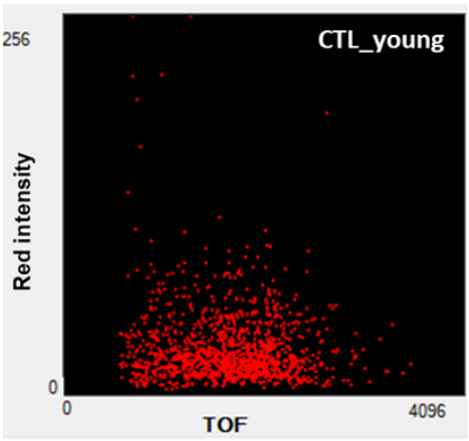
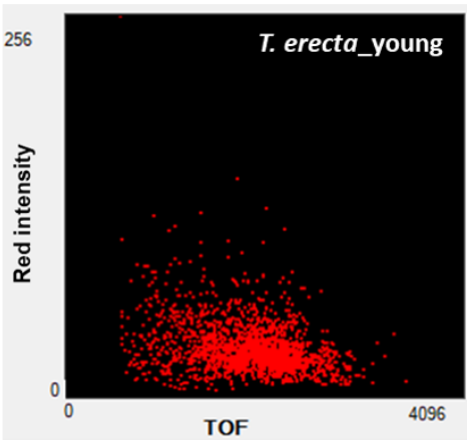

ROS intracelular
(% respecto control joven)
400
300
200
100
0
c
b
d
a
control joven
T. erecta joven
control envejecido
T. erecta envejecido

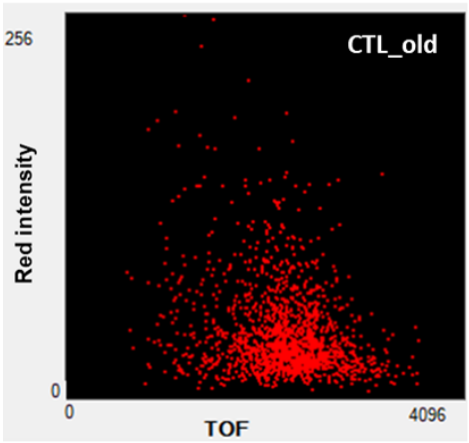
Figura 18: Contenido intracelular de ROS en gusanos jóvenes y envejecidos.

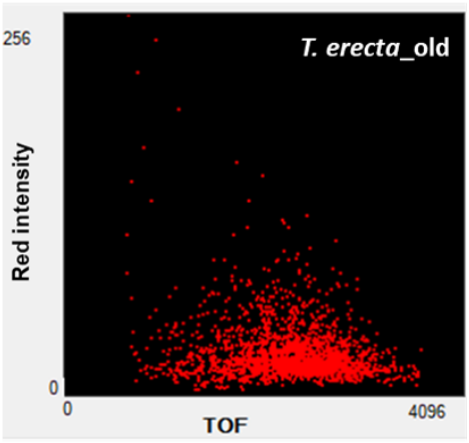
El contenido intracelular de ROS se midió mediante el ensayo de diacetato de 2′,7′-diclorofluoresceína. Los nematodos N2 sincronizados en estadio L3 se trataron con 100 µg/mL de extracto de *T. erecta* y se incubaron a 20 ºC hasta el punto de lectura del experimento (gusanos jóvenes: 5 días de edad; gusanos envejecidos 12 días de edad). Cuantificación de ROS mediante citometría de flujo. Letras diferentes significan diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

Además, se evaluó la producción de ROS a nivel mitocondrial; las mitocondrias son la principal fuente de estrés oxidativo durante el envejecimiento. Estos compartimentos celulares son responsables de la generación de energía, así como de la regulación del metabolismo celular y del estrés oxidativo [170]. En este caso, solo se observaron diferencias significativas en el tratamiento con el extracto de pétalos en los gusanos más envejecidos. Los gusanos mayores tratados liberaron menos ROS en las mitocondrias que los no tratados. Las mitocondrias son particularmente susceptibles a la producción de ROS debido a su proximidad a la generación de radicales libres [171]. Por lo tanto, la reducción de ROS puede mejorar la integridad mitocondrial y preservar la función celular. Estos resultados ponen de manifiesto que el tratamiento con *Tagetes erecta* mejora los parámetros relacionados con la enfermedad de Alzheimer tanto en modelos de nematodo que expresan péptido β amiloide como los que expresan proteína tau y que esto lo hacen a través de la mejoría del perfil antioxidante [128].


CTL_young
256
Red intensity
0
0
4096
TOF


T. erecta_young
256
Red intensity
0
0
4096
TOF


CTL_old
256
Red intensity
0
0
4096
TOF


T. erecta_old
256
Red intensity
0
0
4096
TOF

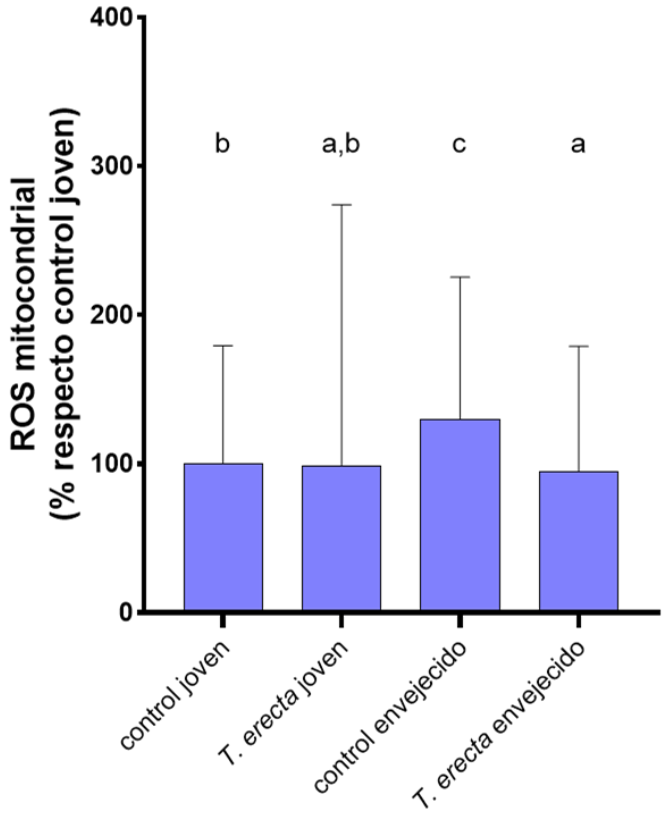

ROS mitocondrial
(% respecto control joven)
400
300
200
100
0
b
a,b
c
a
control joven
T. erecta joven
control envejecido
T. erecta envejecido

Figura 19: Contenido mitocondrial de ROS en gusanos jóvenes y envejecidos tratados con 100 µg/mL del extracto de *Tagetes erecta*. El contenido de ROS mitocondrial. Letras diferentes significan diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

Al igual que en los ensayos celulares, el extracto de *Anthrrinum majus*, no produjo mejorías significativas en el retraso de la aparición de la parálisis, esto se debe probablemente al reducido valor cuantitativo en polifenoles y otros metabolitos, comparado con las otras flores estudiadas.

5.- Conclusiones

1.. A nivel nutricional, las flores estudiadas son alimento con un aporte calórico bajo y un contenido de agua alto. El resto de macronutrientes evaluados son similares entre las tres flores a excepción de las grasas siendo más alto para los pétalos de *Tagetes erecta*.

2. El extracto etanólico obtenido a partir de los pétalos de *Tagetes erecta* tiene un contenido en polifenoles totales muy superior al resto de los extractos estudiados. Además, es el extracto cuya actividad antioxidante total es superior al resto medido mediante los tests in-vitro más comunes.

3. La composición cuantitativa/cualitativa es diferente en cada flor, destacando el contenido de flavones en el extracto de *Tagetes erecta* y las antocianinas en el extracto de *Rosa x hybrida*, estas diferencias cuantitativas pueden condicionar las actividades biológicas de dichos extractos.

4. El extracto obtenido a partir de *Anthrrinum majus* reportó los valores más bajos en cada uno de los parámetros de composición y de capacidad antioxidante, lo que puede estar relacionado con la nula actividad antitumoral y antiparálsis reportada por este extracto.

5. Los tres extractos estudiados han demostrado no producir toxicidad en los parámetros medidos en modelo de gusano, lo que certifica que estas flores comestibles pueden ser empleadas en múltiples aplicaciones industriales tales como producción de alimentos funcionales, cosmética o industria farmacéutica.

6. Tanto el extracto de *Tagetes erecta* como el de *Rosa x hybrida* han reportado actividad antitumoral, reduciendo la viabilidad celular de células tumorales de cáncer de ovario. El extracto de *Tagetes erecta* reportó un valor de IC_{50} sensiblemente inferior al de *Rosa x*

hybrida, demostrando que a priori es un mejor candidato para continuar los ensayos como agente terapéutico.

7. El mecanismo de muerte celular reportado para los extractos de *Tagetes erecta* y de *Rosa x hybrida* difiere según el tipo de extracto, probamente ocurrido por su composición química diferente.

6.- Bibliografía

1. Andrade, M. J. *Day of the {Dead} in {Mexico}*. (La Oferta Publishing Company, 2012).
2. Story, J. Portugal's {Revolution} of {Carnations}: {Patterns} of {Change} and {Continuity}. *Int. Aff.* **52**, 417–433 (1976).
3. Martinez, S. W. Introduction of New Food Products with Voluntary Health- and Nutrition-Related Claims, 1989-2010. *SSRN Electron. J.* (2013) doi:10.2139/ssrn.2266446.
4. Fernandes, L., Ramalhosa, E., Pereira, J., Saraiva, J. & Casal, S. The Unexplored Potential of Edible Flowers Lipids. *Agriculture* **8**, 146 (2018).
5. Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T., Neugebauerova, J. & Vabkova, J. Edible Flowers—A New Promising Source of Mineral Elements in Human Nutrition. *Molecules* **17**, 6672–6683 (2012).
6. Grzeszczuk, M., Grzeszczuk, M., Meller, E., Stefaniak, A. & Wysocka, G. Mineral composition of some edible flowers. *J. Elem.* (2017) doi:10.5601/jelem.2017.22.2.1352.
7. Doyon, M. & Labrecque, J. Functional foods: a conceptual definition. *Br. Food J.* **110**, 1133–1149 (2008).
8. B. Prabawati, N. B., Oktavirina, V., Palma, M. & Setyaningsih, W. Edible Flowers: Antioxidant Compounds and Their Functional Properties. *Horticulturae* **7**, 66 (2021).
9. Navarro-González, I., González-Barrio, R., García-Valverde, V., Bautista-Ortín, A. & Periago, M. Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterisation of Phenolic Compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Int.*

J. Mol. Sci. **16**, 805–822 (2014).

10. Cardone, L. *et al.* Crocus sativus L. Ecotypes from Mediterranean Countries: Phenological, Morpho-Productive, Qualitative and Genetic Traits. *Agronomy* **11**, 551 (2021).
11. Toxinas naturales. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/toxinas_naturales.htm.
12. Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J. A., Saraiva, J. A. & Ramalhosa, E. An Overview on the Market of Edible Flowers. *Food Rev. Int.* **36**, 258–275 (2020).
13. Rodrigues, H. *et al.* Eating flowers? Exploring attitudes and consumers' representation of edible flowers. *Food Res. Int.* **100**, 227–234 (2017).
14. Chen, N.-H. & Wei, S. Factors influencing consumers' attitudes towards the consumption of edible flowers. *Food Qual. Prefer.* **56**, 93–100 (2017).
15. Martinez, S. W. Introduction of New Food Products with Voluntary Health- and Nutrition-Related Claims. *ssrn Electron*.
16. Jadhav, H. B., Badwaik, L. S., Annapure, U., Casanova, F. & Alaskar, K. A Review on the Journey of edible flowers from farm to consumer's plate. *Appl. Food Res.* **3**, 100312 (2023).
17. González-Barrio, R., Periago, M. J., Luna-Recio, C., Garcia-Alonso, F. J. & Navarro-González, I. Chemical composition of the edible flowers, pansy (Viola wittrockiana) and snapdragon (Antirrhinum majus) as new sources of bioactive compounds. *Food Chem.* **252**, 373–380 (2018).
18. Pires, T. C. S. P. *et al.* Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Res. Int.* **105**, 580–588 (2018).
19. Araújo, S., Matos, C., Correia, E. & Antunes, M. C. Evaluation of

phytochemicals content, antioxidant activity and mineral composition of selected edible flowers. *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods* **11**, 471–478 (2019).

20. Cervera-Mata, A. *et al.* Spent coffee grounds improve the nutritional value in elements of lettuce (Lactuca sativa L.) and are an ecological alternative to inorganic fertilizers. *Food Chem.* **282**, 1–8 (2019).

21. Cendrowski, A., Ścibisz, I., Mitek, M., Kieliszek, M. & Kolniak-Ostek, J. Profile of the Phenolic Compounds of Rosa rugosa Petals. *J. Food Qual.* **2017**, 1–10 (2017).

22. Khurana, S., Venkataraman, K., Hollingsworth, A., Piche, M. & Tai, T. Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging. *Nutrients* **5**, 3779–3827 (2013).

23. Gutiérrez-Grijalva, Erick Paul, Ambriz-Pére, Dulce Libna, Leyva-López, Nayely, Castillo-López, Ramón Ignacio, & Heredia, J. B. Review. Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Arch. Latinoam. Nutr.* (2016).

24. Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A. & Silva, A. M. S. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules* **26**, 5377 (2021).

25. Moliner, C. *et al.* Viola cornuta and Viola x wittrockiana: Phenolic compounds, antioxidant and neuroprotective activities on Caenorhabditis elegans. *J. Food Drug Anal.* **27**, 849–859 (2019).

26. Bhutia, T. D., Valant-Vetschera, K. M., Adlassnig, W. & Brecker, L. Flavonoids in selected Primula spp.: bridging micromorphology with chemodiversity. *Nat. Prod. Commun.* **7**, 1469–73 (2012).

27. Rivas-García, L. *et al.* Edible flowers as a health promoter: An evidence-based review. *Trends Food Sci. Technol.* **117**, 46–59 (2021).

28. Vogel, P. *et al.* Polyphenols benefits of olive leaf (Olea europaea L) to human

health. *Nutr. Hosp.* **31**, 1427–33 (2014).

29. Mendis Abeysekera, W. P. K., Arachchige, S. P. G., Abeysekera, W. K. S. M., Ratnasooriya, W. D. & Indeewari Medawatta, H. M. U. Antioxidant and Glycemic Regulatory Properties Potential of Different Maturity Stages of Leaf of Ceylon Cinnamon (Cinnamomum zeylanicum Blume) In Vitro. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2019**, 1–10 (2019).
30. Nowak, R. & Gawlik-Dziki, U. Polyphenols of Rosa L. Leaves Extracts and their Radical Scavenging Activity. *Zeitschrift für Naturforsch. C* **62**, 32–38 (2007).
31. Olech, M., Pietrzak, W. & Nowak, R. Characterization of Free and Bound Phenolic Acids and Flavonoid Aglycones in Rosa rugosa Thunb. Leaves and Achenes Using LC–ESI–MS/MS–MRM Methods. *Molecules* **25**, 1804 (2020).
32. Takahashi, J. A., Rezende, F. A. G. G., Moura, M. A. F., Dominguete, L. C. B. & Sande, D. Edible flowers: Bioactive profile and its potential to be used in food development. *Food Res. Int.* **129**, 108868 (2020).
33. Quiles, J. L. *et al.* Reductive Stress, Bioactive Compounds, Redox-Active Metals, and Dormant Tumor Cell Biology to Develop Redox-Based Tools for the Treatment of Cancer. *Antioxid. Redox Signal.* **33**, 860–881 (2020).
34. Loizzo, M. R. *et al.* Edible Flowers: A Rich Source of Phytochemicals with Antioxidant and Hypoglycemic Properties. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 2467–2474 (2016).
35. Zheng, J., Lu, B. & Xu, B. An update on the health benefits promoted by edible flowers and involved mechanisms. *Food Chem.* **340**, 127940 (2021).
36. Romero-Márquez, J. M. *et al.* In Vivo Anti-Alzheimer and Antioxidant Properties of Avocado (Persea americana Mill.) Honey from Southern Spain. *Antioxidants* **12**, 404 (2023).

37. Rivas-García, L. *et al.* Unravelling potential biomedical applications of the edible flower Tulbaghia violacea. *Food Chem.* **381**, 132096 (2022).

38. Kumari, P. *et al.* Characterization of Anthocyanins and Their Antioxidant Activities in Indian Rose Varieties (Rosa × hybrida) Using HPLC. *Antioxidants* **11**, 2032 (2022).

39. Kumari, P., Raju, D. V. S., Singh, K. P., Prasad, K. V. & Panwar, S. Characterization of phenolic compounds in petal extracts of rose. *Indian J. Hortic.* **75**, 349 (2018).

40. Jabbarzadeh, Z. & Khosh-Khui, M. Factors affecting tissue culture of Damask rose (Rosa damascena Mill.). *Sci. Hortic. (Amsterdam).* **105**, 475–482 (2005).

41. Al-Oqail, M. M. *et al.* Oxidative Stress Mediated Cytotoxicity, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis Induced by Rosa damascena in Human Cervical Cancer HeLa Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, 1–11 (2021).

42. URQUIAGA, I. & LEIGHTON, F. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res.* **33**, (2000).

43. Gholamhoseinian, A., Fallah, H. & Sharifi far, F. Inhibitory effect of methanol extract of Rosa damascena Mill. flowers on α-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia in normal and diabetic rats. *Phytomedicine* **16**, 935–941 (2009).

44. Boskabady, M. H., Shafei, M. N., Saberi, Z. & Amini, S. Pharmacological effects of rosa damascena. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **14**, 295–307 (2011).

45. Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J. A., Saraiva, J. A. & Ramalhosa, E. Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *J. Food Compos. Anal.* **60**, 38–50 (2017).

46. Bendahmane, M., Dubois, A., Raymond, O. & Bris, M. Le. Genetics and

genomics of flower initiation and development in roses. *J. Exp. Bot.* **64**, 847–857 (2013).

47. Pires, T. C. S. P., Dias, M. I., Barros, L. & Ferreira, I. C. F. R. Nutritional and chemical characterization of edible petals and corresponding infusions: Valorization as new food ingredients. *Food Chem.* **220**, 337–343 (2017).

48. Guimarães, R., Barros, L., Carvalho, A. M. & Ferreira, I. C. F. R. Studies on Chemical Constituents and Bioactivity of Rosa micrantha : An Alternative Antioxidants Source for Food, Pharmaceutical, or Cosmetic Applications. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 6277–6284 (2010).

49. Ayati, Z. *et al.* Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacological Profile of Rose Hip: A Review. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 4101–4124 (2019).

50. Abdel-Aal, E.-S., Akhtar, H., Zaheer, K. & Ali, R. Dietary Sources of Lutein and Zeaxanthin Carotenoids and Their Role in Eye Health. *Nutrients* **5**, 1169–1185 (2013).

51. Wan, H. *et al.* Flavonols and Carotenoids in Yellow Petals of Rose Cultivar (Rosa 'Sun City'): A Possible Rich Source of Bioactive Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 4171–4181 (2018).

52. Kumar, P. Role of Food and Nutrition in Cancer. in *The Role of Functional Food Security in Global Health* 193–203 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-813148-0.00012-8.

53. Schmitzer, V., Veberic, R., Osterc, G. & Stampar, F. Changes in the Phenolic Concentration during Flower Development of Rose 'KORcrisett'. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **134**, 491–496 (2009).

54. Cunja, V., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F. & Schmitzer, V. Compound Identification of Selected Rose Species and Cultivars: an Insight to Petal and

Leaf Phenolic Profiles. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **139**, 157–166 (2014).

55. Nagy, A. & Ecseri, K. Edible flowers : The rose. *Gradus* **7**, 59–61 (2020).

56. Deliorman Orhan, D., Hartevioğlu, A., Küpeli, E. & Yesilada, E. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from Rosa canina L. fruits. *J. Ethnopharmacol.* **112**, 394–400 (2007).

57. Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A. & Galán-Vidal, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **113**, 859–871 (2009).

58. Lee, J. H., Lee, H.-J. & Choung, M.-G. Anthocyanin compositions and biological activities from the red petals of Korean edible rose (Rosa hybrida cv. Noblered). *Food Chem.* **129**, 272–278 (2011).

59. Burlec, A. F. *et al.* Phytochemical Profile, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Assessment of Tagetes erecta L. Flowers. *Molecules* **26**, 1201 (2021).

60. Bortolini, D. G. *et al.* Bioactive profile of edible nasturtium and rose flowers during simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem.* **381**, 132267 (2022).

61. Hegde, A. S., Gupta, S., Sharma, S., Srivatsan, V. & Kumari, P. Edible rose flowers: A doorway to gastronomic and nutraceutical research. *Food Res. Int.* **162**, 111977 (2022).

62. Lim, T. K. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. (Springer Netherlands, 2016). doi:10.1007/978-94-017-7276-1.

63. Sowbhagya, H. B., Sushma, S. B., Rastogi, N. K. & Naidu, M. M. Effect of pretreatments on extraction of pigment from marigold flower. *J. Food Sci. Technol.* **50**, 122–128 (2013).

64. Gómez, R., Goñi, F. M. & Macarulla, J. M. Carotenoids from marigold (Tagetes erecta) petals and their esterified fatty acids. *Rev. Esp. Fisiol.* **34**, 253–6 (1978).

65. Gong, Y., Plander, S., Xu, H., Simandi, B. & Gao, Y. Supercritical CO 2 extraction of oleoresin from marigold (Tagetes erecta L.) flowers and determination of its antioxidant components with online HPLC-ABTS •+ assay. *J. Sci. Food Agric.* **91**, 2875–2881 (2011).

66. GREGORY, G. K., CHEN, T. & PHILIP, T. Quantitative Analysis of Lutein Esters in Marigold Flowers (Tagetes erecta) by High Performance Liquid Chromatography. *J. Food Sci.* **51**, 1093–1094 (1986).

67. Kishimoto, S., Sumitomo, K., Yagi, M., Nakayama, M. & Ohmiya, A. Three Routes to Orange Petal Color via Carotenoid Components in 9 Compositae Species. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* **76**, 250–257 (2007).

68. Kaisoon, O., Konczak, I. & Siriamornpun, S. Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand. *Food Res. Int.* **46**, 563–571 (2012).

69. Gupta, P. & Vasudeva, N. In vitro antiplasmodial and antimicrobial potential of Tagetes erecta roots. *Pharm. Biol.* **48**, 1218–1223 (2010).

70. Nandita Dasgupta. Antibacterial Activity of Leaf Extract of Mexican Marigold (Tagetes erecta) Against Different Gram Positive and Gram Negative Bacterial Strains. in *Journal of Pharmacy Research* 4201–4203 (2012).

71. Berendschot, T. T. *et al.* Influence of lutein supplementation on macular pigment, assessed with two objective techniques. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 3322–6 (2000).

72. Granado, F., Olmedilla, B. & Blanco, I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Br. J. Nutr.* **90**, 487–502 (2003).

73. Gansukh, E. *et al.* Lutein derived from marigold (Tagetes erecta) petals triggers ROS generation and activates Bax and caspase-3 mediated apoptosis of human cervical carcinoma (HeLa) cells. *Food Chem. Toxicol.* **127**, 11–18 (2019).

74. Wang, M. *et al.* Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1522–1529 (2006).

75. Mekvimol, T., Poonthong, G., Chaipunna, C. & Pumipuntu, N. Antimicrobial activity of marigold (Tagetes erecta), mulberry (Morus indica), and red shallot (Allium ascalonicum) extracts against Streptococcus agalactiae. *Int. J. One Heal.* **6**, 56–60 (2020).

76. González de Mejía, E., Quintanar-Hernández, J. A. & Loarca-Piña, G. Antimutagenic activity of carotenoids in green peppers against some nitroarenes. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **416**, 11–19 (1998).

77. Bashir, S. & Gilani, A. H. Studies on the antioxidant and analgesic activities of Aztec marigold (Tagetes erecta) flowers. *Phyther. Res.* **22**, 1692–1694 (2008).

78. Meurer, M. C. *et al.* Hydroalcoholic extract of Tagetes erecta L. flowers, rich in the carotenoid lutein, attenuates inflammatory cytokine secretion and improves the oxidative stress in an animal model of ulcerative colitis. *Nutr. Res.* **66**, 95–106 (2019).

79. Giri, R. K., Bose, A. & Mishra, S. K. Hepatoprotective activity of Tagets erecta against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. *Acta Pol. Pharm.* **68**, 999–1003 (2011).

80. Al-Snafi, A. E. The pharmacological importance of Antirrhinum majus-a review. *Asian J. Pharm. Sci. Technol.* **5**, 313–320 (2015).

81. Hudson A, Critchley J, and E. Y. The genus Antirrhinum (Snapdragon) a flowering plant model for evolution and development. **4**, 105-118.

82. Seo, J., Lee, J., Yang, H. Y. & Ju, J. Antirrhinum majus L. flower extract inhibits cell growth and metastatic properties in human colon and lung cancer cell lines.

Food Sci. Nutr. **8**, 6259–6268 (2020).

83. Geissman, T. A., Jorgensen, E. C. & Johnson, B. L. The chemistry of flower pigmentation in Antirrhinum majus. Color genotypes. I. The flavonoid components of the homozygous P, M, Y color types. *Arch. Biochem. Biophys.* **49**, 368–388 (1954).

84. https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-ovario/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/deteccion.html. (2023).

85. https://magazine.medlineplus.gov/es/art%C3%ADculo/los-tres-tipos-de-cancer-de-ovario-explicados#:~:text=Hay%20tres%20tipos%20de%20c%C3%A1nceres,la%20superficie%20externa%20del%20ovario. (2023).

86. Blot, W. J. & Tarone, R. E. Doll and Peto's Quantitative Estimates of Cancer Risks: Holding Generally True for 35 Years. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **107**, djv044–djv044 (2015).

87. Ames, B. N. & Gold, L. S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **250**, 3–16 (1991).

88. Kilinc, K. *et al.* Rosa canina Extract has Antiproliferative and Proapoptotic Effects on Human Lung and Prostate Cancer Cells. *Nutr. Cancer* **72**, 273–282 (2020).

89. Shukla, S. & Mehta, A. Anticancer potential of medicinal plants and their phytochemicals: a review. *Brazilian J. Bot.* **38**, 199–210 (2015).

90. Turan, I. *et al.* Antiproliferative and apoptotic effect of Morus nigra extract on human prostate cancer cells. *Saudi Pharm. J.* **25**, 241–248 (2017).

91. Demir, S. *et al.* Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutr. Cancer* **68**, 165–172 (2016).

92. Arbyn, M. *et al.* Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann. Oncol.* **22**, 2675–2686 (2011).

93. Organization, W. H. Personality Disorder, Severity Unspecified. *Encycl. Personal. Individ. Differ.* 3798–3798 (2020) doi:10.1007/978-3-319-24612-3_301942.

94. Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F. & Aguinaga-Ontoso, I. Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología* **32**, 523–532 (2017).

95. Bateman, R. J. *et al.* Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers. Res. Ther.* **3**, 1 (2010).

96. Chu, L. W. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med. J. = Xianggang yi xue za zhi* **18**, 228–37 (2012).

97. Ashrafian, H., Zadeh, E. H. & Khan, R. H. Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. *Int. J. Biol. Macromol.* **167**, 382–394 (2021).

98. Lane, C. A., Hardy, J. & Schott, J. M. Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* **25**, 59–70 (2018).

99. Terry, A. V. & Buccafusco, J. J. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 821–827 (2003).

100. Scheltens, P. *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet* **397**, 1577–1590 (2021).

101. Crutch, S. J. *et al.* Posterior cortical atrophy. *Lancet Neurol.* **11**, 170–178 (2012).

102. Nuñez, M. & Chana-Cuevas, P. New Perspectives in Iron Chelation Therapy for

the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals* **11**, 109 (2018).

103. Hill, E., Goodwill, A. M., Gorelik, A. & Szoeke, C. Diet and biomarkers of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurobiol. Aging* **76**, 45–52 (2019).

104. McGrattan, A. M. *et al.* Diet and Inflammation in Cognitive Ageing and Alzheimer's Disease. *Curr. Nutr. Rep.* **8**, 53–65 (2019).

105. Mendiola-Precoma, J., Berumen, L. C., Padilla, K. & Garcia-Alcocer, G. Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Biomed Res. Int.* **2016**, 1–17 (2016).

106. Caruso, G. *et al.* Polyphenols and neuroprotection: Therapeutic implications for cognitive decline. *Pharmacol. Ther.* **232**, 108013 (2022).

107. Arya, P. *et al.* Selective Interception of Gelsolin Amyloidogenic Stretch Results in Conformationally Distinct Aggregates with Reduced Toxicity. *ACS Chem. Neurosci.* **5**, 982–992 (2014).

108. Admane, N. *et al.* Molecular insights into the critical role of gallate moiety of green tea catechins in modulating prion fibrillation, cellular internalization, and neuronal toxicity. *Int. J. Biol. Macromol.* **223**, 755–765 (2022).

109. Zhang, C., Wang, Y., Wang, D., Zhang, J. & Zhang, F. NSAID Exposure and Risk of Alzheimer's Disease: An Updated Meta-Analysis From Cohort Studies. *Front. Aging Neurosci.* **10**, (2018).

110. Slice, L. W., Freedman, J. H. & Rubin, C. S. Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel metallothionein-like, cadmium-binding protein from Caenorhabditis elegans. *J. Biol. Chem.* **265**, 256–263 (1990).

111. Cui, Y., McBride, S. J., Boyd, W. A., Alper, S. & Freedman, J. H. Toxicogenomic analysis of Caenorhabditis elegans reveals novel genes and

pathways involved in the resistance to cadmium toxicity. *Genome Biol.* **8**, R122 (2007).

112. Boyd, W. A., McBride, S. J. & Freedman, J. H. Effects of Genetic Mutations and Chemical Exposures on Caenorhabditis elegans Feeding: Evaluation of a Novel, High-Throughput Screening Assay. *PLoS One* **2**, e1259 (2007).

113. Nass, R., Hall, D. H., Miller, D. M. & Blakely, R. D. Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in Caenorhabditis elegans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 3264–3269 (2002).

114. Chen, Y., Scarcelli, V. & Legouis, R. Approaches for Studying Autophagy in Caenorhabditis elegans. *Cells* **6**, 27 (2017).

115. Hunt, P. R. The C. elegans model in toxicity testing. *J. Appl. Toxicol.* **37**, 50–59 (2017).

116. Kim, W., Hendricks, G. L., Lee, K. & Mylonakis, E. An update on the use of C. elegans for preclinical drug discovery: screening and identifying anti-infective drugs. *Expert Opin. Drug Discov.* **12**, 625–633 (2017).

117. Li, J. & Le, W. Modeling neurodegenerative diseases in Caenorhabditis elegans. *Exp. Neurol.* **250**, 94–103 (2013).

118. Corsi, A. K., Wightman, B. & Chalfie, M. A Transparent Window into Biology: A Primer on Caenorhabditis elegans. *Genetics* **200**, 387–407 (2015).

119. Dimitriadi, M. & Hart, A. C. Neurodegenerative disorders: Insights from the nematode Caenorhabditis elegans. *Neurobiol. Dis.* **40**, 4–11 (2010).

120. Lublin, A. L. & Link, C. D. Alzheimer's disease drug discovery: in vivo screening using Caenorhabditis elegans as a model for β-amyloid peptide-induced toxicity. *Drug Discov. Today Technol.* **10**, e115–e119 (2013).

121. Alvarez, J., Alvarez-Illera, P., Santo-Domingo, J., Fonteriz, R. I. & Montero, M.

Modeling Alzheimer's Disease in Caenorhabditis elegans. *Biomedicines* **10**, 288 (2022).

122. Chen, X., Barclay, J. W., Burgoyne, R. D. & Morgan, A. Using C. elegans to discover therapeutic compounds for ageing-associated neurodegenerative diseases. *Chem. Cent. J.* **9**, 65 (2015).

123. Rivas-García, L. *et al.* Rosa x hybrida extracts with dual actions: Antiproliferative effects against tumour cells and inhibitor of Alzheimer disease. *Food Chem. Toxicol.* **149**, 112018 (2021).

124. Fatouros, C. *et al.* Inhibition of tau aggregation in a novel Caenorhabditis elegans model of tauopathy mitigates proteotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3587–3603 (2012).

125. Drake, J. Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid β-peptide (1–42) in a transgenic Caenorhabditis elegans model. *Neurobiol. Aging* **24**, 415–420 (2003).

126. Mæhre, H., Dalheim, L., Edvinsen, G., Elvevoll, E. & Jensen, I.-J. Protein Determination—Method Matters. *Foods* **7**, 5 (2018).

127. Planells, E., Aranda, P., Lerma, A. & Llopis, J. Changes in bioavailability and tissue distribution of zinc caused by magnesium deficiency in rats. *Br. J. Nutr.* **72**, 315–323 (1994).

128. Rivas-García, L. *et al.* Bioactive Properties of Tagetes erecta Edible Flowers: Polyphenol and Antioxidant Characterization and Therapeutic Activity against Ovarian Tumoral Cells and Caenorhabditis elegans Tauopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 280 (2023).

129. Gong, Y. *et al.* Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (Tagetes erecta L.)

residue. *Fitoterapia* **83**, 481–489 (2012).

130. Muñoz, A. E., Hernández, S. S., Tolosa, A. R., Burillo, S. P. & Olalla Herrera, M. Evaluation of differences in the antioxidant capacity and phenolic compounds of green and roasted coffee and their relationship with sensory properties. *LWT* **128**, 109457 (2020).

131. van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L. & Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. in 237–245 (2011). doi:10.1007/978-1-61779-080-5_20.

132. Chensom, S., Okumura, H. & Mishima, T. Primary Screening of Antioxidant Activity, Total Polyphenol Content, Carotenoid Content, and Nutritional Composition of 13 Edible Flowers from Japan. *Prev. Nutr. Food Sci.* **24**, 171–178 (2019).

133. Grosso, G. *et al.* The Effect of Dietary Polyphenols on Vascular Health and Hypertension: Current Evidence and Mechanisms of Action. *Nutrients* **14**, 545 (2022).

134. Shakoor, H. *et al.* Immunomodulatory Effects of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **13**, 728 (2021).

135. Leitão, C. *et al.* The Effect of Nutrition on Aging—A Systematic Review Focusing on Aging-Related Biomarkers. *Nutrients* **14**, 554 (2022).

136. Rivas-Garcia, L. *et al.* Dietary antioxidant intake reduces carotid intima-media thickness in coronary heart disease patients: From the CORDIOPREV study. *Free Radic. Biol. Med.* **210**, 221–229 (2024).

137. Li, A.-N. *et al.* Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *J. Funct. Foods* **6**, 319–330 (2014).

138. http://phenol-explorer.eu/. doi:http://phenol-explorer.eu/.

139. No Title. http://phenol-explorer.eu/.

140. Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T. & Lim, S. M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* **61**, 1361779 (2017).

141. Giampieri, F. *et al.* Anthocyanins: What do we know until now? *J. Berry Res.* **13**, 1–6 (2023).

142. Alvarado-Sansininea, J. *et al.* Quercetagetin and Patuletin: Antiproliferative, Necrotic and Apoptotic Activity in Tumor Cell Lines. *Molecules* **23**, 2579 (2018).

143. Kaczorová, D. *et al.* Influence of Extraction Solvent on the Phenolic Profile and Bioactivity of Two Achillea Species. *Molecules* **26**, 1601 (2021).

144. Moliner, C. *et al.* Edible Flowers of Tagetes erecta L. as Functional Ingredients: Phenolic Composition, Antioxidant and Protective Effects on Caenorhabditis elegans. *Nutrients* **10**, 2002 (2018).

145. KISS, A. *et al.* MTT Test and Time-lapse Microscopy to Evaluate the Antitumor Potential of Nucleoside Analogues. *Anticancer Res.* **41**, 137–149 (2021).

146. Vedam V. A, V., Stanley Xavier, A. & Chellathai David, D. In-Vitro Evaluation of Antifungal and Anticancer Properties of Tagetes Erecta Petal Extract. *Biomed. Pharmacol. J.* **12**, 815–823 (2019).

147. Barhoi, D., Upadhaya, P., Barbhuiya, S. N., Giri, A. & Giri, S. Extracts of Tagetes erecta exhibit potential cytotoxic and antitumor activity that could be employed as a promising therapeutic agent against cancer: A study involving in vitro and in vivo approach. *Phytomedicine Plus* **2**, 100187 (2022).

148. VALLISUTA, O. *et al.* In vitro studies on the cytotoxicity, and elastase and tyrosinase inhibitory activities of marigold (Tagetes erecta L.) flower extracts. *Exp. Ther. Med.* **7**, 246–250 (2014).

149. El-Maraghy, S. A. & Mehana, N. A. Modulatory effects of l-arginine and soy enriched diet on bone homeostasis abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* **229**, 9–16 (2015).

150. Gupta, P., Gupta, A., Agarwal, K., Tomar, P. & Satija, S. Antioxidant and cytotoxic potential of a new thienyl derivative from Tagetes erecta roots. *Pharm. Biol.* **50**, 1013–8 (2012).

151. Zamiri-Akhlaghi1, A., Rakhshandeh1, H., Tayarani-Najaran1, Z. & , Seyed Hadi Mousavi1, 2*. Study of cytotoxic properties of Rosa damascena extract in human cervix carcinoma cell line. *Avicenna J. Phytomedicine* **1**, (2011).

152. Sanjai, C., Hakkimane, S. S., Guru, B. R. & Gaonkar, S. L. A comprehensive review on anticancer evaluation techniques. *Bioorg. Chem.* **142**, 106973 (2024).

153. Li, X. *et al.* Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Glutathione Transferase Inhibitor Mediated Hydrophobic Tagging Molecules. *ACS Med. Chem. Lett.* **12**, 720–725 (2021).

154. Lenis Rojas, O. A., Cordeiro, S., Baptista, P. V. & Fernandes, A. R. Half-sandwich Ru(II) N-heterocyclic carbene complexes in anticancer drug design. *J. Inorg. Biochem.* **245**, 112255 (2023).

155. Yousuf, M. *et al.* Ellagic Acid Controls Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells via Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 6. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3526 (2020).

156. Nebenfuehr, S., Kollmann, K. & Sexl, V. The role of <scp>CDK6</scp> in cancer. *Int. J. Cancer* **147**, 2988–2995 (2020).

157. Giampieri, F. *et al.* Autophagy in Human Health and Disease: Novel Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **30**, 577–634 (2019).

158. Mulcahy Levy, J. M. & Thorburn, A. Autophagy in cancer: moving from

understanding mechanism to improving therapy responses in patients. *Cell Death Differ.* **27**, 843–857 (2020).

159. Rivas-García, L. *et al.* Ultra-Small Iron Nanoparticles Target Mitochondria Inducing Autophagy, Acting on Mitochondrial DNA and Reducing Respiration. *Pharmaceutics* **13**, 90 (2021).

160. Wang, S., Li, H., Yuan, M., Fan, H. & Cai, Z. Role of AMPK in autophagy. *Front. Physiol.* **13**, (2022).

161. Paquette, M., El-Houjeiri, L. & Pause, A. mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. *Cancers (Basel).* **10**, 18 (2018).

162. Bloom, G. S. Amyloid-β and Tau. *JAMA Neurol.* **71**, 505 (2014).

163. Ha, N. M., Tran, S. H., Shim, Y.-H. & Kang, K. Caenorhabditis elegans as a powerful tool in natural product bioactivity research. *Appl. Biol. Chem.* **65**, 18 (2022).

164. Kent, K. *et al.* Anthocyanin intake is associated with improved memory in older adults with mild cognitive impairment. *Nutr. Res.* **104**, 36–43 (2022).

165. Medina dos Santos, N., Berilli Batista, P., Batista, Â. G. & Maróstica Júnior, M. R. Current evidence on cognitive improvement and neuroprotection promoted by anthocyanins. *Curr. Opin. Food Sci.* **26**, 71–78 (2019).

166. Yamakawa, M. Y. *et al.* Anthocyanin suppresses the toxicity of Aβ deposits through diversion of molecular forms in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease. *Nutr. Neurosci.* **19**, 32–42 (2016).

167. Augusti, P. R. *et al.* Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in Caenorhabditis elegans: Protective effect of lutein extracted from marigold flowers. *Food Chem. Toxicol.* **109**, 60–67 (2017).

168. Muralidar, S., Ambi, S. V., Sekaran, S., Thirumalai, D. & Palaniappan, B. Role

of tau protein in Alzheimer's disease: The prime pathological player. *Int. J. Biol. Macromol.* **163**, 1599–1617 (2020).

169. Medeiros, R., Baglietto-Vargas, D. & LaFerla, F. M. The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS Neurosci. Ther.* **17**, 514–24 (2011).

170. Chaban, Y., Boekema, E. J. & Dudkina, N. V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**, 418–426 (2014).

171. Ashleigh, T., Swerdlow, R. H. & Beal, M. F. The role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis. *Alzheimer's Dement.* **19**, 333–342 (2023).