



POSGRADOS

Maestría en

PRODUCTOS

FARMACÉUTICOS NATURALES

RPC-SO-09-NO.174-2020

Opción de Titulación:

Tesis

Tema:

Evaluación de la actividad antimicrobiana
de pétalos de flores comestibles de
Ecuador

Autor(es)

Alejandro Joaquín Alarcón Rosero

Director:

Elena Del Rocío Coyago Cruz

QUITO – Ecuador

2024

Autor(es):



Alejandro Joaquín Alarcón Rosero

Químico Farmacéutico

Candidato a Magíster en Productos Farmacéuticos Naturales por la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.

aalarconr1@est.ups.edu.ec

Dirigido por:



Elena Del Rocío Coyago Cruz

Ingeniera Química

Diplomado en Nutrición para el Envejecimiento

Magister en Ingeniería Industrial y Productividad

Doctora (PhD) en Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y Del Desarrollo Rural Sostenible

ecoyagoc@ups.edu.ec

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra para fines comerciales, sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual. Se permite la libre difusión de este texto con fines académicos e investigativos por cualquier medio, con la debida notificación a los autores.

DERECHOS RESERVADOS

2023 © Universidad Politécnica Salesiana.

QUITO– ECUADOR – SUDAMÉRICA

Alejandro Joaquín Alarcón Rosero

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PÉTALOS DE FLORES COMESTIBLES DE ECUADOR

DEDICATORIA

Tras la culminación del presente trabajo de investigación, quiero dedicar este logro a mi amada esposa Kimberly Carrión, que, gracias a su apoyo y amor incondicional, me ha impulsado para poder culminar con éxito este sueño.

A mi padre Efraín Alarcón que ahora me acompaña desde el cielo.

A mi madre Carmen Rosero, quien es y siempre será mi modelo a seguir.

A mi hermana Daniela Alarcón, quien es además de mi hermana es mi mejor amiga y siempre me alentó a seguir adelante y nunca rendirme.

Adicional, quiero dedicar este logro a mis familiares y amigos más cercanos, quienes me acompañaron durante este trayecto y me brindaron aliento para continuar adelante.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a la Dra. Elena Coyago, quien es una de las mejores mentoras académicas que podido encontrar en mi trayecto educativo, con su paciencia, apoyo, conocimiento y dedicación, me ha guiado para la culminación exitosa de este trabajo de investigación.

Un especial agradecimiento a la Universidad UTE por el apoyo brindado para llevar a cabo esta investigación, en especial a la MSc. Elena Beltrán y al PhD Jorge Heredia.

A la Escuela Politécnica Nacional en especial al PhD Edwin Vera director del Departamento de Ciencia de Alimentos y Biotecnología por el apoyo brindado en el desarrollo de este trabajo experimental.

Adicional quiero agradecer a la Universidad Politécnica Salesiana, institución que me ha brindado los conocimientos para la elaboración del presente trabajo de investigación.

Tabla de Contenido

1.	Introducción	11
2.	Determinación del Problema	14
3.	Marco teórico referencial	15
3.1	Compuestos bioactivos	15
3.1.1	Carotenoides	17
3.1.2	Compuestos fenólicos	20
3.2	Flores comestibles	21
3.3	Actividad antimicrobiana	24
3.3.1	Compuestos bioactivos y la relación con la actividad antimicrobiana	26
3.3.2	Métodos de cuantificación de la actividad antimicrobiana	27
4.	Metodología	29
4.1	Muestreo	29
4.2	Cuantificación de compuestos bioactivos	30
4.3	Determinación de la actividad antimicrobiana	32
4.4	Determinación de la actividad antifúngica	34
4.5	Análisis estadístico	35
5.	Resultados y discusión	36
5.1	Cuantificación de compuestos bioactivos	36
5.1.1	Carotenoides totales	36
5.2.1	Fenoles totales	39
5.2	Determinación de la actividad antimicrobiana	42
5.2.1	Actividad antibacteriana	42
5.2.2	Actividad antifúngica	45
6.	Conclusiones	48
	Referencias	49

Índice de tablas

Tabla 1 Coordenadas de muestreo de las flores comestibles del Ecuador.....	30
Tabla 2 Actividad antibacteriana frente a <i>Escherichia coli</i> de las flores en estudio.....	42
Tabla 3 Actividad antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> de las flores en estudio	43
Tabla 4 Actividad antibacteriana frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de las flores en estudio.....	44
Tabla 5 Actividad antibacteriana frente a <i>Streptococcus mutans</i> de las flores en estudio	45
Tabla 6 Actividad antifúngica frente a <i>Candida albicans</i> de las flores en estudio	46
Tabla 7 Actividad antifúngica frente a <i>Candida tropicalis</i> de las flores en estudio	47

Índice de figuras

Figura No. 1 Aplicaciones de los compuestos bioactivos	12
Figura No. 2 Producción de compuestos bioactivos	16
Figura No. 3 Papel de los compuestos bioactivos en la inflamación, el estrés oxidativo y las alternativas metabólicas inducidas por el estrés alimentario. ...	17
Figura No. 4 Biosíntesis de los carotenoides	18
Figura No. 5 Biosíntesis de los compuestos fenólicos	20
Figura No. 6 Algunos ejemplos de compuestos fenólicos	21
Figura No. 7 Usos comunes de las flores	22
Figura No. 8 Efectos beneficios de las flores	23
Figura No. 9 Concentración de carotenoides totales de las flores comestibles con mayor concentración de carotenoides totales	37
Figura No. 10 Concentración de carotenoides totales de las flores comestibles con mayor concentración de fenoles totales	38
Figura No. 11 Concentración de fenoles totales de las flores comestibles con mayor concentración de carotenoides	40
Figura No. 12 Concentración de fenoles totales de las flores comestibles con mayor concentración de fenoles totales	41

Evaluación de la actividad antimicrobiana de pétalos de flores comestibles de Ecuador

Autor(es):

Alejandro Joaquín Alarcón Rosero

Resumen

Las flores comestibles han sido utilizadas durante milenios como alimento, aportando aroma, sabor y un atractivo visual a diversas preparaciones culinarias. En el contexto actual de creciente preocupación por la resistencia antimicrobiana y la necesidad de alternativas naturales y sostenibles, el estudio de las propiedades antimicrobianas de las flores comestibles emerge como un área de investigación prometedora. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de los pétalos de flores comestibles de Ecuador. Se seleccionaron diez especies ricas en carotenoides o compuestos fenólicos totales, y se evaluó su actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Streptococcus mutans* ATCC 25175, así como su actividad antifúngica contra, *Candida albicans* ATCC 1031 y *Candida tropicalis* ATCC 13803. Los resultados revelaron altas concentraciones de carotenoides en *Calendula officinalis* amarilla (5751,9 mg carotenoides totales/100 g PS), *Helianthus annuus* amarilla (5154,7 mg carotenoides totales/100 g PS) y *Dahlia pinnata* naranja (932,7 mg carotenoides totales/100 g PS) y elevadas concentraciones de fenoles totales en *Hibiscus rosa-sinensis* naranja (343,7 mg EAG/100 g PS) y amarillo (347,9 mg EAG/100 g PS). Se observó una inhibición antimicrobiana intermedia en especies como *Pelargonium peltatum* frente a *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, y *S. mutans* y en *Rosa x hybrid* frente *S. aureus*. Además, *Chrysanthemum x hybrid* mostró actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, mientras que *Pelargonium peltatum* fue efectivo contra *Candida tropicalis*.

Palabras clave: Compuestos bioactivos, Alimentos funcionales, Actividad antimicrobiana

Abstract

Edible flowers have been used as food for thousands of years, adding aroma, flavour and visual appeal to various culinary preparations. In the current context of growing concern about antimicrobial resistance and the need for natural and sustainable alternatives, the study of the antimicrobial properties of edible flowers emerges as a promising area of research. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of edible flower petals from Ecuador. Ten species rich in carotenoids or total phenolic compounds were selected and evaluated for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Streptococcus mutans* ATCC 25175, and antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 1031 and *Candida tropicalis* ATCC 13803. The results showed high concentrations of carotenoids in *Calendula officinalis* yellow (5751,9 mg total carotenoid/100 g DW), *Helianthus annuus* yellow (5154,7 mg total carotenoid/100 g DW) and *Dahlia pinnata* orange (932,7 mg total carotenoid/100 g DW) and high concentrations of total phenolics in *Hibiscus rosa-sinensis* orange (343,7 mg GAE/100 g DW) and yellow (347,9 mg GAE/100 g DW). Intermediate antimicrobial inhibition was observed in species such as *Pelargonium peltatum* against *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *S. mutans* and in *Rosa x hybrid* against *S. aureus*. In addition, *Chrysanthemum x hybrid* showed antifungal activity against *Candida albicans*, while *Pelargonium peltatum* was effective against *Candida tropicalis*.

Keywords: Bioactive compounds, Functional foods, Antimicrobial activity.

1. Introducción

En los últimos años, el mercado de flores comestibles ha experimentado un crecimiento notable, impulsado por la creciente disponibilidad de información sobre su valor nutricional y sus propiedades bioactivas (Fernandes et al., 2017). Este interés también ha crecido debido al potencial de ciertos metabolitos secundarios, como los carotenoides, compuestos fenólicos, vitaminas C y E, saponinas y fitoesteroles, que se encuentran comúnmente en estas flores (Lockowandt et al., 2019). En particular, los carotenoides y los compuestos fenólicos, responsables de los vibrantes colores de las flores, destacan no solo por su atractivo visual, sino también por sus propiedades beneficiosas para la salud y su versatilidad en aplicaciones agroalimentarias y medicinales (Pires et al., 2018).

A lo largo de la historia, las flores comestibles han cautivado a la humanidad, no solo por su belleza, sino también por su uso en la gastronomía y la medicina ancestral (Pipit et al., 2020). Desde la antigüedad, han sido utilizadas como alimento, tanto en la cocina romana y griega, donde se preparaban pasteles con pétalos de rosas maceradas, como en diversas culturas alrededor del mundo, extendiéndose su uso hasta América y Asia (Coyago-Cruz et al., 2023).

Más allá de su función decorativa, las flores comestibles son apreciadas por su capacidad para realzar el sabor, el aroma y la presentación de los platos, y por albergar una rica diversidad de compuestos bioactivos, como fenoles, flavonoides, carotenoides, aceites esenciales, vitaminas y minerales. Estos compuestos, con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, han despertado un creciente interés científico. Sin embargo, no todas las flores son aptas para el consumo, por ello, es adecuada una caracterización y clasificación para identificar aquellas que además de ser seguras, puedan aportar beneficios nutricionales (Pires et al., 2021).

Los compuestos bioactivos son metabolitos secundarios derivados de plantas, hongos, bacterias o animales, con efectos farmacológicos o toxicológicos significativos, lo que los hace valiosos para diversas industrias, incluidas la alimentaria, farmacéutica, cosmética, biorremediación y la

producción de combustible alternativo (A. J. Meléndez-Martínez et al., 2021). La Figura No. 1 muestra algunos de estos compuestos y sus aplicaciones industriales.

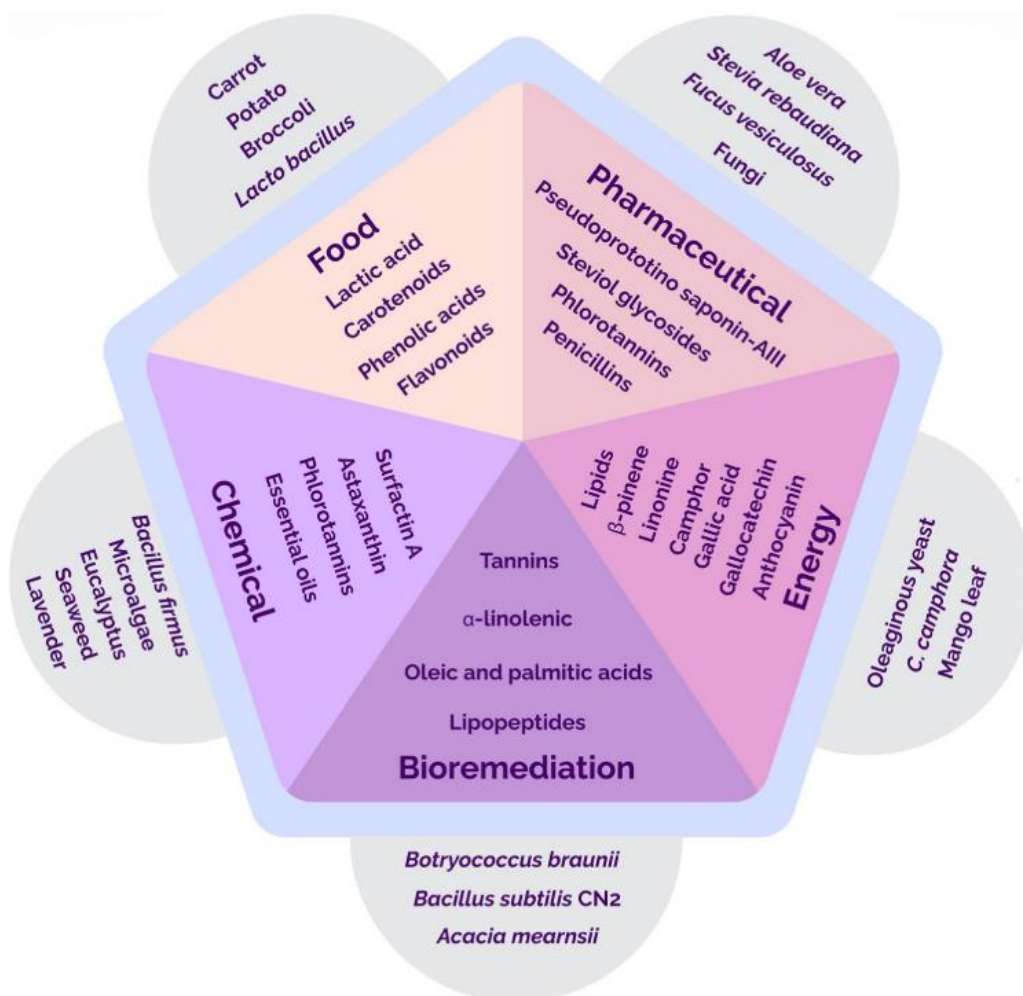


Figura No. 1 Aplicaciones de los compuestos bioactivos

Fuente: Meléndez-Martínez et al., (2022)

En este contexto, el objetivo general de esta investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana de los pétalos de flores comestibles de Ecuador. Se seleccionó cinco especies vegetales con concentraciones de fenoles totales superiores a 200 mg GAE/g peso seco (PS) y cinco con concentraciones de carotenoides totales superiores a 5 μ g/g PS. Estas especies fueron sometidas a pruebas de actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*, y de actividad antifúngica frente a *Candida albicans* y *Candida tropicalis*.

Este estudio no solo enriquecerá el conocimiento científico sobre las propiedades antimicrobianas de las flores comestibles, sino que también podría abrir nuevas oportunidades para el desarrollo de productos naturales enfocados en combatir enfermedades infecciosas. Al centrarse en las especies de Ecuador, se busca resaltar la riqueza biológica y el potencial biotecnológico del país en la búsqueda de soluciones innovadoras para los retos de salud pública a nivel mundial.

2. Determinación del Problema

En el contexto marcado por la creciente preocupación por la resistencia antimicrobiana, y la necesidad urgente de encontrar alternativas naturales y sostenibles; el estudio de las propiedades antimicrobianas de las flores comestibles emerge como una línea de investigación prometedora y relevante. Históricamente, las flores han sido valoradas principalmente por su belleza y su uso en la gastronomía, pero cada vez más evidencia científica sugiere que también contienen compuestos bioactivos con un notable potencial para combatir microorganismos patógenos (Tubon et al., 2024) cita.

A pesar del interés creciente en las propiedades medicinales de las plantas, la investigación específica sobre las capacidades antimicrobianas de las flores comestibles sigue siendo limitada y dispersa. Aunque algunos estudios han demostrado actividad antimicrobiana en ciertas especies florales en diversas regiones del mundo, la comprensión integral de este potencial sigue en desarrollo. Este problema adquiere mayor relevancia al considerar que la resistencia a los antibióticos constituye una amenaza global para la salud pública, con profundas implicaciones en términos de morbilidad, mortalidad y costos sanitarios.

La búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos es esencial en la lucha contra la resistencia bacteriana, y las flores comestibles podrían representar una fuente prometedora de compuestos bioactivos innovadores y efectivos. El reto radica en explorar y caracterizar la diversidad de estos compuestos presentes en las flores comestibles, así como en comprender sus mecanismos de acción antimicrobiana. Este conocimiento es fundamental para identificar especies florales con mayor potencial terapéutico y desarrollar estrategias que permitan aprovechar sus propiedades antimicrobianas de manera segura y sostenible.

3. Marco teórico referencial

3.1 Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos son componentes de alimentos que, aunque no esenciales para la nutrición, tienen efectos beneficiosos en el cuerpo, actuando en el organismo en su conjunto o en tejidos y células específicas. A diferencia de los nutrientes esenciales, no existen recomendaciones establecidas para su ingesta diaria. No obstante, es bien sabido que diversos compuestos de origen vegetal y animal, como carotenoides, polifenoles, fitoesteroles, ácidos grasos y péptidos, influyen positivamente en la salud humana (Pereira et al., 2024).

Aunque los mecanismos de acción de estos compuestos, particularmente en la reducción del riesgo de enfermedades, aún no se comprende completamente, se ha demostrado que algunos actúan como antioxidantes, mientras que otros mejoran la respuesta al estrés oxidativo al estimular mecanismos de defensa. Esto contribuye a prevenir daños celulares o a mejorar los procesos de reparación. Si bien la evidencia sobre la eficacia y seguridad de estos compuestos, particularmente cuando se consumen como suplementos aislados, es insuficiente, existe un consenso general sobre los beneficios que ofrecen cuando forman parte de una dieta equilibrada (Bobo-García et al., 2015).

Entre estos compuestos se incluyen polifenoles, carotenoides, vitaminas, ácidos grasos omega-3, ácidos orgánicos, nucleósidos, nucleótidos y fitoesteroles, conocidos por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Estos beneficios se derivan principalmente de su capacidad para regular el equilibrio redox celular y los estados de acetilación de (Ranasinghe et al., 2019). Además, los compuestos bioactivos desempeñan un papel en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas o agudas, al enfocarse en mecanismos biológicos específicos, lo que mejora la funcionalidad de los alimentos y contribuye al bienestar general (Jung et al., 2018).

Por ejemplo, los flavonoides pueden modular el metabolismo de los carbohidratos y mejorar la sensibilidad a la insulina, lo que es beneficioso en el control de la diabetes. Asimismo, los ácidos grasos omega-3 y los ésteres de

esteroles vegetales ayudan a reducir la inflamación y los niveles de colesterol LDL, mitigando el riesgo cardiovascular (Albuquerque et al., 2021). El β -caroteno y la astaxantina también destacan por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Coyago-Cruz, 2017).

Los recientes avances en ciencias ómicas y biología computacional han permitido una mejor comprensión de la interacción entre estos compuestos y el organismo humano, acelerando su descubrimiento y validación (Baliga et al., 2011). Es así como la extracción y caracterización de los compuestos bioactivos, con la adopción de disolventes ecológicos y métodos de extracción no convencionales ha optimizado su viabilidad comercial, contribuyendo a una economía circular sostenible (Saini et al., 2023). En este sentido, en la Figura No.2, se presentan algunos métodos de extracción convencionales y no convencionales, así como las técnicas de purificación o identificación de los compuestos bioactivos.

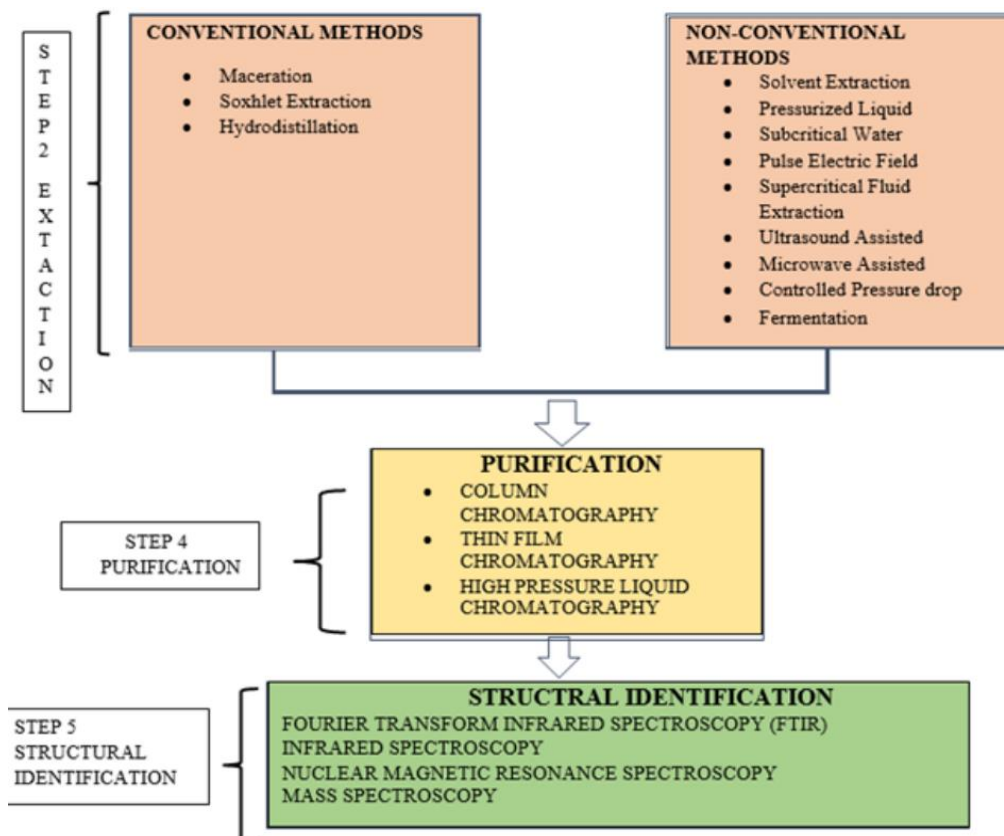


Figura No. 2 Producción de compuestos bioactivos

Fuente: (Chaudhary, 2023)

La comunidad científica ha reconocido la importancia de los compuestos bioactivos, lo que ha llevado a la inclusión en las directrices dietéticas y a la

aprobación de las declaraciones de propiedades saludables, especialmente en la en la Unión Europea (Ranasinghe et al., 2019) . No obstante, a pesar de sus beneficios, es importante evaluar los umbrales beneficiosos y tóxicos de estos compuestos para evitar la posible toxicidad derivada de un consumo excesivo (Jung et al., 2018).

Los compuestos bioactivos, con sus capacidades para eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS) y modular factores de transcripción clave en la inmunidad y el metabolismo, tienen un gran potencial como agentes terapéuticos para combatir la inflamación, el estrés oxidativo y las disfunciones metabólicas inducidas por la dieta (Figura No. 3) (Coyago-Cruz et al., 2023) . En general, estos compuestos contribuyen para mejorar la salud y el bienestar, y los avances tecnológicos continúan expandiendo sus aplicaciones (Chaudhary, 2023).

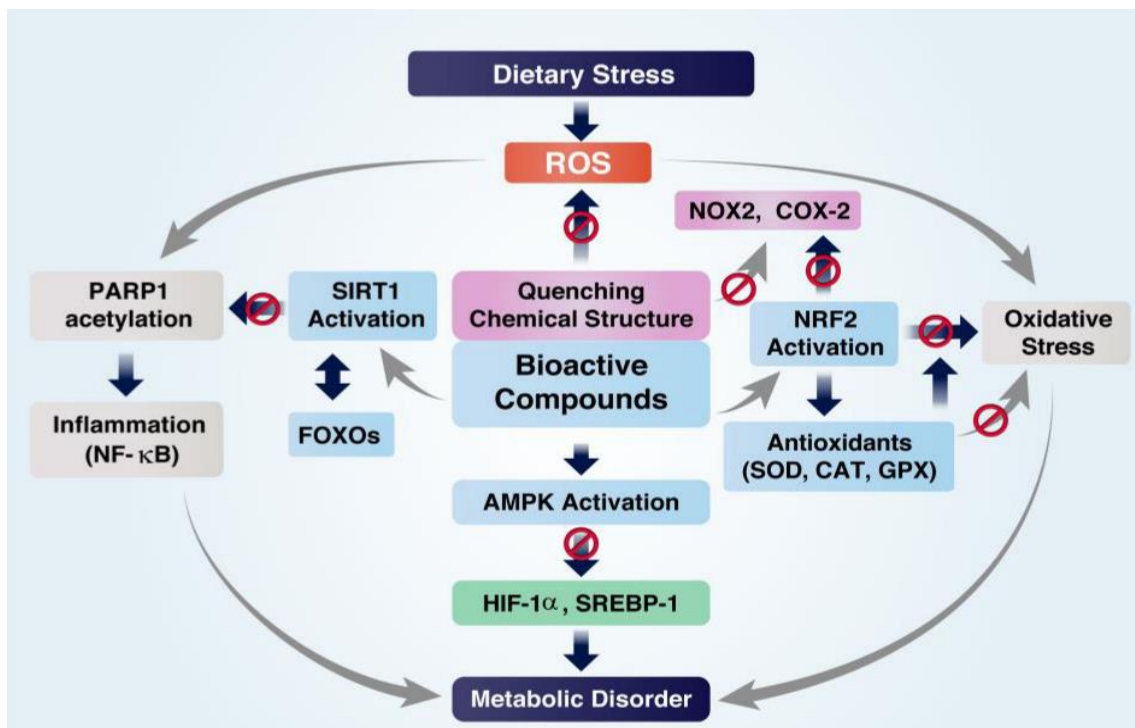


Figura No. 3 Papel de los compuestos bioactivos en la inflamación, el estrés oxidativo y las alternativas metabólicas inducidas por el estrés alimentario.

Fuente: (Gupta et al., 2023)

3.1.1 Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos esenciales en los órganos fotosintéticos, actuando junto a las clorofilas. Además de su papel en la fotosíntesis, también cumplen funciones importantes como fotoprotectores, antioxidantes, atrayentes de color y precursores de hormonas vegetales en órganos no fotosintéticos

(Maoka, 2020). Estos pigmentos lipofílicos naturales, que varían del amarillo al rojo, se encuentran en una amplia variedad de frutas y verduras, y su coloración distintiva proviene de una extensa cadena de dobles enlaces conjugados (Coyago-Cruz, 2017).

El ciclo metabólico de los carotenoides en las plantas, que incluye su síntesis, degradación y reciclaje, juega un papel clave tanto en la fisiología vegetal como en la nutrición humana. La biosíntesis de los carotenoides se inicia en los plástidos a partir de los precursores isoprenoides, derivados de la vía del ácido mevalónico y la vía del metileritritol 4-fosfato. Este proceso comienza con la formación del fitoeno, seguido de una serie de reacciones enzimáticas que producen una diversidad de carotenoides. La estructura química de los carotenoides, compuesta por una cadena de dobles enlaces conjugados, no solo define su color, sino que también es responsable de su actividad antioxidante (Fernandes et al., 2017).

Los carotenoides son pigmentos tetraterpénicos, se encuentran en bacterias fotosintéticas, algunas arqueas, hongos, algas, plantas y animales. Están formados por ocho unidades de isopreno, dando lugar a una estructura de 40 carbonos. Generalmente, presentan una cadena de polieno con nueve dobles enlaces conjugados y grupos terminales en ambos extremos. Se dividen en carotenos y xantofilas que contienen oxígeno (Figura No.4) (Maoka, 2020).

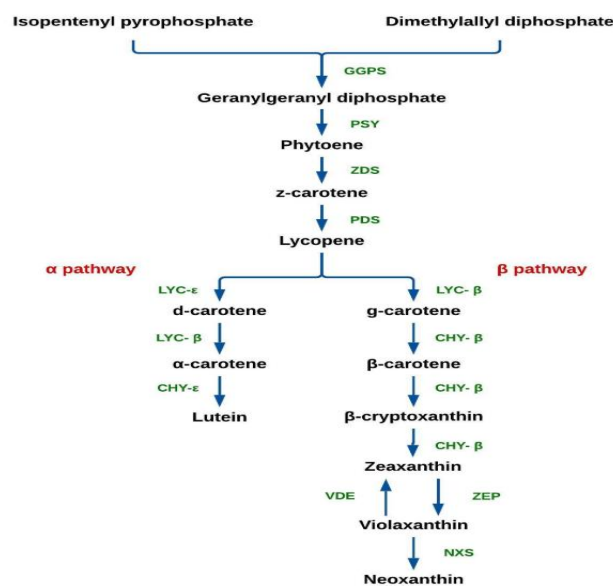


Figura No. 4 Biosíntesis de los carotenoides

Fuente: (González-Peña et al., 2023)

Hasta la fecha, se han identificado alrededor de 1000 carotenoides, de los cuales unos 40 se consumen regularmente en la dieta humana. Entre los más comunes se encuentran los carotenos no oxigenados, como el licopeno y el β -caroteno, y las xantofilas, como la luteína y la zeaxantina. Estos pigmentos son importantes no solo para la fotosíntesis y la fotoprotección, sino también para la síntesis de fitohormonas como el ácido abscísico y las estrigolactonas (Saini et al., 2023).

Los carotenoides se encuentran en una variedad de alimentos, especialmente en frutas y verduras coloridas como zanahorias, calabazas, tomates y vegetales de hoja verde como brócoli y espinacas. Otros alimentos, como los huevos y la leche, también son fuentes dietéticas de carotenoides (Meléndez Martínez et al., 2022). Ejemplos de carotenoides específicos incluyen el licopeno en tomates, la luteína y zeaxantina en huevos, y la astaxantina en algunos productos marinos (Corbacho et al., 2019). Aunque presentes en muchos alimentos, la biodisponibilidad de los carotenoides es limitada, lo que ha impulsado investigaciones sobre cómo mejorar su absorción y bioactividad (Saini et al., 2023). Además, los organismos marinos como algas y bacterias también se han reconocido como fuentes sostenibles de carotenoides, sin agotar los recursos naturales (Choi. et al., 2024).

El consumo de carotenoides está asociado con numerosos beneficios para la salud, ayudando a mitigar el estrés oxidativo, un factor clave en el desarrollo de enfermedades crónicas como trastornos cardiovasculares, neurológicos y el cáncer (Coyago-Cruz, 2017). Además, actúan como precursores de la vitamina A, esencial para la visión y la salud en general (Baliga et al., 2011). Sin embargo, su inestabilidad química y escasa solubilidad en agua, limitan su aplicación industrial, lo que ha llevado al desarrollo de técnicas de encapsulación para mejorar su estabilidad y biodisponibilidad (Fernandes et al., 2017).

Los avances en ingeniería genética, como el uso de CRISPR y la conversión de cloroplastos en cromoplastos, han permitido aumentar el contenido de carotenoides en los cultivos, mejorando su valor nutricional y su impacto en el crecimiento de las plantas (Fu et al., 2015).

3.1.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, también conocidos como polifenoles, son un grupo un grupo diverso de sustancias químicas que se caracterizan por la presencia de anillos aromáticos y al menos dos grupos hidroxilo (Coyago-Cruz, 2017). Estas moléculas juegan un papel importante en las plantas y siguen rutas metabólicas complejas. Su síntesis comienza a través de la vía del skikimato, un proceso que involucra la condensación del ácido fosfoenolpirúvico y *D*-eritrosa-4-fosfato, lo que finalmente conduce a la formación de ácido corísmico (Figura No. 5) (Saini et al., 2023)

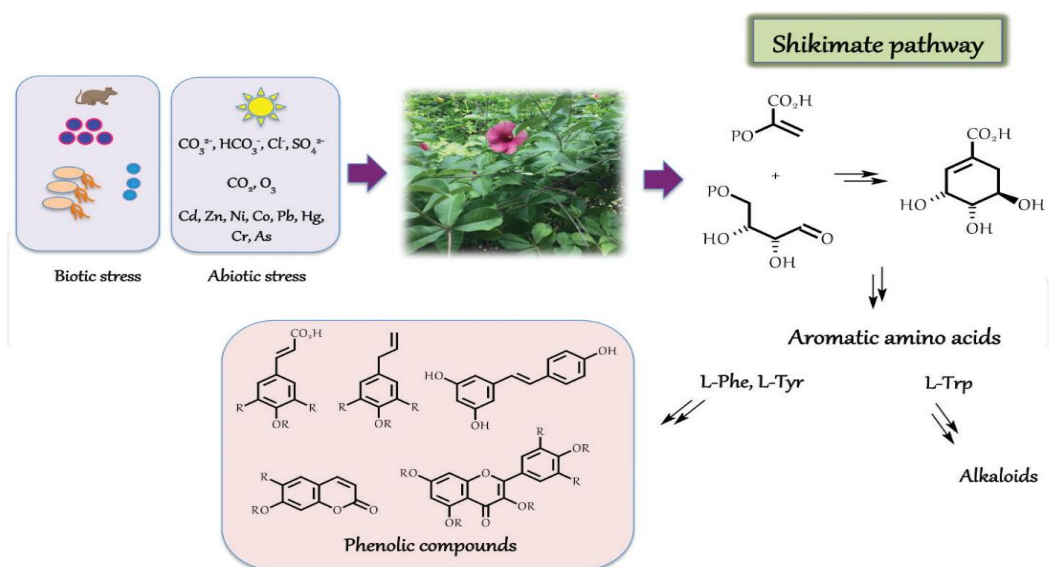


Figura No. 5 Biosíntesis de los compuestos fenólicos

Fuente: (Saini et al., 2023)

En las plantas, los compuestos fenólicos desempeñan una función protectora frente a la radiación ultravioleta y otros factores estresantes ambientales. Son metabolitos secundarios altamente diversos, con más de 10000 estructuras diferentes. Estos compuestos se encuentran abundantemente en frutas, verduras, hierbas, aceites, especias, té, chocolate y vino (Figura No.6) (Albuquerque et al., 2021).

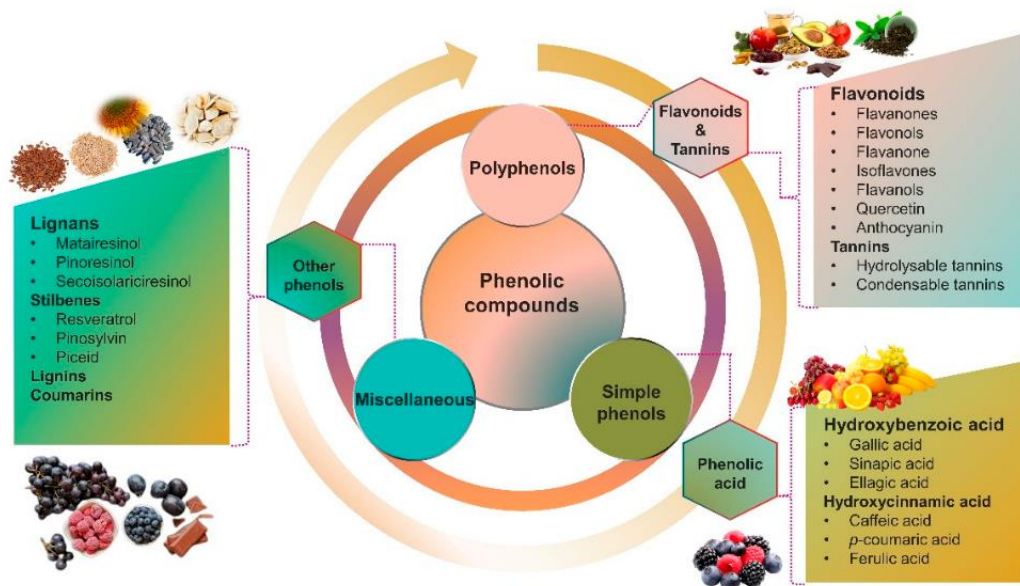


Figura No. 6 Algunos ejemplos de compuestos fenólicos

Fuente: (Saini et al., 2023)

Los beneficios farmacológicos y nutricionales de los compuestos fenólicos están bien documentados. Entre sus propiedades más destacadas se encuentran sus actividades antimicrobianas, antibacterianas, antivirales, antiescleróticas, antioxidantes y antiinflamatorias. Estos compuestos son particularmente conocidos por su capacidad para activar enzimas antioxidantes y mitigar el estrés oxidativo, lo que los convierte en candidatos prometedores para la prevención de enfermedades crónicas, como la diabetes y los trastornos cardiovasculares. En el contexto del cáncer, los compuestos fenólicos han mostrado un potencial significativo para inhibir la carcinogénesis. Lo logran al interferir en mecanismos celulares clave, como la proliferación celular, la angiogénesis y la metástasis, ofreciendo nuevas vías para la investigación en terapias anticancerígenas (Kumari et al., 2021).

3.2 Flores comestibles

Las flores han sido una parte integral de la vida humana, no solo por su belleza, sino también por sus usos prácticos en el arte, la medicina natural y la cocina. A lo largo de la historia, se han utilizado para agregar color, sabor y decoración a los platos (Figura No. 7) (Coyago-Cruz, 2017)



Figura No. 7 Usos comunes de las flores

Fuente: (Coyago-Cruz, 2017)

El uso de las flores comestibles se remonta a la antigüedad, cuando civilizaciones como la romana las empleaban para realzar el sabor y el atractivo visual de sus preparaciones, desde sopas hasta postres y bebidas. En la Edad de Bronce Medio, los habitantes de Anatolia, particularmente en el sitio de Kuklukale en Turquía, consumían plantas exóticas, incluidas flores, durante eventos sociales y ceremoniales, destacando su importancia en la vida económica y social (Feizy & Reyhani, 2016). De manera similar, en culturas indígenas de América, como en México, las flores de *Cucurbita maxima* se han utilizado tradicionalmente, mientras que, en Europa y Asia, especies como *Calendula officinalis* y *Jasminium officinale* se valoraban por sus beneficios nutricionales (Coyago-Cruz, 2017; Coyago-Cruz et al., 2023).

En tiempos modernos, la convergencia de la floricultura y la horticultura ha impulsado el uso de flores comestibles como un nuevo vegetal, gracias a sus altos niveles de pigmentos y propiedades nutraceuticas, incluyendo una importante actividad antioxidante. Su popularidad ha crecido debido a su contenido de compuestos bioactivos como vitaminas, minerales, flavonoides y enzimas, que aportan beneficios para la salud, incluyendo propiedades

antiinflamatorias, antibacterianas, antivirales, gastroprotectoras y hepatoprotectores (Du et al., 2022).

Estudios recientes sugieren que algunos extractos de flores comestibles tienen acciones neuroprotectoras, cardioprotectoras y anticancerígenas, además de mejorar trastornos metabólicos y combatir bacterias multirresistentes (Figura 8) (Ranasinghe et al., 2019). Nutricionalmente, son una excelente fuente de fibra dietética y proteínas vegetales, destacando especialmente en especies de las familias Oleaceae y Asteraceae, que pueden enriquecer las dietas veganas y vegetarianas, y apoyan la salud intestinal gracias a sus funciones prebióticas (Meléndez Martínez et al., 2022).

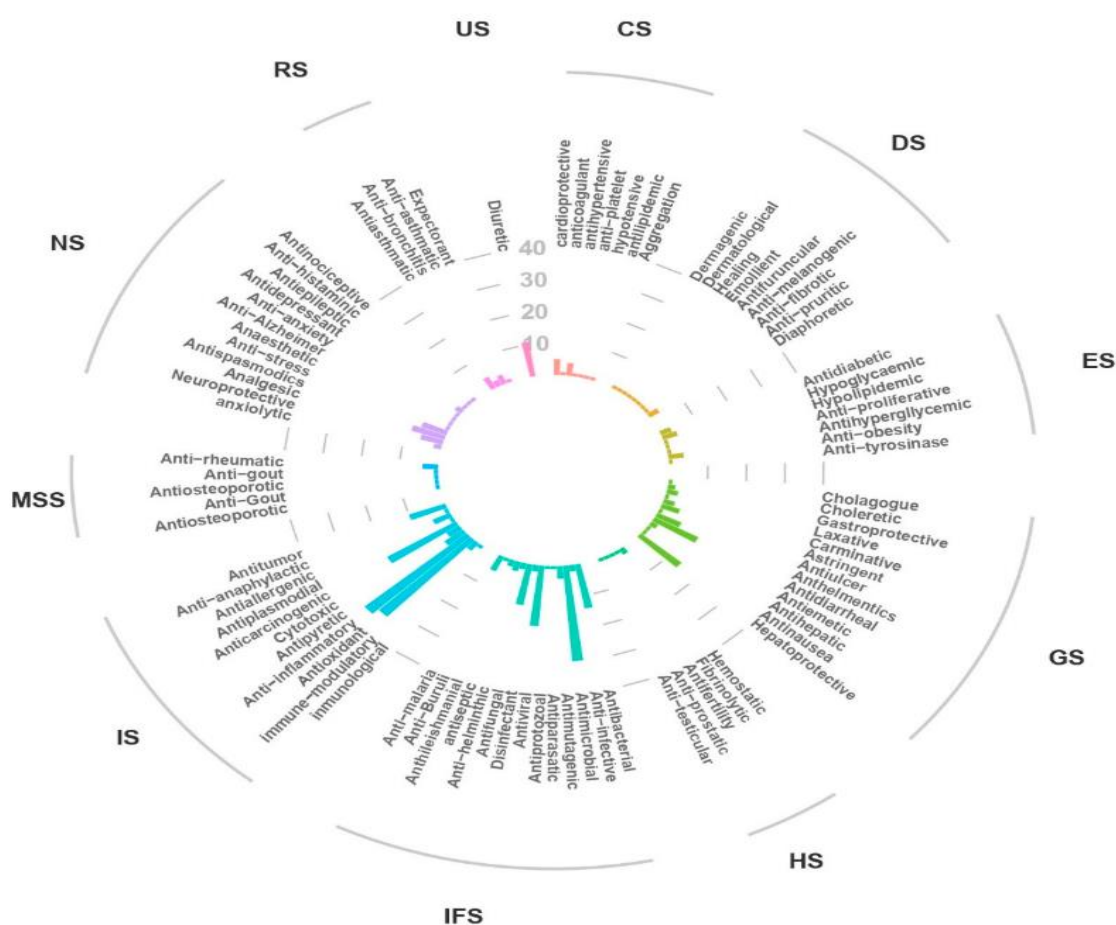


Figura No. 8 Efectos beneficios de las flores

Fuente: (Coyago-Cruz et al., 2023)

Las flores comestibles no solo mejoran la estética de las comidas, sino que también ofrecen un perfil nutricional significativo. Ricas en antioxidantes, como flavonoides y polifenoles, ayudan a combatir el estrés oxidativo,

reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas. También contiene vitaminas y minerales esenciales, como la vitamina C, que fortalecen el sistema inmunológico, y potasio, que contribuye a mantener niveles saludables de presión arterial (Maoka, 2020).

Además de sus beneficios para la salud, las flores comestibles mejoran las propiedades sensoriales de alimentos y bebidas. Por ejemplo, pueden mejorar el aroma y la aceptabilidad de vinos desalcoholizados sin alterar sus características fisicoquímicas (Lara et al., 2014). La creciente demanda de flores comestibles en la gastronomía contemporánea no solo responde a su valor estético, sino también a su capacidad para ofrecer nutrientes esenciales y compuestos bioactivos que promueven el bienestar general (Coyago-Cruz et al., 2023; A. Meléndez-Martínez et al., 2021).

A pesar de su largo historial de uso, todavía se están investigando la seguridad y los límites de ingesta diaria recomendada de flores comestibles. Es necesario contar con información más detallada para garantizar la seguridad del consumo (Li et al., 2020). Hoy en día, el interés por las flores comestibles ha resurgido, impulsados por los cambios en los hábitos de consumo y la búsqueda de opciones alimentarias más saludables, lo que las posiciona como una adición prometedora a las dietas contemporáneas (Jung et al., 2018).

3.3 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se refiere a la capacidad de ciertos agentes para inhibir el crecimiento o destruir microorganismos, como bacterias, hongos, y virus. Las flores comestibles, utilizadas durante siglos por sus valores estéticos y gastronómicos, han despertado un renovado interés científico debido a sus propiedades medicinales, incluidas sus capacidades antimicrobianas (Balasubramaniam et al., 2021).

Los antimicrobianos pueden ser sustancias naturales, sintéticas o semisintéticas que inhiben o destruyen microorganismos. Por ejemplo, estudios han demostrado que el pongamol, un compuesto aislado de *Pongamia pinnata*, inhibe significativamente bacterias grampositivas y gramnegativas como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* a una concentración de 200 µg/disco. De manera similar, extractos de la corteza de *P.*

pinnata mostraron actividad antimicrobiana contra cepas bacterianas y hongos con zonas de inhibición superiores a 22 mm y una concentración mínima inhibitoria de 22 mg/mL (Su et al., 2020)

En el ámbito de los antimicrobianos, los antibióticos, como la penicilina y la tetraciclina, se utilizan para tratar infecciones bacterianas o como bacteriostáticas. Por otro lado, los antifúngicos, como los azoles y polienos, tratan infecciones por hongos, mientras que los antivirales, como el aciclovir, inhiben la replicación viral mediante la interrupción de enzimas específicas o la síntesis de ácidos nucleicos virales (Lakhani et al., 2019). Finalmente, los antisépticos y desinfectantes, como el alcohol y el peróxido de hidrógeno, se emplean para desinfectar superficies y tejidos humanos, actuando por desnaturalización de proteínas y disrupción de membranas (Artasensi et al., 2021).

Los antimicrobianos ejercen su acción a través de diversos mecanismos, como la inhibición de la síntesis de la pared celular, la interferencia en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, y la alteración de la membrana celular. Además, el uso responsable de estos agentes es importante para evitar el desarrollo de resistencia antimicrobiana, un fenómeno preocupante que surge por el uso excesivo o inapropiado de estos compuestos, lo que fomenta la propagación de cepas resistentes y disminuye la eficacia de los tratamientos (Uddin et al., 2021)

La resistencia antimicrobiana se desarrolla a través de mutaciones genéticas, la adquisición de genes de resistencia y la modificación de las dianas moleculares de los antimicrobianos. Los microorganismos también pueden producir enzimas que inactivan los antimicrobianos, como las betalactamasas, o utilizar sistemas de bombeo para expulsarlos fuera de la célula (Reygaert, 2018).

El potencial de las flores comestibles como fuente de antimicrobianos naturales es vasto. Sus extractos pueden formularse en productos tópicos como cremas y ungüentos para el tratamiento de infecciones cutáneas leves, heridas y quemaduras. En la industria alimentaria, los extractos con actividad antimicrobiana podrían actuar como conservantes naturales, prolongando la vida útil de los alimentos al inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición (Quinto et al., 2019). En la industria cosmética, las propiedades antimicrobianas de los extractos de flores, junto con sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios, los convierten en ingredientes valiosos para cremas, lociones

y jabones, ayudando a prevenir infecciones cutáneas y a mejorar la higiene personal (Choi et al., 2024).

3.3.1 Compuestos bioactivos y la relación con la actividad antimicrobiana

Los compuestos bioactivos son sustancias presentes en organismos vivos que influyen en la salud de humanos, animales y plantas. Estos compuestos, provenientes de diversas fuentes naturales como plantas, microorganismos y productos marinos, han sido objeto de numerosos estudios debido a sus propiedades beneficiosas, particularmente en los campos de la medicina y la biotecnología. Entre las propiedades más notables de algunos compuestos bioactivos se encuentra su actividad antimicrobiana (Choi. et al., 2024).

En este contexto, un grupo destacado de compuestos bioactivos son los alcaloides, que se producen principalmente en plantas. Un ejemplo representativo es la berberina, un alcaloide que se encuentra en varias plantas medicinales y ha demostrado una potente actividad antimicrobiana, efectiva tanto contra bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Wojtyczka et al., 2014).

Por otro lado, los flavonoides, una clase de compuestos polifenólicos, son ampliamente conocidos por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. La quercetina, un tipo de flavonoide, ha mostrado eficacia frente a una variedad de bacterias y hongos (Baquer et al., 2024). Los taninos, otro grupo de compuestos polifenólicos, también destaca por su actividad antimicrobiana. Estos compuestos tienen la capacidad de precipitar proteínas y así inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, proporcionando una defensa adicional contra infecciones (Li et al., 2020).

En cuanto a los aceites esenciales, que son mezclas complejas de compuestos volátiles presentes en muchas plantas, varios de ellos han mostrado una actividad antimicrobiana significativa. Ejemplos como el aceite de árbol de té y el aceite de orégano han sido ampliamente estudiados por su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y virus, convirtiéndose en opciones prometedoras para aplicaciones medicinales y conservantes (Smith, 2005).

Los terpenoides también desempeñan un papel importante en la actividad antimicrobiana. Compuestos como el timol y el carvacrol, presentes en el aceite

de orégano, son conocidos por sus potentes efectos antimicrobianos. Estos compuestos actúan sobre la membrana celular de los microorganismos, interfiriendo en su integridad y llevando a su muerte (Choi. et al., 2024). A su vez, las saponinas, que son compuestos glucósidos, exhiben una notable actividad antimicrobiana al destruir la membrana celular de los microorganismos, lo que resulta en su eliminación. Estas propiedades hacen de las saponinas compuestos de gran interés en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (Kumari et al., 2021).

3.3.2 Métodos de cuantificación de la actividad antimicrobiana

Existen varios métodos para cuantificar la actividad antimicrobiana, cada uno adecuado para diferentes tipos de estudio y microorganismos. A continuación, se describen algunos de los métodos más habituales:

- El método de difusión de disco (Prueba de Kirby-Bauer) consiste en colocar discos de papel impregnados con agentes antimicrobianos sobre una placa de agar inoculada con el microorganismo de prueba. Después de la incubación, la presencia de una zona transparente alrededor de los discos indica actividad antimicrobiana. El diámetro de esta zona se mide en milímetros, siendo las zonas más grandes indicativas de una mayor actividad antimicrobiana (Ayyagari et al., 2009).
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determina mediante la dilución seriada del agente antimicrobiano en un medio de cultivo líquido, seguida de la inoculación con el microorganismo. La concentración más baja que inhibe el crecimiento visible se registra como la CMI, y generalmente se expresa en microgramos por mililitro (Choi et al., 2024).
- La concentración bactericida mínima (CMB) se evalúa después de realizar la prueba de CMI. Las muestras de cada dilución que no muestran crecimiento se cultivan en una placa de agar, y la concentración más baja que no produce crecimiento es la CMB, también expresada $\mu\text{g/mL}$ (Sykes & Rankin, 2013).
- El método de dilución en caldo implica la dilución del agente antimicrobiano en un medio líquido inoculado con el microorganismo, evaluando el crecimiento mediante la turbidez. La concentración que impide el crecimiento visible es la que se anota (Balouiri et al., 2016).

- El método de dilución en agar consiste en incorporar agentes antimicrobianos a placas de agar en diversas concentraciones. Posteriormente, estas placas se inoculan con el microorganismo y se registra la concentración más baja que inhibe el crecimiento (Balouiri et al., 2016).
- La tasa de muerte microbiana, es una prueba que mide la velocidad a la que un agente antimicrobiano mata microorganismo a lo largo del tiempo. Se toman muestras en distintos intervalos y se cultivan para determinar la cantidad de organismos viables, graficando la reducción en los recuentos viables a lo largo del tiempo para evaluar la tasa de muerte microbiana (Ummah, 2019).
- El ensayo de tablero de ajedrez es utilizado para evaluar la interacción entre dos o más agentes antimicrobianos, probando diferentes combinaciones y concentraciones. El índice de concentración inhibitoria fraccionaria (CIF) se utiliza para determinar si la interacción es sinérgica, aditiva, indiferente o antagónica (Ni et al., 2015).











4. Metodología

4.1 Muestreo

La experimentación se realizó con la autorización del Ministerio del Ambiente, bajo el contrato marco MAE-DNB-CM-2017-0080-UTE y el proyecto MAE-DNB-2019-0911-O, en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana. Estos experimentos fueron financiados por el proyecto CEPRA XII 2019-09 flores andinas, con el apoyo financiero de CEDIA.

Se recolectaron muestras de pétalos de diez diferentes especies florales comestibles del Ecuador, según se detalla en la Tabla 1. Los pétalos fueron colocados en tubos Falcon y congelados a -80°C antes de ser liofilizados en un equipo Christ Alpha 1-4 LDplus (Martin Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Alemania). Una vez liofilizadas, las muestras se molieron en un mortero hasta obtener un polvo fino, que se almacenó en frascos ámbar hasta su análisis.

Tabla 1 Coordenadas de muestreo de las flores comestibles del Ecuador

N°	Color visual	Familia	Especie	Lugar de muestreo		Altitud (msnm)	Imagen
1	Anaranjado	Asteraceae	<i>Chrysanthemum x hybrid</i>	S2°53,0'11,0"	W78°59,0'23,0"	2738	
2	Amarillo	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	S0°10,0'58,7"	W78°22,0'59,5"	2339	
3	Anaranjado	Asteraceae	<i>Tagetes patula</i>	S0°9,0'0,0"	W78°25,0'60,0"	2600	
4	Roja	Cannaceae	<i>Canna indica</i>	S0°5,0'0,1"	W78°26,0'60,0"	2610	
5	Anaranjado	Compositae	<i>Dahlia pinnata</i>	S1°23,0'43,0"	W78°26,0'18,0"	1600	
6	Roja	Hibisdaceae	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> roja	N0°12,0'28,5"	W78°29,0'14,8"	2738	
7	Naranja	Hibisdaceae	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> anaranjada	N0°12,0'28,5"	W78°29,0'14,8"	2738	
8	Amarilla	Hibisdaceae	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> amarilla	N0°12,0'28,5"	W78°29,0'14,8"	2738	
9	Amarilla	Rosaceae	<i>Rosa x hybrid</i> variedad <i>médium</i> amarilla	S0°9,0'0,0"	W78°25,0'60,0"	2600	
10	Anaranjada	Verbenaceae	<i>Lantana camara</i>	S0°11,0'19,0"	W78°23,0'46,0"	2360	

4.2 Cuantificación de compuestos bioactivos

La evaluación de los compuestos bioactivos consideró el análisis de compuestos fenólicos totales y carotenoides totales, tal como se describe a continuación.

- a) Fenoles totales: se pesó 40 mg de polvo liofilizado en un tubo ependorf de 2 mL de capacidad. Luego, se mezcló con 1 mL de una solución de metanol al 80 % acidificado al 0,1 % con ácido clorhídrico. Esta solución se homogenizó en un vórtex Mixer VM-300 (Interbiolab Inc., Florida) y luego se agitó por 2 minutos en un baño de ultrasonido Fisher Scientific FS60 (Fisher Scientific,

Estados Unidos). La fase orgánica se separó por centrifugación a 14 000 rpm durante 3 min a 4 °C en una microcentrífuga MiniSpin series (Eppendorf, Alemania). El residuo sólido fue extraído dos veces más con 500 µL del metanol acidificado.

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales, se mezclaron 20 µL del extracto metanólico con 100 µL de una solución 1:4 de Folin-Ciocalteu en una placa de 96 pocillos. La mezcla se agitó por 60 segundos en un agitador de microplacas y se dejó reposar por 4 minutos. Luego, se agregaron 75 µL de una solución de carbonato de sodio (100 g/L) y se agitó por 1 minuto. Después de dos horas a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 750 nm usando un lector de microplacas BioTek Synergy H1 (Agilent, Estados Unidos). A su vez, la curva de calibración empleó una solución de ácido gálico con una concentración entre 10 a 200 mg/L (Bobo-García, et al., 2014). La concentración se calculó empleando la ecuación 1

$$FT = \frac{C*V}{Pm} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

FT: Concentración de fenoles totales (mg equivalente de ácido gálico (EAG)/100 g de muestra seca (PS))

C: Concentración de fenoles totales de la curva de calibración (mg/mL)

V: volumen del extracto (mL)

Pm: peso de la muestra liofilizada (g)

b) Carotenoides totales: se pesó 20 mg de polvo liofilizado en un eppendorf de 2 mL de capacidad y se mezcló con 500 µL de una solución de metanol: acetona: diclorometano (1:1:2). Esta solución fue homogenizada previamente en un vórtex Mixer VM-300 (Interbiolab Inc., Florida) y posteriormente se agitó por 2 minutos en un baño de ultrasonido Fisher Scientific FS60 (Fisher Scientific, Estados Unidos). La

fase coloreada se separó por centrifugación a 14 000 rpm durante 3 min a 4 °C en una microcentrífuga MiniSpin series (Eppendorf, Alemania), recolectando la fase orgánica. El extracto acuoso se extrajo nuevamente con 500 µL hasta que la fase orgánica ya no presentó color. La fase orgánica recolectada se evaporó hasta sequedad en un rotavapor Buchi™ R-100 (Fisher Scientific, Estados Unidos), a temperaturas no superiores a 30 °C. Los extractos secos se disolvieron en 2 mL de etanol grado HPLC y se colocaron en una celda de cuarzo de 10 mm de paso de luz. La absorbancia de esta solución se midió a 450 nm en un espectrofotómetro UV-Vis marca ThermoSpectronic Genesys 10 (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos). La concentración de carotenoides totales se expresó en µg de β-caroteno/g de muestra y se calculó utilizando la ecuación 2, considerando un coeficiente de absorción molar de 2620 (Coyago Cruz, 2017).

$$CT = \frac{Abs * V}{A_{1\text{ cm}}^{1\%} * 100 * Pm} * 10\ 000 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

CT: Concentración de carotenoides totales (µg de β-caroteno/g de muestra seca)

Abs: Absorbancia de la muestra a 450 nm

V: Volumen de dilución del extracto (mL)

$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$: Coeficiente de absorción molar (2620 en etanol)

Pm: Peso de la muestra liofilizada (g)

5.1 Determinación de la actividad antimicrobiana por difusión en pozo

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se pesó 0,2 g de muestra liofilizada y se añadió 1 mL de etanol al 50 %. La mezcla se homogenizó y se agitó en un baño de ultrasonido Fisher Scientific FS60 (Fisher Scientific, Estados Unidos) durante 6 minutos. El sobrenadante se recuperó centrifugando a 13000 rpm durante 3 min en una microcentrífuga eppendorf (Eppendorf, Alemania). La extracción se realizó por dos ocasiones

más empleando un volumen de solvente de 0,5 mL. El sobrenadante resultante se filtró empleando filtros de 0,45 µm PDVF de 25 mm de diámetro y el extracto final se secó en un liofilizador Christ Alpha 1-4 LDplus (GmbH, Alemania). Así, 300 mg del extracto seco se mezcló con 1 mL de agua destilada estéril para la determinación de la actividad antimicrobiana.

Los medios de cultivos para bacterias se prepararon pesando 1,85 g de caldo de infusión cerebro corazón (BHI) disuelto en 50 mL de agua destilada, mientras que el agar Mueller Hinton (MHA) se preparó disolviendo 15,2 g en 400 mL de agua destilada. Para los cultivos fúngicos, se pesó 2,5 g de caldo de extracto de levadura peptona dextrosa (YPDB) y se disolvió en 50 mL de agua destilada, mientras que el agar dextrosa Sabouraud (SDA) se preparó pesando 26 g y disolviendo en 400 mL de agua destilada. Todos los medios de cultivos se esterilizaron en una autoclave HV-110 Hiravama.

La determinación de la actividad antibacteriana empleó bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y Gram-negativas como *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y como antibiótico la streptomina en una dosificación de 7,5 mg en 5 mL de agua estéril. El cultivo se realizó por separado, colocando una colonia bacteriana de una cepa madre en un tubo con 2 mL de BHI estéril y agitando en un orbital TE-420 (Piracicaba, Brasil) durante 18 horas a 37 °C, dentro de una cabina de flujo laminar AC2-2E8 Airtream. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se colocó en una placa multipocillos, 196 µL de BHI estéril y 4 µL de la bacteria inoculada y se leyó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multimode (Agilent Technologies, Estados Unidos). La densidad óptica se ajustó a 0,2 que corresponde a una densidad celular de 5×10^5 UFC/mL empleando la ecuación 3.

$$OD_{inicial} * x = 0,2 * Vol. final \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

OD inicial = Valor de absorbancia a 600 nm

X= volumen (50 mL)

Vol. Final= Volumen de inóculo aforado a 500 uL

0,2 = densidad celular de 5×10^5 UFC/mL

Con el volumen final calculado mediante la ecuación 3 se preparó un nuevo inóculo que corresponde a una densidad óptica de 0,2, y este inóculo se empleó para inocular con un hisopo la caja Petri con agar Mueller Hinton, considerando un crecimiento tipo césped. Finalmente, en la caja Petri inoculada se realizaron pozos con un sacabocados en donde se dispuso 80 uL del extracto, agua y estreptomina por separado.

Posteriormente se procedió a la medición del diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos y al cálculo del valor del efecto inhibitorio respecto al control positivo, como se expresa en la siguiente ecuación.

$$\text{índice de inhibición} = \frac{\text{Halo de inhibición del extracto (mm)}}{\text{Halo de inhibición del antibiotico (mm)}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Los resultados de los halos de inhibición de las muestras, se compararon con el halo de inhibición del antibiótico y antimicóticos de referencia, según el Instituto Estándar Clínico y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) (Weinstein & Lewis, 2020)

4.3 Determinación de la actividad antifúngica

Por otra parte, la determinación de la actividad antifúngica empleó hongos como *Candida albicans* ATCC 1031 y como antibiótico la nourseotricina pesando 7,5 mg en 5 mL de agua estéril. El cultivo se realizó por separado, colocando una colonia fúngica de una cepa madre en un tubo con 2 mL de levadura peptona dextrosa (YPDB) agitando en un orbital TE-420 (Piracicaba, Brasil) durante 18 horas a 35 °C, dentro de una cabina de flujo laminar AC2-2E8 Airtream. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se colocó en una placa multipocillos, 196 uL de YPDB estéril y 4 uL del

microorganismo inoculado y se leyó la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multimode (Agilent Technologies, Estados Unidos). La densidad óptica se ajustó a 0,2 que corresponde a una densidad celular de 5×10^5 UFC/mL empleando la ecuación 3.

Con el volumen final calculado mediante la ecuación 3, se preparó un nuevo inóculo que corresponde a una densidad óptica de 0,2, y este inóculo se empleó para inocular con un isopo la caja Petri con agar dextrosa Sabouraud, considerando un crecimiento tipo césped. Finalmente, en la caja Petri inoculada se realizaron pozos con un sacabocados en donde se dispuso 80 uL del extracto, agua y nourseotricina por separado.

4.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se utilizó un modelo ANOVA simple y un análisis multivariado, empleando los programas estadísticos STATGRAPHICS Y SIGMAPLOT.

5. Resultados y discusión

5.1 Cuantificación de compuestos bioactivos

5.1.1 Carotenoides totales

En la Figura 9 se presenta la concentración de carotenoides totales de las flores con altas concentraciones de carotenoides totales, mientras que en la Figura 10 se presenta la concentración de carotenoides totales de las flores con altas concentraciones de fenoles totales.

Los resultados de la Figura 9 señalan que especies como la *Calendula officinalis* y *Helianthus annuus* son fuentes importantes de carotenoides con concentraciones superiores a los 5000 mg/100 g PS.

En la Figura 10 que se exponen a especies que presentaron altas concentraciones de fenoles, también señalan importantes concentraciones de carotenoides como el caso de *Dahlia pinnata* que presentó una concentración de 900 mg/100 g PS. En este sentido, otros autores mostraron una concentración de 25 µg/g en la variedad naranja de dalia (Lara et al., 2014), valores que resultaron ser inferiores a los presentados en este estudio.

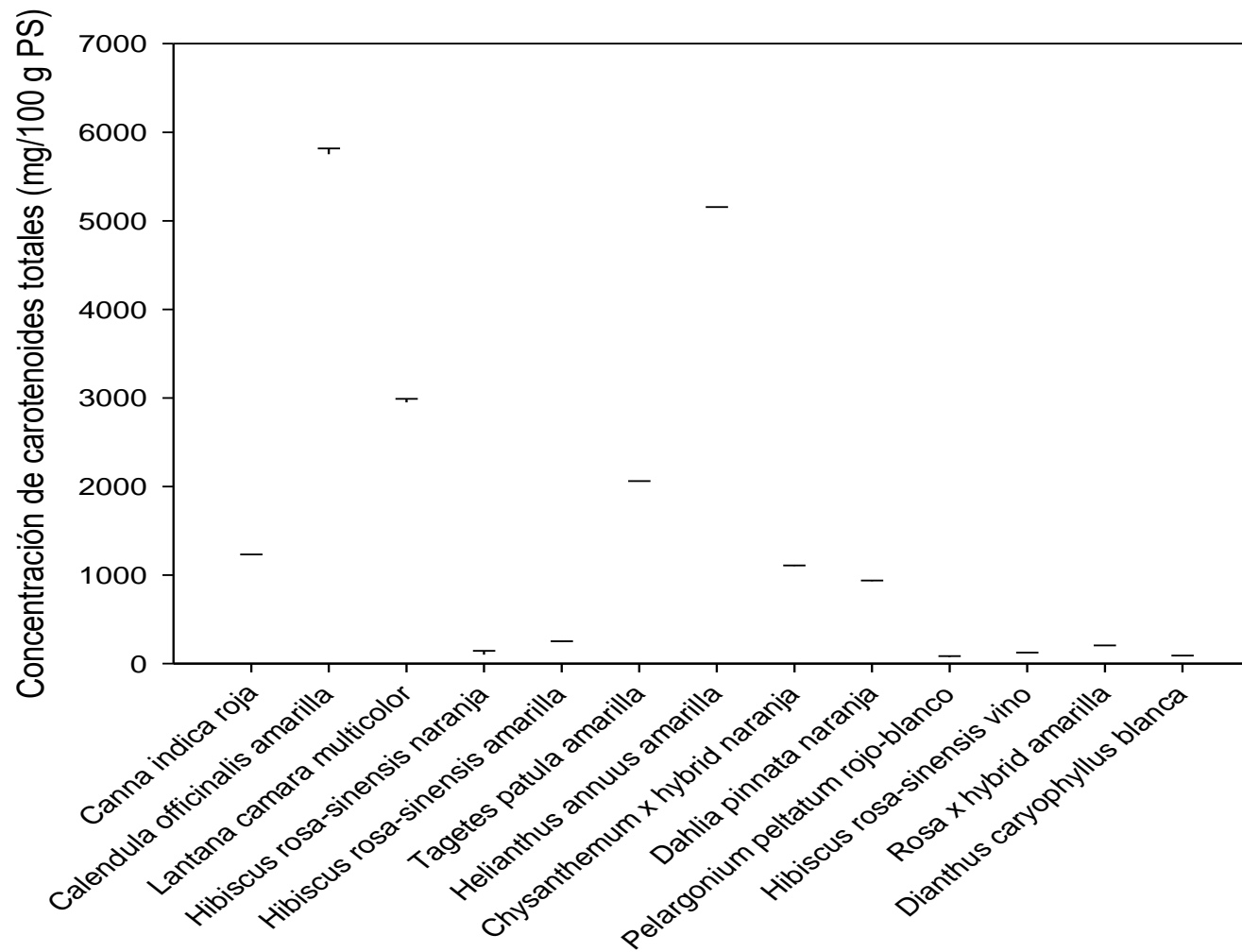


Figura No. 9 Concentración de carotenoides totales de las flores comestibles con mayor concentración de carotenoides totales

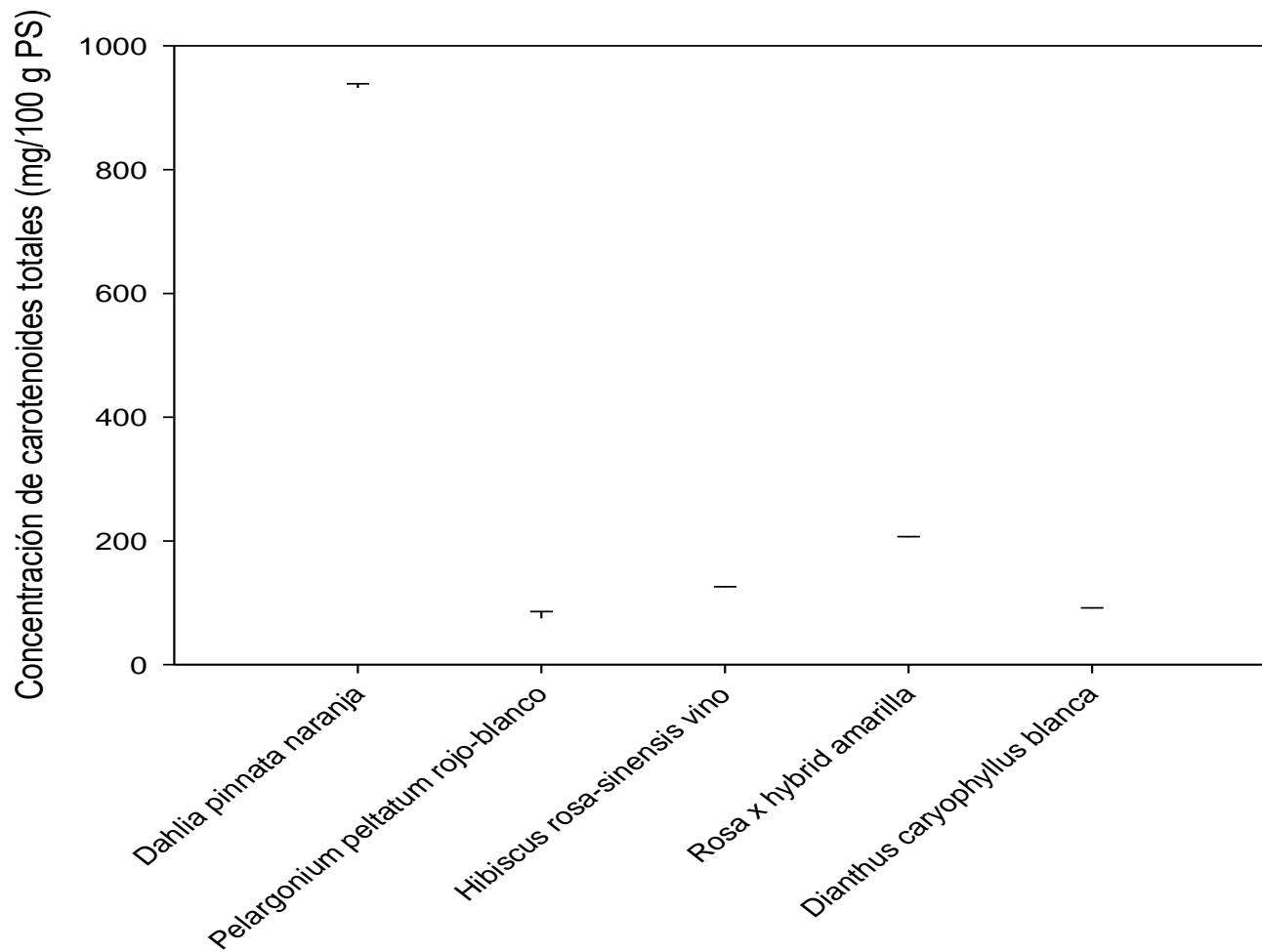


Figura No. 10 Concentración de carotenoides totales de las flores comestibles con mayor concentración de fenoles totales

5.2.1 Fenoles totales

En la Figura No. 11 se presenta la concentración de fenoles totales de las flores con altas concentraciones de carotenoides totales, mientras que en la Figura No.12 se presenta la concentración de fenoles totales de las flores en estudio con altas concentraciones de fenoles totales.

Los resultados de la Figura No.11 señalan que especies como la *Hibiscus rosa-sinensis* naranja e *Hibiscus rosa-sinensis* amarilla son fuentes importantes de fenoles con concentraciones superiores a los 300 mg EAG/100 g PS.

En la Figura No.12 que se exponen a especies que presentaron altas concentraciones de fenoles, presentaron concentraciones que superaron los 300 mg EAG/100 g PS. En este sentido especies como *Dahlia pinnata* naranja además de poseer altas concentraciones de carotenoides también posee altos valores de fenoles totales. Es así como, otros estudios en diferentes variedades de dalia mostraron una concentración de fenoles totales de 40 mg EAG/g (Lara et al., 2014). Estos valores resultaron ser mayores a los reportados en este estudio. Estos hallazgos pueden diferir debido al lugar de origen del cultivo, las condiciones de extracción de la muestra, entre otros (Coyago-Cruz, 2017).

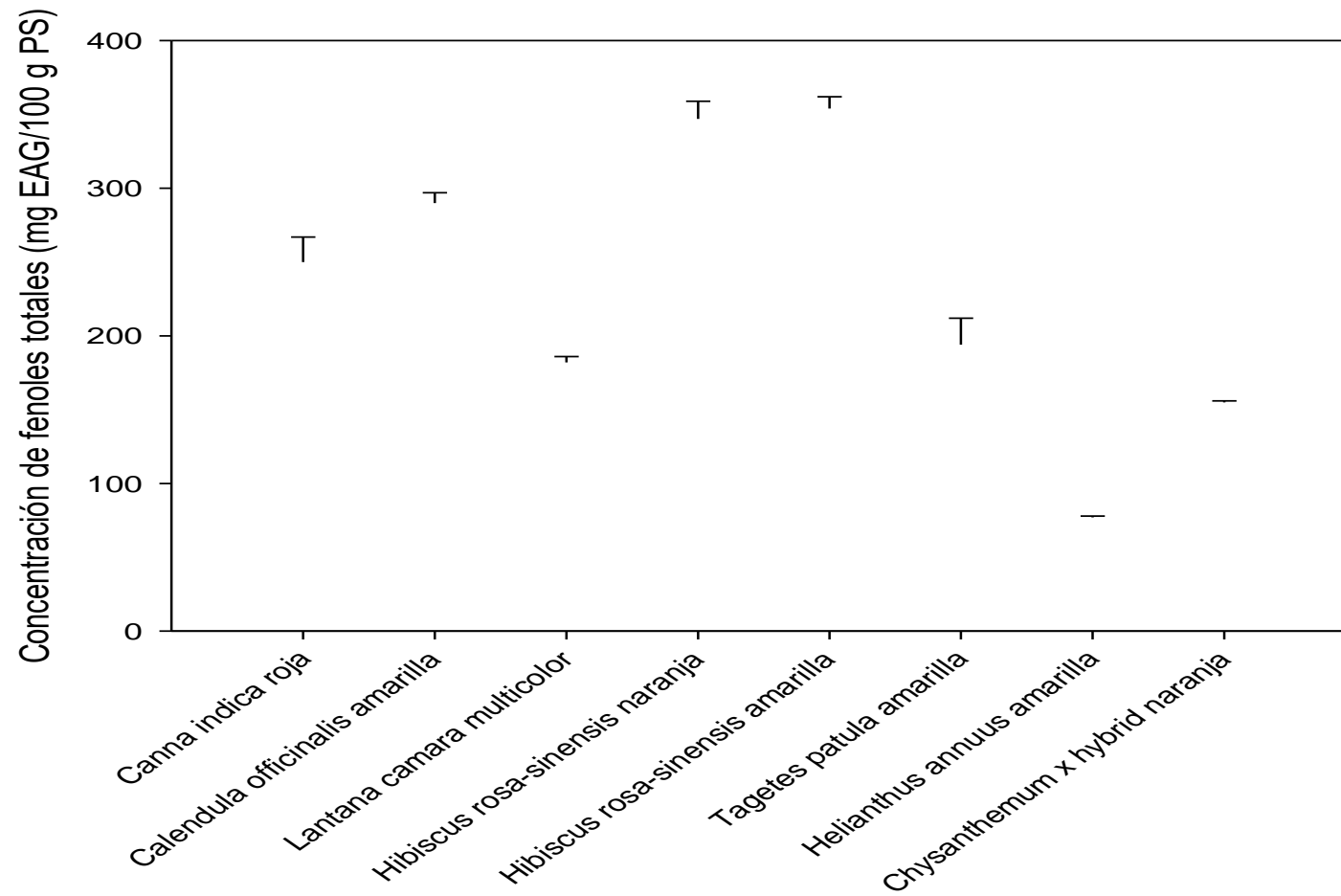


Figura No. 11 Concentración de fenoles totales de las flores comestibles con mayor concentración de carotenoides

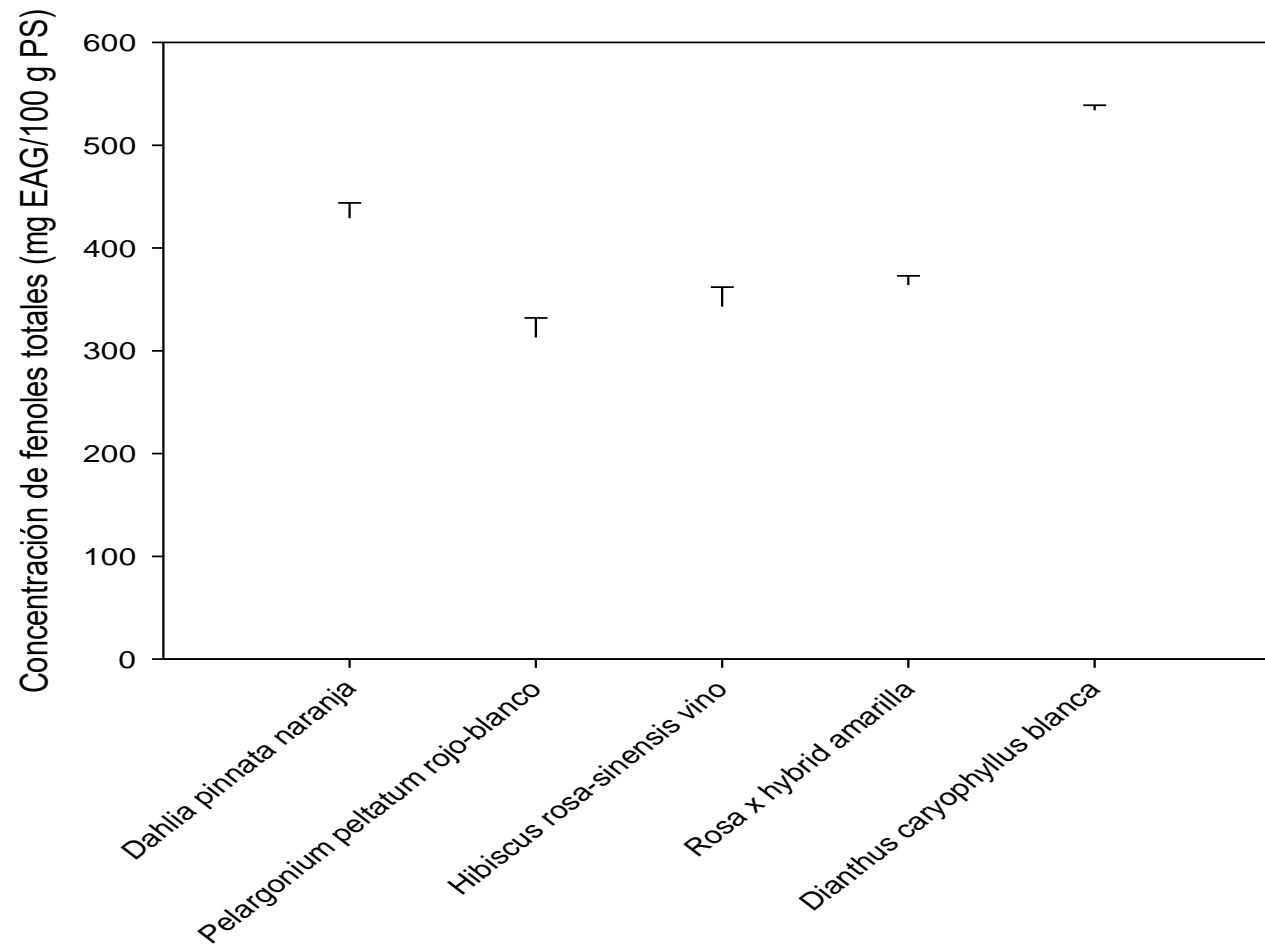


Figura No. 12 Concentración de fenoles totales de las flores comestibles con mayor concentración de fenoles totales

5.2 Determinación de la actividad antimicrobiana

5.2.1 Actividad antibacteriana

En la Tabla 2 se presenta la actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* de las flores en estudio.

Tabla 2 Actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* de las flores en estudio.

Muestra	Índice de inhibición <i>E. coli</i>	Categoría
<i>Canna indica</i> roja	0,0	Resistente
<i>Lantana camara</i> multicolor	0,0	Resistente
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> naranja	0,3	Resistente
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> amarilla	0,0	Resistente
<i>Tagetes patula</i> amarilla	0,3	Resistente
<i>Helianthus annuus</i> amarilla	0,0	Resistente
<i>Chysanthemum x hybrid</i> naranja	0,0	Resistente
<i>Pelargonium peltatum</i> rojo-blanco	0,6	Intermedia
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> vino	0,0	Resistente
<i>Rosa x hybrid</i> amarilla	0,5	Intermedia

Los resultados mostraron que especies como *Rosa x hybrid* amarilla al igual que *Pelargonium peltatum* rojo-blanco, mostraron una intermedia actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*. Estos resultados fueron similares a los encontrados por otros autores, en los que señala que la *Rosa rugosa* presenta actividad frente a este microorganismo. Además, resultó ser diferente en *Hibiscus sabdariffa* que según otros autores presenta inhibición

del microorganismo, sin embargo, en este estudio no se mostró inhibición (Prabawati et al., 2021). Otros autores mostraron también inhibición en *Hibiscus* (Lin et al., 2019). La diferencia puede deberse al método de extracción utilizado por los otros autores, así como la concentración y fases móviles aplicadas.

En la Tabla 3 se presenta la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* de las flores en estudio. Los resultados mostraron que especies como *Pelargonium peltatum* rojo-blanco, al igual que *Rosa x hybrid* amarilla, mostraron una intermedia actividad antibacteriana frente a *S. aureus*. Estos resultados fueron similares a los encontrados por otros autores, en los que señala que la *Rosa rugosa* presenta actividad frente a este microorganismo (Prabawati et al., 2021). Al igual que en el caso de *Hibiscus*, estudiada por otros autores (Lin et al., 2019).

Tabla 3 Actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* de las flores en estudio

Muestra	Índice de inhibición <i>S. aureus</i>	Categoría
<i>Canna indica</i> roja	0,0	Resistente
<i>Lantana camara</i> multicolor	0,5	Intermedia
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> naranja	0,5	Intermedia
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> amarilla	0,5	Intermedia
<i>Tagetes patula</i> amarilla	0,6	Intermedia
<i>Helianthus annuus</i> amarilla	0,4	Resistente
<i>Chysanthemum x hybrid</i> naranja	0,5	Intermedia
<i>Pelargonium peltatum</i> rojo-blanco	0,7	Intermedia
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> vino	0,0	Resistente
<i>Rosa x hybrid</i> amarilla	0,7	Intermedia

En la Tabla 4, se presenta la actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* de las flores en estudio. Los resultados mostraron que especies como *Lantana camara* multicolor al igual que *Pelargonium peltatum* rojo-blanco, mostraron una intermedia actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa*.

Tabla 4 Actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* de las flores en estudio

Muestra	Índice de inhibición <i>P. aeruginosa</i>	Categoría
<i>Canna indica</i> roja	0,0	Resistente
<i>Lantana camara</i> multicolor	0,6	Intermedia
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> naranja	0,5	Intermedia
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> amarilla	0,0	Resistente
<i>Tagetes patula</i> amarilla	0,3	Resistente
<i>Helianthus annuus</i> amarilla	0,0	Resistente
<i>Chysanthemum x hybrid</i> naranja	0,2	Resistente
<i>Pelargonium peltatum</i> rojo-blanco	0,7	Intermedia
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> vino	0,0	Resistente
<i>Rosa x hybrid</i> amarilla	0,5	Intermedia

En la Tabla 5 se presenta la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* de las flores en estudio. Los resultados mostraron que especies como *Pelargonium peltatum* rojo-blanco mostró una intermedia actividad antibacteriana frente a *S. mutans*. Es así como, los resultados para

Rosa e *Hibiscus* fueron diferentes a los encontrados por otros autores, que mostraron inhibición frente a este microorganismos en las dos especies (Prabawati et al., 2021).

Tabla 5 Actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* de las flores en estudio

Muestra	Índice de inhibición <i>S. mutans</i>	S. Categoría
<i>Canna indica</i> roja	0,0	Resistente
<i>Lantana camara</i> multicolor	0,0	Resistente
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> naranja	0,4	Resistente
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> amarilla	0,0	Resistente
<i>Tagetes patula</i> amarilla	0,6	Intermedia
<i>Helianthus annuus</i> amarilla	0,5	Resistente
<i>Chysanthemum x hybrid</i> naranja	0,0	Resistente
<i>Pelargonium peltatum</i> rojo-blanco	0,7	Intermedia
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> vino	0,6	Intermedia
<i>Rosa x hybrid</i> amarilla	0,0	Resistente

5.2.2 Actividad antifúngica

En la Tabla 6 se presenta la actividad antifúngica frente a *Candida albicans* de las flores en estudio. Es así como, las flores de *Chrysanthemum x hybrid* naranja y *Pelargonium peltatum* rojo-blanco mostraron actividad antifúngica frente a este microorganismo. A su vez, los resultados en *Hibiscus* presentaron diferencias con los resultados reportados por otros autores quienes señalan que esta especie presenta inhibición frente a *C.albicans* (Lin et al., 2019).

Tabla 6 Actividad antifúngica frente a *Candida albicans* de las flores en estudio

Muestra	Índice de inhibición <i>C. albicans</i>	Categoría
<i>Canna indica</i> roja	0,0	Resistente
<i>Lantana camara</i> multicolor	0,0	Resistente
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> naranja	0,0	Resistente
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> amarilla	0,0	Resistente
<i>Tagetes patula</i> amarilla	0,0	Resistente
<i>Helianthus annuus</i> amarilla	0,0	Resistente
<i>Chysanthemum x hybrid</i> naranja	0,9	Intermedia
<i>Pelargonium peltatum</i> rojo-blanco	0,5	Intermedia
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> vino	0,0	Resistente
<i>Rosa x hybrid</i> amarilla	0,0	Resistente

En la Tabla 7 se presenta la actividad antifúngica frente a *Candida tropicalis* de las flores en estudio. Es así como especies como *Pelargonium peltatum* rojo-blanco presentó una inhibición intermedia frente a este microorganismo.

Tabla 7 Actividad antifúngica frente a *Candida tropicalis* de las flores en estudio

Muestra	Índice de inhibición <i>C. tropicalis</i>	Categoría
<i>Canna indica</i> roja	0,0	Resistente
<i>Lantana camara</i> multicolor	0,0	Resistente
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> naranja	0,0	Resistente
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> amarilla	0,0	Resistente
<i>Tagetes patula</i> amarilla	0,0	Resistente
<i>Helianthus annuus</i> amarilla	0,0	Resistente
<i>Chysanthemum x hybrid</i> naranja	0,0	Resistente
<i>Pelargonium peltatum</i> rojo-blanco	0,5	Intermedia
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> vino	0,0	Resistente
<i>Rosa x hybrid</i> amarilla	0,0	Resistente

6. Conclusiones

1. Las flores se han empleado desde tiempos antiguos en la alimentación, sin embargo, hasta la actualidad aún faltan estudios para dilucidar el valor real de las mismas. Es así como especies como *Calendula officinalis* amarilla, *Helianthus annuus* amarilla y *Dahlia pinnata* naranja mostraron concentraciones superiores a 1000 mg de carotenoides totales/ 100 g PS.
2. Las especies vegetales son una fuente importante de compuestos fenólicos los cuales en la mayoría de los casos son los responsables de las diferentes actividades biológicas que presentan ciertas especies. Es así como el *Hibiscus rosa-sinensis* naranja y amarillo presentaron concentraciones de fenoles que superaron los 300 mg EAG/100 g PS.
3. La resistencia frente a ciertos microorganismos es un problema mundial, sin embargo, la búsqueda de nuevas especies que contribuyan a esta lucha es necesario. En este sentido se presentó una inhibición intermedia en especies como el *Pelargonium peltatum* frente a *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, y *S. mutans* y *Rosa x hybrid* frente *S. aureus*.
4. Las infecciones fúngicas han sobrepasado los límites debido al mal uso de antifúngicos, por lo que es indispensable poseer nuevas alternativas frente a esta lucha. En este sentido, se presentó una inhibición intermedia en especies como *Chrysanthemum x hybrid* frente a *Candida albicans* y *Pelargonium peltatum* frente a *Candida tropicalis*.

Referencias

- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A. 8., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2021). Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & Function*, 12(1), 14–29. <https://doi.org/10.1039/D0FO02324H>
- Artasensi, A., Mazzotta, S., & Fumagalli, L. (2021). Back to basics: Choosing the appropriate surface disinfectant. *Antibiotics*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060613>
- Ayyagari, A., Gandhi, S., & Gupta, S. (2009). Gram Positive Bacteria Encountered in Infectious Diseases – an Update. *ICMR Bulletin*, 39(1), 1–20.
- Balasubramaniam, B., Prateek, Ranjan, S., Saraf, M., Kar, P., Singh, S. P., Thakur, V. K., Singh, A., & Gupta, R. K. (2021). Antibacterial and Antiviral Functional Materials: Chemistry and Biological Activity toward Tackling COVID-19-like Pandemics. *ACS Pharmacology and Translational Science*, 4(1), 8–54. <https://doi.org/10.1021/acspsci.0c00174>
- Baliga, M. S., Shivashankara, A. R., Haniadka, R., Dsouza, J., & Bhat, H. P. (2011). Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam (jackfruit): A review. *Food Research International*, 44(7), 1800–1811. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.02.035>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2015.11.005>
- Baqer, S. H., Al-Shawi, S. G., & Al-Younis, Z. K. (2024). Quercetin, the Potential Powerful Flavonoid for Human and Food: A Review. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 16(3), 30. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1603030>
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M.

R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>

Chaudhary, M. (2023). *Evolución de la producción de uva en el departamento de La Libertad, Perú. | Download Scientific Diagram.*
https://www.researchgate.net/figure/Evolucion-de-la-produccion-de-uva-en-el-departamento-de-La-Libertad-Peru_fig1_354456671

Choi., Kim, J. K., Yoon, J., Lim, J., Kim, K., Kim, B., Park, C. H., Sathasivam, R., Kwon, S. J., & Park, S. U. (2024). Identification of metabolite changes and evaluation of biological activities in edible flowers of *Magnolia kobus* at different developmental stages. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s40538-024-00625-6>

Choi, H. Y., Lee, Y. J., Kim, C. M., & Young-Mi Lee. (2024). *Revolutionizing Cosmetic Ingredients : Harnessing the Power of.*

Corbacho, J., Inês, C., Paredes, M. A., Labrador, J., Cordeiro, A. M., & Gomez-Jimenez, M. C. (2019). Regulation of sterol content and biosynthetic gene expression during flower opening and early fruit development in olive. *Physiologia Plantarum*, 167(4), 526–539. <https://doi.org/10.1111/ppl.12969>

Coyago-Cruz, E. (2017). *Estudio sobre el contenido en carotenoides y compuestos fenólicos de tomates y flores en el contexto de la alimentación funcional* [Tesis doctoral]. Universidad de Sevilla, Departamento de Ciencias Agroforestales.

Coyago-Cruz, E., Moya, M., Méndez, G., Villacís, M., Rojas-Silva, P., Corell, M., Mapelli-Brahm, P., Vicario, I., & Meléndez-Martínez, A. (2023). Exploring plants with flowers : From therapeutic nutritional benefits to innovative sustainable uses. *Foods*, 12(4066), 67. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods12224066>

Du, Y., Fu, X., Chu, Y., Wu, P., Liu, Y., Ma, L., Tian, H., & Zhu, B. (2022).

Biosynthesis and the Roles of Plant Sterols in Development and Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4).

<https://doi.org/10.3390/ijms23042332>

Feizy, J., & Reyhani, N. (2016). *Gas Chromatographic Determination of Phytosterols and Fatty Acids Profile in Saffron Petals*. 4(3), 389–397.

<https://doi.org/10.13179/canchemtrans.2016.03.0329>

Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J. A., Saraiva, J. A., & Ramalhosa, E. (2017).

Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 38–50. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2017.03.017>

Fu, M., Qu, Q., & Dai, H. (2015). Variation in antioxidant properties and metabolites during flower maturation of Flos Lonicerae Japonicae flowers.

European Food Research and Technology, 240(4), 735–741.

<https://doi.org/10.1007/S00217-014-2378-6/METRICS>

Gupta, A., Marquess, A. R., Pandey, A. K., & Bishayee, A. (2023). Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) in health and disease: a critical review.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 63(23), 6344–6378.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2031094>

Jung, Y. S., Weon, J. B., Yang, W. S., Ryu, G., & Ma, C. J. (2018).

Neuroprotective effects of Magnoliae Flos extract in mouse hippocampal neuronal cells. *Scientific Reports*, 8(1), 1–6.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-28055-z>

Kumari, P., Ujala, & Bhargava, B. (2021). Phytochemicals from edible flowers:

Opening a new arena for healthy lifestyle. *Journal of Functional Foods*, 78,

104375. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2021.104375>

Lakhani, P., Patil, A., & Majumdar, S. (2019). Challenges in the Polyene- and Azole-Based Pharmacotherapy of Ocular Fungal Infections. *Journal of*

Ocular Pharmacology and Therapeutics, 35(1), 6–22.

<https://doi.org/10.1089/jop.2018.0089>

- Lara, E., Martín, O., Osorio, P., Barrera, L., Sánchez, J., & Bautista, S. (2014). Actividad antioxidante, composición nutrimental y funcional de flores comestibles de dalia. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, *20*(1), 101–116. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2013.07.024>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *148*, 80–89. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2020.01.006>
- Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C. L., Pereira, C., Abreu, R. M. V., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Barros, L., Bredol, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, *128*, 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.059>
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, *74*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- Meléndez-Martínez, A., Benítez, A., Corell, M., Hernanz, D., Mapelli-Brahm, P., Stinco, C., & Coyago-Cruz, E. (2021). Screening for innovative sources of carotenoids and phenolic antioxidants among flowers. *Foods*, *10*(2625), 1–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods10112625>
- Meléndez-Martínez, A. J., Böhm, V., Borge, G. I. A., Cano, M. P., Fikselová, M., Gruskiene, R., Lavelli, V., Loizzo, M. R., Mandić, A. I., Brahm, P. M., Mišan, A., Pinteá, A. M., Sereikaitė, J., Vargas-Murga, L., Vlaisavljević, S. S., Vulić, J. J., & O'Brien, N. M. (2021). Carotenoids: Considerations for Their Use in Functional Foods, Nutraceuticals, Nutricosmetics, Supplements, Botanicals, and Novel Foods in the Context of Sustainability, Circular Economy, and Climate Change. *Annual Review of Food Science and Technology*, *12*, 433–460. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-062220-013218>

- Meléndez Martínez, A., Mandić, A., Bantis, F., Böhm, V., Borge, G. I., Brnčić, M., Bysted, A., Cano, M. P., Dias, M. G., Elgersma, A., Fikselová, M., García-Alonso, J., Giuffrida, D., Gonçalves, V. S. S., Hornero-Méndez, D., Kljak, K., Lavelli, V., Manganaris, G. A., Mapelli-Brahm, P., ... O'Brien, N. (2022). A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: status quo, applications, patents, and research needs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(8), 1999–2049. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1867959/ASSET/531327C2-67CB-4DF5-998F-6414F9DFD979/ASSETS/IMAGES/BFSN_A_1867959_F0003_B.JPG
- Ni, W., Shao, X., Di, X., Cui, J., Wang, R., & Liu, Y. (2015). In vitro synergy of polymyxins with other antibiotics for *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2014.10.002>
- Pereira, A. G., Fraga-Corral, M., Silva, A., Barroso, M. F., Grosso, C., Carpena, M., Garcia-Perez, P., Perez-Gregorio, R., Cassani, L., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2024). Unraveling the Bioactive Potential of *Camellia japonica* Edible Flowers: Profiling Antioxidant Substances and In Vitro Bioactivity Assessment. *Pharmaceuticals*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ph17070946>
- Pipit, M., Dyah, A., Sukma, S. N., Tommy, H., & Setiana, S. W. S. T. (2020). 濟無No Title No Title No Title. *Journal GEEJ*, 7(2).
- Pires, Di Gioia, F., Roupheal, Y., Ferreira, I. C. F. R., Caleja, C., Barros, L., & Petropoulos, S. A. (2021). The compositional aspects of edible flowers as an emerging horticultural product. *Molecules*, 26(22), 1–31. <https://doi.org/10.3390/molecules26226940>
- Pires, T. C. S. P., Dias, M. I., Barros, L., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Research International*, 105, 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.014>

- Quinto, E. J., Caro, I., Villalobos-Delgado, L. H., Mateo, J., De-Mateo-silleras, B., & Redondo-Del-río, M. P. (2019). Food safety through natural antimicrobials. *Antibiotics*, *8*(4), 1–30.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics8040208>
- Ranasinghe, R. A. S. N., Maduwanthi, S. D. T., & Marapana, R. A. U. J. (2019). Nutritional and Health Benefits of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.): A Review. *International Journal of Food Science*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/4327183>
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, *4*(3), 482–501.
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Saini, R. K., Ahn, H. Y., Park, G. W., Shin, J. W., Lee, J. H., Yu, J. W., Song, M. H., Keum, Y. S., & Lee, J. H. (2023). Quantitative Profiling of Carotenoids, Tocopherols, Phytosterols, and Fatty Acids in the Flower Petals of Ten Marigold (*Tagetes* spp. L.) Cultivars. *Foods*, *12*(19).
<https://doi.org/10.3390/foods12193549>
- Smith, M. A. (2005). Antibiotic resistance. *Nursing Clinics of North America*, *40*(1), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2004.08.006>
- Su, P. A., Li, S. L., Tang, H. J., Chen, C. C., Lu, Y. C., Cheng, K. C., Lin, Y. C., Chuang, Y. C., & Lai, C. C. (2020). In vitro synergy of *Pongamia pinnata* extract in combination with antibiotics for inhibiting and killing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, *9*(3).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9030103>
- Sykes, J. E., & Rankin, S. C. (2013). Isolation and identification of aerobic and anaerobic bacteria. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 17–28.
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00003-X>
- Tubon, I., Rebeca, G., Naranjo, M., Silva, P. M., Liseth, G., & Altamirano, V. (2024). *La resistencia bacteriana en el Ecuador Bacterial resistance in Ecuador*. 43.

Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766.
<https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2021.10.020>

Ummah, M. S. (2019). Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 11, Issue 1).
http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1091/RED2017-Eng-8ene.pdf?sequence=12&isAllowed=y%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.regsciurbeco.2008.06.005%0Ahttps://www.researchgate.net/publication/305320484_SISTEM_PEMBETUNGAN_TERPUSAT_STRATEGI_MELESTARI

Weinstein, M. P., & Lewis, J. S. (2020). The clinical and laboratory standards institute subcommittee on Antimicrobial susceptibility testing: Background, organization, functions, and processes. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 58, Issue 3). <https://doi.org/10.1128/JCM.01864-19>

Wojtyczka, R. D., Dziejczak, A., Kępa, M., Kubina, R., Kabała-Dzik, A., Mularz, T., & Idzik, D. (2014). Berberine enhances the antibacterial activity of selected antibiotics against coagulase-negative staphylococcus strains in vitro. *Molecules*, 19(5), 6583–6596.
<https://doi.org/10.3390/molecules19056583>