



# Bioactive properties of edible flowers with potential in the prevention and management of metabolic diseases and healthy ageing

Sonia Núñez Alonso

Tesis Doctoral en Ciencias de la Salud

Facultad de Ciencias de la Salud

Villanueva de Gállego, 2024





# Bioactive properties of edible flowers with potential in the prevention and management of metabolic diseases and healthy ageing

Sonia Núñez Alonso

Tesis Doctoral en Ciencias de la Salud

Facultad de Ciencias de la Salud

Villanueva de Gállego, 2024





**USJ**

**FACULTAD DE  
CIENCIAS DE  
LA SALUD**

**Dr. Víctor López Ramos**, Profesor Titular de la Universidad San Jorge e Investigador principal del grupo de Investigación Phyto-Pharm.

**Dra. Carlota Gómez-Rincón**, Profesora Titular de la Universidad San Jorge e Investigadora del grupo de Investigación Phyto-Pharm.

**Dra. Marta Sofía Valero Gracia**, Profesora Titular de la Universidad de Zaragoza e Investigadora del grupo de Investigación Phyto-Pharm.

#### **CERTIFICAN**

Que el trabajo de investigación recogido en la presente Tesis titulada: “***Bioactive properties of edible flowers with potential in the prevention and management of metabolic diseases and healthy ageing***”, presentada en la Universidad San Jorge, ha sido realizado bajo su dirección, por Dña. Sonia Núñez Alonso y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor con Mención Internacional.

Y para que conste, firmamos el presente certificado en Villanueva de Gállego (Zaragoza), a 11 de noviembre de 2024.

Fdo. Víctor López

Fdo. Carlota Gómez-Rincón

Fdo. Marta Sofía Valero



# AGRADECIMIENTOS



Agradecer en primer lugar a la Universidad San Jorge la oportunidad de realizar el doctorado en Ciencias de la Salud.

Al Banco Sabadell por la concesión de la beca predoctoral de formación de investigadores con la cual pude iniciar mi doctorado.

A Industrias Químicas del Ebro, por la concesión del contrato predoctoral con el cual pude continuar mi doctorado y finalizar las investigaciones necesarias para que esta tesis doctoral viera la luz.

A la beca Erasmus+, gracias por permitirme realizar mi estancia en Italia.

A mis tres directores les quiero expresar mi más sincero agradecimiento, sin vuestro apoyo, orientación y constante motivación este proyecto no hubiera sido posible.

En primer lugar, a Carlota, mi tutora desde hace 10 años. Gracias por abrirme las puertas a la investigación, por cuidarme y ayudarme siempre que lo he necesitado. Eres un rayo de luz y en ocasiones un autentico vendaval, pero siempre me has aportado claridad y comprensión.

A Marta Sofía, la mejor compañera y maestra. Gracias por darme lecciones tanto en el campo de la ciencia como de la vida en general. En seguida te convertiste en una gran amiga. Me has enseñado la importancia de cuidar cada detalle, y que siempre es un buen momento para una croqueta.

A Víctor, gracias por la confianza puesta en mí a cada paso. Tu liderazgo y visión han sido esenciales para el desarrollo de esta tesis, has sido un faro guía en momentos de decisión y sé que siempre puedo confiar en ti para caminar en la dirección adecuada.

A los tres, gracias por haber creído en mí y por haber sido el equipo de mentores que cualquier doctorando desearía tener.

Al resto del grupo Phyto-Pharm, gracias a mis predecesores por la ayuda y el apoyo. Por la armonía y el buen ambiente que desde el minuto cero experimenté con todos vosotros. Especial mención a Cris por introducirme en el precioso mundo de los gusis, y a Guille por sacarme siempre una sonrisa.

A los técnicos de laboratorio, todos los que habéis compartido horas de trabajo conmigo, gracias por las risas, por la ayuda, por la compañía. Silvia, Marta, Cris, las Andreas, Ángela, y en especial Adri, que pasó al lado oscuro y se ha convertido en un gran compañero y amigo.

A mis buenos amigos de Camerino, gracias a Filippo y Giovanni por acogerme y cuidarme, a mis chicas italianas Marta, Cecilia, Agnese y Eleonora por enseñarme tanto dentro y fuera del CHIP, y por ser las mejores profesoras de italiano.

A mis compañeras de viaje, Pilar y Zuli. Gracias por estar siempre disponibles para escuchar, desconectar, cotillear, comer sushi,... simplemente gracias por aconsejarme y darme la mano cuando más lo necesitaba. Sois el mejor apoyo que podía haber deseado para esta complicada senda y vuestra amistad una de las mayores satisfacciones que me llevo.

A mis amigos, sois de las cosas mas bonitas que he encontrado en la vida. Gracias por estar siempre ahí, por ser mi lugar seguro y entenderme cuando yo misma muchas veces no lo hago.

A Celia, mi hermana de otra madre, mi incondicional roca, simplemente gracias por ser tú.

A mi hermano, el mejor que podría haber tenido.

A mis padres, gracias por ser el mejor ejemplo y por darme todo en esta vida.

A mis abuelos, por darme las enseñanzas vitales más importantes que jamás tendré.

Gracias en definitiva a todos los que me han acompañado de una manera y otra en este viaje.

# ÍNDICE



<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>1. ENFERMEDADES NO TRANSMISIBLES Y SÍNDROME METABÓLICO</b> .....	<b>11</b>
1.1 Obesidad .....	15
1.2 Diabetes mellitus .....	20
1.3 Obesidad y diabetes: diabetesidad .....	27
1.4 Hipertensión arterial .....	30
1.5 Los efectos tóxicos del exceso de glucosa en el organismo .....	34
<b>2. ENVEJECIMIENTO SALUDABLE</b> .....	<b>39</b>
2.1 Envejecimiento y enfermedades no transmisibles .....	41
2.2 El envejecimiento oxidativo-inflamatorio: Oxi-inflamm-ageing .....	41
<b>3. LA PREVENCIÓN FRENTE AL TRATAMIENTO</b> .....	<b>43</b>
<b>4. FLORES COMESTIBLES</b> .....	<b>45</b>
4.1 Fitoquímicos de las flores comestibles .....	48
4.2 Métodos de extracción y análisis de fitoquímicos en flores comestibles .....	52
4.3 Potencial nutracéutico de las flores comestibles .....	54
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>56</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>73</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>77</b>
<b>MATERIALES EMPLEADOS</b> .....	<b>81</b>
<b>RESULTADOS: Publicaciones aportadas</b> .....	<b>87</b>
<b>ARTÍCULO 1:</b> Volatile composition, antidiabetic, and anti-obesity potential of <i>Brassica incana</i> leaf and flowering top extracts .....	<b>91</b>
<b>ARTÍCULO 2:</b> Flowers of <i>Allium cepa</i> L. as nutraceuticals: phenolic composition, anti-obesity and antioxidant effects in <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	<b>101</b>
<b>ARTÍCULO 3:</b> Lipid lowering and anti-ageing effects of edible flowers of <i>Viola x wittrockiana</i> Gams in a <i>Caenorhabditis elegans</i> obese model .....	<b>119</b>

<b>ARTÍCULO 4:</b> Antidiabetic and anti-obesity properties of a polyphenol-rich flower extract from <i>Tagetes erecta</i> L. and its effects on <i>Caenorhabditis elegans</i> fat storages .....	<b>133</b>
<b>ARTÍCULO 5:</b> Ultrasound Assisted Extraction (UAE) versus traditional Soxhlet apparatus for the obtention of polyphenols, carotenoids and tocopherols from <i>Tagetes erecta</i> L. flowers .....	<b>149</b>
<b>ARTÍCULO 6:</b> Vasorelaxant effects of edible flowers <i>Tagetes erecta</i> L. and its possible action mechanism as a hypotensive agent .....	<b>175</b>
<b>RESUMEN DE RESULTADOS</b> .....	<b>205</b>
<b>1. PERFIL FITOQUÍMICO</b> .....	<b>208</b>
<b>2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>209</b>
<b>2.1 Ensayos <i>in vitro</i></b> .....	<b>209</b>
<b>2.2 Ensayos <i>in vivo</i></b> .....	<b>210</b>
<b>3. ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA Y ANTI-OBESIDAD</b> .....	<b>212</b>
<b>3.1 Ensayos <i>in vitro</i></b> .....	<b>212</b>
<b>3.2 Ensayos <i>in vivo</i>: modelo obeso de <i>C. elegans</i></b> .....	<b>213</b>
<b>4. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA</b> .....	<b>218</b>
<b>4.1 Ensayos <i>ex vivo</i>: miografía</b> .....	<b>218</b>
<b>5. ACTIVIDAD ANTIENVEJECIMIENTO</b> .....	<b>221</b>
<b>5.1 Ensayos <i>in vivo</i></b> .....	<b>121</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>225</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>237</b>
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b> .....	<b>247</b>
<b>ANEXOS: Aceptación Coautores de Publicaciones Aportadas</b> .....	<b>253</b>

---

## **LISTADO DE ABREVIATURAS**

---

**ACV:** accidente cerebrovascular

**ADNI:** antidiabéticos no insulínicos

**AEMPS:** Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

**AGEs:** productos finales de glicación avanzada

**AMG:** aminoguanidina

**arGIP:** agonista de los receptores del polipéptido insulínico

**aGLP-1:** análogo del péptido similar al glucagón

**BK<sub>Ca</sub>:** canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de elevada conductancia

**CGC:** Caenorhabditis Genetics Center

**DM1:** diabetes mellitus tipo 1

**DM2:** diabetes mellitus tipo 2

**DPP-4:** dipeptil peptidasa 4

**ECV:** enfermedad cardiovascular

**EMA:** European Medicine Agency, Agencia Europea del Medicamento

**ENTs:** Enfermedades no transmisibles

**EPOC:** enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**EROS:** especies reactivas de oxígeno

**EVAS:** esperanza de vida ajustada por salud

**FDA:** Food and Drug Administration

**HbA<sub>1c</sub>:** hemoglobina glicosilada

**HTA:** hipertensión arterial

**I<sub>CaL</sub>:** canales de Ca<sup>2+</sup> de tipo L

**IK<sub>Ca</sub>:** canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de media conductancia

**IMC:** índice de masa corporal

**K<sub>ATP</sub>:** canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP

**KCl:** cloruro de potasio

**K<sub>IR</sub>**: canales de K<sup>+</sup> rectificadores internos

**K<sub>V</sub>**: canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje

**MAE**: extracción asistida por microondas

**MLC**: cadena ligera de miosina

**NAFLD**: enfermedad de hígado no graso

**NGM**: nematode growth media (medio de cultivo *C. elegans*)

**NO**: óxido nítrico

**OMS**: organización mundial de la salud

**PE**: fenilefrina

**PKC**: proteína quinasa C

**RAGE**: receptor de productos finales de glicación avanzada

**RI**: Resistencia insulínica

**SK<sub>Ca</sub>**: canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de pequeña conductancia

**SGLT-2**: transportador de sodio-glucosa tipo 2

**SM**: síndrome metabólico

**UAE**: extracción asistida por ultrasonidos

**VDCC**: canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje

**VSMC**: células del músculo liso vascular

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

- Figura 1.** Diferencias en las causas de mortalidad en los años 2000 y 2019, por región y renta per cápita. *Adaptado de: WHO, 2022*..... **11**
- Figura 2.** Modelo del riesgo de padecer alguna enfermedad no transmisible a lo largo de la vida y la influencia de los distintos factores modificables y no modificables. Azul: trayectoria vital de bajo riesgo, rojo: trayectoria vital de elevado riesgo. *Adaptado de: Hanson, 2019*..... **12**
- Figura 3.** Fisiopatología del SM. *Adaptado de: Martín et al., 2005*..... **14**
- Figura 4.** Algunas de las principales comorbilidades asociadas a la obesidad. *Adaptado de: WHO, 2022*..... **17**
- Figura 5.** Algoritmo de tratamientos farmacológicos para el manejo de la obesidad. *Adaptado de: Caixàs et al, 2020*..... **19**
- Figura 6.** Fisiopatología de la DM2. *Adaptado de: Gómez Ramon et al, 2021*..... **21**
- Figura 7.** Estimación de la prevalencia DM2 global en adultos (20 - 79 años) en el año 2021. *Adaptado de: IDF, 2021*..... **22**
- Figura 8.** Criterios para el diagnóstico de la diabetes. HbA<sub>1c</sub>: Hemoglobina glicosilada; ITG: Intolerancia oral a la glucosa; IFG: Glucemia en ayunas alterada. *Adaptado de: IDF, 2021*..... **23**
- Figura 9.** Algoritmo simplificado del tratamiento de la diabetes mellitus 2. ADNI: antidiabético no insulínico; arGIP: agonista de los receptores del polipéptido insulino-trópico; aGLP-1: análogo del péptido similar al glucagón; HbA<sub>1c</sub>: hemoglobina glicosilada, iDPP4: inhibidor de la dipeptidil peptidasa; IMC: índice de masa corporal; iSGLT2: inhibidor del cotransportador de sodio y glucosa tipo 2; Met: metformina; Pio: pioglitazona. *Adaptado de: Fundación redGDPS, 2023*..... **26**
- Figura 10.** Hipótesis de la relación fisiopatológica entre obesidad y DM2. A) Hipótesis inflamatoria, B) hipótesis de exceso lipídico y C) hipótesis de las adipoquinas. IL-1: interleuquina tipo 1; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . *Adaptado de: Chadt et al, 2000*..... **28**
- Figura 11.** Hipertensión arterial y diabetes incrementan el riesgo de enfermedad cardiovascular al promover daño y modificación endotelial, cuyas consecuencias se ven

exacerbadas por la coexistencia de ambas patologías. <i>Adaptado de: Petrie, Guzik &amp; Touyz, 2018</i> .....	32
<b>Figura 12.</b> Algoritmo general del tratamiento de la hipertensión arterial. AB: bloqueante $\alpha$ -adrenérgico; ACA: antagonista canales de calcio; ARA-II: antagonista receptores angiotensina II; BB: bloqueante $\beta$ -adrenérgico; IECA: inhibidor enzima convertidora de angiotensina. <i>Adaptado de: Macia et al, 2023</i> .....	33
<b>Figura 13.</b> Enfermedades y alteraciones asociados al exceso de glucosa y su efecto tóxico. <i>Adaptado de: WHO, 2022</i> .....	34
<b>Figura 14.</b> Mecanismos por los que la glucosa intracelular genera toxicidad en el organismo. AGEs: productos finales de glicación avanzada; ATC: ácido tricarbóxico; EROS: especies reactivas de oxígeno; PKC: proteína quinasa C. <i>Adaptado de: Campos, 2012</i> .....	36
<b>Figura 15.</b> Esquema de los mecanismos endógenos de síntesis de AGEs. ág: ácidos grasos, aa: aminoácidos; EROS: especies reactivas de oxígeno. <i>Adaptado de: Gill et al, 2019; Nass et al, 2007</i> .....	37
<b>Figura 16.</b> Diferentes fuentes de origen de los productos finales de glicación (AGEs). <i>Adaptado de: Vlassara, 2005</i> .....	38
<b>Figura 17.</b> Papel de los fitoquímicos en la inhibición de formación de AGEs a través de la reducción de los niveles de glucosa. <i>Adaptado de Khangholi et al, 2016</i> .....	39
<b>Figura 18.</b> Estimación de la proporción de población mayor de 60 años por países para el año 2050. <i>Adaptado de: Almeida et al, 2016</i> .....	40
<b>Figura 19.</b> Mecanismos del oxi-inflamm-ageing. <i>Adaptado de: Romero Cabrera, 2015</i> . 43	
<b>Figura 20.</b> Estructura de una planta de <i>Tagetes erecta</i> . A) flores, B) hojas, C) tallo, D) raíces. <i>Adaptado de: Blanco, 1837</i> .....	45
<b>Figura 21.</b> Búsqueda del término “edible flower” en diversos motores de búsqueda bibliográfica. <i>Realización propia</i> .....	46
<b>Figura 22.</b> Clasificación de los metabolitos secundarios. *Pigmentos. <i>Realización propia</i> .....	49
<b>Figura 23.</b> Diferentes estructuras de polifenoles identificados en flores comestibles. <i>Adaptado de: Lu, Lin &amp; Yin, 2016; Zagoskina et al, 2023</i> .....	50
<b>Figura 24.</b> Estructuras de las diferentes formas de tocoferoles. <i>Adaptado de: Burton &amp; Ingold, 1981</i> .....	51

**Figura 25.** Estructuras de diferentes carotenoides. *Adaptado de: Chandra et al, 2022.* **52**

**Figura 26.** Imágenes de las cuatro especies de flores comestibles estudiadas en esta tesis doctoral. *Adaptado de: PI@ntNet, World Flora (2014-2024)*..... **55**

**Figura 27.** Esquema de los ensayos realizados durante el desarrollo de la Tesis Doctoral. *Realización propia*..... **85**

**Figura 28.** Inhibición de radicales libres mediante dos métodos: (A) DPPH y (B) xantina oxidasa. Ácido gálico sustancia control. (C) Inhibición no enzimática de la formación de AGEs. Resultados expresados como media  $\pm$  SEM. Se realizaron tres replicados independientes. AMG: aminoguanidina, sustancia control..... **179**

**Figura 29.** Producción de EROS en *C. elegans* (cepa SS104) tras la exposición durante 7 días a extracto de *T. erecta* amarillo (TA) extraído por Soxhlet (SOX) y UAE. Extractos estudiados a concentración 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 70 – 90 gusanos). Se realizaron tres replicados independientes. \* $p < 0,05$  Glucosa vs NGM; # $p < 0,05$  Glucosa vs Soxhlet; & $p < 0,05$ , && $p < 0,001$  Glucosa vs UAE..... **181**

**Figura 30.** Inhibición de enzimas relacionadas con la obesidad y DM2:  $\alpha$ -glucosidasa (A) y lipasa (B). Resultados expresados como media  $\pm$  SEM. Se realizaron tres replicados independientes. Acarbosa y orlistat como controles positivos..... **182**

**Figura 31.** Imágenes de fluorescencia y perfil de gotas lipídicas de *C. elegans* (cepa N2). Imágenes tomadas tras exposición a las diferentes condiciones, tinción con Nile Red y exposición a luz ultravioleta. Sólo se muestran imágenes de los extractos a la concentración 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Barra de escala = 120  $\mu\text{m}$ ..... **184**

**Figura 32.** Cuantificación del contenido lipídico en *C. elegans* (cepa N2) obeso tras la exposición a diversos extractos de flores comestibles. Control de referencia orlistat. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 80 - 100 gusanos). Se realizaron tres replicados independientes. \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs Glucosa; # $p < 0,05$ , ### $p < 0,0005$ , #### $p < 0,0001$  vs NGM; &&&& $p < 0,0001$  vs Orlistat..... **185**

**Figura 33.** Fluorescencia de *C. elegans* (cepa N2) tras exposición a las diferentes condiciones y ser alimentados por *E. coli*-GFP durante 48 horas. Extractos expuestos a concentración 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Control de referencia orlistat. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 30 - 40 gusanos). Se realizaron tres replicados independientes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  vs NGM; # $p < 0,05$ , ### $p < 0,0005$ , #### $p < 0,0001$  vs Glucosa..... **186**

**Figura 34.** Número de bombeos promedio de la faringe de *C. elegans* (cepa N2) durante 30 segundos. Extractos de flores expuestos a concentración 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 48 h. Los resultados se expresan como media + SEM (n = 50 - 70 gusanos). Control de referencia orlistat. Se realizaron tres replicados independientes. \*\*\* $p < 0,001$  vs NGM..... **187**

**Figura 35.** Efecto de los extractos de *T. erecta* amarillo (A) y naranja (B) sobre la tensión producida por diferentes concentraciones de angiotensina II (Ag-II,  $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  M) en anillos de aorta intactos. Verapamilo (V) como sustancia control. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6-8). \* $p$  <0,05 y \*\* $p$  <0,01 y \*\*\* $p$  <0,001 vs. control (disolvente solo)..... **189**

**Figura 36.** Efecto de la pre-incubación con apamina (AP,  $10^{-6}$  M), TRAM-34 ( $10^{-6}$  M), IbTX ( $3 \cdot 10^{-8}$  M), Glibenclamida (Glib,  $10^{-5}$  M), BaCl<sub>2</sub> ( $3 \cdot 10^{-5}$  M) y 4-aminopiridina (4-AP,  $10^{-1}$  M) de anillos intactos de aorta pre-contraídos con PE  $10^{-6}$  M, sobre la respuesta vaso-relajante de los extractos de *T. erecta* A) amarillo y B) naranja (0,3, 1 y 2 mg/mL). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6 - 8). \* $p$  <0,05; \*\* $p$  <0,01; \*\*\* $p$  <0,001 vs. control (extracto solo)..... **191**

**Figura 37.** Imágenes del pigmento fluorescente lipofuscina (A) y su cuantificación en *C. elegans* (cepa SS104) tras la exposición a diferentes condiciones a los días 7 y 10 de vida (B). Extractos de *V. x wittrockiana* expuesto a concentración 500  $\mu$ g/mL. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 30 – 40 gusanos). Se realizaron tres replicados independientes. \* $p$  <0,05; # $p$  <0,05 vs Glucosa 7; & $p$  <0,01, && $p$  <0,005 vs Glucosa 10..... **193**

**Figura 38.** Longitud *C. elegans* (cepa N2) en  $\mu$ m tras la exposición a diferentes condiciones durante 48h. Resultados expresados como media  $\pm$  SEM. (n = 80 - 100 gusanos). Tres replicados independientes fueron realizados. \*\*\*\* $p$  <0,0001 vs NGM; # $p$  <0,05, ## $p$  <0,001, ### $p$  <0,0005, #### $p$  <0,0001 vs Glucosa; && $p$  <0,001, &&& $p$  <0,0005; &&&& $p$  <0,0001 vs Orlistat..... **194**

**Figura 39.** Mecanismo de acción de las sustancias inhibidoras de las enzimas digestivas  $\alpha$ -glucosidasa (A y B) y lipasa (C y D). A) Rotura de polisacáridos y oligosacáridos en el intestino delgado en monosacáridos por la enzima, permitiendo su fácil absorción. B) Una sustancia ejerce inhibición competitiva sobre la  $\alpha$ -glucosidasa impidiendo la correcta digestión de los oligosacáridos y polisacáridos, resultado en menor absorción de monosacáridos y en reducción de los niveles de glucosa postprandial. C) Digestión de los triglicéridos en ácidos grasos simples por la lipasa pancreática para su absorción en la mucosa duodenal. D) Inhibición irreversible de la enzima lipasa pancreática que impide la digestión de los triglicéridos y reduce su absorción, resultando en su eliminación por heces. *Adaptado de: Arungarinathan, McKay & Fisher (2011); Chan et al (2021)*..... **200**

**Figura 40.** Variedad de daños fisiológicos producidos por las AGEs en el organismo. *Adaptado de: Chawla & Kumar Tripathi (2019); Lui et al (2022)*..... **202**

**Figura 41.** Diagrama del mecanismo de acción de la actividad vasodilatadora de *T. erecta* sobre el tejido endotelial. BK<sub>Ca</sub>: canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de elevada conductancia; I<sub>CaL</sub>: canales Ca<sup>2+</sup> de tipo L; IK<sub>Ca</sub>: canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de media conductancia; K<sub>ATP</sub>: canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP; K<sub>IR</sub>: canales de K<sup>+</sup> rectificadores internos; K<sub>V</sub>: canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje; SK<sub>Ca</sub>: canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de pequeña conductancia. *Realización propia*..... **207**



---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los distintos grados de obesidad y peso en función del IMC (Índice de Masa Corporal). <i>Adaptado de: Lecuebe et al, 2024</i> .....	<b>16</b>
<b>Tabla 2.</b> Principales características y diferencias de los dos principales tipos de diabetes mellitus. <i>Adaptado de: Anibaro &amp; Lachica, 2023</i> .....	<b>21</b>
<b>Tabla 3.</b> Resumen de los diferentes tipos de insulina exógena en función de su farmacocinética. <i>Adaptado de: Anibaro &amp; Lachica, 2023</i> .....	<b>26</b>
<b>Tabla 4.</b> Resumen fármacos aprobados anti-diabesidad en España. <i>Adaptado de: AEMPS, 2014; Chakhtoura et al, 2023; Jastreboff et al, 2022</i> .....	<b>29</b>
<b>Tabla 5.</b> Clasificación de los grados y categorías de hipertensión arterial. <i>Adaptado de: Mancía et al, 2023</i> .....	<b>31</b>
<b>Tabla 6.</b> Revisión sobre el uso comestible y terapéutico de diversas flores comestibles. Se marcan en verde las flores utilizadas en esta tesis doctoral. <i>Realización propia</i> .....	<b>47</b>
<b>Tabla 7.</b> Comparativa sobre las condiciones óptimas de diferentes métodos de extracción de fitoquímicos. <i>Adaptado de: Kumar et al, 2023</i> .....	<b>53</b>
<b>Tabla 8.</b> Cepas, genotipos y tipos de ensayos para los que fueron empleados <i>C. elegans</i> .....	<b>83</b>
<b>Tabla 9.</b> Potencia antioxidante y anti-glicante de los extractos de <i>T. erecta</i> , <i>V. x wittrockiana</i> , <i>A. cepa</i> y <i>B. incana</i> . Ácido gálico y aminoguanidina como controles positivos.....	<b>180</b>
<b>Tabla 10.</b> Capacidad anti-diabesidad de los extractos de flores comestibles.....	<b>183</b>
<b>Tabla 11.</b> Reducción del contenido lipídico expresado en porcentaje (%) obtenido por los distintos extractos de flores comestibles sobre <i>C. elegans</i> (cepa N2). Control de referencia orlistat.....	<b>185</b>
<b>Tabla 12.</b> Resumen de resultados de los ensayos <i>in vitro</i> .....	<b>195</b>



# RESUMEN



Las flores comestibles han ganado importancia en los últimos años como potencial fuente de moléculas biológicamente activas. Sus extractos, a través de la identificación de compuestos bioactivos, podrían ser beneficiosos en la prevención de patologías como la obesidad o la diabetes mellitus (DM), así como para prevenir la aparición de sus factores de riesgo asociados. Los beneficios generales de estas flores incluyen la promoción del envejecimiento saludable y la prevención de enfermedades no transmisibles (ENTs). El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar las propiedades antidiabéticas, anti-obesidad, antihipertensivas y antienvjecimiento de diversas flores comestibles: *Tagetes erecta* L., *Viola x wittrockiana* Gams., *Allium cepa* L., y *Brassica incana* Ten.

Nuestra investigación ha demostrado que las flores de *Brassica incana* son fuente de ingredientes funcionales con propiedades antidiabéticas y anti-obesidad. Se demostró por primera vez la capacidad de *B. incana* de inhibir enzimas digestivas clave, su capacidad antioxidante neutralizando radicales libres mediante el sistema xantina/xantina oxidasa, así como la capacidad de prevenir la formación de productos finales de glicación (AGEs). Las flores de *Allium cepa* mostraron *in vitro* significativa actividad antioxidante e inhibición de dianas terapéuticas relacionadas con obesidad y DM, incluidas lipasa y  $\alpha$ -glucosidasa, además de impedir la producción de AGEs. En el modelo *C. elegans*, *A. cepa* mostró efectos anti-obesidad reduciendo los niveles de depósitos de grasa, resaltando así su potencial como ingrediente funcional.

Las flores de *Viola x wittrockiana* demostraron efecto anti-obesidad y antienvjecimiento mediante la reducción de los niveles de grasa y la ingesta de bacteria en el modelo de *C. elegans* obeso. Fueron capaces además de mejorar marcadores relacionados con la calidad de vida como la reducción en la acumulación de lipofuscina, y de revertir efectos tóxicos producidos por el exceso de glucosa sobre el crecimiento y la progenie, respaldando su uso como nutraceuticos e ingredientes saludables.

Los extractos de flores de *Tagetes erecta*, ricos en compuestos bioactivos hidrosolubles como polifenoles, y liposolubles como carotenoides y tocoferoles, mostraron actividad frente a dianas terapéuticas de obesidad y diabetes *in vitro*, así como *in vivo* en el modelo obeso de *C. elegans*. Se demostró por primera vez el efecto vasorrelajante de *T. erecta*, de manera dosis dependiente, actuando principalmente de manera independiente al endotelio a través de la activación de canales de potasio, activación de la PKA y reducción del calcio citosólico a través del bloqueo de la entrada de calcio extracelular y su liberación desde el retículo sarcoplasmático. Además, la vía NO/GCs contribuye de manera parcial en la vasodilatación, pudiendo ser beneficioso su efecto en patologías relacionadas con la disfunción endotelial como la hipertensión arterial, DM o síndrome metabólico.

Todos estos hallazgos demuestran el potencial terapéutico de las flores comestibles como fuentes de compuestos bioactivos en la prevención y manejo de patologías metabólicas y cardiovasculares, impulsando su aplicación como nutraceuticos y alimentos funcionales.



# ABSTRACT



Edible flowers have gained attention as potential sources of biologically active molecules, and their extracts, through the identification of bioactive compounds, may aid in the prevention of obesity, diabetes mellitus (DM), as well as prevent the appearance of associated risk factors. The overall health benefits of these flowers include promoting healthy aging and helping prevent non-communicable diseases (NCDs). The main objective of this Doctoral Thesis has been to evaluate the antidiabetic, anti-obesity, antihypertensive, and anti-aging properties of selected edible flowers: *Tagetes erecta* L., *Viola x wittrockiana* Gams., *Allium cepa* L., and *Brassica incana* Ten.

Our findings have revealed that *Brassica incana* flowers are a novel source of functional ingredients with antidiabetic and anti-obesity properties. This study is the first to demonstrate the inhibitory effect of *B. incana* on key digestive enzymes and its radical-scavenging capacity via the xanthine/xanthine oxidase system, along with its inhibition of advanced glycation end-products (AGEs) formation. Additionally, *Allium cepa* flower extracts displayed significant *in vitro* antioxidant activity and inhibition of pharmacological targets for obesity and DM, including  $\alpha$ -glucosidase and lipase, and prevented AGE formation. *In vivo*, *A. cepa* exhibited anti-obesity effects, reducing fat deposits, highlighting its potential as a functional food ingredient.

*Viola x wittrockiana* flowers showed anti-obesity and anti-ageing effects by reducing lipid levels and bacterial ingestion in the obese *C. elegans* model. They also improved the quality-of-life markers, such as reduced lipofuscin accumulation and reversal of glucose-induced effects on growth and progeny, supporting their use as nutraceuticals and healthy ingredients.

Extracts from *Tagetes erecta* flowers, containing both water-soluble phytochemicals like polyphenols and lipid-soluble compounds such as carotenoids and tocopherols, showed activity against obesity and diabetes *in vitro*, as well as *in vivo* in the *C. elegans* obese model. This study is also the first to report a dose-dependent vasorelaxant effect of *T. erecta*, which acts independently of the endothelium via potassium channel activation, PKA activation, and reduced cytosolic calcium by blocking extracellular calcium entry and sarcoplasmic calcium release. Additionally, the NO/sGC pathway contributes partially to the vasorelaxant effect, potentially benefiting conditions associated with endothelial dysfunction, such as hypertension, DM, and metabolic syndrome (MS).

These findings highlight the therapeutic potential of edible flowers as bioactive sources for the prevention and management of metabolic and cardiovascular diseases, promoting further applications in the field of functional foods and nutraceuticals.

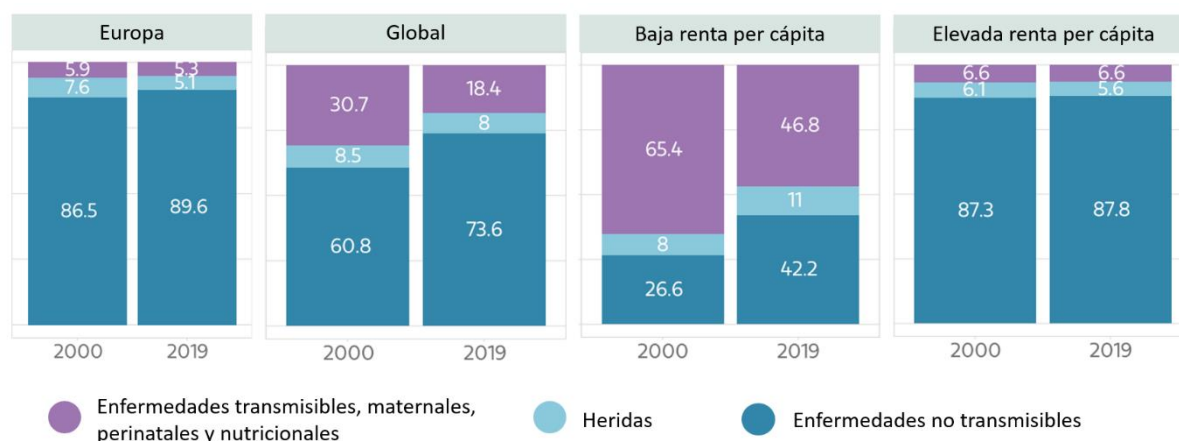


# INTRODUCCIÓN



## 1. ENFERMEDADES NO TRANSMISIBLES Y SÍNDROME METABÓLICO

Las enfermedades no transmisibles (ENTs) son aquellas enfermedades no contagiosas que cursan de manera crónica y multifactorial; siendo su avance y desarrollo el resultado de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y de comportamiento. Los avances en la medicina han supuesto el incremento en supervivencia a enfermedades transmisibles, así como el incremento en la longevidad; dando lugar a poblaciones más ancianas y susceptibles a sufrir riesgos debido a estas enfermedades no transmisibles. En las últimas décadas se han convertido en la principal causa de muerte mundial alcanzando anualmente cifras de 41 millones de personas, aproximadamente el 74% de todas las defunciones según valores del año 2019 (Figura 1) <sup>1</sup>. Al contrario que otras enfermedades endémicas, las ENTs poseen elevada incidencia en todo el mundo, tanto en los países de elevada renta per cápita donde las ENTs suponen alrededor del 88% de las causas de muerte; como en los países de bajas rentas donde constituyen casi la mitad (46,8) <sup>2</sup>. Además de repercutir gravemente en la mortalidad de la población, suponen un elevado gasto a los sistemas sanitarios que podría ser evitado o reducido en gran medida.



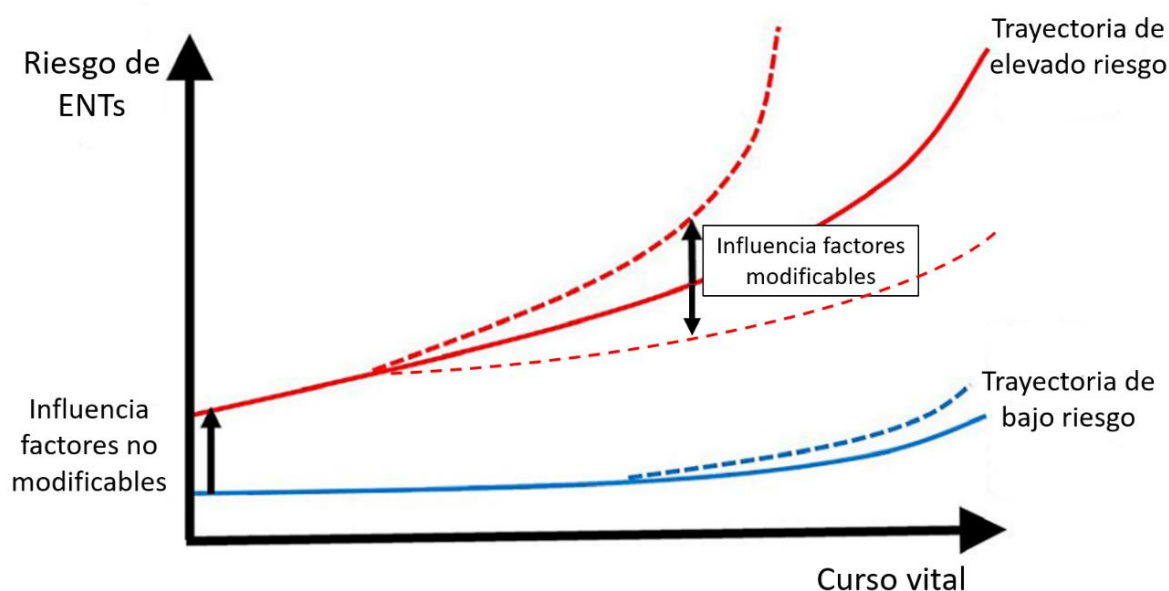
**Figura 1.** Diferencias en las causas de mortalidad en los años 2000 y 2019, por región y renta per cápita. *Adaptado de: WHO, 2022.*

En este grupo de enfermedades hallamos una gran variedad de patologías y condiciones; entre las relacionadas con la obesidad podemos encontrar la hipertensión arterial (HTA), la diabetes mellitus tipo 2, la dislipemia, la enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease), y la enfermedad cardiovascular (ECV). Pero también se engloban dentro de las ENTs algunos tipos de cáncer o enfermedades respiratorias crónicas como el EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) <sup>3</sup>.

Las enfermedades cardiovasculares constituyen año tras año la principal causa de muerte a nivel global, aproximadamente el 71%, estimándose en 23,6 millones para el año 2030 <sup>4</sup>. El

incremento en la esperanza de vida e incidencia de estas condiciones crónicas supone elevados costes a los sistemas de salud que se prevé que sigan aumentando en las próximas décadas <sup>5</sup>. A nivel nacional, se estimó que en España el coste medio de un paciente que sufre un infarto es de aproximadamente 9.499€ anuales; incluyendo hospitalizaciones, tratamiento farmacológico, pruebas de laboratorio, seguimiento, transporte, etc <sup>6</sup>. Es por ello por lo que se debe trabajar en programas de prevención y detección temprana para minimizar la incidencia de estas enfermedades.

La particularidad de estas patologías es que pueden ser prevenidas en cierta medida, debido a los factores de riesgo de su desarrollo; modificables y no modificables. La evolución que la influencia de estos factores ejerce sobre la salud y probabilidad de sufrir alguna ENTs se desarrolla de manera no lineal como podemos observar en la Figura 2. Los factores no modificables marcarán el punto de partida, pero la influencia de los factores modificables será clave para el desarrollo de posibles ENTs <sup>7</sup>.



**Figura 2.** Modelo del riesgo de padecer alguna enfermedad no transmisible a lo largo de la vida y la influencia de los distintos factores modificables y no modificables. Azul: trayectoria vital de bajo riesgo, rojo: trayectoria vital de elevado riesgo. *Adaptado de: Hanson, 2019.*

En los **factores no modificables** encontramos la edad, el sexo y la genética. Estos elementos juegan un papel importante en el desarrollo, fisiopatología, y tratamiento de numerosas patologías; pero son especialmente determinantes en la evolución de las ENTs. Como su nombre indica, son rasgos de las personas que no pueden ser alterados, por lo que no supondrán posibles focos de actuación.

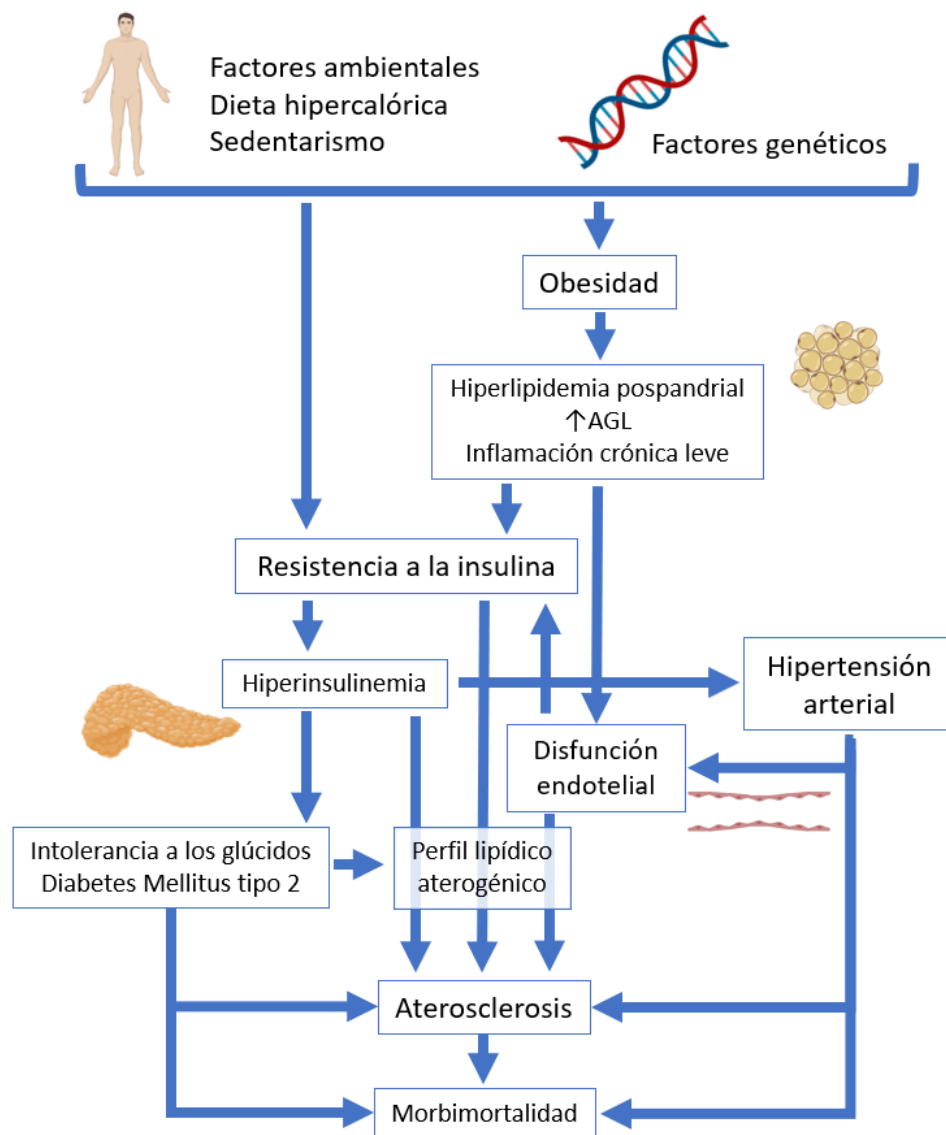
Por el contrario, los **factores modificables** son susceptibles a sufrir cambios y son los ámbitos donde podemos trabajar e incidir para la mejora de estas patologías. Los factores de riesgo

modificables son un grupo heterogéneo de características fisiológicas o metabólicas y conductuales entre las que podemos encontrar <sup>4,8</sup>:

- Sobrepeso
- Elevada presión arterial
- Consumo de tabaco
- Inactividad física
- Dieta no saludable
- Hiperlipidemia
- Consumo elevado de alcohol

La actuación sobre estos factores o rasgos modificables será variada y en ocasiones se podrá realizar de manera holística.

Dentro del entorno de las enfermedades no transmisibles, encontramos el **síndrome metabólico** (SM), también denominado síndrome de resistencia a la insulina. Se conoce como SM al conjunto de trastornos que se presentan al mismo tiempo e incrementan el riesgo de padecer ECV, accidente cerebrovascular (ACV) y DM2 <sup>9</sup>. Para el desarrollo de SM existe una predisposición genética importante, la cual se ve potenciada por factores modificables como el exceso de grasa o la falta de actividad física (Figura 3). En la fisiopatología del SM se involucran alteraciones en el metabolismo glucolipídico, estados proinflamatorios y protrombóticos, vinculados todos ellos a través de la **resistencia insulínica** (RI). La RI se relaciona en numerosas ocasiones con el sobrepeso y exceso de ácidos grasos libres, provocando trastornos en el empleo de la glucosa celular o desregulación de su producción hepática. El metabolismo lipídico también se ve modificado por la RI, generando las alteraciones propias del SM: hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. La HTA se relaciona con diferentes mecanismos como consecuencia de alteraciones en la vía de la insulina y en la regulación del sistema nervioso vegetativo. Además de las repercusiones en el desarrollo de la aterosclerosis, últimamente se han relacionado el SM y la RI con otras enfermedades, como el hígado graso no alcohólico y el síndrome del ovario poliquístico (Figura 3) <sup>10</sup>.



**Figura 3.** Fisiopatología del SM. *Adaptado de: Martín et al., 2005.*

Entre los trastornos o condiciones que presentan los pacientes con SM encontramos:

- Obesidad
- Diabetes mellitus
- Hipertensión arterial
- Hiperlipidemia

Estas condiciones, además de suponer factores de riesgo por sí solas, se consideran enfermedades crónicas cuyo tratamiento en ocasiones van de la mano. Comparten también la característica de que pueden ser prevenidas en gran medida mediante intervenciones higiénico-dietéticas.

## 1.1 Obesidad

La **obesidad** y **sobrepeso** se definen por la acumulación de grasa excesiva o anormal que puede alterar la salud. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se producen más muertes mundialmente por estas condiciones que por infrapeso <sup>11</sup>. Durante las últimas décadas en los países con mayor índice de desarrollo humano se ha producido una tendencia al sedentarismo y consumo de alimentos precocinados y artificiales que han llevado a la población a sufrir obesidad y sobrepeso, los cuales pueden desembocar en enfermedades cardiovasculares y metabólicas; además de incrementar el riesgo de morbilidad y mortalidad. Pero el problema de la obesidad no se limita a las zonas más desarrolladas, este problema de salud afecta globalmente a todos los estratos sociales y cada vez en población más joven. Se estima que para el año 2030, la incidencia de obesidad infantil alcanzará los 250 millones de personas <sup>12</sup>. Si nos centramos en la población española, un informe de la OMS del año 2022 declara que alrededor del 23,8% de la población adulta padece obesidad, y un 37,8% se encuentra en valores de pre-obesidad o sobrepeso <sup>13</sup>. Una de las principales razones por las que estas cifras son tan elevadas es el auge del **sedentarismo**, estilo de vida adoptado en las últimas décadas por los cambios en los patrones de la alimentación poblacionales y la disminución en la actividad física. La exposición cada vez a edad más temprana a factores obesogénicos incrementa la probabilidad de padecer obesidad durante el desarrollo de la vida. Los adolescentes con obesidad cargan con las comorbilidades propias de la patología como pueden ser la HTA o dislipemia. La prevalencia en España de obesidad y sobrepeso se estima entre los valores de 14 y 29% en adolescentes de 11 a 15 años, y alrededor del 40% incluyendo el sobrepeso en niños entre 7 y 9 años <sup>13</sup>. Las estimaciones epidemiológicas predicen que estos valores incrementarán, y gran parte de estos niños que ahora son obesos mantendrán esta condición cuando sean adultos <sup>14</sup>. La actividad y el ejercicio físico proporcionan una serie de beneficios en el manejo de la obesidad, pero es la **nutrición** uno de los pilares más importantes en el control de esta. La alimentación es clave, ya que sabemos que no todas las calorías ingeridas afectan del mismo modo al organismo, por lo que la calidad nutricional de los alimentos puede jugar un papel fundamental en la dieta <sup>15</sup>. Es por lo que la prevención y correcta educación nutricional deben comenzar en edades tempranas y/o adolescencia. Además, el enfoque de su manejo y tratamiento debe ser realizado de manera individualizada.

### 1.1.1 Diagnóstico

Tradicionalmente, se ha realizado la clasificación de los diferentes grados de obesidad en función del **Índice de Masa Corporal (IMC)** (Tabla 1), aunque en la actualidad esta clasificación ha quedado un poco relegada empleándose más frecuentemente los valores de grasa visceral y circunferencia de la cintura <sup>16</sup>. El IMC ( $\text{peso}/\text{talla}^2$ ) se ha empleado durante muchos años al ser una medida objetiva y fácil de reproducir, pero cuenta con ciertas limitaciones al no tratarse de una medida directa del contenido de grasa corporal ni indicar su distribución en el organismo. No tiene en cuenta la masa muscular ni distingue entre sexos, y promueve el

estigma social asociado a valores elevados de IMC. Es por ello por lo que las mediciones complementarias están ganando importancia; como la circunferencia de la cintura, la cual permite diagnosticar obesidad abdominal en función del **perímetro de la cintura** (> 88 cm en mujer y > 102 cm en hombre). Como limitación comparte con el IMC la falta de medida directa de la grasa visceral <sup>17</sup>. Es esta grasa visceral la que supone mayor perjuicio para la salud comparado con la grasa subcutánea, y por ello es tan importante su correcta cuantificación. Para una mejor predicción de la evolución de los pacientes, la OMS sugiere emplear la combinación de estos dos métodos no invasivos y directos, el IMC y la circunferencia de cintura <sup>13</sup>. Se acepta como punto de corte para la obesidad un valor de IMC de 30 kg/m<sup>2</sup>. En el caso de la adolescencia, no se pueden aplicar los varemos del IMC por lo que se han creado percentiles en función de la edad, que permiten clasificar el estado ponderal y facilitar el diagnóstico precoz <sup>18</sup>.

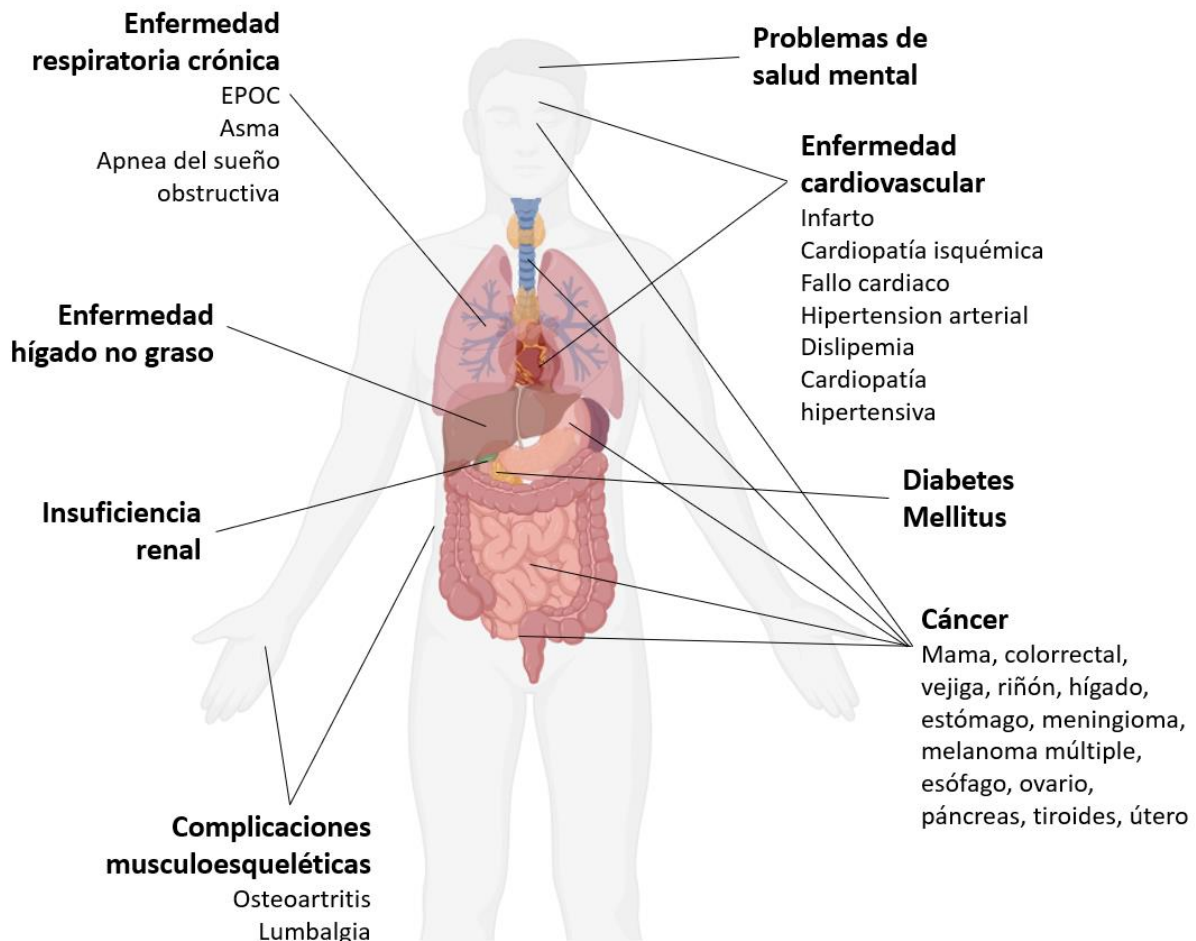
**Tabla 1.** Clasificación de los distintos grados de obesidad y peso en función del IMC (Índice de Masa Corporal). *Adaptado de: Lecuebe et al, 2024.*

Categoría	IMC (kg/m <sup>2</sup> )
Infrapeso	<18,5
Normopeso	18,5 - 24,9
Estadio pre-obesidad	25,0 - 29,9
Obesidad grado I (leve)	30,0 - 34,9
Obesidad grado II (moderada)	35,0 - 39,9
Obesidad grado III (mórbida)	40 - 49,9
Obesidad grado IV (extrema)	≥ 50

### 1.1.2 Fisiopatología

La fisiopatología de la obesidad define esta condición como una **enfermedad crónica multifactorial**, actualmente se considera el resultado de una acumulación excesiva y/o anormal del tejido adiposo que provoca la disfuncionalidad de este. Cuando el tejido adiposo deja de ejercer su función de almacenaje de lípidos, estos se acumulan en otras estructuras como órganos o músculo, provocando **lipotoxicidad**. El almacenamiento de los lípidos en el organismo en tejido adiposo se divide entre dos tipos: subcutáneo y visceral. La acumulación en tejido adiposo visceral supone mayor riesgo para la salud que el subcutáneo, que se ve agravado todavía más cuando alcanza su expansión máxima y comienza a acumularse y localizarse de manera ectópica en tejidos y órganos ajenos como hígado o páncreas. Este acúmulo de grasa víscera se asocia con el aumento de riesgos para la salud e incidencia de patologías crónicas cardiovasculares como HTA o enfermedad coronaria, endocrino-metabólicas como la diabetes, y respiratorias como el EPOC (Figura 4) <sup>19</sup>. La obesidad se asocia

también con el incremento en susceptibilidad de sufrir infecciones nosocomiales, gripes o infecciones en heridas, así como incremento del riesgo de muerte prematura y reducción de la esperanza de vida en hasta 20 años <sup>20</sup>. Además, se relaciona la obesidad con el incremento de prevalencia y mortalidad de al menos trece tipos de cáncer entre los que podemos encontrar cáncer de estómago, colon, hígado, páncreas o de riñón <sup>4,21,22</sup>.



**Figura 4.** Algunas de las principales comorbilidades asociadas a la obesidad. *Adaptado de: WHO, 2022.*

La explicación tradicional sobre el desarrollo y aparición de la **obesidad** se basa en un desequilibrio entre las calorías ingeridas y las gastadas por el organismo; pero la realidad es más compleja y multifactorial. Hoy en día siguen existiendo estigmas e ideas preconcebidas sobre este tipo de pacientes, influyendo negativamente en la calidad de atención que reciben; así como su salud mental y autoestima <sup>23</sup>.

Esta **enfermedad crónica** está causada por la acción de múltiples factores metabólicos, genéticos, conductuales, ambientales y sociales <sup>23</sup>. Parte de este incremento en la incidencia se debe a la adaptación de nuestros genes a un ambiente más obesogénico, promoviendo la

acumulación de energía en épocas de abundancia; adaptación que tenía sentido y era necesaria en los periodos históricos pasados donde la calidad y esperanza de vida eran inferiores <sup>24</sup>. Sin embargo, estos genes y adaptaciones por sí mismos no pueden explicar el incremento en la incidencia de obesidad que ha tenido lugar en las últimas décadas; es por ello por lo que otros factores como los medioambientales deben jugar un papel importante en el desarrollo de la obesidad. Entre los factores medioambientales podemos encontrar la **nutrición**, el **estilo de vida** y la **actividad física**; los tres pilares en los que se basa el manejo del peso.

### *1.1.3 Tratamiento farmacológico y no farmacológico*

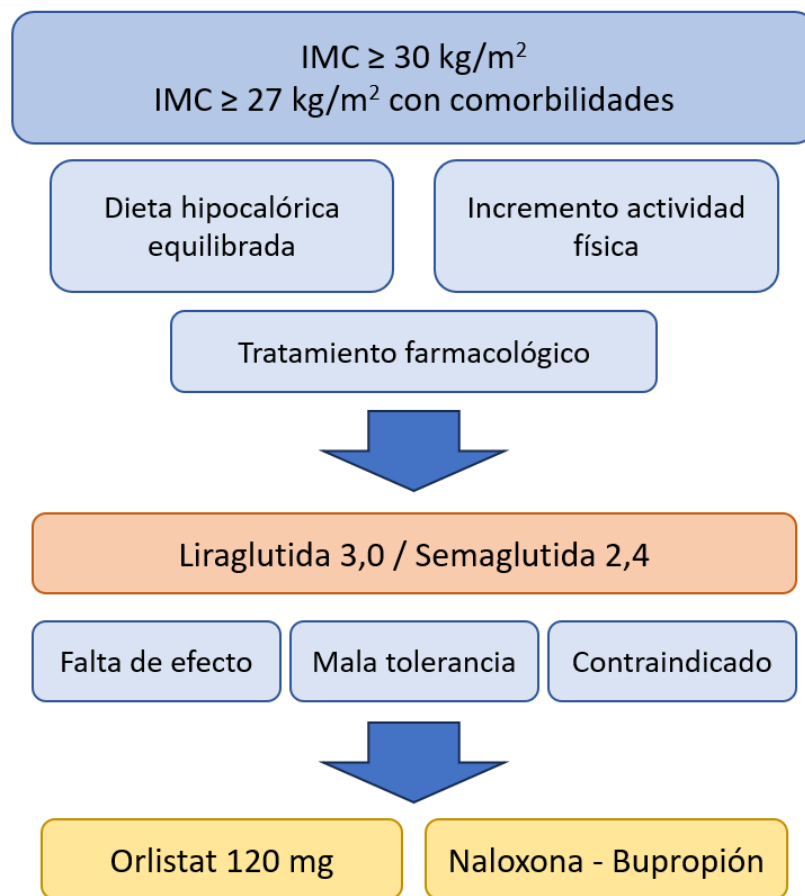
Ya que la obesidad se considera una enfermedad crónica, los fármacos aprobados para su manejo son de larga duración; los únicos fármacos autorizados por la FDA (Food and Drug Administration) para esta patología hasta hace pocos años eran la **fentermina** y el **orlistat** <sup>25</sup>. La **fentermina** se aprobó en el año 1959 en los Estados Unidos y ha sido el medicamento más empleado para el tratamiento de la obesidad. Se trata de un isómero de la meta-anfetamina con actividad anorexigénica, produciendo supresión del apetito además de incremento en el gasto calórico. Su mecanismo de acción consiste en la estimulación de los receptores  $\beta$ 2 adrenérgicos por la liberación de noradrenalina desde el hipotálamo. También se han reportado otras actividades a nivel del sistema nervioso, como la reducción en la señalización del hambre. Pero este fármaco cuenta a su vez con numerosos efectos adversos como dolor de cabeza, mareos, irritabilidad, náuseas o vómitos, etc.; además de numerosas contraindicaciones con historial de enfermedades cardiovasculares o hipertiroidismo. Más aún, como tratamiento en solitario solo está aprobado para periodos cortos con un máximo de 12 semanas. En el año 2012, la FDA aprobó el uso de **fentermina** asociada a topiramato como tratamiento crónico para el manejo de la obesidad <sup>25,26</sup>. El topiramato es un agonista del ácido  $\gamma$ -aminobutírico, antagonista del glutamato e inhibidor de la anhidrasa carbónica que ha demostrado supresión del apetito <sup>27</sup>.

En la actualidad, son pocos los fármacos aprobados por la EMA (Agencia Europea del Medicamento) para el manejo de la obesidad: **orlistat**, **naltrexona-bupropión**, **liraglutida** y recientemente **semaglutida** y **tirzepatida** (Figura 5) <sup>28</sup>.

El **orlistat** fue aprobado por la EMA en 1998 y un año después por la FDA como fármaco anti-obesidad de largo plazo con efecto periférico, su mecanismo de acción es la inhibición irreversible de la lipasa pancreática y gástrica. Cuando es ingerido con alimentos que contienen grasa, su acción inhibe parcialmente la hidrólisis de los triglicéridos, reduciendo la absorción de monoglicéridos y ácidos grasos en el tracto gastrointestinal. La eficacia de este fármaco es muy variable entre pacientes, obteniéndose resultados de bajada de peso diversos. Fue el primer fármaco anti-obesidad cuya acción se centraba en el tracto gastrointestinal y no tiene acción aparente en los neurotransmisores del sistema central. Actualmente no es muy empleado debido a sus efectos adversos relacionados con incontinencia fecal o esteatorrea, además de influir en la biodisponibilidad y absorción de

vitaminas liposolubles y ciertos fármacos como ciclosporina, levotiroxina, amiodarona, o fármacos antirretrovirales <sup>29</sup>.

En los últimos años se han aprobado diversos fármacos análogos del péptido similar a glucagón 1 (aGLP-1) como la **liraglutida** y **semaglutida** (Tabla 4). El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la activación de los receptores de GLP-1, potenciando la secreción de insulina, inhibiendo la secreción de glucagón en función de la concentración de glucosa en sangre; y además han demostrado suprimir el centro del apetito y retrasar el vaciado gástrico, ayudando en la pérdida de peso <sup>30</sup>. **Liraglutida** debe administrarse diariamente mediante inyección subcutánea, mientras que **semaglutida** es de administración subcutánea semanal y se ha aprobado la forma de administración oral, aunque esta última presenta grandes variabilidades en biodisponibilidad y eficacia <sup>31</sup>. Ambos aGLP-1 cuentan con numerosos efectos adversos, contraindicaciones e interacciones farmacológicas importantes. Recientes estudios han relacionado el uso de aGLP-1 con un incremento en neuropatías ópticas <sup>32</sup>. El último fármaco en unirse a esta batería de tratamientos ha sido **tirzepatida**, un principio activo con mecanismo de acción dual, ya que es análogo de GLP-1 y además de agonista de los receptores del polipéptido insulínico (arGIP) <sup>33,34</sup>.



**Figura 5.** Algoritmo de tratamientos farmacológicos para el manejo de la obesidad. *Adaptado de: Caixàs et al, 2020.*

Otro tratamiento ampliamente empleado es la **cirugía bariátrica**, se considera para aquellos adultos con IMC superior a 40 kg/m<sup>2</sup> o >35 kg/m<sup>2</sup> con comorbilidades que se verían beneficiadas por una bajada de peso. Dentro de la cirugía bariátrica podemos encontrar diferentes tipos de intervenciones, todas enfocadas en la reducción del volumen del estómago y por ende reducción de la absorción de alimentos e ingesta de calorías <sup>35</sup>. Son un tipo de intervenciones invasivas, que pueden contar con numerosos riesgos o efectos a largo plazo como reflujo gastroesofágico, incontinencia fecal, déficits vitamínicos y proteicos o recuperación ponderal del peso <sup>36</sup>.

Debido a la cantidad de **efectos adversos** y secundarios que producen esta serie de tratamientos y la enorme **variabilidad en eficacia** interindividual de los mismos, el uso de otras terapias menos agresivas y de carácter más natural sería más recomendable para la ayuda en el control del peso y mejora de la obesidad. La terapia médica nutricional se basa en una intervención individualizada sobre la nutrición para reducir la ingesta calórica y mejorar la calidad nutricional de los alimentos consumidos <sup>16,23</sup>. Este tipo de intervenciones debe ir siempre acompañado por actividad física y acompañamiento psicológico para que sus efectos se mantengan en el tiempo y sea efectivo; ya que los mecanismos compensatorios del organismo conducen a la persistencia de la obesidad <sup>37</sup>.

## 1.2 Diabetes mellitus

La **diabetes mellitus (DM)** es una enfermedad metabólica caracterizada por elevados valores de glucosa en sangre que pueden provocar graves complicaciones en el organismo o incluso la muerte cuando no son tratadas adecuadamente. Esta patología crónica se caracteriza por la falta de producción de insulina en el organismo, o bien la deficiencia en el uso de esta, provocando finalmente resistencia de los tejidos y órganos a su acción. La **insulina** es una hormona producida por el páncreas, que permite la entrada de glucosa en las células del organismo para su consumo o almacenamiento. También es esencial en el control del metabolismo de grasa y proteínas. La falta de insulina o la incapacidad de las células del organismo a responder a ella provocan elevados niveles de glucosa en sangre, situación también denominada **hiperglucemia**.

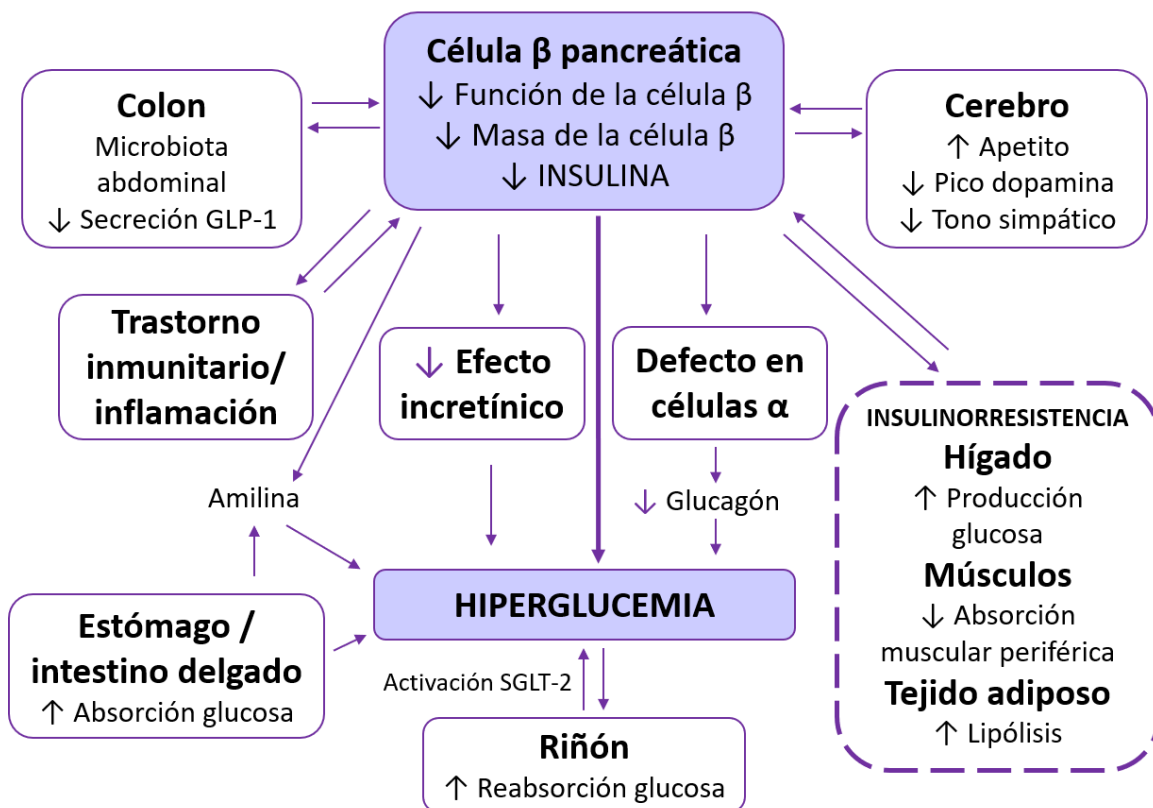
Diferenciamos diferentes tipos de diabetes, principalmente tipo 1 y tipo 2, en función de las características de su aparición o desarrollo (Tabla 2) <sup>38</sup>. La **diabetes tipo 1 (DM1)** tiene un origen autoinmune, donde el propio organismo ataca las células  $\beta$  pancreáticas impidiendo la producción de insulina <sup>39</sup>. Se suele diagnosticar en la infancia o adolescencia, y su desarrollo se debe a distintos factores tanto genéticos como ambientales e idiopáticos <sup>40</sup>. Es en cambio la **diabetes tipo 2 (DM2)** la que está relacionada con la obesidad y los malos hábitos alimenticios. Se define la DM2 como las **alteraciones metabólicas** que implican una hiperglucemia crónica secundaria a trastornos en el metabolismo de los hidratos de carbono,

provocados principalmente por defectos en la secreción de insulina, RI o de la combinación de ambos procesos (Figura 6) <sup>41</sup>.

**Tabla 2.** Principales características y diferencias de los dos principales tipos de diabetes mellitus. *Adaptado de: Anibaro & Lachica, 2023.*

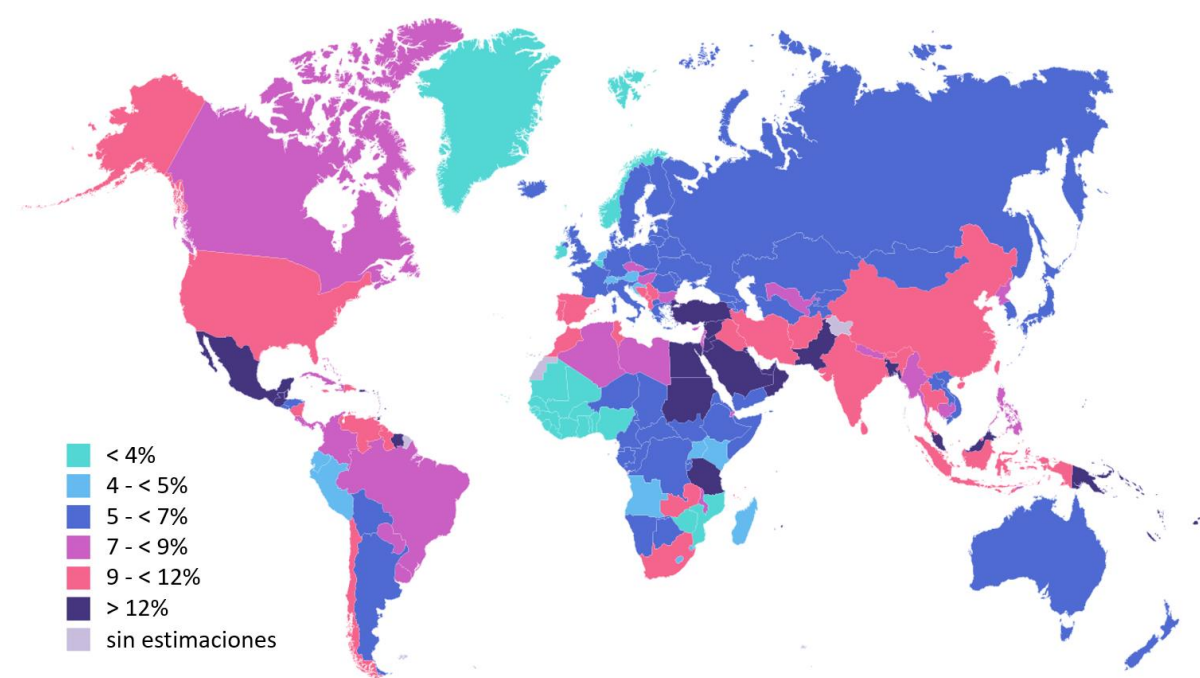
	DM1	DM2
Edad diagnóstica	< 30 años	> 40 años
Origen	Autoinmune	Multifactorial
Aparición	Brusca	Progresiva
Peso	No obesidad	Obesidad (80%)
Niveles insulina	Descendidos o nulos	Variables
Prevalencia	< 10%	90%

DM1: diabetes mellitus tipo 1, DM2: diabetes mellitus tipo 2.



**Figura 6.** Fisiopatología de la DM2. *Adaptado de: Gómez Ramon et al, 2021.*

En el año 2021, alrededor de 537 millones de personas en el mundo padecían diabetes (Figura 7), siendo alrededor del 90% la incidencia del tipo 2; valores que se espera que incrementen en los próximos años <sup>42</sup>. Además, anualmente 1,5 millones de muertes están directamente asociadas a esta patología <sup>43</sup>. En la actualidad, la **DM2** es una de las enfermedades más prevalentes del mundo, especialmente en los países de mayor índice humano, donde los valores de obesidad son más elevados. Tanto el número de casos como la incidencia de diabetes en la población ha crecido de manera exponencial durante las últimas décadas <sup>44</sup>. El desarrollo de DM2 tiene lugar por la combinación de diversos factores tanto genéticos, como medioambientales, por lo que su origen es **multifactorial**.



**Figura 7.** Estimación de la prevalencia DM2 global en adultos (20 - 79 años) en el año 2021. Adaptado de: IDF, 2021.

### 1.2.1 Diagnóstico

El diagnóstico de la DM2 se realiza mediante la detección de niveles elevados de glucosa en sangre, estos pueden ser medidos en plasma o a través de la **hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>)** (Figura 8). La medida de sangre en plasma puede realizarse en ayunas o tras una sobrecarga oral de glucosa (test de tolerancia a la glucosa), y ambas nos aportan valores puntuales; mientras que la HbA<sub>1c</sub> nos presenta una media de la glucemia que ha tenido el paciente en los últimos 2-3 meses aportando una visión más realista de su estado. Se consideran niveles elevados de glucosa los superiores a 126 mg/dL en ayunas, y superiores a 200 mg/dL dos horas tras la ingesta de 75 g de glucosa; así como niveles de HbA<sub>1c</sub> superiores a 6,5% <sup>45</sup>.

Prueba	Diabetes Diagnostico si UNO o MÁS criterios se cumplen	Prediabetes (ITG) Diagnostico si AMBOS criterios se cumplen	Prediabetes (IFG) Diagnostico si el PRIMERO o AMBOS criterios se cumplen
Glucosa en plasma en ayunas	$\geq 7,0$ mmol/L (126 mg/dL)	$< 7,0$ mmol/L (126 mg/dL)	6,1 – 6,9 mmol/L (110 - 125 mg/dL)
Glucosa en plasma 2h Administración oral de 75g glucosa (test oral tolerancia a la glucosa)	$\geq 11,1$ mmol/L (200 mg/dL)	$\geq 7,8$ y $< 11,1$ mmol/L (140 - 200 mg/dL)	$< 7,8$ mmol/L (140 mg/dL)
HbA <sub>1c</sub>	$\geq 48$ mmol/mol (equivalente al 6,5%)		
Medida aleatoria glucosa en plasma con síntomas de hiperglicemia	$\geq 11,1$ mmol/L (200 mg/dL)		

**Figura 8.** Criterios para el diagnóstico de la diabetes. HbA<sub>1c</sub>: Hemoglobina glicosilada; ITG: Intolerancia oral a la glucosa; IFG: Glucemia en ayunas alterada. *Adaptado de: IDF, 2021.*

### 1.2.2 Fisiopatología

Ya que la glucosa circula por la sangre dentro de los vasos sanguíneos, gran parte de su efecto dañino se producirá en el sistema circulatorio. Los niveles elevados de glucosa mantenidos durante largos periodos de tiempo pueden provocar graves daños tanto microvasculares como macrovasculares, ya que es el momento idóneo para que tenga lugar la **glificación de proteínas**<sup>46,47</sup> y la producción de **especies reactivas de oxígeno** (EROS). Estudios muestran que la severidad de los daños vasculares depende del grado y duración de la exposición a esos niveles elevados de glucosa<sup>45,48</sup>. Englobamos entre las complicaciones **microvasculares** la retinopatías, nefropatía y neuropatías; mientras que los daños **macrovasculares** engloban arteriopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad arterial periférica<sup>49</sup>.

La complicación microvascular más común de la diabetes es la **retinopatía**, la cual puede terminar en ceguera. Su principal mecanismo de acción deriva de la producción de productos finales de glificación (AGEs); a los cuales dedicaremos un apartado más adelante, que pueden llegar a producir pequeñas hemorragias en la retina o provocar su desprendimiento<sup>48</sup>. La **nefropatía diabética** es una de las principales causas del fallo renal en insuficiencia renal grave, y tiene lugar tras una combinación de alteraciones metabólicas que provocan hipertrofia glomerular y pérdida de células funcionales. La **neuropatía diabética** se define

como la presencia de disfunción en los nervios periféricos. Los principales causantes parecen ser el estrés oxidativo y la acumulación de polialcoholes en tejidos.

La **arteriopatía coronaria** es el daño macrovascular más común entre los pacientes con DM2. Los niveles elevados de glucosa promueven el estado procoagulatorio así como la tendencia a la formación de placas de ateroma, incrementando la probabilidad de un evento trombótico. Además, los pacientes con DM poseen un riesgo de sufrir **ictus cerebral** superior en un 150-400% comparado con la población no diabética <sup>48</sup>. Las lesiones en arterias periféricas y su gravedad se ven influenciadas por los niveles y duración de la hiperglucemia en plasma.

Una diabetes descontrolada puede provocar desequilibrios metabólicos que podrían requerir hospitalización inmediata. El abordaje de la DM debe realizarse de **manera integral**, similarmente a la obesidad. Las medidas no farmacológicas (estilo de vida, alimentación, ejercicio físico) juegan un papel esencial en el control de los síntomas de la diabetes y en la prevención de su avance al igual que en la obesidad.

### *1.2.3 Tratamiento farmacológico y no farmacológico*

Al tratarse de una enfermedad tan prevalente en el mundo, su farmacoterapia es extensa y se basa en el manejo de los niveles de glucosa en sangre; principalmente los niveles de glucosa postprandial. La reducción del valor de HbA<sub>1c</sub> por debajo de 7% ha demostrado disminuir el riesgo de sufrir complicaciones macrovasculares <sup>50</sup>. Originalmente se denominaba antidiabéticos orales a toda la farmacología que no suponía la administración de insulina, pero en la actualidad es más correcto denominarlos antidiabéticos no insulínicos (ADNI), ya que han sido aprobados diferentes fármacos en presentación inyectable subcutánea. Los fármacos ADNI pueden dividirse en 8 grupos <sup>38,51</sup>:

- Biguanidas:

La única molécula empleada de este grupo es la **metformina**, ejerce su acción reduciendo la secreción de glucagón y aumentando la recaptación de glucosa en los tejidos periféricos. Es el tratamiento de elección en todos los pacientes con DM2, para todos los estadios de la enfermedad salvo en insuficiencia renal grave. Sus efectos secundarios más frecuentes son gastrointestinales (dispepsia y diarrea); y ha demostrado disminuir las complicaciones microvasculares y la morbimortalidad en pacientes obesos.

- Sulfonilureas:

Actúan incrementando la secreción pancreática de insulina, la única molécula empleada de este grupo es la **glicazida**. Como principal efecto adverso encontramos la hipoglucemia, además de ganancia de peso.

- Glinidas:

Poseen mismo mecanismo de acción que las sulfonilureas, incrementando la secreción de insulina desde el páncreas. La única molécula comercializada es la **repaglinida**, y su

principal efecto adverso también son las hipoglucemias. Puede producir además diarrea y dolor abdominal.

- Glitazonas (tiazolidinadionas):

Único grupo que funciona elevando la sensibilidad periférica a la insulina. Actualmente encontramos comercializados dos moléculas, **pioglitazona** y **rosiglitazona**. Promueven la retención de líquidos y ganancia de peso, por lo que están contraindicados en insuficiencia cardíaca o cáncer de vejiga.

- Inhibidores DPP-4:

Su mecanismo de acción es la inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4) en el intestino, elevando los niveles de incretina endógena como el GLP-1 y el GIP. Encontramos diferentes moléculas, principalmente **sitagliptina**, **vidagliptina** y **linagliptina**. Se emplean tanto en monoterapia como en combinación con metformina. Poseen pocos efectos adversos, pero no deben emplearse en combinación con los agonistas de GLP-1.

- Inhibidores cotransportador SGLT-2:

El mecanismo de acción de este grupo se basa en la inhibición de la recaptación de glucosa a nivel renal, bloqueando los transportadores de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT-2) del túbulo contorneado proximal de las nefronas. Podemos encontrar las moléculas **dapaglifozina**, **ampaglifozina** y **canaglifozina**. Se les asocian incrementos en las infecciones genitales debido a la eliminación de glucosa a nivel renal. No producen hipoglucemias, ayudan a la bajada de peso y pueden tener beneficios cardiovasculares.

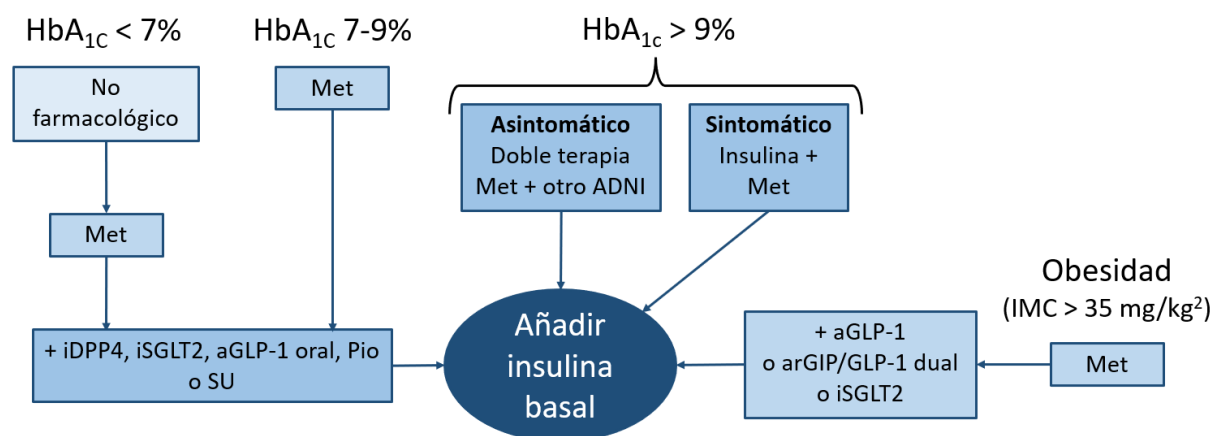
- Agonistas GLP-1:

Su acción incrementa los niveles de GLP-1, un péptido intestinal que aumenta la secreción de insulina y reduce la de glucagón. Se trata de inyectables subcutáneos, salvo **semaglutida** que también existe en presentación oral. Otras moléculas comercializadas son **liraglutida** y **exenetida**. Los principales efectos secundarios son las náuseas y vómitos que aparecen al inicio del tratamiento.

- Inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa:

Funcionan inhibiendo la enzima digestiva  $\alpha$ -glucosidasa, reduciendo la absorción intestinal de glucosa. La única molécula comercializada es la **acarbosa**, cuyo uso es muy limitado, pero sirve como sustancia de referencia en el estudio de nuevos fármacos antidiabéticos. Sus principales efectos adversos son las flatulencias y diarrea.

La administración de insulina exógena es la base de la farmacología en DM1; sin embargo, mientras el funcionamiento del páncreas permita la secreción de insulina útil, se evitará su uso en DM2. Solo en los estadios avanzados o imposibilidad de control de la glucemia tras uso de combinaciones de 3-4 ADNI se introducirá la administración de insulina basal (Figura 9) <sup>52</sup>.



**Figura 9.** Algoritmo simplificado del tratamiento de la DM2. ADNI: antidiabético no insulínico; arGIP: agonista de los receptores del polipéptido insulínico; aGLP-1: análogo del péptido similar al glucagón; HbA<sub>1c</sub>: hemoglobina glicosilada, iDPP4: inhibidor de la dipeptidil peptidasa; IMC: índice de masa corporal; iSGLT2: inhibidor del cotransportador de sodio y glucosa tipo 2; Met: metformina; Pio: pioglitazona. *Adaptado de: Fundación redGDPS, 2023.*

Los distintos tipos de insulinas exógenas disponibles se estructuran en función de su farmacocinética, ya que el mecanismo de acción es el mismo que la propia insulina (Tabla 3).

**Tabla 3.** Resumen de los diferentes tipos de insulina exógena en función de su farmacocinética. *Adaptado de: Anibaró & Lachica, 2023.*

Tipo de insulina		Comienzo acción	Pico máximo	Duración
Ultrarrápidas (lispro, aspart)		10 – 15 min	1 – 2 h	4 h
Rápidas	IHB	30 min	2 – 4 h	5 – 6 h
	AIH	5 – 15 min	0,5 – 2 h	4 – 8 h
Acción intermedia (NPH, NPL)		2 – 4 h	4 – 10 h	10 – 18 h
Acción prolongada	Glargina	1 – 2 h	No	> 24 h
	Degludec	1 – 2 h	No	> 42 h

AIH: análogos insulina humana; IHB: insulina humana biosintética; NPH: insulina isofánica; NPL: insulina lispro protamina.

Además de los tratamientos farmacológicos, las terapias no farmacológicas pueden servir en su prevención y mejora. Dentro de estas terapias podemos encontrar la actividad física junto

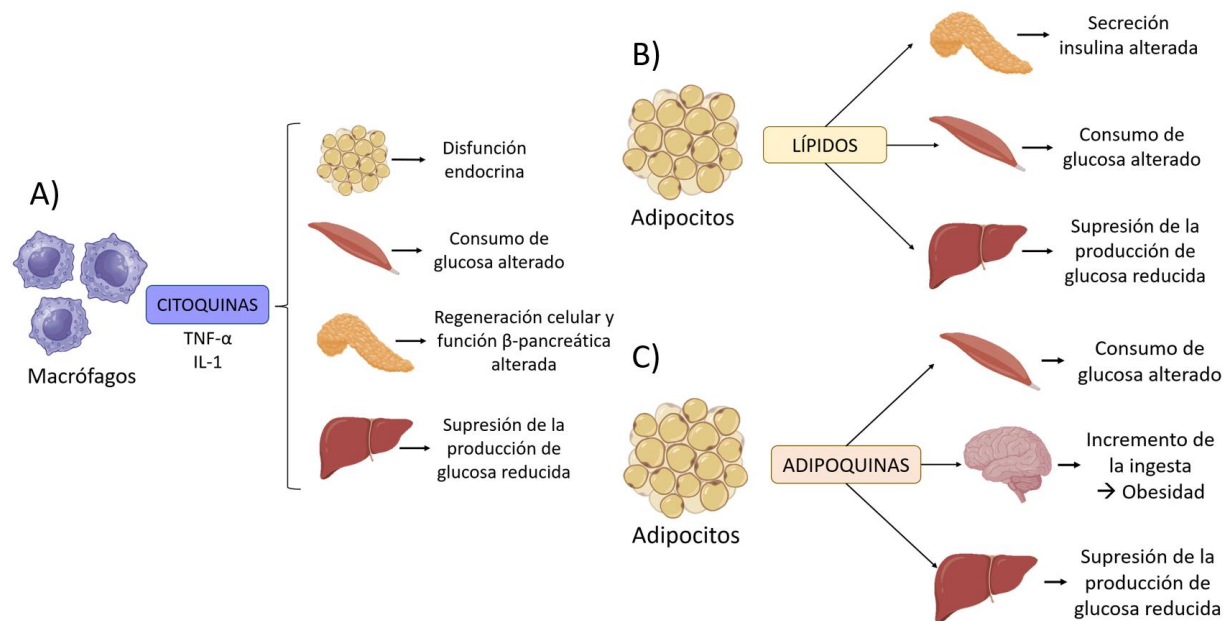
con una correcta dieta. A través de la alimentación se pueden realizar notables mejoras en el bienestar de la población.

### 1.3 Obesidad y diabetes: diabetes

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de DM2, y se estima que el grado de obesidad es la mayor influencia medioambiental en la prevalencia de la DM2; siendo alrededor del 85% de las personas que sufren DM2 obesas o con sobrepeso<sup>53</sup>. Es por lo que desde principios de los años 70 se ha acuñado el término “**diabetes**” para referirse a la presencia de diabetes en el contexto de la obesidad; ya que son situaciones que cada vez van más de la mano<sup>54</sup>. La obesidad o exceso de grasa inducen RI que puede desembocar en DM<sup>55</sup>. Se considera a este problema de salud como una **pandemia a nivel mundial**, con graves consecuencias económicas en los países sin importar su nivel de desarrollo<sup>56</sup>. Consideraremos que un individuo padece diabetes cuando se dé la situación diagnóstica de DM2 y obesidad grado I o superior.

Existen tres hipótesis que relacionan la fisiopatología de estas dos enfermedades (Figura 10)<sup>57,58</sup>:

- Hipótesis inflamatoria: debido al estado constante de inflamación en pacientes obesos, existen lazos entre citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , interleuquinas) producidas por adipocitos y el incremento en la RI.
- Hipótesis de exceso lipídico: metabolitos de lípidos liberados por el tejido adiposo inhiben señales de transducción de insulina e inducen RI.
- Hipótesis de las adipoquinas: citoquinas (adipoquinas) secretadas por tejido adiposo inducen inflamación y cascadas metabólicas que contribuyen a la RI.



**Figura 10.** Hipótesis de la relación fisiopatológica entre obesidad y DM2. A) Hipótesis inflamatoria, B) hipótesis de exceso lipídico y C) hipótesis de las adipoquinas. IL-1: interleuquina tipo 1; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . *Adaptado de: Chadt et al, 2000.*

La principal prioridad en los pacientes con diabetes es el control glucémico, ya que como anteriormente se ha comentado es el principal causante de las complicaciones asociadas a la DM2. Sin embargo, la pérdida de peso de valores entre el 5 y 10% se asocia con mejora en los factores de riesgo cardiovascular como HTA y dislipemia, además de evitar la morbilidad y mortalidad asociadas a la obesidad conjunta a DM <sup>53</sup>. Es por ello por lo que en las últimas décadas se ha producido una inclusión de tratamientos que permiten esa mejora de los niveles de glucosa y promueven la pérdida de peso, ayudando a un mejor control global de la patología. Este conjunto de fármacos permite un **tratamiento dual** de la DM2 y la obesidad, por lo que podríamos denominarlos fármacos anti-diabetes (Tabla 4). Los fármacos que mejor encarnan este posible tratamiento dual son los aGLP-1 y arGIP. Para obtener los efectos de bajada de peso de más de un 10% sobre el peso original, se requiere un uso de al menos **1 año de tratamiento** a dosis máximas, incluso año y medio dependiendo del fármaco, ya que discontinuidades en la administración han demostrado una recuperación del peso perdido <sup>30</sup>.

**Tabla 4.** Resumen fármacos aprobados anti-diabesidad en España. *Adaptado de: AEMPS, 2014; Chakhtoura et al, 2023; Jastreboff et al, 2022.*

Principio activo	Año de aprobación (FDA/EMA)		Mecanismo de acción	Bajada de peso (%)	Coste mensual aproximado
	DM2	Obesidad			
Orlistat	-	FDA 1999 EMA 1998	Inhibición lipasa gástrica y pancreática	10,6	99,50 €
Fentermina / Topiramato	-	FDA 2012	Agonista NE / Agonista GABA, antagonista glutamato	8,6	*
Naltrexona / Bupropion	-	FDA 2014 EMA 2015	Antagonista receptores opioides / Inhibidor recaptación NE y D	6,1	81 €
Liraglutida	FDA 2010 EMA 2009	FDA 2014 EMA 2015	Análogo GLP-1	8	283 €
Semaglutida	FDA 2017 EMA 2018	FDA 2021 EMA 2021	Análogo GLP-1	14,8	292 €
Tirzepatida	FDA 2022 EMA 2022	FDA 2023 EMA 2024	Agonista receptores GIP y análogo GLP-1	20,9	359 €

D: dopamina; EMA: Agencia Europea del Medicamento; FDA: Food and Drug Administration; GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico; GIP: polipéptido inhibidor gástrico; GLP-1: péptido 1 similar al glucagón; NE: norepinefrina. \* No comercializado en España. % bajada de peso con dosis máximas aprobadas tras 52 - 72 semanas de tratamiento.

Los **fármacos aGLP-1** poseen ciertos efectos adversos que pueden llegar a ser graves como la pancreatitis aguda<sup>30</sup>, además de compartir reacciones adversas más frecuentes como diarrea, náuseas, hipoglucemia (muy graves si está/va asociada a sulfonilureas), infecciones del tracto urinario, taquicardia, HTA, fatiga, o cefalea<sup>59</sup>.

**Liraglutida** reporta una mejora de los factores cardiovasculares<sup>60</sup>, pero también es el principio activo que más interacciones farmacológicas se han notificado. Se teorizan importantes interacciones con fármacos que actúan a nivel renal como el iSGLT2 ertuglifozina, o diversos diuréticos como la indapamida o furosemida<sup>59</sup>. Por otro lado, **semaglutida** posee una interacción importante con el anticoagulante oral warfarina, mientras que **tirzepatida** todavía no ha reportado ninguna interacción farmacológica debido a su reciente aprobación.

Aunque los fármacos aGLP-1 y arGIP se encuentran en algunos casos financiados por el sistema nacional de salud para el tratamiento de la DM2; se deben cumplir ciertos

requerimientos para su financiación, ya que no son la primera línea terapéutica. En la actualidad no se encuentran financiados para el tratamiento de la obesidad, esto supone que los precios no se encuentran intervenidos y el paciente debe costear su totalidad. Esto marca una gran diferencia en la posibilidad de acceso a estos tratamientos en función del poder adquisitivo. Además, su extendido uso y popularización a través de las redes sociales han fomentado problemas de suministro y **desabastecimiento** desde el pasado año 2022 <sup>61</sup>.

A pesar de la eficacia de estos fármacos para el tratamiento de la diabetes, siempre van a ser considerados como **coadyuvantes**, ya que el tratamiento principal y clave para su éxito es el cambio en el estilo de vida; incluyendo ejercicio físico y dieta. La pérdida de peso supone una mejora en el control de la glucemia y en la evolución de muchos de los factores de riesgo presentes en este tipo de pacientes como la HTA o dislipemia. La pérdida de peso es una meta difícil de lograr y más difícil todavía de mantener. El uso de fármacos para reducir el peso es efectivo pero el consumo de este tipo de sustancias durante largos periodos de tiempo no es recomendable debido a su perfil de seguridad y presencia de efectos adversos.

## 1.4 Hipertensión arterial

La **presión arterial** o presión sanguínea es una medición de la fuerza que ejerce la sangre que circula por las arterias contra las paredes de estas; sus valores nos aportan información del sistema cardiovascular de una manera sencilla, rápida y no invasiva. La **hipertensión arterial (HTA)** más que una patología por si sola se considera un síntoma que exacerba y predispone al desarrollo de otras patologías cardiovasculares como ACV, ictus, infarto de miocardio, etc; incrementando su morbimortalidad <sup>62</sup>. Podemos diferenciar entre HTA primaria o secundaria, en función del origen que causa esta condición. La forma secundaria se da en una pequeña porción de los pacientes debido a causas muy concretas como alteraciones genéticas u otras patologías, lo cual dificulta su detección, diagnóstico y correcto tratamiento; ya que en ocasiones derivan en HTA resistente. El origen de la forma primaria se debe a complejas interacciones entre la genética del individuo, factores ambientales y su propio proceso de envejecimiento <sup>63</sup>.

### 1.4.1 Diagnóstico

La HTA viene definida según las Guías Europeas por los valores de presión sanguínea, a partir de los valores de 140 mmHg de presión sistólica y/o de 90 mmHg de diastólica <sup>63</sup>. La categoría de la HTA se clasifica en tres niveles de gravedad (Tabla 5). El diagnóstico de HTA debe basarse en múltiples medidas realizadas en momentos separados en el tiempo, también es esencial la información sobre los antecedentes tanto familiares como personales.

**Tabla 5.** Clasificación de los grados y categorías de hipertensión arterial. *Adaptado de: Mancía et al, 2023.*

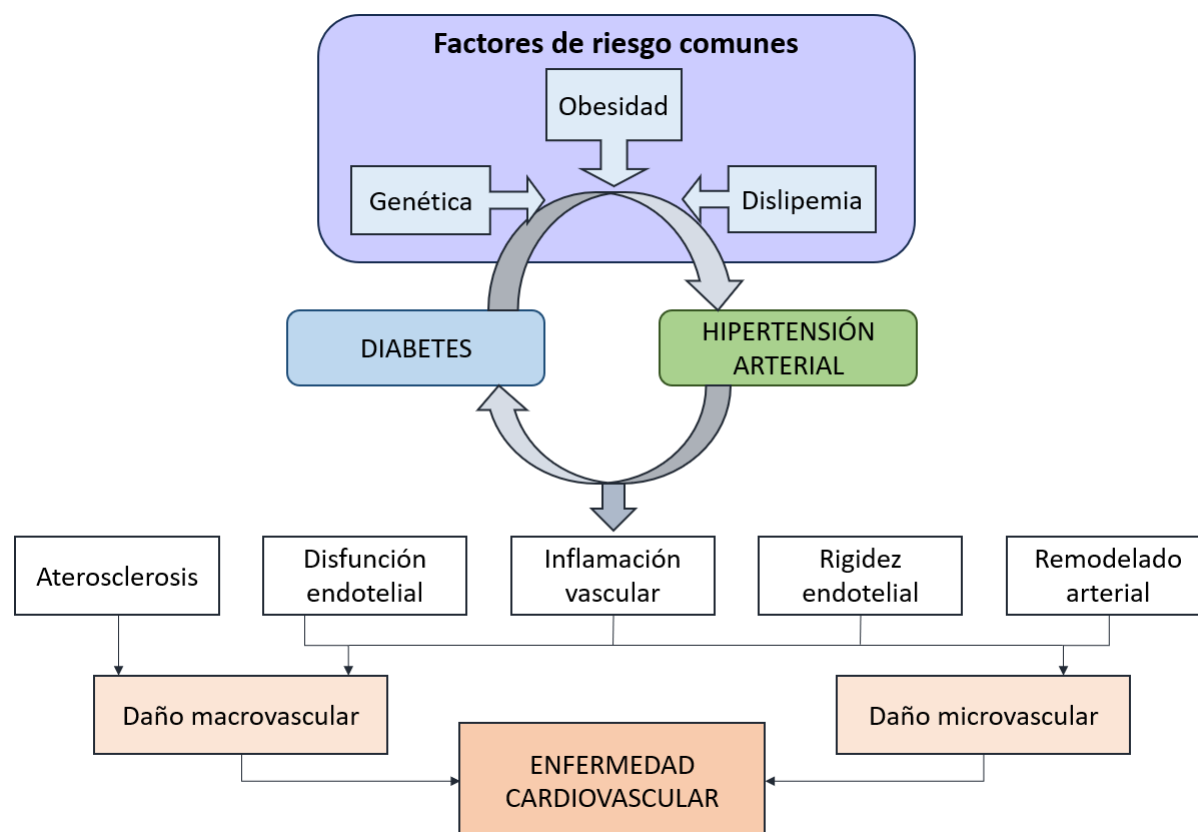
Categoría	Sistólica (mmHg)		Diastólica (mmHg)
Óptimo	< 120	y	> 80
Normal	120 - 129	y	80 - 84
Normal - Elevada	130 - 139	y/o	85 - 89
HTA grado 1	140 - 159	y/o	90 - 99
HTA grado 2	160 - 179	y/o	100 - 109
HTA grado 3	≥ 180	y/o	≥ 110

La HTA es el trastorno cardiovascular con mayor prevalencia mundial, según las OMS en el año 2023 la cifra de personas entre 30 y 79 años que padecía HTA era de 1,28 billones <sup>64</sup>. A pesar de ello, se estima que más de la mitad de las personas que padecen HTA no han sido diagnosticadas. La HTA es uno de los principales factores reversibles de las enfermedades cardiovasculares.

#### 1.4.2 Fisiopatología

Existe una relación entre elevada presión arterial y eventos cardiovasculares, así como problemas renales. La **presión arterial** es regulada por una variedad de sistemas neurohormonales, sin embargo, uno de los principales determinantes para el desarrollo de HTA es la acumulación de grasa visceral, y el ratio entre masa muscular y tejido adiposo. Existe una clara asociación entre el incremento de peso y el incremento en la presión arterial <sup>65</sup>. Se ha demostrado que en los pacientes con elevada grasa visceral hay un incremento en la actividad simpática, que conlleva elevación del ritmo cardiaco y de la presión arterial <sup>65</sup>. Preocupa especialmente al aumento en la incidencia de HTA asociada a obesidad en niños y adolescentes <sup>9,66</sup>.

En obesidad y patologías relacionadas con la obesidad como la HTA, hay una reducción en la disponibilidad de óxido nítrico (NO) principalmente causado por el estrés oxidativo, así como la resistencia periférica a insulina <sup>67,68</sup>. Existe un vínculo entre el estrés oxidativo y la disfunción endotelial, agravados por la presencia de obesidad. También encontramos elevada incidencia de pacientes que sufren HTA juntamente con DM2, esto se debe a que frecuentemente comparten características fisiopatológicas (Figura 11) <sup>69</sup>. La **hiperglucemia crónica** y consecuente RI, son clave para el desarrollo de alteraciones y complicaciones vasculares. El **endotelio vascular** juega un papel fundamental en el desarrollo de HTA y complicaciones cardiovasculares, ya que es un elemento esencial del tono vascular. Existe una relación entre la hiperglucemia crónica y el incremento en formación de AGEs, estrés oxidativo e inflamación; estas alteraciones vasculares generan endurecimiento de las arterias y vasos provocando pérdida de su elasticidad <sup>70</sup>.



**Figura 11.** Hipertensión arterial y diabetes incrementan el riesgo de enfermedad cardiovascular al promover daño y modificación endotelial, cuyas consecuencias se ven exacerbadas por la coexistencia de ambas patologías. *Adaptado de: Petrie, Guzik & Touyz, 2018.*

### 1.4.3 Tratamiento farmacológico y no farmacológico

La farmacología básica para el tratamiento de la HTA se basa en tres grandes grupos de acción: diuréticos, inhibidores de la actividad simpática y vasodilatadores<sup>63,71</sup>. Cuyas combinaciones se resumen en el algoritmo de la Figura 12.

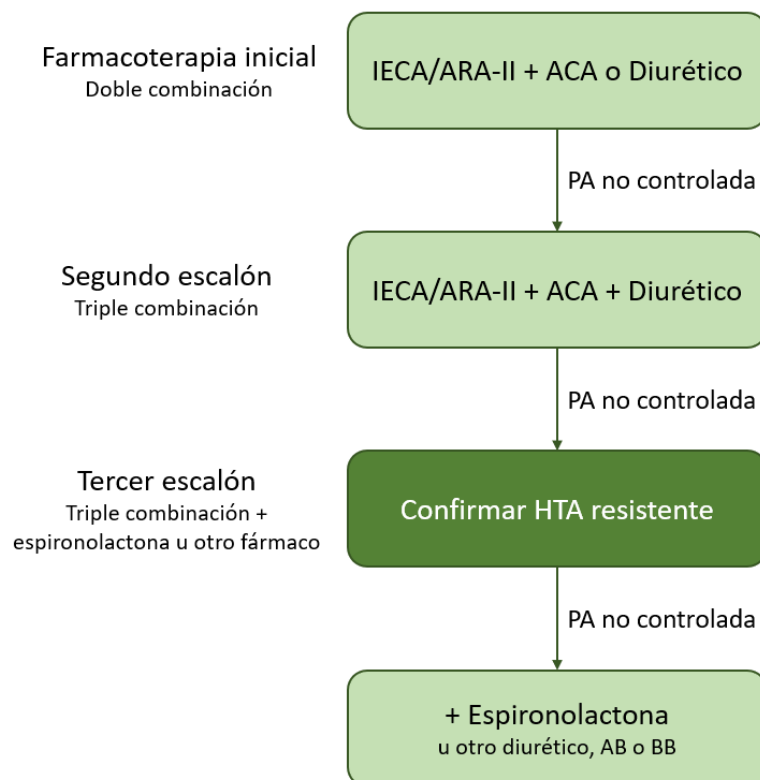
1. **Diuréticos:** mediante la eliminación de líquido acumulado, muchas veces originario de edemas, se logra reducir el volumen de sangre en las arterias, así como la carga de esfuerzo que debe ejercer el corazón para bombearla.
  - Diuréticos del asa: inhiben la reabsorción de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el asa de Henle, incrementando la excreción renal de  $\text{H}_2\text{O}$  y reduciendo la presión arterial. Ej. **Furosemida**.
  - Tiazidas: incrementan la secreción de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{K}^+$  en el túbulo contorneado renal distal, reduciendo el volumen de líquido extracelular. Ej. **Hidroclorotiazida**.
  - Diuréticos ahorradores de potasio: bloquean los canales de  $\text{Na}^+$  en el túbulo contorneado distal impidiendo la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Ej. **Eplerenona** y **espironolactona**.

2. Inhibidores de la actividad simpática

- $\beta$ -bloqueantes: bloqueo de ambos receptores  $\beta$ . Encontramos un subgrupo cardio-selectivo antagonistas de  $\beta$ -1 que producen reducción de la frecuencia cardiaca y contractilidad, y provocan relajación en musculatura lisa. Ej. **Bisoprolol, nebivolol**.
- $\alpha$ -bloqueantes: bloqueantes selectivos de los receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos postsinápticos produciendo vasodilatación periférica. Ej. **Doxazosina**.

3. Vasodilatadores

- Modificadores del sistema renina angiotensina:
  - Inhibidores enzima convertidora de angiotensina (IECA): se logra reducción de la formación de angiotensina II induciendo vasodilatación entre otras acciones. Ej. **Enalapril**.
  - Antagonistas receptor angiotensina II (ARA-II): bloquean los receptores AT1 de la angiotensina II localizados en los vasos, produciendo vasodilatación. Ej. **Olmesartán, valsartán**.
  - Inhibidor de renina: bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona mediante inhibición directa de la renina. Única molécula del grupo es **aliskiren**.
- Antagonistas de canales de calcio: bloquean la entrada del ion  $Ca^{2+}$  en las células musculares lisas, produciendo vasodilatación arterial. Ej. **Amlodipino, verapamilo**.



**Figura 12.** Algoritmo general del tratamiento de la hipertensión arterial. AB: bloqueante  $\alpha$ -adrenérgico; ACA: antagonista canales de calcio; ARA-II: antagonista receptores angiotensina II; BB: bloqueante  $\beta$ -adrenérgico; IECA: inhibidor enzima convertidora de angiotensina; PA: presión arterial. *Adaptado de: Macia et al, 2023.*

La pérdida de peso basado en dieta, ejercicio y cambio de hábitos sigue siendo el tratamiento de elección en la prevención y mejora de la fisiopatología de la HTA, especialmente la asociada a obesidad. El tratamiento farmacológico de la HTA asociado a obesidad puede producir efectos adversos a tener en cuenta, sobre todo cuando hablamos de poblaciones adolescentes y pediátricas, donde lo más adecuado sería la prevención.

### 1.5 Los efectos tóxicos del exceso de glucosa en el organismo

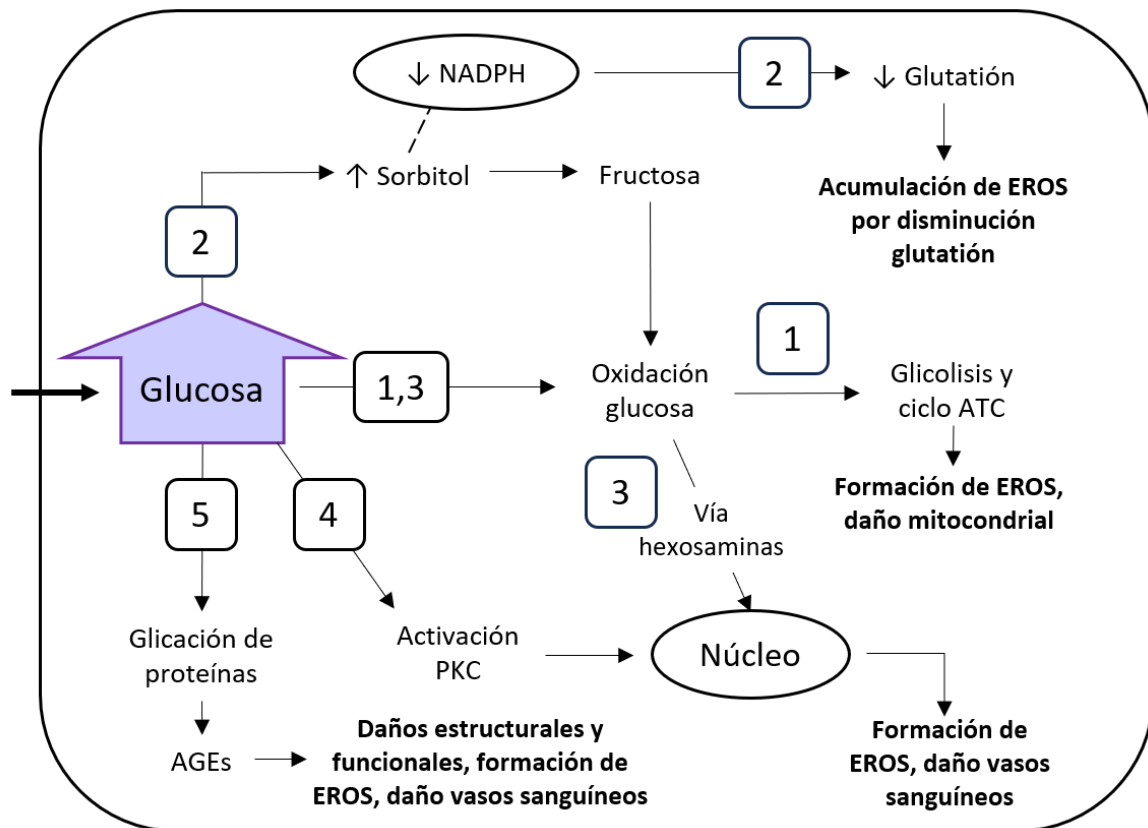
El **exceso de glucosa** produce daños micro y macrovasculares en el organismo, pero se desconoce cuan grave debe ser esa hiperglucemia y el tiempo de exposición para que se manifiesten los efectos tóxicos (Figura 13). Para que la glucosa produzca daños a nivel celular, esta debe ser introducida a través de las membranas mediante los transportadores de glucosa. Ciertos tipos celulares son más susceptibles a estos desequilibrios introduciendo cantidades de glucosa superiores a lo necesario, como las células  **$\beta$ -pancreáticas**, **neuronas** y células del **endotelio vascular**; lo que los convierte en los tejidos más susceptibles a la toxicidad inducida por glucosa <sup>45</sup>.



**Figura 13.** Enfermedades y alteraciones asociados al exceso de glucosa y su efecto tóxico. Adaptado de: WHO, 2022.

Existen diversos mecanismos por los que el exceso de glucosa produce toxicidad en el organismo (Figura 14):

1. El incremento de la oxidación de glucosa promueve la **producción de superóxido**. Tras la entrada de glucosa en la célula, se metaboliza y proporciona dadores de electrones para ceder a la mitocondria. Cuando la capacidad de trabajo de la mitocondria se supera, los dadores de electrones comienzan a sintetizar especies reactivas de oxígeno (EROS).
2. Producción de sorbitol a partir del exceso de glucosa se incrementa, **disminuyendo el NADPH**, limitando a su vez la producción del antioxidante glutatión; uno de los mecanismos antioxidantes importantes en las células. La enzima glutatión reductasa lo reduce ayudado del NADPH, cuando se agota la cantidad de NADPH la célula queda vulnerable a los efectos de los EROS.
3. Parte del exceso de glucosa se convierte en fructosa-6-fosfato y pasa a la ruta de las **hexaminas**, cuyos productos modifican la expresión genética y a su vez incrementan la síntesis de EROS.
4. Activación del **sistema PKC** (proteína quinasa C) resulta en la expresión de factores que promueven la formación de EROS y producen daños en los vasos sanguíneos y la circulación. La activación de esta ruta puede promover la activación de expresión de genes inductores de daño endotelial, así como inducir la vasoconstricción.
5. La presencia de niveles elevados de glucosa de manera crónica induce a la **glicación de proteínas**, que servirán como precursores de AGEs y producirán modificaciones estructurales y daños a nivel de los vasos sanguíneos.

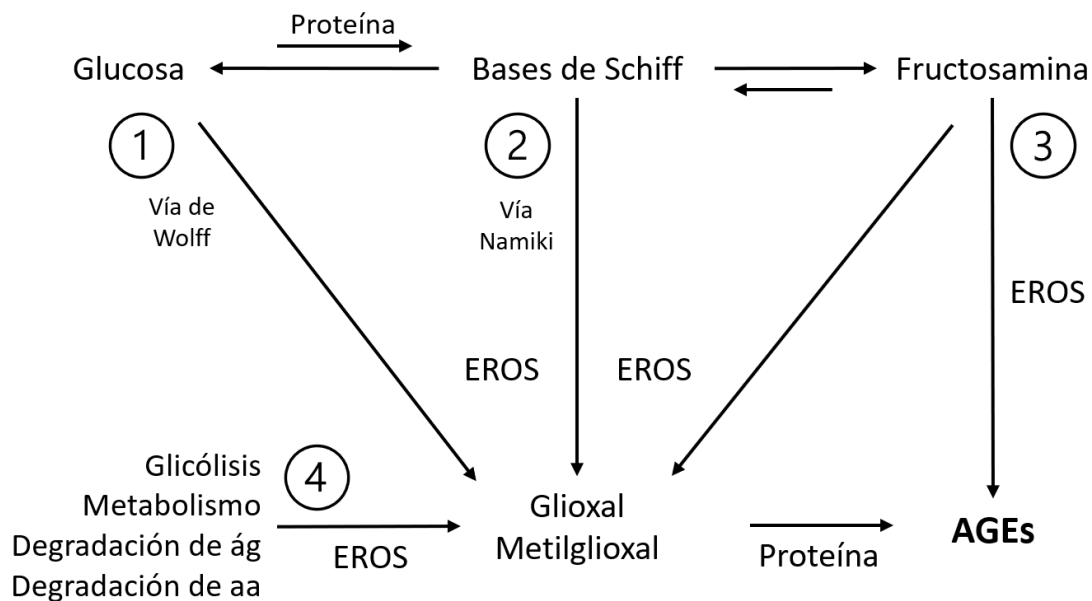


**Figura 14.** Mecanismos por los que la glucosa intracelular genera toxicidad en el organismo. AGEs: productos finales de glicación avanzada; ATC: ácido tricarboxílico; EROS: especies reactivas de oxígeno; PKC: proteína quinasa C. *Adaptado de: Campos, 2012.*

### 1.5.1 Productos finales de glicación avanzada (AGEs)

Los **productos finales de glicación avanzada (AGEs)** son moléculas, principalmente proteínas y ácidos nucleicos, que sufren modificaciones irreversibles en un proceso denominado la reacción de Maillard que tiene lugar a través del metabolismo normal, pero su síntesis se ve inducida por las elevadas concentraciones de glucosa. Las concentraciones de **AGEs** en plasma elevadas se han asociado con DM 1 y DM2, y pueden emplearse como biomarcadores predictores de la evolución de patologías cardiovasculares o de la propia diabetes. En la mayoría de los casos, estas moléculas se forman a partir de proteínas, cuya glicación tiene efectos muy variados sobre el organismo. Por ejemplo, la glicación de proteína  $\beta$ -amiloide presente en el tejido neuronal se relaciona con progresión de la enfermedad de Alzheimer; y la glicación de proteínas estructurales como el colágeno resulta en el endurecimiento de la matriz extracelular y consiguiente disfunción de vasos sanguíneos y órganos<sup>72</sup>. La glicación de proteínas sucede de manera natural en el organismo conforme envejecemos, por lo tanto, aquellas proteínas que permanezcan durante periodos muy prolongados sin modificarse o metabolizarse, serán diana para sufrir estas modificaciones y formar AGEs. Se han identificado cuatro tipos de reacciones por las que se producen estas moléculas (Figura 15):

1. Autooxidación de monosacáridos.
2. Fragmentación de bases Schiff.
3. Degradación de fructosa.
4. Formación de compuestos  $\alpha$ ,  $\beta$ -dicarbonílicos a partir de la degradación de intermediarios glucolíticos y la peroxidación lipídica.



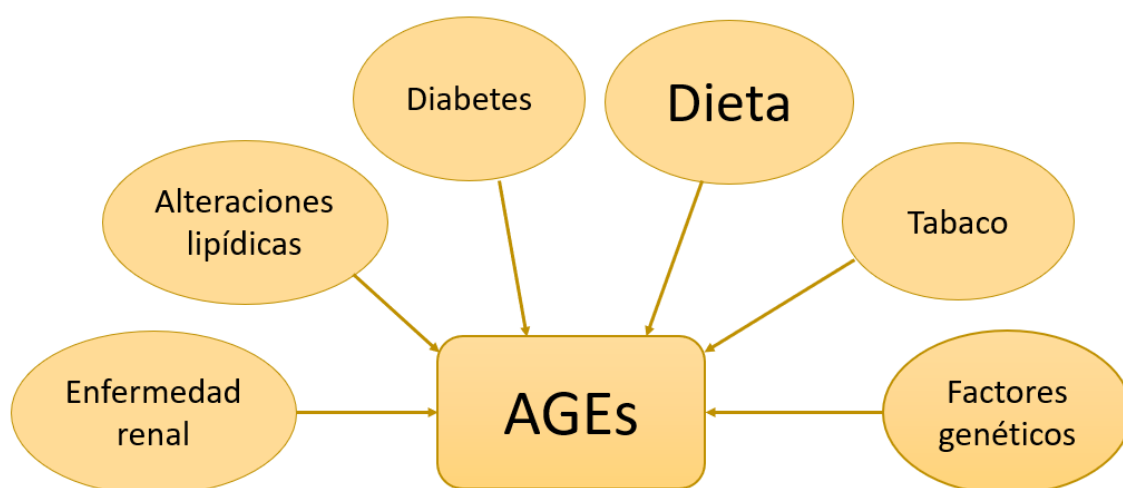
**Figura 15.** Esquema de los mecanismos endógenos de síntesis de AGEs. aa: aminoácidos; ág: ácidos grasos; EROS: especies reactivas de oxígeno. *Adaptado de: Gill et al, 2019; Nass et al, 2007.*

La acumulación de AGEs intracelulares induce fallos como plegamiento erróneo de proteínas, o su agregación irregular; mientras que, si esta acumulación tiene lugar en espacios extracelulares, los daños provocados se dan principalmente mediante dos mecanismos de acción: induciendo **deformaciones estructurales** mediante enlaces entre proteínas, y a través de la **unión a receptores de AGEs (RAGE)** <sup>73</sup>. Los **RAGE** son receptores de superficie celular de la familia de las inmunoglobulinas, cuyos múltiples ligandos tienden a acumularse en tejidos diabéticos. Estos receptores pueden unirse no solo a moléculas endógenas, sino que son capaces de interactuar con bacterias o incluso priones <sup>74</sup>. Se expresan en multitud de tejidos y tipos celulares entre los que podemos encontrar músculo liso, endotelio, o tejido neuronal. La unión de ligandos a estos receptores produce la activación de vías de señalización que provocan estrés oxidativo, disfunción celular, daños tisulares e inflamación <sup>75</sup>.

La formación de enlaces entre moléculas AGE y proteínas estructurales, así como la glicación de esas proteínas estructurales como el colágeno, promueven la rigidez de arterias, tejido del

miocardio y tejido conectivo, incrementado en condiciones de hiperglucémicas prolongadas en el tiempo <sup>75-77</sup>.

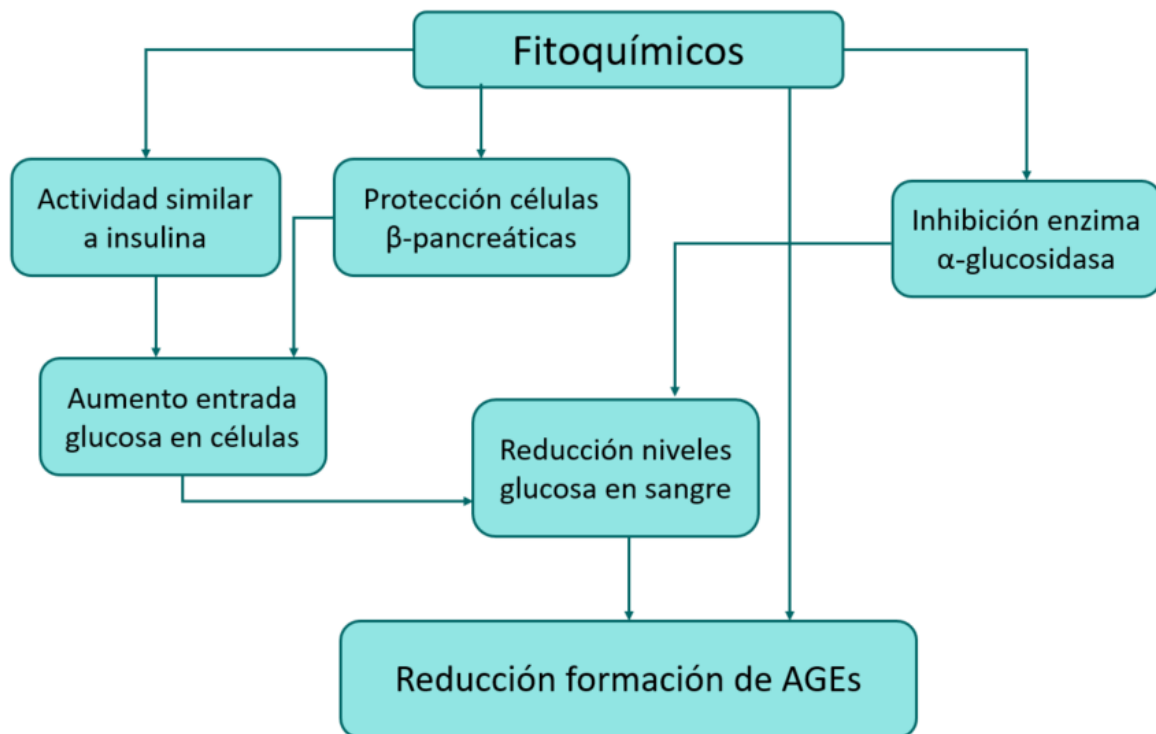
Los AGEs no solo pueden tener procedencia endógena, también pueden ser introducidos en el organismo a través de la ingesta de alimentos (Figura 16) <sup>78</sup>. En las últimas décadas, se ha producido una modificación en el estilo y contenido de la dieta; actualmente parte de la cultura del consumismo, incitando la **sobrenutrición** e ingesta por encima de las necesidades fisiológicas, así como la ingesta de azúcar y grasas. Muchos alimentos y productos que constituyen la dieta de gran parte de la población hoy en día son preparados precocinados o bebidas azucaradas <sup>79</sup>. Estos alimentos sufren procesos en los que pueden darse la formación de compuestos indeseados y perjudiciales como los AGEs <sup>73</sup>. Emplear elevados tiempos de cocción, a elevadas temperaturas y en ambientes secos inducen la producción de AGEs en los alimentos precocinados, ya que se necesitan temperaturas mucho más elevadas que las necesarias en el organismo para su síntesis <sup>80</sup>. La ingesta de dieta baja en moléculas AGEs ha demostrado ser beneficiosa en la evolución de patologías como DM2, SM y obesidad, así como reducir los marcadores inflamatorios asociados a este tipo de patologías cardiovasculares <sup>81-83</sup>.



**Figura 16.** Diferentes fuentes de origen de los productos finales de glicación (AGEs). *Adaptado de: Vlassara, 2005.*

La **aminoguanidina** (AMG) es un fármaco experimental que ha demostrado reducir la producción de AGEs, pero a su vez demostró numerosos efectos adversos como la glomerulonefritis <sup>84</sup>, por lo que su uso no es recomendable. Es preferible una modificación en la dieta e ingesta, ya que ciertos alimentos y compuestos naturales han demostrado capacidad de prevención en la producción de AGEs debido a sus propiedades **antioxidantes** <sup>85,86</sup>, así como prevenir síntomas de patologías como la diabetes <sup>87,88</sup> y otras enfermedades incluida la enfermedad cardiovascular <sup>89</sup>. Además, las moléculas capaces de reducir los niveles

de glucosa en sangre como ciertos fitoquímicos ayudarán en la prevención de la formación de AGEs<sup>90</sup> (Figura 17).



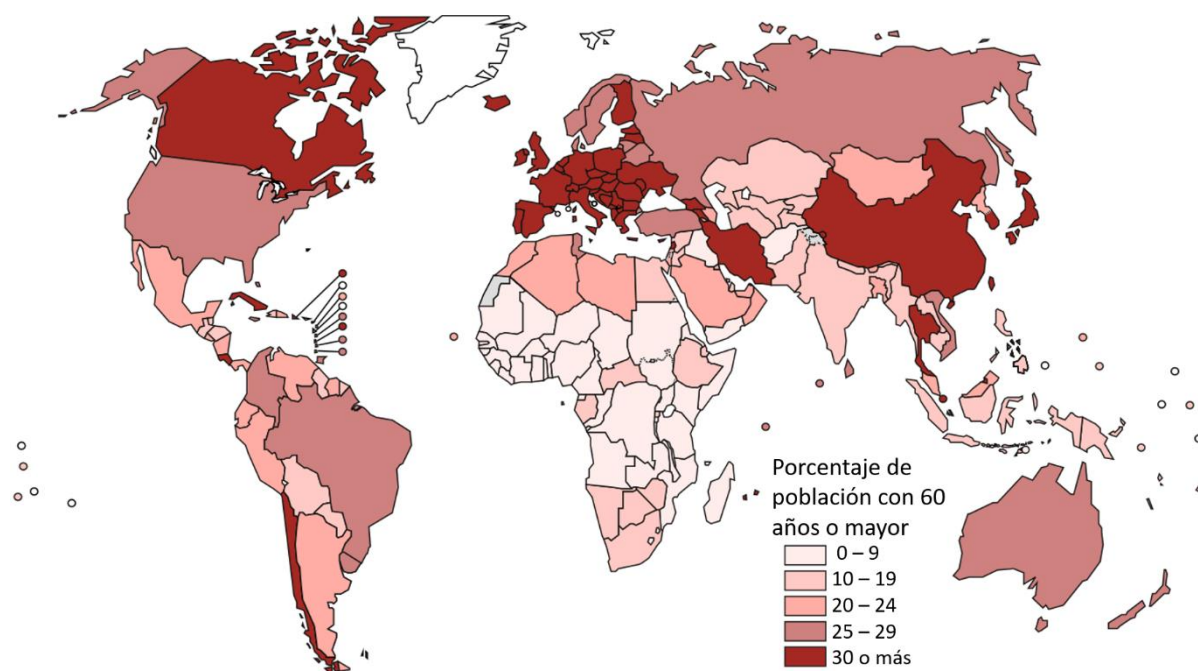
**Figura 17.** Papel de los fitoquímicos en la inhibición de formación de AGEs a través de la reducción de los niveles de glucosa. *Adaptado de Khanghali et al, 2016.*

## 2. ENVEJECIMIENTO SALUDABLE

La mejora en la calidad de vida y los avances en medicina, entre otros factores, han permitido que la población alcance una esperanza de vida cada vez más elevada. Durante las últimas décadas, la **esperanza de vida** mundial se ha incrementado desde los 66,8 años en el 2000 hasta alcanzar la media de 73,3 años en 2019. En países con un estado de bienestar instaurado como España, la esperanza de vida media de la población alcanza valores de 83,3 años. Se estima que para el año 2050 la población de mayores de 60 años alcanzará los dos billones de personas, superando el número de niños (Figura 18)<sup>91</sup>. Este incremento en la esperanza de vida en la población mundial, sumado con el descenso en la natalidad, plantea un futuro con población cada vez más envejecida y con más problemas de salud.

El **envejecimiento** implica cambios en la fisiología de las personas a lo largo de los años; que principalmente consisten en pérdida de la vista y audición, declive de muchos procesos cognitivos, disminución en la producción de hormonas sexuales y del crecimiento, y mayor presencia de inflamación<sup>92</sup>. El envejecimiento supone el principal factor en el deterioro de la salud y metabolismo; a nivel biológico se asocia con la acumulación de daños a nivel molecular y celular, siendo el factor de riesgo más importante en el desarrollo de numerosas

enfermedades. Las patologías de carácter crónico se ven agravadas con la edad, y su incidencia no se limita a los países de mayores rentas.



**Figura 18.** Estimación de la proporción de población mayor de 60 años por países para el año 2050. *Adaptado de: Almeida et al, 2016.*

El término **EVAS** (Esperanza de Vida Ajustada por Salud) se acuñó para referirse a los años que una persona se espera que viva en completa salud, sin ninguna enfermedad o lesión. Debido al sedentarismo, el aumento en el consumo de azúcar y alimentos procesados, entre otros factores, la esperanza de vida se ha elevado a un mayor ritmo que la EVAS, lo que se traduce en menos años de vida en completa salud y restante vida sufriendo diversas patologías. Esto implica que la incidencia de enfermedades metabólicas y relacionadas con el envejecimiento aumentará con el paso del tiempo, planteando un escenario de **multimorbilidad**. Por multimorbilidad consideramos la presencia de más de una patología crónica afectando a un mismo paciente, cuyo tratamiento y control no debe considerarse de manera independiente, pudiendo darse interacciones entre las propias condiciones y sus tratamientos. Asociando este panorama a mayores gastos sanitarios y consumo de recursos <sup>93</sup>.

El **envejecimiento saludable** es un término holístico empleado por la OMS para referirse al proceso de desarrollo y mantenimiento de la capacidad funcional que permite bienestar en la vejez <sup>91</sup>. Viene marcado por las interacciones que se producen entre los individuos y su entorno, pudiendo desarrollarse diversas trayectorias o evoluciones diferentes. Implica la promoción de vida activa y productiva, mantenimiento de las capacidades físicas, cognitivas y sociales. El envejecimiento saludable viene determinado por diferentes factores; algunos no modificables como la genética y otros modificables como el estilo de vida y el entorno social.

La OMS trata como personas mayores a todos aquellos adultos que superan los 60 años, pero debido a la longevidad actual es necesaria una mayor clasificación<sup>91</sup>. Se definen como adultos de edad avanzada a los que se encuentran entre los 60 y 74 años, ancianos de los 75 a 90 años, y se denominan como longevos a aquellos que superan los 90 años<sup>94</sup>.

## 2.1 Envejecimiento y enfermedades no transmisibles

Debido al envejecimiento poblacional que está teniendo lugar globalmente, la relación entre obesidad y pérdida de las capacidades cognitivas, así como la salud general cobran gran importancia<sup>95</sup>. La obesidad conlleva una serie de consecuencias metabólicas perjudiciales para la salud y que además precipitan el deterioro que el propio envejecimiento supone al organismo, ya que imita alguna de las características del envejecimiento a nivel metabólico. Se asocia con aceleración en los procesos celulares que tienen lugar en el envejecimiento normal como la reducción de los telómeros o disminución en la capacidad de respuesta inmune<sup>20</sup>. Por otro lado, el envejecimiento se asocia a un aumento de la acumulación abdominal de grasa a la par que disminución de la grasa subcutánea<sup>92</sup>. La obesidad induce desestabilización en el balance redox similar al envejecimiento; de hecho, se ha observado en ratones obesos una disminución en la esperanza de vida, así como incremento de marcadores de estrés oxidativo<sup>96</sup>. Se puede considerar a la obesidad por lo tanto como una patología que acelera el envejecimiento.

El número de pacientes mayores con DM2 sigue aumentando cada año debido al incremento de la esperanza de vida; es más, se estima que entre los años 2017 y 2045 la población de más de 65 años con DM2 incrementa de los 122 a los 253 millones de personas<sup>97</sup>. Relacionado también con la DM, se ha observado que la hiperglicemia e hiperinsulinemia mantenidas en el tiempo inducen un envejecimiento acelerado de las células  $\beta$ -pancreáticas<sup>98</sup>.

Se estima que un 60% de los adultos mayores de 65 años padecen HTA, y el porcentaje incrementa cuando se trata de pacientes frágiles como los ancianos. Los niveles de presión arterial incrementan conforme envejece una persona, al igual que le sucede al pulso cardíaco<sup>99</sup>. Además, el envejecimiento vascular precoz causado por los **AGEs** y **EROS**, así como los mecanismos inflamatorios son clave para el desarrollo de HTA<sup>100</sup>.

## 2.2 El envejecimiento oxidativo-inflamatorio: Oxi-inflamm-ageing

Dentro de los mecanismos descritos para explicar el envejecimiento, la teoría del envejecimiento oxidativo-inflamatorio ("**oxi-inflamm-ageing**") surgió como una hipótesis integral que relaciona la biología del envejecimiento con las enfermedades asociadas a él. El envejecimiento se asocia con un empeoramiento en el funcionamiento del sistema inmune y un aumento en la presencia de actividad inflamatoria<sup>101</sup>. Los niveles de citoquinas proinflamatorias se encuentran elevados entre 2 y 4 veces más en sujetos mayores de 50 años

comparado con pacientes más jóvenes <sup>102</sup>. Mientras que, en la población anciana con un envejecimiento saludable inusual, los niveles de parámetros inflamatorios son inferiores a otros individuos del mismo grupo etario <sup>103</sup>. Se produce entonces una inflamación crónica y generalizada en el organismo que se asocia a la activación de las células inmunes durante el curso de la vida, cuya función se ve comprometida, así como estrés oxidativo crónico <sup>92</sup>. Esta oxidación afecta principalmente a sistemas regulatorios del organismo, reduciendo su capacidad de homeostasis; una de las principales manifestaciones del envejecimiento. También podemos considerar estas moléculas inflamatorias como biomarcadores del envejecimiento <sup>104</sup>.

Las fuentes del origen de este **oxi-inflamm-ageing** se consideran variadas e interconectadas (Figura 19) <sup>105</sup>. Se teoriza que el incremento en los niveles de inflamación se pueda deber a un incremento en la activación del sistema de coagulación, al igual que sucede en la DM2, o a la senescencia celular. Otra teoría de la constante inflamación es la **inmunosenescencia**, el empeoramiento gradual de la capacidad de respuesta inmune tanto innata como adaptativa; conllevando disminución en la activación y proliferación celular, que tiene lugar en el envejecimiento de los individuos <sup>106</sup>. Y la teoría más relacionada con los daños tóxicos que el exceso de glucosa puede provocar en el organismo, es la **acumulación de macromoléculas y células dañadas**. Estos componentes son entre otros AGEs, relacionados con un estado de leve inflamación crónica, empeorando la evolución y pronóstico de numerosas patologías, así como el propio envejecimiento <sup>107</sup>.

La inflamación crónica puede ser prevenida a través de compuestos naturales presentes en alimentos <sup>108</sup> y su acción sería más efectiva si la prevención se realiza a lo largo de la vida y no en edad avanzada donde el margen de maniobra es más limitado.

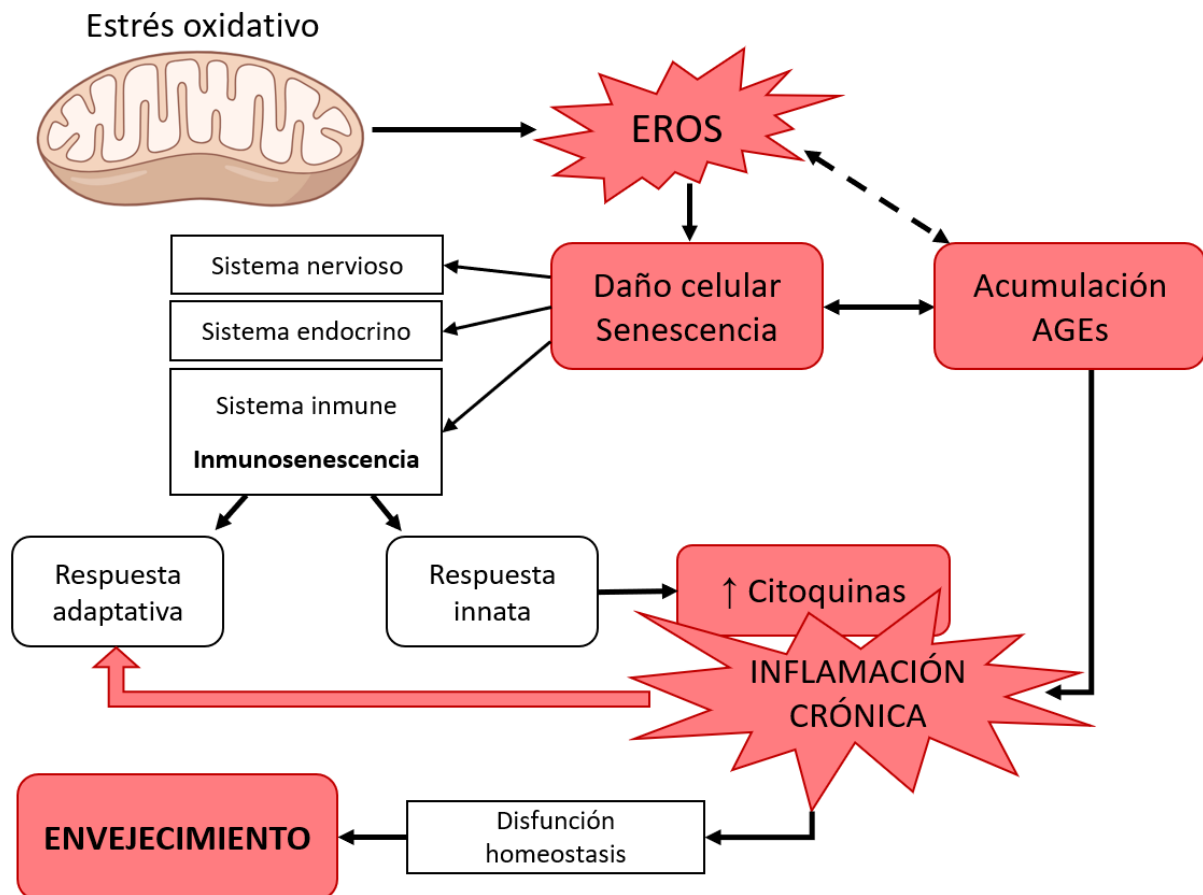


Figura 19. Mecanismos del oxi-inflamm-ageing. Adaptado de: Romero Cabrera, 2015.

### 3. LA PREVENCIÓN FRENTE AL TRATAMIENTO

El futuro de la medicina recae en la prevención y detección temprana de las patologías o condiciones para no tener que llegar al tratamiento, o reducirlo lo máximo posible. Se conoce a este campo de la salud como **medicina preventiva**, centrada en la promoción de la salud y prevención de las enfermedades.

El correcto manejo de pacientes con patologías crónicas, como ECV, diabetes y otras ENTs, es esencial para prevenir la acumulación de fallos y déficits funcionales, reducir las hospitalizaciones y disminuir el número de muertes prematuras<sup>109</sup>. Se ha demostrado a través de ensayos clínicos aleatorizados la eficacia de los programas preventivos en el mantenimiento y/o mejora de la salud en la población mayor<sup>110</sup>. Además de lograr mejoras en la calidad de vida de la población, este tipo de intervenciones preventivas supondrían una reducción en el gasto de sanidad pública. Como hemos observado en apartados anteriores, los tratamientos para las patologías más prevalentes hoy en día son costosos y no al alcance de cualquier individuo. Además, con la reducción del consumo de fármacos se pueden prevenir la aparición de efectos adversos e interacciones indeseadas e innecesarias. Este tipo de intervenciones pueden estar enfocadas a diferentes áreas de acción; como pueden ser

manejo y revisión de la medicación, prevención de las caídas en personas mayores, fomento de la actividad física, o fomento de una alimentación saludable.

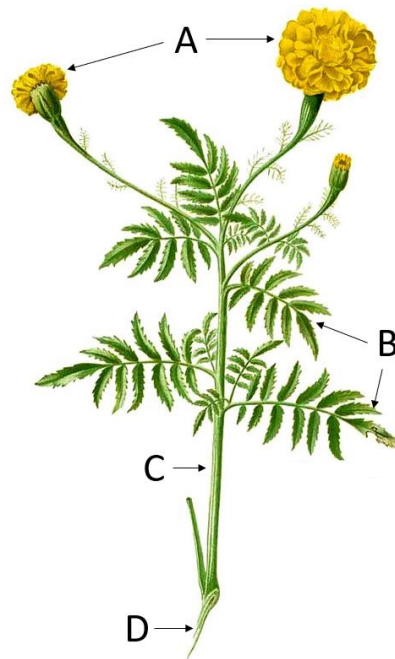
Se ha demostrado que numerosas afecciones pueden ser prevenidas o mitigadas sin tener que recurrir a tratamientos farmacológicos <sup>111</sup>. Existen estrategias terapéuticas no farmacológicas dirigidas a combatir el estrés oxidativo y la inflamación en la obesidad y envejecimiento, que se pueden englobar en las intervenciones dietéticas y el ejercicio físico. Dentro de las intervenciones dietéticas encontramos la restricción calórica, el ayuno intermitente y los suplementos dietéticos. La restricción calórica y ayuno intermitente suponen una solución efectiva en algunos pacientes para la pérdida de peso <sup>101</sup>. Pero no sólo con la bajada de peso se logran combatir los efectos perjudiciales de la obesidad y envejecimiento prematuro; mediante la **intervención nutricional** se pretende mantener la capacidad antioxidante y eficacia celular, así como incluir ciertos nutrientes que aporten beneficios y ayuden en la mitigación de patologías relacionadas con la edad. Estas intervenciones a nivel nutricional entran en la categoría de suplementos dietéticos; y es dentro de los suplementos dietéticos dónde podemos ejercer mayor acción preventiva y terapéutica al administrar **alimentos funcionales** o **nutracéuticos** <sup>112-114</sup>. Estos alimentos funcionales o nutracéuticos poseen una composición rica en moléculas y compuestos bioactivos generalmente antioxidantes. Gracias a su capacidad antioxidante juegan un papel importante en la prevención del daño causado por radicales libres, manteniendo el funcionamiento normal de las células <sup>101</sup>.

El término nutracéutico se acuñó en 1989 por S. Defelice a pesar de no existir una definición internacionalmente establecida del término. La Asociación Europea de Nutracéutica (European Nutraceutical Association) define los nutracéuticos como productos aislados o purificados a partir de alimentos, que generalmente se comercializan en formas médicas no asociadas a alimentos y han demostrado poseer beneficios fisiológicos y/o prevenir el avance o empeoramiento de una enfermedad crónica. Por otro lado, alimento funcional se define como aquellos alimentos convencionales que se consumen en la dieta cotidiana y que contienen compuestos biológicamente activos y cuyos beneficios sobre la salud pueden prevenir el avance de ciertas patologías <sup>89</sup>. Ambos términos se emplean en ocasiones de manera indistinta, aunque sería más correcto emplearlos diferenciando el tipo de producto; emplearemos alimento funcional cuando hablemos de un alimento completo sin alterar, pero usaremos nutracéutico cuando se produzcan alteraciones, extractos o compuestos aislados del alimento o producto natural.

Estos alimentos pueden influenciar sobre el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono en el organismo, esencial para el control y prevención de patologías como DM2 y obesidad <sup>113,114</sup>. Un buen ejemplo de posibles nutracéuticos y alimentos funcionales son las **flores comestibles**.

## 4. FLORES COMESTIBLES

Durante siglos, la medicina tradicional se ha basado en el uso de plantas medicinales, empleando sus diferentes partes para infinidad de usos terapéuticos (Figura 20) <sup>115</sup>. Una de las partes más llamativas de las plantas siempre han sido las flores, bien por su uso ornamental, por su fragancia o incluso por su aplicación en gastronomía.

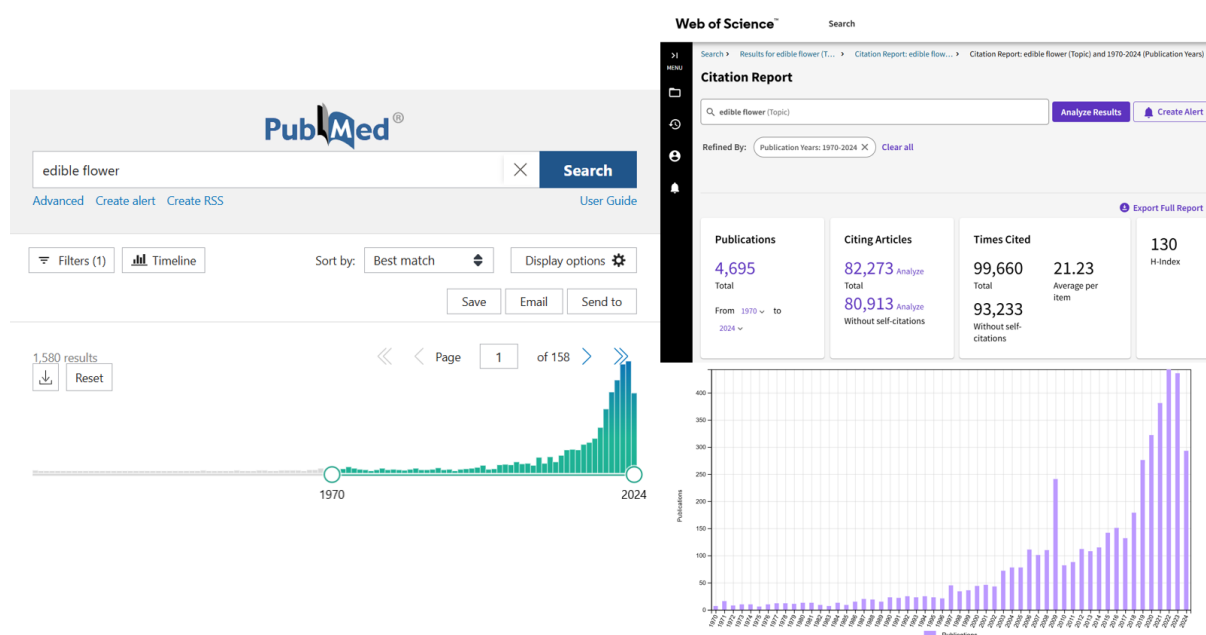


**Figura 20.** Estructura de una planta de *Tagetes erecta*. A) flores, B) hojas, C) tallo, D) raíces. Adaptado de: Blanco, 1837.

Existen flores que pueden ser consumidas frescas e inalteradas sin ser tóxicas para el organismo, son las denominadas **flores comestibles**. Las flores comestibles pueden dividirse principalmente en tres grupos: flores de frutos, flores de vegetales y flores aromáticas medicinales <sup>116</sup>. Se considera que el número de especies comestibles ronda las 30.000 en todo el mundo; sin embargo, las que se emplean con fines alimenticios son una minoría. La gran variedad de plantas comestibles existentes representa un recurso infrutilizado como fuente de alimento.

El uso de flores comestibles en gastronomía no se debe considerar como un descubrimiento, sino una puesta en contacto de nuevo con tradiciones etnobotánicas de la antigüedad, ya que su uso se remonta a la antiguas Grecia y Roma <sup>117,118</sup>. También existen referencias al consumo de flores en ensaladas en la Edad Media <sup>119</sup>. El consumo en los últimos años de flores comestibles se asocia a preparaciones gourmet o de alta cocina más que un uso cotidiano <sup>120</sup>. Ofrecen una variedad de sabores y texturas diferentes a las habituales, enriqueciendo la experiencia gastronómica. Pero más allá de su valor estético y culinario; estas flores han generado un **creciente interés** en investigación debido a su potencial para brindar beneficios

para la salud humana. Poseen importante calidad nutricional debido a su composición de nutrientes esenciales y valor energético, y podrían considerarse incluso beneficiosas para la salud debido a su rica composición en **moléculas bioactivas** <sup>120</sup>. Gracias a la popularidad que los productos naturales han obtenido en los últimos años, se ha incrementado el interés en la fitoterapia <sup>121</sup>. Además, numerosos estudios han revelado propiedades nutricionales, medicinales y funcionales de las flores comestibles, generando un renovado interés en su estudio y aplicación en diferentes campos como la industria, la alimentación, la cosmética o la farmacología <sup>122-127</sup>. Prueba de ello, es el incremento exponencial producido en el número de publicaciones sobre flores comestibles en los últimos años como podemos observar en la Figura 21.



**Figura 21.** Búsqueda del término “edible flower” en diversos motores de búsqueda bibliográfica. *Realización propia.*

Las flores comestibles provienen de 97 familias, 100 géneros y 180 especies a lo largo del globo. Las especies más citadas por familia son *Asteraceae*, y por género son *Viola* <sup>117</sup>, siendo Italia y España los países mediterráneos con mayor uso de flores comestibles a nivel nacional. Las nuevas líneas de investigación basadas en flores comestibles se deben a su **composición fitoquímica** y se fundamentan en los precedentes existentes sobre sus usos tradicionales (Tabla 6).

## Introducción

**Tabla 6.** Revisión sobre el uso comestible y terapéutico de diversas flores comestibles. *Realización propia.*

Nombre científico	Nombre común	Familia	Origen	Uso comestible	Uso terapéutico	Principales compuestos bioactivos	Referencias
<i>Allium cepa</i>	Flor de cebolla	<i>Amaryllidaceae</i>	Asia Central	Condimento, decoración, ensaladas	Antioxidante, anti-obesidad.	Flavonoles	128,129
<i>Antirrhinum majus</i>	Boca de dragón	<i>Scrophulariaceae</i>	Europa, América Central	Condimento y decoración	Diurético, patologías hepáticas, antioxidante.	Antocianinas, flavonoles	130-132
<i>Brassica incana</i>	Rabaniza amarilla	<i>Brassicaceae</i>	Sudeste de Europa	Condimento	Antioxidante, anti-obesidad, citotóxico.	Flavonoles	133,134
<i>Calendula officinalis</i>	Caléndula, flor de muerto	<i>Asteraceae</i>	Sur de Europa	Té, tartas, condimento	Hepatoprotector, antiinflamatorio, antibactericida, antifúngico, gastroprotector, tratamiento de úlceras y heridas tópicas.	Carotenoides, flavonoles, ácidos fenólicos	124,125,135-139
<i>Echinacea purpurea</i>	Equinácea purpúrea	<i>Asteraceae</i>	Norteamérica	Té de pétalos	Antioxidante, antidiabético, antihipertensivo, antimicrobiano, citotóxico.	Ácidos fenólicos, flavonoles	140,141
<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	Rosa de China, Hibisco, Cayena	<i>Malvaceae</i>	África	Té, complemento alimenticio	Tratamiento de catarro, fiebre y problemas genito-urinarios.	Antocianinas, flavonoles	142-144
<i>Rosa spp.</i>	Rosa	<i>Rosaceae</i>	Hemisferio norte de Europa	Té, ensalada, tartas, condimento	Cáncer, inflamación, enfermedad cardíaca, envejecimiento, antioxidante.	Antocianinas, flavonoles, flavanoles y carotenoides.	145-151
<i>Tagetes erecta</i>	Caléndula africana, clavel chino	<i>Asteraceae</i>	México	Ensalada y colorante alimenticio	Antienvjecimiento, degeneración macular relacionada con la edad, antiinflamatorio, neuro protector, antidiabético, antioxidante.	Carotenoides, flavonoles y ácidos fenólicos.	152-158
<i>Tagetes patula</i>	Clavel moro						
<i>Tropaeolum majus</i>	Capuchina, flor de sangre	<i>Tropaeolaceae</i>	Sudamérica	Té, tartas y condimento	Diurético, infecciones del tracto urinario, antiséptico y expectorante.	Carotenoides y ácidos fenólicos	159-161
<i>Viola × wittrockiana</i>	Pensamiento	<i>Violaceae</i>	Europa	Postres, sopas, bebidas, ensaladas o condimento	Laxante, expectorante, emético, antioxidante, antiinflamatorio, diurético, sedante y antiséptico.	Antocianinas, flavonas	162-167
<i>Yucca elephantipes</i>	Yuca gigante, yuca de interior	<i>Agavaceae</i>	América central y México	Ensalada y verdura	Diurético y tratamiento de enfermedades renales. Antioxidante, antiinflamatorio.	Flavonoles y ácidos fenólicos	168,169

Se marcan en verde las flores utilizadas en esta tesis doctoral.

Las plantas y sus componentes bioactivos han demostrado poseer una amplia gama de beneficios para la salud. Dentro de este contexto, las flores comestibles han sido identificadas como una fuente prometedora de compuestos bioactivos con **potencial terapéutico**. Se han reportado gran variedad de bioactividades en este tipo de productos. Prácticamente todas las flores comestibles son capaces de neutralizar radicales libres de manera muy eficaz <sup>131-133,135,140,163,167</sup>. El elevado contenido de compuestos fenólicos en las flores, comparado con el resto de los órganos, es el causante de esa actividad marcada actividad **antioxidante** cuyos mecanismos de acción se basan en vías de transducción multi-señal. Las propiedades **antiinflamatorias** de las flores comestibles están relacionadas con las vías de señalización que regulan la expresión de mediadores de inflamación como óxido nítrico (NO) y citoquinas <sup>126,135,139,151,152,168,170</sup>. Ciertas flores comestibles han demostrado propiedades **anticancerosas** cuyos mecanismos de acción pueden estar relacionados con la disfunción mitocondrial producida por EROS o la inducción de apoptosis <sup>133,171</sup>. Se han recogido también las inhibiciones de enzimas como acetilcolinesterasa o pseudocolinesterasa, a través de las cuales se logra disminuir el deterioro cognitivo además de estimular la plasticidad neuronal proporcionando propiedades **neuro-protectoras** a estas flores, útiles en patologías que afectan al SNC como la enfermedad de Alzheimer <sup>137,153,166,172</sup>. Se ha realizado también el estudio de propiedades **hipotensoras**; así, ciertos extractos o compuestos de flores logran la reducción de los niveles de presión sistólica y diastólica, cuyos mecanismos de acción se podrían producir de manera dependiente o independiente del endotelio vascular <sup>139,140,173</sup>. Diversos fitoquímicos y extractos de flores comestibles han demostrado propiedades **antidiabéticas** al lograr inhibir enzimas capaces de reducir de los niveles de glucosa postprandial, siendo eficaces en la prevención o manejo de patologías como la DM <sup>140,174,175</sup>. Se han estudiado además las propiedades **anti-obesidad** de ciertas flores comestibles, cuyos mecanismos y vías de actuación son muy diversos: disminuyendo la ingesta de alimentos, reduciendo la lipogénesis, induciendo la lipólisis, estimulando la oxidación de ácidos grasos, inhibiendo la diferenciación y crecimiento de adipocitos o reduciendo la formación de EROS <sup>101,129</sup>.

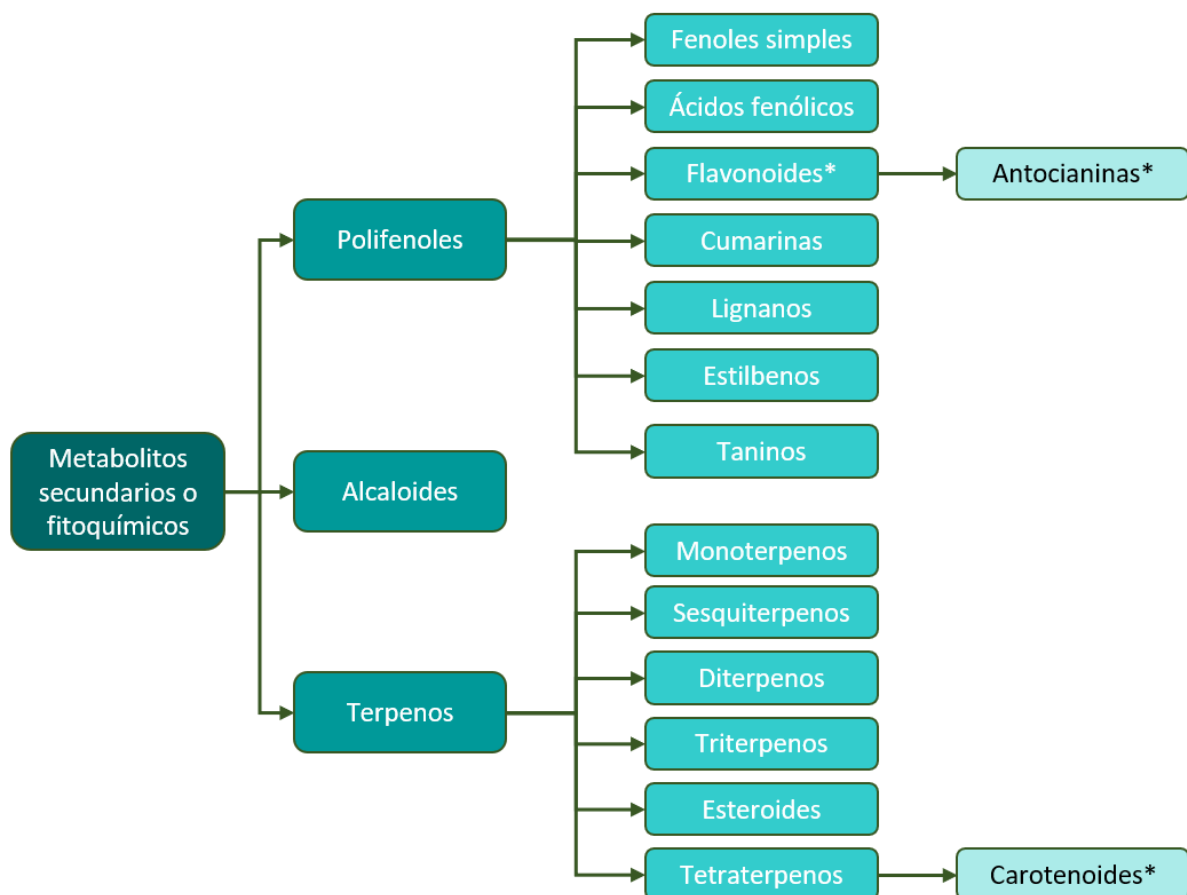
#### 4.1 Fitoquímicos de las flores comestibles

Las plantas, como seres vivos, realizan reacciones metabólicas esenciales para su supervivencia; en función del tipo de metabolito que sintetizan podemos diferenciar entre metabolitos primarios o secundarios. Son metabolitos primarios aquellos compuestos indispensables para la vida vegetal, es decir los que intervienen en procesos de obtención de energía, la reproducción o estructuras básicas. Sin embargo, llamamos metabolitos secundarios a todos aquellos compuestos sintetizados que no son esenciales para la vida, pero si son responsables de algunas funciones biológicas. Tanto los metabolitos primarios como secundarios son de interés en el campo de la medicina, pero son los metabolitos secundarios, también denominados **fitoquímicos**, los que mayor interés suscitan en multitud

de áreas como la cosmética, alimentación, farmacología o ecología entre otras <sup>132,176-179</sup>. No solo pueden ser sintetizados por las plantas, también podemos localizar metabolitos secundarios en microorganismos y hongos.

Definimos los **fitoquímicos** como los componentes no nutritivos de plantas, frutas, frutos y vegetales, que poseen el potencial de prevenir y reducir el riesgo de padecer importantes patologías crónicas como la obesidad o ECV <sup>171</sup>. Este potencial profiláctico y terapéutico proviene de sus variadas bioactividades, ya que encontramos fitoquímicos con potente capacidad antioxidante, antimicrobiana, neuroprotectora, antidiabética, hepatoprotectora o anticancerígena <sup>171</sup>. Algunos de estos fitoquímicos se encuentran en mayores concentraciones en las flores debido a su función como pigmentos, dependiendo del color del pétalo encontraremos diversidad de estas moléculas.

Dentro de los fitoquímicos encontramos una amplia variedad de estructuras moleculares. En función del origen sintético podemos diferenciar principalmente 3 grupos fitoquímicos: **polifenoles** (fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, lignanos y taninos), **terpenoides** (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, esteroides y tetraterpenos) y **alcaloides** (Figura 22).

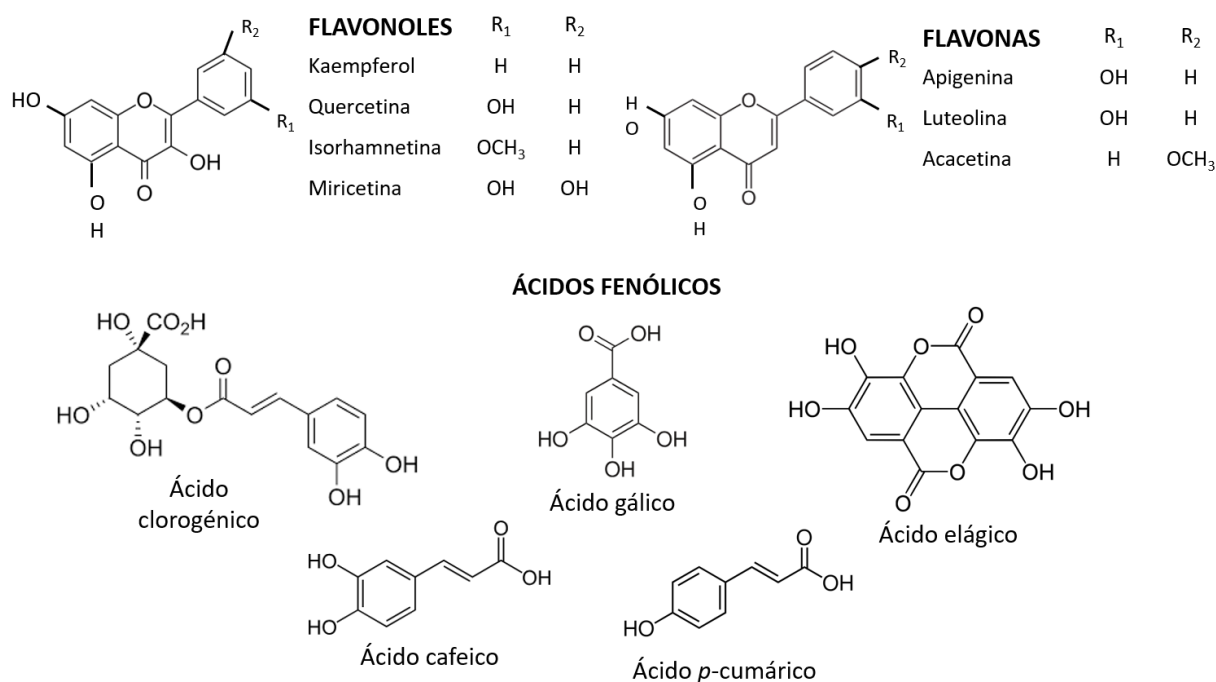


**Figura 22.** Clasificación de los metabolitos secundarios. \*Pigmentos. *Realización propia.*

### 4.1.1 Polifenoles o compuestos fenólicos

Este grupo de moléculas se encuentran en gran multitud de verduras, frutas, flores y bebidas de origen vegetal, siendo los metabolitos secundarios más frecuentes. Ejercen multitud de acciones en las plantas como protección frente a patógenos, estrés y radiación UV; así como otorgarles color y características sensoriales <sup>180</sup>. Se denominan también **compuestos fenólicos**, debido a que todas sus estructuras poseen al menos un anillo aromático y grupos hidroxilo, y junto con las vitaminas, se consideran antioxidantes esenciales de la dieta. La biosíntesis de los compuestos fenólicos tiene lugar en las plantas a través de la vía del **ácido sikímico**, cuyo origen parte de los aminoácidos fenilalanina y tirosina.

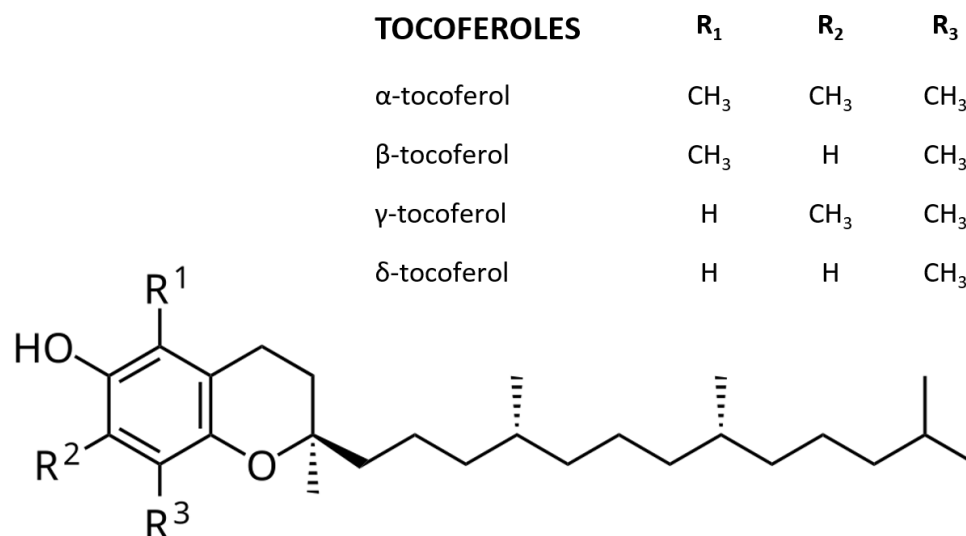
Dentro de los polifenoles (Figura 23), los **flavonoides** son el grupo más abundante y diverso presente, junto con los **ácidos fenólicos**, en las flores comestibles <sup>171</sup>. Poseen actividad antioxidante y antiinflamatoria. Dentro de este grupo de polifenoles encontramos chalconas, auronas, **flavonoles**, flavonas, isoflavonas, flavan-3-oles, catequinas y **antocianinas** <sup>180</sup>.



**Figura 23.** Diferentes estructuras de polifenoles identificados en flores comestibles. *Adaptado de: Lu, Lin & Yin, 2016; Zagoskina et al, 2023.*

En relación con los compuestos fenólicos, nos encontramos con los **tocopheroles**, estructuras químicas de origen fenólico con propiedades liposolubles <sup>181</sup>. Estas moléculas anfipáticas se encuentran en los aceites de oliva, soja y girasol, además de en vegetales de hoja verde <sup>182</sup>. Existen cuatro formas diferentes en función de la localización de los radicales metilos (Figura 24): alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ). Se consideran 4 de las 16 isoformas de la vitamina E, ejerciendo bioactividades variadas y muy relacionadas con la antioxidación. Se atribuye esa función antioxidante a la inhibición de la peroxidación de membrana y la neutralización de

EROS. La vitamina E se ha asociado con numerosos beneficios en ECV, cáncer y otras patologías <sup>182</sup>.



**Figura 24.** Estructuras de las diferentes formas de tocoferoles. *Adaptado de: Burton & Ingold, 1981.*

#### Ácidos fenólicos

Los **ácidos fenólicos** son otro de los fitoquímicos mayoritarios presentes en las flores comestibles, se caracterizan estructuralmente por poseer un único anillo aromático. Suponen alrededor del 30% de las formas libres o enlazadas de compuestos fenólicos presentes en la dieta <sup>183</sup>. De entre ellos, los más detectados en flores comestibles son ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido gálico y ácido 3-cafeoilquínico <sup>184</sup>.

#### Flavonoles y flavonas

Tanto flavonoles como flavonas poseen estructuras similares al ser tipos de flavonoides (Figura 23), y en los vegetales se encuentran en forma de heterósidos. La apigenina es la **flavona** más común en plantas alimentarias, mientras que los heterósidos de kaempferol, quercetina, isorhamnetina y miricetina son los **flavonoles** más presentes en las flores comestibles. Estas moléculas poseen muy variada bioactividad.

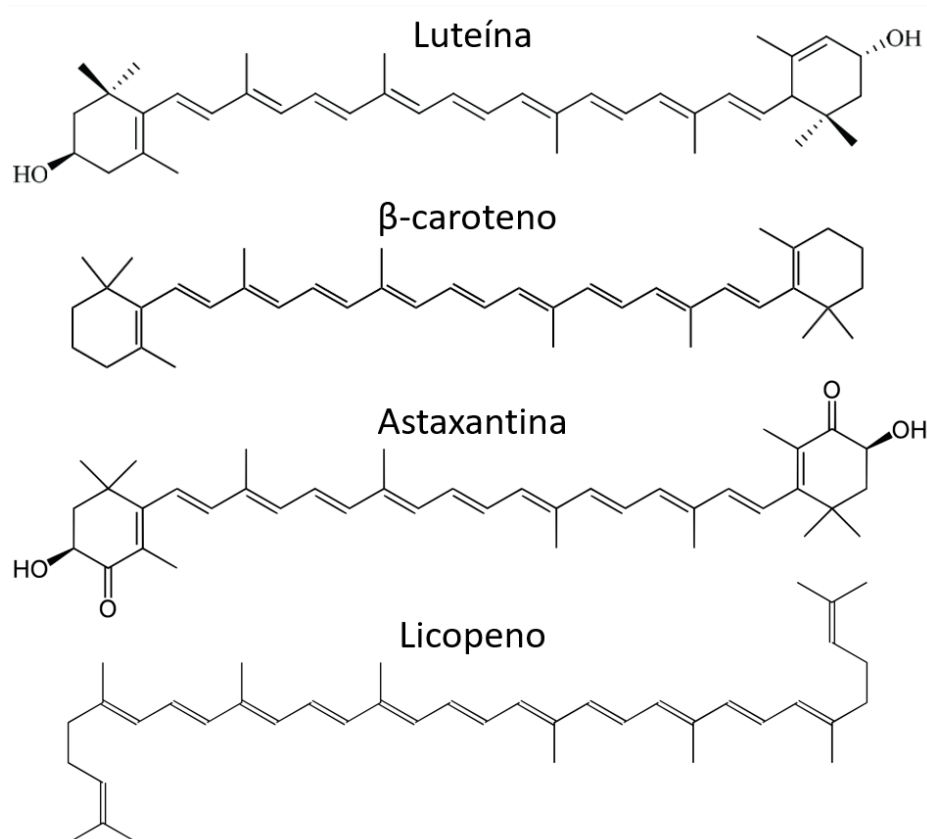
#### Antocianinas

Tras las clorofilas, las **antocianinas** son el siguiente grupo de pigmentos visibles al ojo humano más importante, aportando variedad de colores rojos, azules y morados a las flores y frutos. Pertenecen estructuralmente a los flavonoides ya que se sintetizan por las mismas rutas, pero se consideran un grupo aparte debido a sus propiedades y características. Las antocianinas más presentes en las flores comestibles son cianidina, delphinidina, petunidina y pelargonidina. Son moléculas solubles en agua que generalmente poseen potente actividad antioxidante y antiinflamatoria, pero han demostrado otras numerosas propiedades <sup>185</sup>.

#### 4.1.2 Carotenoides

Los **carotenoides** son metabolitos secundarios derivados terpénicos cuya función principal en las flores es pigmentar los pétalos, ya que otorgan coloración amarilla, naranja y rojiza. Su estructura básica se compone por ocho unidades de isopreno, y podemos diferenciar estructuras con presencia de algún átomo de oxígeno (xantofilas) o sin oxígenos como se pueden diferenciar en la Figura 25, por lo que son altamente **lipofílicos**. Las plantas producen más de 600 tipos de carotenoides, pero alrededor de 50 son absorbidos por el organismo <sup>186</sup>. Los principales compuestos que encontramos en este grupo son luteína y  $\beta$ -caroteno, mientras que la astaxantina es el carotenoide xantofila con mayor potencia antioxidante.

Los  **$\beta$ -carotenos** pueden transformarse en vitamina A en el organismo, esencial para el correcto funcionamiento y protección de órganos como la piel y ojos; la **luteína** también se emplea en la prevención de cataratas y daño macular.



**Figura 25.** Estructuras de diferentes carotenoides. *Adaptado de: Chandra et al, 2022.*

#### 4.2 Métodos de extracción y análisis de fitoquímicos en flores comestibles

La obtención de extractos ricos en fitoquímicos en farmacognosia y fitoterapia puede realizarse a través de una diversidad de metodologías. Tradicionalmente los métodos empleados eran maceración, decocción, infusión o percolación (Tabla 7). Con la mejora de las

tecnologías y modernización, en el siglo XVIII surgió un nuevo método a partir de la decocción denominado **Soxhlet** <sup>187</sup>. La extracción por **Soxhlet** supuso una mejora en los métodos de extracción frente a la maceración o percolación al requerir menos tiempo y cantidad de disolvente. Pero, por otro lado, las elevadas temperaturas que alcanza el sistema pueden suponer la degradación de algunos compuestos, y se considera costoso por los tiempos y cantidades de disolvente necesarios <sup>188</sup>. Este tipo de procedimientos tradicionales se siguen empleando de manera amplia hoy en día, pero la necesidad de procesos menos costosos, más rápidos y ecosostenibles ha dado lugar a la invención de procedimientos como la **extracción asistida por ultrasonidos (UAE)**, la extracción asistida por microondas (MAE), la extracción por líquido presurizado o la extracción con fluidos supercríticos.

**Tabla 7.** Comparativa sobre las condiciones óptimas de diferentes métodos de extracción de fitoquímicos. *Adaptado de: Kumar et al, 2023.*

Método de extracción	Disolvente	Temperatura	Presión	Tiempo	Clasificación
Maceración	Agua, acuosos y no acuosos	4 – 15 °C	Atmosférica	3 – 7 días	Tradicional
Percolación	Agua, acuosos y no acuosos	35 – 70 °C	Atmosférica	2 – 24 h	Tradicional
Decocción	Agua	65 – 70 °C	Atmosférica	1 – 2 h	Tradicional
Soxhlet	Orgánicos	65 – 100 °C	Atmosférica	6 – 24 h	Tradicional
UAE	Agua, acuosos y no acuosos	20 – 40 °C	Atmosférica	10 – 60 min	No convencional
MAE	Agua, acuosos y no acuosos	40 – 120 °C	Atmosférica	30 s – 20 min	No convencional
PLE	Agua, acuosos y no acuosos	50 – 200 °C	2,4 – 20,4 atm	5 – 20 min	No convencional

atm: atmósfera de presión; h: hora; MAE: extracción asistida por microondas; min: minuto; PLE: extracción por líquido presurizado; UAE: extracción asistida por ultrasonidos.

Las metodologías de extracción no convencionales, también denominadas “verdes” suponen una reducción en el consumo de disolventes y mejor ratio de extracción. La **UAE** se basa en el principio de cavitación ultrasónica, donde microburbujas son formadas por cambios de presión y su choque produce la rotura de células y salida del contenido activo al solvente <sup>189</sup>. No requiere elevadas temperaturas, por lo que puede haber menos degradación de compuestos fitoquímicos.

Para la detección y cuantificación de compuestos fitoquímicos, se emplean diversas técnicas cromatográficas dependiendo del tipo de molécula que se pretende estudiar. Los compuestos fenólicos y derivados se estudian a través de cromatografías líquidas: HPLC MS/MS y LC DAD ESI/MSn <sup>190,191</sup>. En cuanto a los carotenoides y sustancias lipófilas como tocoferoles, su estudio se realiza a través de la cromatografía líquida de tipo HPLC DAD FLD <sup>192</sup>. Y por otro lado los compuestos volátiles presentes en los extractos son estudiados mediante cromatografía de gases como GC/MS <sup>193</sup>.

### 4.3 Potencial nutracéutico de las flores comestibles

En el contexto de la alimentación saludable, las flores comestibles ofrecen una innovadora fuente de mejora en la calidad nutricional de la dieta. Si se incorporaran a ciertos alimentos, se podría incrementar la ingesta de nutrientes esenciales y compuestos bioactivos.

En esta Tesis Doctoral se decidieron estudiar las propiedades bioactivas relacionadas con obesidad, DM2 y envejecimiento saludable de las siguientes cuatro especies de flores comestibles (Figura 26):

- ***Tagetes erecta* L.:** comúnmente denominado clavel chino o caléndula, suele presentarse en color amarillo o naranja. Pertenece a la familia *Asteraceae* y tradicionalmente se ha empleado como decorativa, principalmente en América central en ciertos ritos religiosos. En México esta planta se encuentra registrada dentro de su Farmacopea ya que se consume la decocción de la planta entera para aliviar resfriados, y el jugo de la flor y hojas se considera emético, antipirético y relajante muscular entre otras propiedades <sup>139</sup>. Las flores son ampliamente empleadas en Tailandia para té y ensaladas <sup>194</sup>; pero generalmente su uso es industrial, ya que se cultiva para la extracción de luteína <sup>195</sup>.
- ***Viola x wittrockiana* Gams.:** el pensamiento pertenece a la familia de las *Violaceae*, y es una de las flores más comunes en España. Surge del cruce entre dos géneros diferentes de la familia: *V. tricolor* y *V. hortensis*. Además de emplearse como decoración y ornamentación, es una de las flores comestibles más consumidas en la península debido a su sabor dulce <sup>196</sup>.
- ***Allium cepa* L.:** la cebolla es el tercer vegetal más cultivado en el mundo tras las legumbres y patatas <sup>197</sup>. Pertenece a la familia *Liliaceae* y posee una floración bianual. El bulbo ha sido empleado con gran variedad de fines durante siglos como antimicrobiano, antiinflamatorio o neuro-protector; pero las propiedades de su flor, aunque comestible, son menos conocidas.
- ***Brassica incana* Ten.:** la familia *Brassicaceae* incluye 338 géneros y 3709 especies, y es conocida por ser una rica fuente de compuestos bioactivos. *B. incana*, también

denominada *Hirschfeldia incana*, es una especie silvestre relacionada con *B. oleracea*. Esta planta es cultivada principalmente en el área del Mediterráneo para aprovechar sus raíces, hojas o flores comestibles <sup>198</sup>.



**Figura 26.** Imágenes de las cuatro especies de flores comestibles estudiadas en esta tesis doctoral. Adaptado de: *Pl@ntNet, World Flora (2014-2024)*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. (2022). *WHO European Regional Obesity Report 2022*.  
<http://apps.who.int/bookorders.%0Ahttps://www.who.int/europe/publications/i/item/9789289057738>
2. World Health Organisation. (2022). World health statistics 2022 (Monitoring health of the SDGs). In *Monitoring health of the SDGs*.
3. World Health Organization. (2013). Global action plan: for the prevention and control of noncommunicable diseases. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*, 1–232.  
<https://doi.org/10.4324/9780429033735>
4. Balakumar, P., Maung-U, K., & Jagadeesh, G. (2016). Prevalence and prevention of cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Pharmacological Research*, 113, 600–609.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.09.040>
5. Muka, T., Imo, D., Jaspers, L., Colpani, V., Chaker, L., van der Lee, S. J., Mendis, S., Chowdhury, R., Bramer, W. M., Falla, A., Pazoki, R., & Franco, O. H. (2015). The global impact of non-communicable diseases on healthcare spending and national income: a systematic review. *European Journal of Epidemiology*, 30(4), 251–277. <https://doi.org/10.1007/s10654-014-9984-2>
6. Ryder, S., Fox, K., Rane, P., Armstrong, N., Wei, C. Y., Deshpande, S., Stirk, L., Qian, Y., & Kleijnen, J. (2019). A Systematic Review of Direct Cardiovascular Event Costs: An International Perspective. *PharmacoEconomics*, 37(7), 895–919. <https://doi.org/10.1007/s40273-019-00795-4>
7. Hanson, M. (2019). The inheritance of cardiovascular disease risk. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 108(10), 1747–1756. <https://doi.org/10.1111/apa.14813>
8. Kiani, M. M., Takian, A., Farzadfar, F., Rezaei, S., & Zandian, H. (2023). The Relationships between Social Capital, Metabolic, and Behavioral Risk Factors of Non-Communicable Diseases: A Systematic Review. *Iranian Journal of Public Health*, 52(9), 1803–1817.  
<https://doi.org/10.18502/ijph.v52i9.13563>
9. Landsberg, L., Aronne, L. J., Beilin, L. J., Burke, V., Igel, L. I., Lloyd-Jones, D., & Sowers, J. (2013). Obesity-Related Hypertension: Pathogenesis, Cardiovascular Risk, and Treatment: A Position Paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension Landsberg et al. Obesity Related Hypertension. *Journal of Clinical Hypertension*, 15(1), 14–33.  
<https://doi.org/10.1111/jch.12049>
10. Martín, L. G., Clara, B. M., Isaac, P. C., & A., C. L. J. (2005). Síndrome metabólico. Concepto y fisiopatología. *Revista Española de Cardiología*, 5, 1–52.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1131-3587\(05\)74114-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1131-3587(05)74114-5)
11. World Health Organisation. (2018). Obesity-and-Overweight @ [Www.Who.Int](http://www.who.int). In *Organización Mundial de la Salud* (p. 1).
12. Michaelidou, M., Pappachan, J. M., & Jeeyavudeen, M. S. (2023). Management of diabetes: Current concepts. *World Journal of Diabetes*, 14(4), 396–411.  
<https://doi.org/10.4239/wjd.v14.i4.396>
13. World Health Organization. (2022). *WHO European Regional Obesity Report 2022*.

14. Reinehr, T., & Dieris, B. (2023). New clinical practice guideline for evaluation and treatment of children and adolescents with obesity: paradigm shifts. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, *11*(4), 222–223. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(23\)00036-0](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(23)00036-0)
15. Hassapidou, M., Vlassopoulos, A., Kalliostra, M., Govers, E., Mulrooney, H., Ells, L., Salas, X. R., Muscogiuri, G., Darleska, T. H., Busetto, L., Yumuk, V. D., Dicker, D., Halford, J., Woodward, E., Douglas, P., Brown, J., & Brown, T. (2023). European Association for the Study of Obesity Position Statement on Medical Nutrition Therapy for the Management of Overweight and Obesity in Adults Developed in Collaboration with the European Federation of the Associations of Dietitians. *Obesity Facts*, *16*(1), 11–28. <https://doi.org/10.1159/000528083>
16. Yumuk, V., Tsigos, C., Fried, M., Schindler, K., Busetto, L., Micic, D., & Toplak, H. (2015). European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obesity Facts*, *8*(6), 402–424. <https://doi.org/10.1159/000442721>
17. Lecuebe, A., Azriel, S., Barreiro, E., Blay, G., Carretero, J., Ciudin, A., Fernandez, J., Flores, L., de Hollanda, A., Martínez, E., Miñambres, I., Moizé, V., Morales, C., Ramírez, V., J, S., Soler, M., Supervía, M., Valentí, V., Vicente, G., ... Malagón, M. (2024). *Guía Española GIRO: guía española del manejo integral y multidisciplinar de la obesidad en personas adultas, 2024* (Sociedad E).
18. American Academy of Pediatrics Institute. (2015). Algorithm for the Assessment and Management of Childhood Obesity in Patients 2 Years and Older. In *AAP Institute for Healthy Childhood Weight*. [https://doi.org/10.1542/9781610023559-algorithm\\_for](https://doi.org/10.1542/9781610023559-algorithm_for)
19. Del Álamo, A. J., & Luna Álvarez, D. A. (2024). *Guía Clínica de Obesidad*.
20. Tam, B. T., Morais, J. A., & Santosa, S. (2020). Obesity and ageing: Two sides of the same coin. *Obesity Reviews*, *21*(4), 1–21. <https://doi.org/10.1111/obr.12991>
21. Lustig, R. H., Collier, D., Kassotis, C., Roepke, T. A., Ji Kim, M., Blanc, E., Barouki, R., Bansal, A., Cave, M. C., Chatterjee, S., Choudhury, M., Gilbertson, M., Lagadic-Gossman, D., Howard, S., Lind, L., Tomlinson, C. R., Vondracek, J., & Heindel, J. J. (2022). Obesity I: Overview and molecular and biochemical mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, *199*, 1–61. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115012>
22. Upadhyay, J., Farr, O., Perakakis, N., Ghaly, W., & Mantzoros, C. (2018). Obesity as a Disease. *Medical Clinics of North America*, *102*(1), 13–33. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.08.004>
23. Wharton, S., Lau, D. C. W., Vallis, M., Sharma, A. M., Biertho, L., Campbell-Scherer, D., Adamo, K., Alberga, A., Bell, R., Boulé, N., Boyling, E., Brown, J., Calam, B., Clarke, C., Crowshoe, L., Divalentino, D., Forhan, M., Freedhoff, Y., Gagner, M., ... Wicklum, S. (2020). Obesity in adults: A clinical practice guideline. *Cmaj*, *192*(31), E875–E891. <https://doi.org/10.1503/cmaj.191707>
24. Gadde, K. M., Martin, C. K., Berthoud, H. R., & Heymsfield, S. B. (2018). Obesity: Pathophysiology and Management. *Journal of the American College of Cardiology*, *71*(1), 69–84. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.011>
25. Saunders, K. H., Umashanker, D., Igel, L. I., Kumar, R. B., & Aronne, L. J. (2018). Obesity Pharmacotherapy. *Medical Clinics of North America*, *102*(1), 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.08.010>

26. Garvey, W. T. (2013). Phentermine and topiramate extended-release: A new treatment for obesity and its role in a complications-centric approach to obesity medical management. *Expert Opinion on Drug Safety*, 12(5), 741–756. <https://doi.org/10.1517/14740338.2013.806481>
27. Husum, H., Van Kammen, D., Termeer, E., Bolwig, T. G., & Mathé, A. A. (2003). Topiramate normalizes hippocampal NPY-LI in flinders sensitive line “depressed” rats and upregulates NPY, galanin, and CRH-LI in the hypothalamus: Implications for mood-stabilizing and weight loss-inducing effects. *Neuropsychopharmacology*, 28(7), 1292–1299. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300178>
28. Caixàs, A., Villaró, M., Arraiza, C., Montalvá, J. C., Lecube, A., Fernández-García, J. M., Corio, R., Bellido, D., Llisterri, J. L., & Tinahones, F. J. (2020). SEEDO-SEMERGEN consensus document on continuous care of obesity between Primary Care and Specialist Hospital Units 2019. *Medicina Clinica*, 155(6), 267.e1-267.e11. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2019.10.014>
29. Heck, Amy M.; Yanovski, Jack A.; Anton Calis, K. (2000). Orlistat, a New Lipase Inhibitor for the Management of Obesity. *Pharmacotherapy*, 20(3), 270–279.
30. Nauck, M. A., Quast, D. R., Wefers, J., & Meier, J. J. (2021). GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes – state-of-the-art. *Molecular Metabolism*, 46(October 2020), 101102. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101102>
31. AEMPS. (2014). *Anexo I: Ficha técnica Rybelsus*. CIMA. [ec.europa.eu/health/documents/community.../anx\\_130850\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/health/documents/community.../anx_130850_es.pdf)
32. Zekavat, S. M., Krasniqi, D., Jr, J. W. G., Cestari, D., Estrela, T., & Iii, J. F. R. (2024). *Risk of Nonarteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy in Patients Prescribed Semaglutide*. 02114, 1–9. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2024.2296>
33. Jastreboff, A. M., Aronne, L. J., Ahmad, N. N., Wharton, S., Connery, L., Alves, B., Kiyosue, A., Zhang, S., Liu, B., Bunck, M. C., & Stefanski, A. (2022). Tirzepatide Once Weekly for the Treatment of Obesity. *New England Journal of Medicine*, 387(3), 205–216. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2206038>
34. EMA. (2022). Anexo I: Ficha técnica Mounjaro. In *Agencia Europea de Medicamentos*.
35. Gadde, K. M., Martin, C. K., Berthoud, H. R., & Heymsfield, S. B. (2018). Obesity: Pathophysiology and Management. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(1), 69–84. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.011>
36. Biertho, L., Hong, D., & Gagner, M. (2020). Bariatric Surgery: Surgical Options and Outcomes. *Canadian Adult Obesity Clinical Practice Guidelines*.
37. Sumithran, P., Prendergast, L. A., Delbridge, E., Purcell, K., Shulkes, A., Kriketos, A., & Proietto, J. (2012). Long-Term Persistence of Hormonal Adaptations to Weight Loss. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 67(2), 91–92. <https://doi.org/10.1097/ogx.0b013e318247c6f7>
38. Anibarro, E., & Lachica, L. (2023). Guía clínica Diabetes mellitus. In *Sociedad Andaluza de Medicina Familiar y Comunitaria (SAMFyC)* (Vol. 512, Issue 58).
39. Atkinson, M., Eisenbarth, G., & Michels, A. (2014). Type 1 diabetes. *Lancetncet*, 383(9911), 69–82. <https://doi.org/10.1007/978-0-85729-754-9>
40. Yoldi Arrieta, A., & Yoldi Urdiroz, J. (2021). *Guía Clínica Diabetes Mellitus tipo 1*.

41. Gómez Ramón, O., Sanz Vela, N., Álvarez Hermida, Á., & García Soidán, J. (2019). Abordaje integral del paciente con DM2 en enfermería y medicina. In *Abordaje integral del paciente con DM2 en enfermería y medicina*. <https://doi.org/10.52102/978-84-09-32813-0>
42. IDF. (2021). IDF Diabetes Atlas, 10th edition. In *International Diabetes Federation* (10th ed.). <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.10.013>
43. OMS. (2017). *Diabetes*. Organización Mundial de La Salud. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
44. OMS. (2016). *Global Report on Diabetes* (Vol. 978).
45. Campos, C. (2012). Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: Pathology and clinical sequelae. *Postgraduate Medicine*, 124(6), 90–97. <https://doi.org/10.3810/pgm.2012.11.2615>
46. Goh, S. Y., & Cooper, M. E. (2008). The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(4), 1143–1152. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1817>
47. Tan, K. C. B., Chow, W. S., Ai, V. H. G., Metz, C., Bucala, R., & Lam, K. S. L. (2002). Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 25(6), 1055–1059. <https://doi.org/10.2337/diacare.25.6.1055>
48. Maranta, F., Cianfanelli, L., & Cianflone, D. (2021). Glycaemic Control and Vascular Complications in Diabetes Mellitus Type 2. In Md. S. Islam (Ed.), *Diabetes: from Research to Clinical Practice: Volume 4* (pp. 129–152). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2020\\_514](https://doi.org/10.1007/5584_2020_514)
49. Lee, J., Yun, J. S., & Ko, S. H. (2022). Advanced Glycation End Products and Their Effect on Vascular Complications in Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients*, 14(15), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu14153086>
50. Pereira, L., Palay, S., Rodríguez, A., Neyra, R., & Angeles, M. (2015). Hemoglobina glucosilada en pacientes con diabetes mellitus. *Medisan*, 19(4), 555–561.
51. American Diabets Association. (2024). Standards of Care in Diabetes 2024. *Diabetes Care*, 47(January), 1–328.
52. Fundación redGDPS. (2023). *Algoritmo de tratamiento de la DM2* (p. 2023).
53. Lazzaroni, E., Ben Nasr, M., Loretelli, C., Pastore, I., Plebani, L., Lunati, M. E., Vallone, L., Bolla, A. M., Rossi, A., Montefusco, L., Ippolito, E., Berra, C., D'Addio, F., Zuccotti, G. V., & Fiorina, P. (2021). Anti-diabetic drugs and weight loss in patients with type 2 diabetes. *Pharmacological Research*, 171(July), 105782. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105782>
54. Sims, E. A. H., Danforth, E., & Horton, E. S. (1973). Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. In *Recent Progress in Hormone Research* (Vol. 29). ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571129-6.50016-6>
55. Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121), 840–846. <https://doi.org/10.1038/nature05482>

56. Farag, Y. M. K., & Gaballa, M. R. (2011). Diabesity: An overview of a rising epidemic. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(1), 28–35. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq576>
57. Pappachan, J. M., & Viswanath, A. K. (2017). Medical Management of Diabesity: Do We Have Realistic Targets? *Current Diabetes Reports*, 17(1). <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0828-9>
58. Chadt, A., Scherneck, S., Joost, H.-G., & Al-Hasani, H. (2000). Molecular links between Obesity and Diabetes: “Diabesity.” *Endotext*, 1–26.
59. CGCOF. (2022). *BotPlus*. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. <https://botplusweb.farmaceuticos.com/>
60. Chakhtoura, M., Haber, R., Ghezzawi, M., Rhayem, C., Tcheroyan, R., & Mantzoros, C. S. (2023). Pharmacotherapy of obesity: an update on the available medications and drugs under investigation. *EClinicalMedicine*, 58, 101882. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2023.101882>
61. AEMPS. (2024). *La AEMPS actualiza la situación de suministro de los medicamentos análogos del GLP-1*. Notas Informativas AEMPS. <https://www.aemps.gob.es/informa/la-aemps-actualiza-la-situacion-de-suministro-de-los-medicamentos-analogos-del-glp-1/>
62. Lombera Romero, F., Barrios Alonso, V., Soria Arcos, F., Placer Peralta, L., Cruz Fernández, J. M., Tomás Abaldal, L., Rodríguez Padial, L., & González Juanatey, J. R. (2000). Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en hipertensión arterial. *Rev Esp Cardiol*, 53(1), 66–90.
63. Mancia, G., Kreutz, R., Brunström, M., Burnier, M., Grassi, G., Januszewicz, A., Muiesan, M. L., Tsioufis, K., Agabiti-Rosei, E., Algharably, E. A. E., Azizi, M., Benetos, A., Borghi, C., Hitij, J. B., Cifkova, R., Coca, A., Cornelissen, V., Cruickshank, J. K., Cunha, P. G., ... Kjeldsen, S. E. (2023). 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension: Endorsed by the International Society of Hypertension (ISH) and the European Renal Associat. *Journal of Hypertension*, 41(12), 1874–2071. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000003480>
64. WHO. (2023). *Hypertension*. Fact Sheets: Hypertension. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
65. Seravalle, G., & Grassi, G. (2017). Obesity and hypertension. *Pharmacological Research*, 122, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.013>
66. Litwin, M., & Kulaga, Z. (2021). Obesity, metabolic syndrome, and primary hypertension. *Pediatric Nephrology*, 36, 825–837. <https://doi.org/10.1007/s00467-020-04579-3>
67. Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Magagna, A., & Salvetti, A. (1998). Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*, 97(22), 2222–2229. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.22.2222>
68. Bosello, O., & Zamboni, M. (2000). Visceral obesity and metabolic syndrome. *Obesity Reviews*, 1(1), 47–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1467-789x.2000.00008.x>
69. Petrie, J. R., Guzik, T. J., & Touyz, R. M. (2018). Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Canadian Journal of Cardiology*, 34(5), 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.12.005>

70. Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. In *Diabetes* (Vol. 54, Issue 6, pp. 1615–1625). <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>
71. Williams, B., Mancía, G., Spiering, W., Rosei, E. A., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D. L., Coca, A., De Simone, G., Dominiczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J., Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S. E., Kreutz, R., Laurent, S., ... Zamorano, J. L. (2022). Guía clínica de Hipertensión Arterial. *Fisterra*. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>
72. Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Navarrete Santos, A., Grune, T., & Simm, A. (2014). Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*, *2*(1), 411–429. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.016>
73. Gill, V., Kumar, V., Singh, K., Kumar, A., & Kim, J. J. (2019). Advanced glycation end products (AGEs) may be a striking link between modern diet and health. *Biomolecules*, *9*(12), 888. <https://doi.org/10.3390/biom9120888>
74. Bierhaus, A., Humpert, P. M., Morcos, M., Wendt, T., Chavakis, T., Arnold, B., Stern, D. M., & Nawroth, P. P. (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine*, *83*(11), 876–886. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0688-7>
75. Rungratanawanich, W., Qu, Y., Wang, X., Essa, M. M., & Song, B. J. (2021). Advanced glycation end products (AGEs) and other adducts in aging-related diseases and alcohol-mediated tissue injury. *Experimental and Molecular Medicine*, *53*(2), 168–188. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00561-7>
76. Delgado-Andrade, C., & Fogliano, V. (2018). Dietary Advanced Glycosylation End-Products (dAGEs) and Melanoidins Formed through the Maillard Reaction: Physiological Consequences of their Intake. *Annual Review of Food Science and Technology*, *9*, 271–291. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012441>
77. Luévano-Contreras, C., Gómez-Ojeda, A., Macías-Cervantes, M. H., & Garay-Sevilla, M. E. (2017). Dietary Advanced Glycation End Products and Cardiometabolic Risk. *Current Diabetes Reports*, *17*(8). <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0891-2>
78. Vlassara, H. (2005). Advanced glycation in health and disease: Role of the modern environment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1043*, 452–460. <https://doi.org/10.1196/annals.1333.051>
79. Nowak, D., Gośliński, M., & Nowatkowska, K. (2018). The effect of acute consumption of energy drinks on blood pressure, heart rate and blood glucose in the group of young adults. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(3). <https://doi.org/10.3390/ijerph15030544>
80. Poulsen, M. W., Hedegaard, R. V., Andersen, J. M., de Courten, B., Bügel, S., Nielsen, J., Skibsted, L. H., & Dragsted, L. O. (2013). Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food and Chemical Toxicology*, *60*, 10–37. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.052>
81. Uribarri, J., Cai, W., Ramdas, M., Goodman, S., Pyzik, R., Xue, C., Li, Z., Striker, G. E., & Vlassara, H. (2011). Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: Potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care*, *34*(7), 1610–1616. <https://doi.org/10.2337/dc11-0091>

82. Vlassara, H., Cai, W., Tripp, E., Pyzik, R., Yee, K., Goldberg, L., Tansman, L., Chen, X., Mani, V., Fayad, Z. A., Nadkarni, G. N., Striker, G. E., He, J. C., & Uribarri, J. (2016). Oral AGE restriction ameliorates insulin resistance in obese individuals with the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Diabetologia*, *59*(10), 2181–2192. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4053-x>
83. Di Pino, A., Currenti, W., Urbano, F., Mantegna, C., Purrazzo, G., Piro, S., Purrello, F., & Rabuazzo, A. M. (2016). Low advanced glycation end product diet improves the lipid and inflammatory profiles of prediabetic subjects. *Journal of Clinical Lipidology*, *10*(5), 1098–1108. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.07.001>
84. Ramasamy, R., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2011). Receptor for AGE (RAGE): Signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1243*(1), 88–102. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06320.x>
85. Nass, N., Bartling, B., Santos, A. N., Scheubel, R. J., Börgermann, J., Silber, R. E., & Simm, A. (2007). Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Zeitschrift Fur Gerontologie Und Geriatrie*, *40*(5), 349–356. <https://doi.org/10.1007/s00391-007-0484-9>
86. Song, Q., Liu, J., Dong, L., Wang, X., & Zhang, X. (2021). Novel advances in inhibiting advanced glycation end product formation using natural compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *140*(May), 111750. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111750>
87. Nagai, R., Shirakawa, J. I., Ohno, R. I., Moroishi, N., & Nagai, M. (2014). Inhibition of AGEs formation by natural products. *Amino Acids*, *46*(2), 261–266. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1487-z>
88. Alkhatib, A., Tsang, C., Tiss, A., Bahorun, T., Arefanian, H., Barake, R., Khadir, A., & Tuomilehto, J. (2017). Functional foods and lifestyle approaches for diabetes prevention and management. *Nutrients*, *9*(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu9121310>
89. Asgary, S., Rastqar, A., & Keshvari, M. (2018). Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, *37*(5), 429–455. <https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1410867>
90. Khangholi, S., Majid, F. A. A., Berwary, N. J. A., Ahmad, F., & Aziz, R. B. A. (2015). The Mechanisms of Inhibition of Advanced Glycation End Products Formation through Polyphenols in Hyperglycemic Condition. *Planta Medica*, *82*(1–2), 32–45. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1558086>
91. Almeida, C. S. de, Miccoli, L. S., Anghini, N. F., Aranha, S., Oliveira, L. C. de, Artigo, C. E., Em, A. A. R., Em, A. A. R., Bachman, L., Chick, K., Curtis, D., Peirce, B. N., Askey, Dale., Rubin, J., Egnatoff, Dr. W. J., Uhl Chamot, A., El-Dinary, P. B., Scott, J.; Marshall, G., Prenskey, M., ... Santa, U. F. De. (2016). World Report on Ageing and health. *Revista Brasileira de Linguística Aplicada*, *5*(1), 1689–1699.
92. Jura, M., & Kozak, L. P. (2016). Obesity and related consequences to ageing. *Age*, *38*(1), 23. <https://doi.org/10.1007/s11357-016-9884-3>
93. Marengoni, A., Angleman, S., Melis, R., Mangialasche, F., Karp, A., Garmen, A., Meinow, B., & Fratiglioni, L. (2011). Aging with multimorbidity: A systematic review of the literature. *Ageing Research Reviews*, *10*(4), 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2011.03.003>

94. Forman, D. E., Berman, A. D., McCabe, C. H., Baim, D. S., & Wei, J. Y. (1992). PTCA in the elderly: the “young-old” versus the “old-old”. *Journal of the American Geriatrics Society*, *40*(1), 19–22. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1992.tb01823.x>
95. Dye, L., Boyle, N. B., Champ, C., & Lawton, C. (2017). The relationship between obesity and cognitive health and decline. *Proceedings of the Nutrition Society*, *76*(4), 443–454. <https://doi.org/10.1017/S0029665117002014>
96. Zhang, Y., Fischer, K. E., Soto, V., Liu, Y., Sosnowska, D., Richardson, A., & Salmon, A. B. (2015). Obesity-induced oxidative stress, accelerated functional decline with age and increased mortality in mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *576*, 39–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.018>
97. Bellary, S., Kyrou, I., Brown, J. E., & Bailey, C. J. (2021). Type 2 diabetes mellitus in older adults: clinical considerations and management. *Nature Reviews Endocrinology*, *17*(9), 534–548. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00512-2>
98. Aguayo-Mazzucato, C., van Haaren, M., Mruk, M., Lee, T. B. J., Crawford, C., Hollister-Lock, J., Sullivan, B. A., Johnson, J. W., Ebrahimi, A., Dreyfuss, J. M., Van Deursen, J., Weir, G. C., & Bonner-Weir, S. (2017).  $\beta$  Cell Aging Markers Have Heterogeneous Distribution and Are Induced by Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, *25*(4), 898-910.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.015>
99. Rigaud, A.-S., & Forette, B. (2001). Hypertension in older adults. *Journal of Gerontology: MEDICAL SCIENCES*, *56A*(4), M217–M225. [https://doi.org/10.1016/S1889-1837\(18\)30072-2](https://doi.org/10.1016/S1889-1837(18)30072-2)
100. Guzik, T. J., & Touyz, R. M. (2017). Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension*, *70*(4), 660–667. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802>
101. Santos, A. L., & Sinha, S. (2021). Obesity and aging: Molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Ageing Research Reviews*, *67*(February), 101268. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101268>
102. Romero, Á. J., & Amores, L. (2016). El envejecimiento oxidativo inflamatorio: una nueva teoría con implicaciones prácticas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, *14*(5), 1–10.
103. Romero Cabrera, Á. J. (2015). Theories of Human Aging of Molecules to Society. *MOJ Immunology*, *2*(2). <https://doi.org/10.15406/moji.2015.02.00041>
104. Wagner, K. H., Cameron-Smith, D., Wessner, B., & Franzke, B. (2016). Biomarkers of aging: From function to molecular biology. *Nutrients*, *8*(6), 8–10. <https://doi.org/10.3390/nu8060338>
105. Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *69*, S4–S9. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>
106. Martínez de Toda, I., Ceprián, N., Díaz-Del Cerro, E., & De la Fuente, M. (2021). The role of immune cells in oxi-inflamm-aging. *Cells*, *10*(11), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cells10112974>
107. Ma, X., Nan, F., Liang, H., Shu, P., Fan, X., Song, X., Hou, Y., & Zhang, D. (2022). Excessive intake of sugar: An accomplice of inflammation. *Frontiers in Immunology*, *13*(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.988481>

108. Franceschi, C. (2007). Inflammaging as a Major Characteristic of Old People: Can It Be Prevented or Cured? *Nutrition Reviews*, 65(SUPPL.3), 12–15. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00358.x>
109. Epping-Jordan, J. A. E., Galea, G., Tukuitonga, C., & Beaglehole, R. (2005). Preventing chronic diseases: Taking stepwise action. *Lancet*, 366(9497), 1667–1671. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67342-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67342-4)
110. Cameron, K. A. (2012). Healthy Aging: Programs That Make a Difference—Part 1. *The Consultant Pharmacist*, 27(4), 239–253. <https://doi.org/10.4140/tcp.n.2012.239>
111. Kones, R. (2011). Is prevention a fantasy, or the future of medicine? A panoramic view of recent data, status, and direction in cardiovascular prevention. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 5(1), 61–81. <https://doi.org/10.1177/1753944710391350>
112. Russell, L. B. (2009). Perspective: Preventing chronic disease: An important investment, but don't count on cost savings. *Health Affairs*, 28(1), 42–45. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.28.1.42>
113. Meydani, M., & Hasan, S. T. (2010). Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients*, 2(7), 737–751. <https://doi.org/10.3390/nu2070737>
114. Dragan, S., Andrica, F., Serban, M.-C., & Timar, R. (2015). Polyphenols-Rich Natural Products for Treatment of Diabetes. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 14–22. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140826115422>
115. Blanco, M. (1837). *Flora de Filipinas*.
116. Zhao, L., Fan, H., Zhang, M., Chitrakar, B., Bhandari, B., & Wang, B. (2019). Edible flowers: Review of flower processing and extraction of bioactive compounds by novel technologies. *Food Research International*, 126, 108660. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108660>
117. Motti, R., Paura, B., Cozzolino, A., & Falco, B. de. (2022). Edible Flowers Used in Some Countries of the Mediterranean Basin: An Ethnobotanical Overview. *Plants*, 11(23), 1–22. <https://doi.org/10.3390/plants11233272>
118. Melillo, L. (1994). Diuretic Plants in the Paintings of Pompeii. *American Journal of Nephrology*, 14(4–6), 423–425.
119. Guiné, R. P. F., Florença, S. G., Moya, K. V., & Anjos, O. (2020). Edible flowers, old tradition or new gastronomic trend: A first look at consumption in portugal versus costa rica. *Foods*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/foods9080977>
120. 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>
121. Kumar, Halmuthur. M. S., Rajpal, V. R., Koul, H. K., Raina, S. N., & Qazi, G. N. (2024). Phytochemicals for Human Health: The Emerging Trends and Prospects, Part-1. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 24(4), 1011–1012. <https://doi.org/10.2174/156802662412240506092824>

122. Castillo-Carrión, M., Martínez-Espinosa, R., Pérez-Álvarez, J. Á., Fernández-López, J., Viuda-Martos, M., & Lucas-González, R. (2024). Nutritional, Fatty Acids, (Poly)phenols and Technological Properties of Flower Powders from *Fuchsia hybrida* and *Alcea rosea*. *Foods*, *13*(2). <https://doi.org/10.3390/foods13020237>
123. Chen, L., Li, M., Yang, Z., Tao, W., Wang, P., Tian, X., Li, X., & Wang, W. (2020). *Gardenia jasminoides* Ellis: Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological and industrial applications of an important traditional Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *257*(March), 112829. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112829>
124. John, R., & Jan, N. (2017). *Calendula Officinalis*-An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, *93*(0), 769–787. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2017/49126>
125. Bragueto Escher, G., Borges, L. D. C. C., Santos, J. S., Cruz, T. M., Marques, M. B., Do Carmo, M. A. V., Azevedo, L., Furtado, M. M., Sant'ana, A. S., Wen, M., Zhang, L., & Granato, D. (2019). From the field to the pot: Phytochemical and functional analyses of *calendula officinalis* l. flower for incorporation in an organic yogurt. *Antioxidants*, *8*(11), 1–23. <https://doi.org/10.3390/antiox8110559>
126. Huang, S. K. H., Hsieh, C. Y., Fu, P. W., Lee, C. J., Domingo, G. C., Alimboyoguen, A. B., Lin, P. Y., Hung, L. C., Roxas, T. J. R., De Castro-Cruz, K. A., & Tsai, P. W. (2023). Phytochemical Constituent Analysis, Antioxidative Effect, and Anti-inflammatory Activity of *Bombax ceiba* Flowers. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *13*(5), 1–12. <https://doi.org/10.33263/BRIAC135.408>
127. Kumari, P., Ujala, & Bhargava, B. (2021). Phytochemicals from edible flowers: Opening a new arena for healthy lifestyle. *Journal of Functional Foods*, *78*(January), 104375. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104375>
128. Moliner, C., Nuñez, S., Casedas, G., Valero, M. S., Dias, M. I., Barros, L., López, V., & Gómez-Rincón, C. (2023). Flowers of *Allium cepa* L. as Nutraceuticals : Phenolic Composition and Anti-Obesity and Antioxidant Effects in *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants*, *12*(3), 720. <https://doi.org/10.3390/antiox12030720>
129. Marrelli, M., Amodeo, V., Statti, G., & Conforti, F. (2019). Biological properties and bioactive components of *allium cepa* L.: Focus on potential benefits in the treatment of obesity and related comorbidities. *Molecules*, *24*(1). <https://doi.org/10.3390/molecules24010119>
130. Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T., Neugebauerova, J., & Vabkova, J. (2012). Edible flowers - A new promising source of mineral elements in human nutrition. *Molecules*, *17*(6), 6672–6683. <https://doi.org/10.3390/molecules17066672>
131. Al-Snafi, A. E. (2015). *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology THE PHARMACOLOGICAL IMPORTANCE OF ANTIRRHINUM MAJUS-A REVIEW*. *5*(January 2015), 313–320.
132. Kumar, G. (2022). A review of the chemical constituents and pharmacological activities of *Antirrhinum majus* (snapdragon). *IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology*, *7*(2), 72–76. <https://doi.org/10.18231/j.ijcaap.2022.013>
133. Miceli, N., Cavò, E., Ragusa, M., Cacciola, F., Mondello, L., Dugo, L., Acquaviva, R., Malfa, G. A., Marino, A., D'Arrigo, M., & Taviano, M. F. (2020). *Brassica incana* Ten. (Brassicaceae): Phenolic

- constituents, antioxidant and cytotoxic properties of the leaf and flowering top extracts. *Molecules*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/molecules25061461>
134. Taviano, M. F., Núñez, S., Millán-Laleona, A., Conduurso, C., Verzera, A., Merlino, M., Ragusa, M., Miceli, N., & López, V. (2022). Volatile composition, antidiabetic, and anti-obesity potential of *Brassica incana* leaf and flowering top extracts. *Pharmaceutical Biology*, 60(1), 1994–2001. <https://doi.org/10.1080/13880209.2022.2128825>
135. Benvenuti, S., Bortolotti, E., & Maggini, R. (2016). Antioxidant power, anthocyanin content and organoleptic performance of edible flowers. *Scientia Horticulturae*, 199, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.052>
136. Pinteá, A. (2003). HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis*, 47(1–4), 37 – 40.
137. Olennikov, D. N., Kashchenko, N. I., Chirikova, N. K., Akobirshoeva, A., Zilfikarov, I. N., & Vennos, C. (2017). Isorhamnetin and quercetin derivatives as anti-acetylcholinesterase principles of marigold (*Calendula officinalis*) flowers and preparations. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms18081685>
138. Besil, N., Pequeño, F., Alonzo, N., Hladki, R., Cesio, M. V., & Heinzen, H. (2017). Evaluation of different QuEChERS procedures for pesticide residues determination in *Calendula officinalis* (L) inflorescences. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 7(June), 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.09.001>
139. Chitrakar, B., Zhang, M., & Bhandari, B. (2019). Edible flowers with the common name “marigold”: Their therapeutic values and processing. *Trends in Food Science and Technology*, 89(May), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.008>
140. Chiou, S. Y., Sung, J. M., Huang, P. W., & Lin, S. D. (2017). Antioxidant, Antidiabetic, and Antihypertensive Properties of *Echinacea purpurea* Flower Extract and Caffeic Acid Derivatives Using in Vitro Models. *Journal of Medicinal Food*, 20(2), 171–179. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3790>
141. Coelho, J., Barros, L., Dias, M. I., Finimundy, T. C., Amaral, J. S., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Santos, P. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2020). *Echinacea purpurea* (L.) moench: Chemical characterization and bioactivity of its extracts and fractions. *Pharmaceuticals*, 13(6), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ph13060125>
142. Kumar, A., & Singh, A. (2012). Review on *Hibiscus rosa sinensis*. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(2), 534–538.
143. Purushothaman, A., Meenatchi, P., S, S., Sundaram, R., & Saravanan, N. (2016). Quantification of Total Phenolic Content, HPLC Analysis of Flavonoids and Assessment of Antioxidant and Anti-haemolytic Activities of *Hibiscus rosa-sinensis* L. Flowers in vitro. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 4(5), 134–150. <https://doi.org/10.21276/ijprhs.2016.05.02>
144. Grajeda-Iglesias, C., Figueroa-Espinoza, M. C., Barouh, N., Baréa, B., Fernandes, A., De Freitas, V., & Salas, E. (2016). Isolation and Characterization of Anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* Flowers. *Journal of Natural Products*, 79(7), 1709–1718. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00958>

145. Kumari, P., Raju, D. V. S., Singh, K. P. A. L., Prasad, K. V., & Panwar, S. (2018). Characterization of phenolic compounds in petal extracts of rose. *Indian Journal of Horticulture*, *75*(2), 349–351.
146. Lee, J. H., Lee, H. J., & Choung, M. G. (2011). Anthocyanin compositions and biological activities from the red petals of Korean edible rose (*Rosa hybrida* cv. Noblered). *Food Chemistry*, *129*(2), 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.040>
147. Cendrowski, A., Ścibisz, I., Mitek, M., Kieliszek, M., & Kolniak-Ostek, J. (2017). Profile of the Phenolic Compounds of *Rosa rugosa* Petals. *Journal of Food Quality*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/7941347>
148. Wan, H., Yu, C., Han, Y., Guo, X., Luo, L., Pan, H., Zheng, T., Wang, J., Cheng, T., & Zhang, Q. (2019). Determination of flavonoids and carotenoids and their contributions to various colors of rose cultivars (*Rosa* spp.). *Frontiers in Plant Science*, *10*(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00123>
149. Kumari, P., Raju, D. V. S., Prasad, K. V., Singh, K. P. A. L., Saha, S., Arora, A., & Hossain, F. (2017). Quantification and correlation of anthocyanin pigments and their antioxidant activities in rose (*Rosa hybrida*) varieties. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, *87*(10), 1340–1346. <https://doi.org/10.56093/ijas.v87i10.74991>
150. Zhang, J., Rui, X., Wang, L., Guan, Y., Sun, X., & Dong, M. (2014). Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Food Control*, *42*, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.001>
151. Wan, H., Yu, C., Han, Y., Guo, X., Ahmad, S., Tang, A., Wang, J., Cheng, T., Pan, H., & Zhang, Q. (2018). Flavonols and Carotenoids in Yellow Petals of Rose Cultivar (*Rosa* 'Sun City'): A Possible Rich Source of Bioactive Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(16), 4171–4181. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01509>
152. Yasukawa, K., & Kasahara, Y. (2013). Effects of flavonoids from French marigold (Florets of *Tagetes patula* L.) on acute inflammation model. *International Journal of Inflammation*, *2013*, 2–7. <https://doi.org/10.1155/2013/309493>
153. Moliner, C., Barros, L., Dias, M. I., López, V., Langa, E., Ferreira, I. C. F. R., & Gómez-Rincón, C. (2018). Edible flowers of *tagetes erecta* l. As functional ingredients: Phenolic composition, antioxidant and protective effects on *caenorhabditis elegans*. *Nutrients*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/nu10122002>
154. Núñez, S., Moliner, C., Sofía, M., Mustafa, A. M., Maggi, F., Rincón, C. G., & López, V. (2023). Antidiabetic and anti - obesity properties of a polyphenol - rich flower extract from *Tagetes erecta* L . and its effects on *Caenorhabditis elegans* fat storages. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13105-023-00953-5>
155. Varzakas, T., & Kiokias, S. (2016). HPLC analysis and determination of carotenoid pigments in commercially available plant extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science*, *4*(SpecialIssue1), 1 – 14. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue1.01>
156. Bhave, A., Schulzová, V., Mrnka, L., & Hajšlová, J. (2020). Influence of Harvest Date and Postharvest Treatment on Carotenoid and Flavonoid Composition in French Marigold Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(30), 7880–7889. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02042>

157. Pavelková, P., Krmela, A., & Schulzová, V. (2020). Determination of carotenoids in flowers and food supplements by HPLC-DAD. *Acta Chimica Slovaca*, *13*(1), 6–12. <https://doi.org/10.2478/acs-2020-0002>
158. Xu, L. wei, Chen, J., Qi, H. yang, & Shi, Y. ping. (2012). Phytochemicals and Their Biological Activities of Plants in *Tagetes L.* *Chinese Herbal Medicines*, *4*(2), 103–117. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-6384.2012.02.004>
159. Benvenuti, S., Bortolotti, E., & Maggini, R. (2016). Antioxidant power, anthocyanin content and organoleptic performance of edible flowers. *Scientia Horticulturae*, *199*, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.052>
160. Niizu, P. Y., & Rodriguez-Amaya, D. (2005). Flowers and Leaves of *Tropaeolum majus L.* as Rich Sources of Lutein. *Journal of Food Science*, *70*(9), 605–609.
161. Garzón, G. A., Manns, D. C., Riedl, K., Schwartz, S. J., & Padilla-Zakour, O. (2015). Identification of phenolic compounds in petals of nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*) by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry and determination of oxygen radical absorbance capacity (ORAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(6), 1803–1811. <https://doi.org/10.1021/jf503366c>
162. Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J. A., Pereira, E. L., Saraiva, J. A., & Ramalhosa, E. (2019). Physicochemical, antioxidant and microbial properties of crystallized pansies (*Viola × wittrockiana*) during storage. *Food Science and Technology International*, *25*(6), 472–479. <https://doi.org/10.1177/1082013219833234>
163. Fernandes, L., Ramalhosa, E., Baptista, P., Pereira, J. A., Saraiva, J. A., & Casal, S. I. P. (2019). Nutritional and Nutraceutical Composition of Pansies (*Viola × wittrockiana*) During Flowering. *Journal of Food Science*, *84*(3), 490–498. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14482>
164. Gonçalves, J., Borges Júnior, J. C. F., de Almeida Carlos, L., Silva, A. P. C. M., & de Souza, F. A. (2019). Bioactive compounds in edible flowers of garden pansy in response to irrigation and mycorrhizal inoculation. *Revista Ceres*, *66*(6), 407–415. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201966060001>
165. González-Barrio, R., Periago, M. J., Luna-Recio, C., Garcia-Alonso, F. J., & Navarro-González, I. (2018). Chemical composition of the edible flowers, pansy (*Viola wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*) as new sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, *252*(October 2017), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.102>
166. Moliner, C., Barros, L., Dias, M. I., Reigada, I., Ferreira, I. C. F. R., López, V., Langa, E., & Rincón, C. G. (2019). *Viola cornuta* and *Viola x wittrockiana*: Phenolic compounds, antioxidant and neuroprotective activities on *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Food and Drug Analysis*, *27*(4), 849–859. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.05.005>
167. Skowrya, M., Calvo, M. I., Gallego, M. G., Azman, N. A. M., & Almajano, M. P. (2014). Characterization of Phytochemicals in Petals of Different Colours From *Viola × wittrockiana* Gams. and Their Correlation With Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural Science*, *6*(9), 93–105. <https://doi.org/10.5539/jas.v6n9p93>
168. Culhuac, E. B., Maggiolino, A., Elghandour, M. M. M. Y., De Palo, P., & Salem, A. Z. M. (2023). Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Phytochemicals Found in the *Yucca* Genus. *Antioxidants*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/antiox12030574>

169. Juárez-Trujillo, N., Monribot-Villanueva, J. L., Jiménez-Fernández, V. M., Suárez-Montaño, R., Aguilar-Colorado, Á. S., Guerrero-Analco, J. A., & Jiménez, M. (2018). Phytochemical characterization of Izote (*Yucca elephantipes*) flowers. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *91*, 202–210. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2018.091.027>
170. Lee, E. J., Kim, J. S., Kim, H. P., Lee, J. H., & Kang, S. S. (2010). Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities. *Food Chemistry*, *120*(1), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.088>
171. Lu, B., Li, M., & Yin, R. (2016). Phytochemical Content, Health Benefits, and Toxicology of Common Edible Flowers: A Review (2000–2015). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*, S130–S148. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1078276>
172. Mota, A. H., Andrade, J. M., Rodrigues, M. J., Custódio, L., Bronze, M. R., Duarte, N., Baby, A., Rocha, J., Gaspar, M. M., Simões, S., Carvalheiro, M., Fattal, E., Almeida, A. J., & Reis, C. P. (2020). Synchronous insight of in vitro and in vivo biological activities of *Sambucus nigra* L. extracts for industrial uses. *Industrial Crops and Products*, *154*(May), 112709. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112709>
173. Rameshwar, V., Kishor, D., Tushar, G., Siddharth, G., & Sudarshan, G. (2014). Pharmacognostic and phytopharmacological overview on *Bombax ceiba*. *Scholars Academic Journal Oh Pharmacy*, *3*(2), 100–107. <https://doi.org/10.5530/srp.2019.1.4>
174. Tripathi, A. K., Gupta, P. S., & Singh, S. K. (2019). Antidiabetic, anti-hyperlipidemic and antioxidant activities of *Bauhinia variegata* flower extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *19*, 101142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101142>
175. Kim, B. R., Paudel, S. B., Nam, J. W., Jin, C. H., Lee, I. S., & Han, A. R. (2020). Constituents of *Coreopsis lanceolata* flower and their dipeptidyl peptidase IV inhibitory effects. *Molecules*, *25*(19). <https://doi.org/10.3390/molecules25194370>
176. Cortez, R., Luna-Vital, D. A., Margulis, D., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(1), 180–198. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>
177. Dabas, D. (2018). Polyphenols as Colorants. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences - Open Journal*, *SE*(2), S1–S6. <https://doi.org/10.17140/aftnsoj-se-2-101>
178. D'Andrea, G. (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, *106*, 256–271. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.09.018>
179. Villa, C., Cuna, F. S. R. Della, Russo, E., Ibrahim, M. F., Grignani, E., & Preda, S. (2022). Microwave-Assisted and Conventional Extractions of Volatile Compounds from *Rosa x damascena* Mill. Fresh Petals for Cosmetic Applications. *Molecules*, *27*(12). <https://doi.org/10.3390/molecules27123963>
180. Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Bolivian Journal of Chemistry*, *31*(2), 68–81. <https://doi.org/10.1021/bk-1992-0507.ch001>
181. Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1981). Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of the American Chemical Society*, *103*(21), 6472–6477. <https://doi.org/10.1021/ja00411a035>

182. Colombo, M. L. (2010). An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives. In *Molecules* (Vol. 15, Issue 4, pp. 2103–2113). <https://doi.org/10.3390/molecules15042103>
183. Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>
184. Janarny, G., Gunathilake, K. D. P. P., & Ranaweera, K. K. D. S. (2021). Nutraceutical potential of dietary phytochemicals in edible flowers—A review. *Journal of Food Biochemistry*, 45(4), 1–20. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13642>
185. Alappat, B., & Alappat, J. (2020). Anthocyanin pigments: Beyond aesthetics. *Molecules*, 25(23). <https://doi.org/10.3390/molecules25235500>
186. Chandra, S., Saklani, S., Kumar, P., Kim, B., & Coutinho, H. D. M. (2022). Nutraceuticals: Pharmacologically Active Potent Dietary Supplements. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2051017>
187. Maaiden, E. El, Bouzroud, S., Nasser, B., Moustaid, K., Mouttaqi, A. El, Ibourki, M., Boukcim, H., Hirich, A., Kouisni, L., & Kharrassi, Y. El. (2022). A Comparative Study between Conventional and Advanced Extraction Techniques : Pharmaceutical and Cosmetic Properties of Plant Extracts. *Molecules*, 27, 2074.
188. Kumar, A., Nirmal, P., Kumar, M., Jose, A., Tomer, V., Oz, E., Proestos, C., Zeng, M., Elobeid, T., Sneha, V., & Oz, F. (2023). Major Phytochemicals: Recent Advances in Health Benefits and Extraction Method. *Molecules*, 28(2), 1–41. <https://doi.org/10.3390/molecules28020887>
189. Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., Stulić, V., Barba, F. J., Chemat, F., Barbosa-Cánovas, G., & Režek Jambrak, A. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*, 113, 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.036>
190. Mustafa, A. M., Angeloni, S., Abouelenein, D., Acquaticci, L., Xiao, J., Sagratini, G., Maggi, F., Vittori, S., & Caprioli, G. (2022). A new HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 36 polyphenols in blueberry, strawberry and their commercial products and determination of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 367, 130743. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.130743>
191. Moliner, C., Barros, L., Dias, M. I., Reigada, I., Ferreira, I. C. F. R., López, V., Langa, E., & Rincón, C. G. (2019). *Viola cornuta* and *Viola x wittrockiana*: Phenolic compounds, antioxidant and neuroprotective activities on *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(4), 849–859. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.05.005>
192. Bosco, R., Caser, M., Vanara, F., & Scariot, V. (2013). Development of a Rapid LC-DAD/FLD Method for the Simultaneous Determination of Auxins and Abscisic Acid in Plant Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10940–10947. <https://doi.org/10.1021/jf4034305>
193. Miceli, N., Cavò, E., Ragusa, M., Cacciola, F., Mondello, L., Dugo, L., Acquaviva, R., Malfa, G. A., Marino, A., D'Arrigo, M., & Taviano, M. F. (2020). *Brassica incana* Ten. (Brassicaceae): Phenolic constituents, antioxidant and cytotoxic properties of the leaf and flowering top extracts. *Molecules*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/molecules25061461>

194. Loizzo, M. R., Pugliese, A., Bonesi, M., Tenuta, M. C., Menichini, F., Xiao, J., & Tundis, R. (2016). Edible Flowers: A Rich Source of Phytochemicals with Antioxidant and Hypoglycemic Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(12), 2467–2474. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03092>
195. Šivel, M., Kráčmar, S., Fišera, M., Klejdus, B., & Kubáň, V. (2014). Lutein content in marigold flower (*Tagetes erecta* L.) concentrates used for production of food supplements. *Czech Journal of Food Sciences*, *32*(6), 521–525. <https://doi.org/10.17221/104/2014-cjfs>
196. Mlcek, J., & Rop, O. (2011). Fresh edible flowers of ornamental plants - A new source of nutraceutical foods. *Trends in Food Science and Technology*, *22*(10), 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.04.006>
197. Perković, J., Major, N., Ban, D., Cvitan, D., & Ban, S. G. (2021). Shallot species and subtypes discrimination based on morphology descriptors. *Plants*, *10*(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/plants10010060>
198. Geraci, A., Amato, F., Di Noto, G., Bazan, G., & Schicchi, R. (2018). The wild taxa utilized as vegetables in Sicily (Italy): A traditional component of the Mediterranean diet. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *14*(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/s13002-018-0215-x>



# JUSTIFICACIÓN



A pesar del incremento en la esperanza de vida de la población a nivel mundial y las mejoras en la calidad de vida, existe un gran número de personas que padecen enfermedades prevenibles potencialmente mortales. En el año 2019, murieron 30 millones y medio de personas en el mundo debido a causas no transmisibles como patologías cardiovasculares, cáncer, obesidad-diabetes, Alzheimer, nefropatías y enfermedades respiratorias crónicas. Por ello, la disminución de la mortalidad prematura para 2030 debido a enfermedades no transmisibles constituye el objetivo 3 de “Desarrollo Sostenible” propuestos por Naciones Unidas.

Una dieta abundante en alimentos vegetales con propiedades antioxidantes, que también favorezca el control de la glucemia y los niveles de lípidos en sangre, puede ser beneficiosa para promover un envejecimiento saludable y prevenir patologías relacionadas con la obesidad y la diabetes. Los polifenoles presentes en las plantas de interés alimentario pueden ser beneficiosos para la salud, contribuyendo a la prevención del envejecimiento y del síndrome metabólico, así como de sus factores de riesgo. Además, pueden reducir su incidencia y progresión, gracias a su capacidad para proteger al organismo del estrés oxidativo y sus diversas acciones fisiológicas. Pero hay que tener en cuenta que no todos los polifenoles poseen las mismas propiedades, por lo que resulta esencial la identificación del compuesto biológicamente activo. Debido a que las flores comestibles son ricas en compuestos bioactivos su estudio e interés están experimentando un fuerte crecimiento en los últimos años.



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



La **hipótesis general** que se planteó para el desarrollo de esta Tesis Doctoral es que las flores comestibles pueden ser consideradas como fuentes potenciales de moléculas biológicamente activas para el tratamiento de la diabetes, obesidad e hipertensión. Por ello, los extractos procedentes de las flores comestibles, junto con la identificación de los compuestos bioactivos, ayudarán a prevenir el síndrome metabólico, así como sus factores de riesgo, como la obesidad y DM; siendo beneficiosos para la salud, favoreciendo un envejecimiento saludable y contribuyendo a la prevención de enfermedades no transmisibles.

El **objetivo general** ha sido valorar las propiedades antidiabéticas, anti-obesidad, antihipertensivas y antienvjecimiento de flores comestibles, concretamente *Tagetes erecta* L., *Viola x wittrockiana* Gams., *Allium cepa* L., y *Brassica incana* Ten., para el tratamiento o prevención de enfermedades no transmisibles como la diabetes y obesidad.

Para ello los **objetivos específicos** han sido:

1. Comparar el potencial antidiabético y anti-obesidad de las inflorescencias y las hojas de *Brassica incana* Ten. (Brassicaceae). (ARTÍCULO 1)
2. Evaluar la capacidad protectora de un extracto de flores de cebolla (*Allium cepa* L.) frente al estrés oxidativo en diferentes bioensayos. (ARTÍCULO 2)
3. Determinar las propiedades anti-obesidad y antienvjecimiento de un extracto etanólico de pensamiento (*Viola wittrockiana* Gams) que promueven la calidad de vida del nematodo *Caenorhabditis elegans*. (ARTÍCULO 3)
4. Estudiar la actividad antidiabética y anti-obesidad de dos cultivares de *Tagetes erecta* L. en modelos *in vitro* e *in vivo* usando el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. (ARTÍCULO 4)
5. Comparar la composición fitoquímica y la bioactividad empleando diferentes métodos de extracción para los dos tipos de variedades de *Tagetes erecta*. (ARTÍCULO 5)
6. Estudiar el efecto antihipertensivo de los extractos de *Tagetes erecta* mediante miografía en aorta de rata. (ARTÍCULO 6 – en preparación)



**MATERIAL  
EMPLEADO**



La metodología experimental empleada durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se encuentra descrita en profundidad en cada uno de los artículos que la conforman. A continuación, se resumen las características principales de los materiales vegetales y biológicos empleados en los experimentos, así como una esquematización del trabajo realizado (Figura 27).

## 1. Material vegetal

Las flores empleadas en este estudio provienen de tres fuentes diferentes:

- Las flores de las especies *V. x wittrockiana* y *T. erecta* (variedades amarillo y naranja) fueron proporcionadas por la empresa InnoFlower S.L. entre septiembre de 2014 y noviembre de 2015. Una segunda tanda de flores de *T. erecta* variedades amarillo y naranja fueron proporcionadas en abril de 2022.
- Las flores de *A. cepa* var Fuentes se cultivaron en un huerto privado en Herrera de los Navarros, Zaragoza (España), y se recogieron en julio de 2015.
- Las flores de *B. incana* fueron cultivadas en la zona Capo d'Orlando en Messina, Italia y se recogieron en mayo de 2019.

## 2. Material animal

Ensayos *in vivo* con modelo *Caenorhabditis elegans*

Las cepas de *C. elegans* con las que se ha trabajado durante esta Tesis Doctoral fueron proporcionadas por Caenorhabditis Genetics Center (CGC) de la Universidad de Minnesota (Twin Cities, USA). En la Tabla 8 encontramos las características de cada una de ellas.

**Tabla 8.** Cepas, genotipos y tipos de ensayos para los que fueron empleados *C. elegans*.

Cepa	Genotipo	Observaciones	Tipo de ensayo
N2	Wild-type	Variedad Bristol	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cuantificación lipídica</li> <li>- Efecto sobre la ingesta</li> <li>- Bombeo de la faringe</li> <li>- Efecto sobre el ciclo de vida y crecimiento</li> </ul>

<b>SS104</b>	<i>glp-4(bn2) I</i>	Mutación sensible a T <sup>a</sup> . Defecto en la proliferación de la línea germinal durante el desarrollo de las larvas a 25°C.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cuantificación de lipofuscina</li> <li>- Producción de EROS</li> </ul>
--------------	---------------------	--	---

### Ensayos *ex vivo* mediante miografía de aorta

Para estos ensayos se utilizaron ratas albinas macho Wistar, las cuales fueron adquiridas de Janvier Labs (LeGenest St. Isle, France). Tras eutanasiar a los animales se extrajeron las aortas para realizar ensayos de miografía en un baño de órganos. Su manejo y trato fueron en base a las directrices que dicta la Ley de Bienestar Animal RD 53/2013, el cual recoge las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación. Todos los procedimientos fueron aprobados previamente por la Comisión Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (España).

### 3. Esquema resumen

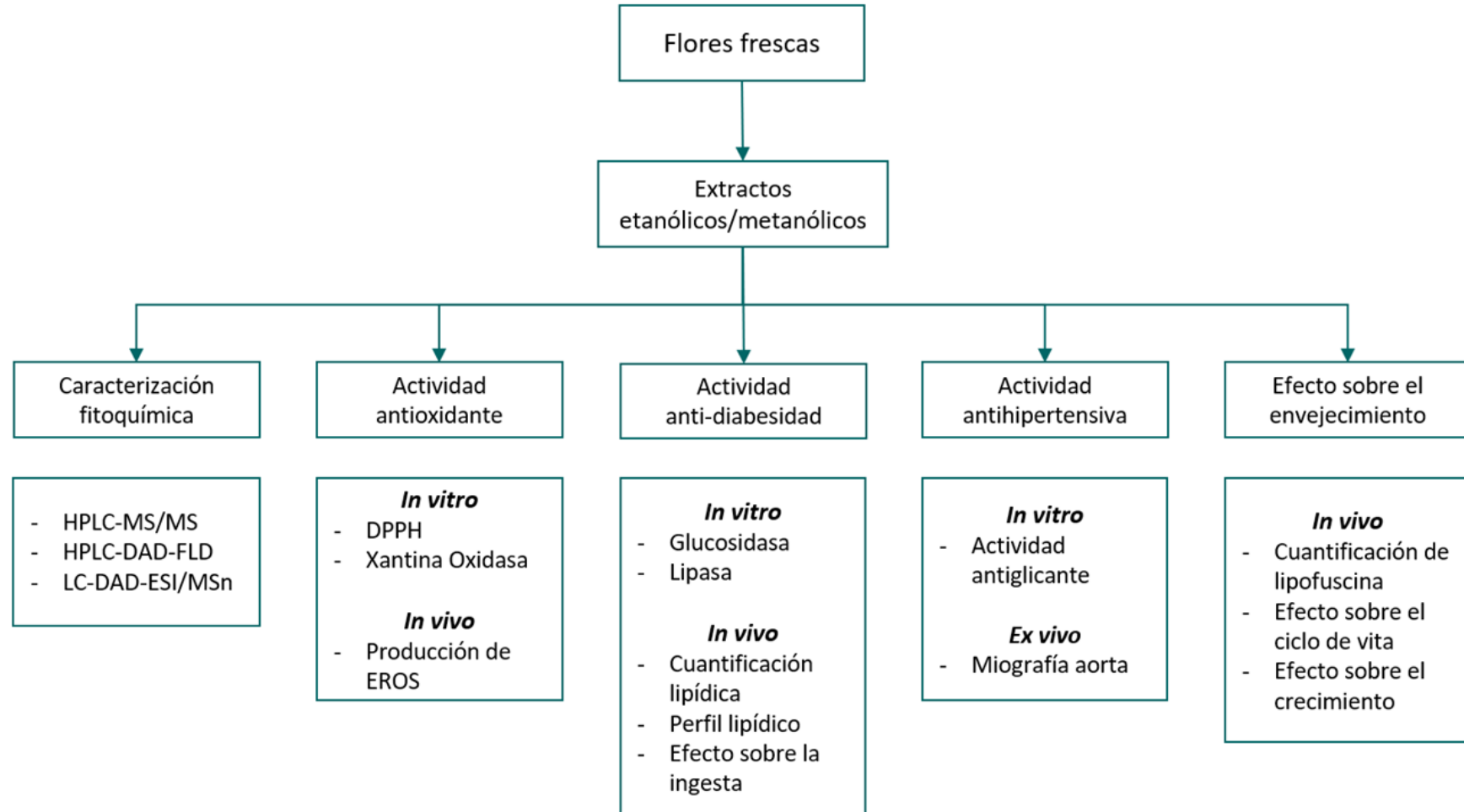


Figura 27. Esquema de los ensayos realizados durante el desarrollo de la Tesis Doctoral. *Realización propia.*



**RESULTADOS:  
PUBLICACIONES  
APORTADAS**



#### ARTÍCULO 1: páginas 91-100

Título: Volatile composition, antidiabetic, and anti-obesity potential of *Brassica incana* leaf and flowering top extracts.

Autores: Maria Fernanda Taviano, **Sonia Núñez**, Adrián Millán-Laleona, Concetta Conduro, Antonella Verzera, Maria Merlino, Mónica Ragusa, Natalizia Miceli & Víctor López.

DOI: 10.1080/13880209.2022.2128825

Revista: Pharmaceutical Biology 2022, 60(1), 1994–2001.

Cuartil revista: Q1 (Pharmaceutical Science)

#### ARTÍCULO 2: páginas 101-117

Título: Flowers of *Allium cepa* L. as nutraceuticals: phenolic composition, anti-obesity and antioxidant effects in *Caenorhabditis elegans*.

Autores: Cristina Moliner, **Sonia Núñez**, Guillermo Cásedas, Marta Sofía Valero, Maria Inês Dias, Lillian Barros, Víctor López and Carlota Gómez-Rincón.

DOI: 10.3390/ANTIOX12030720

Revista: Antioxidants 2023, 12(3), 720.

Cuartil revista: Q1 (Food Science)

#### ARTÍCULO 3: páginas 119-131

Título: Lipid lowering and anti-ageing effects of edible flowers of *Viola x wittrockiana* Gams in a *Caenorhabditis elegans* obese model.

Autores. **Sonia Núñez**, Víctor López, Cristina Moliner, Marta Sofía Valero, and Carlota Gómez-Rincón.

DOI: 10.1039/d3fo02181e

Revista: Food and Function 2023,14, 8854-8864.

Cuartil revista: Q1 (Food Science & Technology)

#### ARTÍCULO 4: páginas 133-148

Título: Antidiabetic and anti-obesity properties of a polyphenol-rich flower extract from *Tagetes erecta* L. and its effects on *Caenorhabditis elegans* fat storages.

Autores: **Sonia Núñez**, Cristina Moliner, Marta Sofía Valero, Ahmed M. Mustafa, Filippo Maggi, Carlota Gómez-Rincón, Víctor López.

DOI: 10.1007/s13105-023-00953-5

Revista: Journal of Physiology and Biochemistry 2023, 79, 427–440.

Cuartil revista: Q1 (Medicine (miscellaneous))

#### ARTÍCULO 5: páginas 149-174

Título: Ultrasound Assisted Extraction (UAE) versus traditional Soxhlet apparatus for the obtention of polyphenols, carotenoids and tocopherols from *Tagetes erecta* L. flowers.

Autores: **Sonia Nuñez**, Marta Sofía Valero, Ahmed M Mustafa, Giovanni Caprioli, Filippo Maggi, Carlota Gómez-Rincón, Víctor López.

DOI: xx

Revista: Journal of the Science of Food and Agriculture 2024.

Cuartil revista: Q1 (Food Science)

#### ARTÍCULO 6: páginas 175-203

Título: Vasorelaxant effects of edible flowers *Tagetes erecta* L. and its possible action mechanism as a hypotensive agent.

Autores: **Sonia Nuñez**, Víctor López, Carlota Gómez-Rincón, María Pilar Arruebo, Miguel Ángel Plaza, Marta Sofía Valero.

EN PREPARACIÓN

## ARTÍCULO 1



### Composición volátil y potencial antidiabético y anti-obesidad de extractos de hojas y flores de *Brassica incana*.

#### Resumen:

*Brassica incana* Ten. (Brassicaceae) es una planta comestible con información disponible muy limitada. Estudios previos han demostrado el perfil polifenólico y las propiedades antioxidantes y citotóxicas de extractos hidroalcohólicos de las hojas y flores.

El objetivo de este estudio fue identificar los compuestos volátiles presentes en los extractos de hojas y flores de *B. incana* y testar sus propiedades antidiabéticas y anti-obesidad.

Para la caracterización de los compuestos volátiles se emplearon técnicas de análisis HS-SPME-GC/MS. Las capacidades antidiabética y anti-obesidad fueron cuantificadas a diferentes concentraciones mediante espectrofotometría *in vitro* a través de la inhibición de lipasa y  $\alpha$ -glucosidasa empleando orlistat y acarbosa como los controles positivos. La inhibición en producción de productos finales de glicación (AGEs) fue medida empleando aminoguanidina como control positivo, y la capacidad antioxidante a través del sistema xantina/xantina oxidasa usando Trolox como control positivo.

Se lograron identificar diversos compuestos volátiles de diferentes clasificaciones químicas, siendo los compuestos sulfurados los más abundantes en ambos extractos de hoja y flores (56,33% y 64,40% de todos los compuestos volátiles respectivamente). A pesar de que el extracto de hoja mostró valores IC<sub>50</sub> inferiores que el extracto de flores en la mayoría de los ensayos (0,968 y 1,921 mg/mL en  $\alpha$ -glucosidasa; 0,192 y 0,262 mg/mL en AGEs; 0,022 y 0,038 mg/mL en la neutralización de radicales libres), no se hayaron diferencias significativas entre las dos muestras. Estos extractos demostraron un comportamiento similar al compuesto Trolox en el ensayo de xantina oxidasa (valores IC<sub>50</sub> 0,022 mg/mL para el extracto de hojas, 0,038 mg/mL para el extracto de flores y 0,028 para Trolox).

Como conclusión, las hojas y flores de *B. incana* pueden usarse como fuente de compuestos funcionales que podrían actuar como agentes antidiabéticos y anti-obesogénicos.

RESEARCH ARTICLE



## Volatile composition, antidiabetic, and anti-obesity potential of *Brassica incana* leaf and flowering top extracts

Maria Fernanda Taviano<sup>a</sup> , Sonia Núñez<sup>b,c</sup>, Adrián Millán-Laleona<sup>b,c</sup>, Concetta Conduro<sup>d</sup> , Antonella Verzera<sup>d</sup> , Maria Merlino<sup>d</sup> , Monica Ragusa<sup>e</sup>, Natalizia Miceli<sup>a</sup>  and Víctor López<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Messina, Italy; <sup>b</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Universidad San Jorge, Villanueva de Gállego (Zaragoza), Spain; <sup>c</sup>Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, CITA-Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain; <sup>d</sup>Department of Veterinary Sciences, Viale Palatucci, University of Messina, Messina, Italy; <sup>e</sup>IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli, Complex Structure of Surgical Sciences and Technologies, Bologna, Italy

### ABSTRACT

**Context:** *Brassica incana* Ten. (Brassicaceae) is an edible plant with very limited available information. Previous studies have demonstrated the polyphenolic profile and the antioxidant and cytotoxic properties of the leaf and flowering top hydroalcoholic extracts.

**Objective:** The volatile composition and the antidiabetic and anti-obesity potential of *B. incana* leaf and flowering top extracts have been investigated.

**Material and methods:** The volatile characterization of the extracts was attained by HS-SPME-GC/MS analysis. The antidiabetic and anti-obesity potential was investigated spectrophotometrically *in vitro* by the ability to modulate pancreatic lipase and  $\alpha$ -glucosidase at different concentrations using orlistat and acarbose as reference drugs. The inhibition of advanced glycation end-products (AGEs) was measured with aminoguanidine as reference and the antioxidant activity with the xanthine/xanthine oxidase system and Trolox for comparative purposes.

**Results:** Several volatiles belonging to different chemical classes were identified, being sulphur compounds the most abundant in both leaf and flowering top extracts (56.33% and 64.40% of all volatiles). Although the leaf extract showed lower IC<sub>50</sub> values in most of the assays (0.968 and 1.921 mg/mL for  $\alpha$ -glucosidase; 0.192 and 0.262 mg/mL for AGEs; 0.022 and 0.038 mg/mL for superoxide scavenging), there were no statistically significant differences between both samples. These extracts showed a similar behaviour to Trolox in the xanthine oxidase assay (IC<sub>50</sub> values of 0.022 mg/mL for leaf extract; 0.038 mg/mL for flowering top and 0.028 for Trolox).

**Conclusions:** Leaves and flowering tops from *B. incana* can be used as sources of functional compounds that could act as antidiabetic and anti-obesogenic agents.

### ARTICLE HISTORY

Received 11 April 2022  
Revised 16 August 2022  
Accepted 20 September 2022

### KEYWORDS





Anti-glucosidase; anti-lipase; antioxidant; Brassicaceae; enzyme inhibitor; isothiocyanates; volatile compounds


### Introduction

*Brassica incana* Ten., a wild *B. oleracea*-related species, is an edible plant belonging to the Brassicaceae family. *Brassica incana* is a suffrutex up 100 cm high, woody at the base, branched, glabrous except at base. Basal leaves with petiole with two irregularly dentate wings, are pubescent to tomentose especially on the lower surface and along the veining, ovate to lanceolate, lyrate; the lamina has margin entire and irregularly crenate or 1–2 lobes in the lower half, usually obtuse; upper leaves are denticulate, with amplexicaule basal auricles, gradually smaller. The flowers are gathered in racemes many-flowered with yellow spatulate petals. The fruit is a siliqua patent, constricted at intervals, terete, gradually attenuate into beak (Heywood 1964). This species is native to south-eastern Europe, including Albania, Bosnia-Herzegovina, Croatia, Greece, and Italy; the plant has also been introduced in Ukraine and Crimea (Marhold 2011).

As far as we know, only a few studies on *B. incana* are present in the published literature, which focus on the glucosinolates contained in the leaves and the seeds, while no studies on its therapeutic potential are available (Horn and Vaughan 1983; Heaney et al. 1987; Velasco and Becker 2000).

Considering the very limited information about *B. incana*, our research team started a study aimed at investigating the potential of this species as a source of bioactive phytochemicals. In a previous study, some of the authors of the present work had characterized the volatile composition of *B. incana* fresh leaves and roots (Tripodi et al. 2012). In a recent work, the antioxidant properties, the cytotoxicity against human colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells and the absence of toxicity versus brine shrimp larvae (*Artemia salina* Leach) of the hydroalcoholic extracts obtained from the leaves and the flowering tops of *B. incana* grown wild in Sicily (Italy) were established (Miceli et al. 2020). Moreover, the quali-quantitative characterization of the

**CONTACT** Natalizia Miceli  [nmiceli@unime.it](mailto:nmiceli@unime.it)  University of Messina, Messina, Italy; Víctor López  [ilopez@usj.es](mailto:ilopez@usj.es)  Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Universidad San Jorge, Villanueva de Gállego (Zaragoza), Spain

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/13880209.2022.2128825>.

This article has been republished with minor changes. These changes do not impact the academic content of the article.

© 2022 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

phenolic compounds was performed, highlighting the presence of quercetin, kaempferol and isorhamnetin derivatives, whose antioxidant, anti-inflammatory properties as well as protective against metabolic disorders have been previously demonstrated (Carullo et al. 2017; Nasri et al. 2017; Liu et al. 2021).

As a continuation of the ongoing research, this work was designed to further investigate the phytochemical volatile profile and the biological potential of the same extracts obtained from edible parts of this species. To achieve a comprehensive view of the volatile composition of the extracts the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was utilized. Besides, *B. incana* extracts were investigated *in vitro* as candidates with antidiabetic and anti-obesity potential. For this purpose, the ability to modulate lipase and  $\alpha$ -glucosidase together with inhibition of advanced glycation end-products (AGEs) and free radicals was examined (Sriramavaratharajan and Murugan 2018; Mustafa et al. 2022).

## Materials and methods

### Reagents and chemicals

All enzymes for bioassays such as lipase,  $\alpha$ -glucosidase and xanthine oxidase were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Orlistat as drug reference was also acquired from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) while acarbose was bought in Cymit Quimica (Barcelona, Spain). All other reagents, unless indicated, were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

### Plant material and extraction procedure

The plant material was collected around Capo d'Orlando (Messina, Italy). The leaves of *Brassica incana* were harvested in November 2018 and the flowering tops in May 2019. The taxonomic identification was confirmed by Prof. S. Ragusa, Department of Health Sciences, University Magna Graecia of Catanzaro. A voucher specimen (1108/18) was deposited in the same department.

After harvesting, the plant material was washed, blended, frozen, and lyophilized. The extraction was carried out as reported in our previous work (Miceli et al. 2020). The yields of the leaf and flowering top hydroalcoholic (70% MeOH) extracts, compared to 100 g of lyophilized plant material, were 26.47% and 33.16%, respectively.

### Characterization of volatile compounds by SPME-GC/MS

#### Extraction (HS-SPME)

The hydroalcoholic extracts of both the leaves and the flowering tops of *B. incana* were analyzed for their volatile composition by HS-SPME-GC/MS.

The dried extracts were solubilized in saturated sodium chloride solution to a final concentration of 10 mg/mL; then  $3 \pm 0.1$  mL of each extract solution were transferred to a 7 mL vial closed with a 'mininert' valve (Supelco, Bellefonte, PA). For the volatile extraction, the sample was equilibrated for 15 min at 40 °C, and a DVB/CAR/PDMS fibre, 50/30  $\mu$ m film thickness (Supelco, Bellefonte, PA), was exposed for 15 min to the headspace of the sample maintained at 40 °C under continuous magnetic stirring. Finally, the SPME fibre was placed for 3 min into the injector port of the GC/MS, held at 260 °C, for the thermal desorption of the analytes onto the capillary GC column.

### Analysis (GC/MS)

The volatiles were analyzed by a Shimadzu GC 2010 Plus gas chromatograph coupled to a TQMS 8040 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Milan, Italy). Two capillary columns of different polarity were used: (1) VF-WAXms, 60 m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film thickness polar column (Agilent Technologies Italia S.p.A., Milan, Italy); (2) DB-5ms, 30 m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film thickness apolar column (Agilent Technologies Italia S.p.A., Milan, Italy).

The conditions were as follows. Injection mode: splitless. Oven temperature: (1) 45 °C held for 5 min, then increased to 80 °C at a rate of 10 °C/min and to 240 °C at 2 °C/min, held at 240 °C for 5 min, for VF-WAXms column; (2) 45 °C increased to 160 °C at a rate of 3 °C/min and to 260 °C at 10 °C/min, held at 260 °C for 5 min, for DB-5ms column. Carrier gas: helium at a constant flow of 1 mL/min. Transfer line temperature: 250 °C. Acquisition range: 40–360 *m/z*; scan speed of 1250. For the identification of the volatiles, mass spectral data, NIST<sup>®</sup> 14 (NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, version 2.0, USA) and FFNSC 3.0 database, linear retention indices (LRI), literature data and injection of the available standards were used (Cincotta et al. 2018).

### Bioactivity of *B. incana* extracts

All *in vitro* bioactivity tests were performed as previously described in Taviano et al. (2020) using control wells with all reagents except for extract and sample wells in order to check the inhibitory profile. Blank wells were also measured in order to eliminate interferences. A wide range of concentrations (0.0001–10 mg/mL for enzymatic assays and 0.03–0.5 mg/mL for AGES) was tested in the assays.

#### Pancreatic lipase inhibition

Lipase inhibition was measured as previously reported by Taviano et al. (2020) in 96-well microplates. Briefly, 40  $\mu$ L of enzyme (2.5 mg/mL in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0), previously centrifugated at 2000  $\times$  *g* for 7 min was mixed with 40  $\mu$ L of extract and 20  $\mu$ L of 10 mM *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NPB). After 10 min incubation, absorbance was recorded at 405 nm using also orlistat as drug reference.

#### $\alpha$ -Glucosidase inhibition

$\alpha$ -Glucosidase inhibition was also investigated as reported by Taviano et al. (2020). 100  $\mu$ L of enzyme (1 U/mL) dissolved in buffer (12.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH = 6.9) was mixed with 50  $\mu$ L of extract and then incubated at room temperature for 10 min. Then, 50  $\mu$ L of 3 mM *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG) were added. After 15 min at 37 °C, absorbance was recorded at 405 nm using acarbose as drug reference.

#### Advanced glycation end-products inhibition

Advanced glycation end-products (AGEs) inhibition was measured in 96-black well-plates according to Spinola and Castilho (2017). 10 mg/mL Bovine serum albumin solution (50  $\mu$ L) was mixed with 80  $\mu$ L of 0.1 M phosphate buffer (containing sodium azide 3 mM, pH = 7.4), 50  $\mu$ L of 0.5 M fructose solution (0.5 M) and 20  $\mu$ L of extracts. After 24 h incubation at 37 °C in the dark, fluorescence was measured (355 nm excitation wavelength and

460 nm emission wavelength) using aminoguanidine (AMG) as drug reference.

### Antiradical activity

Free radical scavenging activity was evaluated by calculating the percentage of inhibition of superoxide radicals generated by xanthine oxidase (Mustafa et al. 2022) using trolox as reference substance. Briefly, 240  $\mu$ L of the reaction mixture [90  $\mu$ M xanthine, 16 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , and 22.8  $\mu$ M nitroblue tetrazolium chloride (NBT) in phosphate buffer pH 7.0] was mixed with 30  $\mu$ L of extract solution at different concentrations; then, xanthine oxidase (XO) was added, and absorbance was read at 560 nm after 2 min incubation at 37 °C.

### Data and statistical analyses

Results about bioactivity are presented as mean values and standard error of mean (SEM) of at least three independent experiments in different days. All bioactivity assays were performed at between 5 and 9 different concentrations for non-linear regression. GraphPad Prism v.7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used for formal analyses.  $\text{IC}_{50}$  values were obtained by non-linear regression and one-way ANOVA with Tukey multiple comparison test was used in order to detect differences between the samples.

## Results and discussion

### Characterization of volatile compounds by SPME-GC/MS

The volatile composition of the hydroalcoholic extracts of the *B. incana* leaves and flowering tops are reported in Tables 1 and 2, respectively. A large number of compounds belonging to the chemical classes of esters, alcohols, acids, ketones, aldehydes, terpenes, hydrocarbons, sulphur compounds and nitriles were detected in the headspace of leaf and flowering top extracts.

Regarding the leaf extract, its volatile fraction was constituted mainly of sulphur compounds (sulphides and isothiocyanates) which accounted for over 56% of all volatiles. Among the other chemical classes, alcohols, aldehydes and acids were the most represented with a percentage close to 10% for each one. 3-Butenyl isothiocyanate (43.10%), dimethyl trisulphide (10.66%) and 1-dodecanol (7.61%) were the compounds quantitatively most represented.

These results are quite different from those reported in our previous study on the volatiles of *B. incana* leaves (Tripodi et al. 2012); this can be explained considering that previously the SPME extraction technique was directly applied to the fresh plant leaves, and the characteristic “green leaf” volatiles, such as (*E*)-2-hexanal (leaf aldehyde), (*Z*)-3-hexenol (leaf alcohol) and, in general, C6 aldehydes and alcohols, resulted the main constituents of the leaf headspace; instead isothiocyanates were the main volatiles of the hydroalcoholic extract of *B. incana* leaves. Isothiocyanates arise from the glucosinolate hydrolysis after plant cell rupture, and in case of the hydroalcoholic extract, the procedure for sample preparation certainly favoured their formation (Fenwick et al. 1983). However, in both cases the class of isothiocyanates was constituted mostly of 3-butenyl isothiocyanate.

The volatile fraction of the flowering top extract was composed mostly of sulphur compounds and nitriles. These two classes of compounds constituted about the 82% of the whole volatile fraction. The main constituents were dimethyl trisulphide

(36.22%), dimethyl disulphide (18.51%), 3-methyl-3-butenenitrile (16.06%) and dimethyl tetrasulphide (8.16%). Isobutyl isothiocyanate and 3-butenyl isothiocyanate were the only isothiocyanates detected but they were present at very low levels representing only the 0.08% and 0.57% of the whole volatile fraction, respectively. The remaining compounds were present as minor constituents (<1%), except for 1-penten-3-one (1.95%), hexahydrofarnesyl acetone (1.32%), 1-octen-3-ol (1.07%), 1-octanol (1.11%) and limonene (2.20%).

The volatile profiles of the *B. incana* extracts showed significant differences. In particular, among sulphur compounds, isothiocyanates prevailed in the leaf extract, whereas sulphides in the flowering top one; similarly, Robertson et al. (1993) analyzing five different varieties of *Brassica napus* found that organic sulphides were among the major volatile compounds released from the flowers, whereas no isothiocyanates were detected.

Moreover, the headspace of the flowering top extract was very rich in nitriles while aldehydes, alcohols and acids were quantitatively less represented than in the leaf extract headspace.

Like isothiocyanates, nitriles are hydrolysis products of glucosinolates by the action of the myrosinase. The enzymatic cleavage can lead to different products depending on the glucosinolate structure and the presence of factors which modify the action of the enzyme. It has been demonstrated that ferrous ions and acidic conditions favour nitrile formation; moreover, nitriles are also favoured by the aglycone autolysis (Fenwick et al. 1983).

### Bioactivity of *B. incana* extracts

*Brassica incana* extracts were able to inhibit pancreatic lipase and  $\alpha$ -glucosidase in a dose-dependent manner, as reported in Figure 1. Although the observed inhibitions were not superior to the drug references used in the bioassays, orlistat and acarbose, it is the first time that these activities are reported for this plant species. In the case of pancreatic lipase, the  $\text{IC}_{50}$  value was lower for the flowering top extract whereas in the glucosidase assay the best results were obtained for the leaves extract (Table 3). Both enzymes, pancreatic lipase and  $\alpha$ -glucosidase, are key physiological and pharmacological targets for the treatment and prevention of metabolic disorders such as obesity, diabetes or the metabolic syndrome and therefore widely studied as pharmacological targets for phytochemicals (Ahmad et al. 2020; El-Nashar et al. 2021). Cruciferous plants (Brassicaceae family) have been presented several times as healthy food plants due to their content in bioactive compounds; particularly because they are rich in glucosinolates and their derived volatile sulphur compounds known as isothiocyanates, which are in relation with the prevention of certain cancers and disorders such as the metabolic syndrome (Esteve 2020; Melim et al. 2022). Although it is not clear in the literature that isothiocyanates act as pancreatic lipase or  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, other cruciferous plants have also demonstrated this kind of *in vitro* activity (Taviano et al. 2020). In previous work, several polyphenols, such as phenolic acids or flavonoids, have been detected in both *B. incana* leaf and flowering top extracts utilized in this study (Miceli et al. 2020). It was reported that extracts rich in polyphenols have a great capacity to inhibit enzymes involved in glucose and fat metabolism, such as  $\alpha$ -glucosidase and lipase (Les et al. 2020). Thus, it can be assumed that the polyphenolic compounds are involved in the lipase or glucosidase inhibiting activity highlighted for *B. incana* extracts.

In relation with antiobesogenic and antidiabetic activity, these extracts have also revealed AGEs inhibitory properties. The

**Table 1.** Composition as volatile constituents and classes of substances of *B. incana* leaf hydroalcoholic extract.

Compound	LRI <sup>a</sup> on DB-5ms	LRI <sup>a</sup> on VF-WAXms	Amount <sup>b</sup>	Percentage
<b>Sulphur compounds</b>				
Dimethyl disulphide	742	1080	3959	1.99
Isobutyl isothiocyanate	929	1322	610	0.31
Dimethyl trisulphide	969	1388	21,163	10.66
3-Butenyl isothiocyanate	973	1462	85,532	43.10
Methyl methylthiomethyl disulphide	1135	1665	520	0.26
All			111,784	56.33
<b>Nitriles</b>				
4-Pentenenitrile	745	1279	5254	2.65
Heptanenitrile	991	1408	120	0.06
All			5374	2.71
<b>Aldehydes</b>				
( <i>E</i> )-2-Pentenal	758	1131	387	0.19
Heptanal	904	1186	776	0.39
( <i>E</i> )-2-Heptenal	958	1329	571	0.29
Octanal	1004	1290	1116	0.56
( <i>E</i> )-2-Octenal	1058	1433	140	0.07
Nonanal	1105	1396	4201	2.12
Decanal	1207	1501	7448	3.75
Undecanal	1307	1606	240	0.12
Dodecanal	1408	1711	1174	0.59
Tridecanal	1510	1817	559	0.28
Tetradecanal	1610	1922	1058	0.53
$\beta$ -Cyclocitral	1220	1624	1388	0.70
Safranal	1200	1649	1071	0.54
All			20,128	10.14
<b>Ketones</b>				
6-Methyl-5-hepten-2-one	985	1340	249	0.13
All			249	0.13
<b>Alcohols</b>				
1-Hexanol	870	1347	188	0.09
1-Octen-3-ol	980	1448	233	0.12
2-Ethyl-1-hexanol	1028	1489	484	0.24
( <i>Z</i> )-2-Octen-1-ol	1060	1620	356	0.18
( <i>E</i> )-2-Octen-1-ol	1068	1616	101	0.05
1-Octanol	1071	1557	171	0.09
1-Nonanol	1173	1659	363	0.18
Dodecanol	1475	1966	15,106	7.61
Tetradecanol	1576	2171	5164	2.6
All			22,165	11.17
<b>Acids</b>				
Butanoic acid	779	1636	5276	2.66
Hexanoic acid	978	1851	7856	3.96
Octanoic acid	1171	2064	3707	1.87
Hexadecanoic acid	1960	3000	2426	1.22
All			19,264	9.71
<b>Esters</b>				
3-Methyl-1-butyl acetate	876	1121	829	0.42
Hexyl acetate	1011	1270	3001	1.51
1-Methylbutyl butanoate	1015	1208	509	0.26
Butyl hexanoate	1185	1412	664	0.33
Hexyl butanoate	1194	1415	228	0.11
Methyl hexadecanoate	1926	2216	3268	1.65
All			8498	4.28
<b>Terpenes</b>				
Limonene	1029	1193	4363	2.20
( <i>Z</i> )-Calamenene	1531	1835	1335	0.67
Guaiol	1597	2087	2333	1.18
Bulnesol	1667	2208	2391	1.20
All			10,423	5.25

<sup>a</sup>Linear retention indexes calculated according to the Van Den Dool and Kratz equation.<sup>b</sup>Peak area arbitrary scale.

inhibitory activity is also better for the leaves than for the flowering top extracts (Figure 2); the level of fluorescence of BSA alone, and BSA + fructose, and BSA + fructose + treatments is included as [Supplementary material](#). AGEs production is implicated in these metabolic diseases because of bad hyperglycaemia control; elevated glucose blood concentration leads to increased protein glycation generating a proinflammatory state (Garay-Sevilla et al. 2021).

Nevertheless, hyperglycaemia not only contributes to AGEs production but also to oxidative stress and free radical release, inducing cellular ageing and dysfunction (Silveira Rossi et al. 2022). For this reason, it is also important that  $\alpha$ -glucosidase inhibitors may also act as anti-AGEs and antioxidant agents. Figure 3 shows the activity of leaf and flowering top extracts of *B. incana* against superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system. As it can be observed, the antiradical activity is

**Table 2.** Composition as volatile constituents and classes of substances of *B. incana* flowering top hydroalcoholic extract.

Compounds	LRI <sup>a</sup> on DB-5ms	LRI <sup>a</sup> on VF-WAXms	Amount <sup>b</sup>	Percentage
<b>Sulphur compounds</b>				
Dimethyl disulphide	742	1080	32,307	18.96
Isobutyl isothiocyanate	929	1322	137	0.08
Dimethyl trisulphide	969	1388	63,208	36.62
3-Butenyl isothiocyanate	973	1462	995	0.57
Dimethyl tetrasulfide	1216	1750	14,244	8.16
All			112,673	64.40
<b>Nitriles</b>				
3-Methyl-3-butenenitrile	759	–	28,026	16.06
Benzyl nitrile	1136	1893	1442	0.83
Benzenepropanenitrile	1237	2041	119	0.07
1H-Indole-3-acetonitrile	1807	–	1028	0.59
All			30,495	17.54
<b>Aldehydes</b>				
Hexanal	803	1085	683	0.39
Heptanal	904	1186	110	0.06
( <i>E</i> )-2-Heptenal	958	1329	299	0.17
Benzaldehyde	962	1530	231	0.13
( <i>E,E</i> )-2,4-Heptadienal	1000	1508	92	0.05
Octanal	1004	1290	400	0.23
Phenylacetaldehyde	1044	1645	336	0.19
Nonanal	1105	1396	1150	0.66
Decanal	1207	1501	356	0.20
All			3657	2.10
<b>Ketones</b>				
1-Penten-3-one	721	1020	3405	1.95
6-Methyl-5-hepten-2-one	985	1340	251	0.14
6-Methyl-3,5-heptadien-2-one	1096	1582	532	0.30
6,4,10-Trimethyl-2-pentadecanone (hexahydrofarnesyl acetone)	1844	2119	2302	1.32
All			6490	3.72
<b>Alcohols</b>				
1-Octen-3-ol	980	1448	1871	1.07
( <i>E</i> )-2-Octen-1-ol	1068	1616	867	0.50
1-Octanol	1071	1557	1945	1.11
1-Nonanol	1173	1659	98	0.06
All			4781	2.74
<b>Acids</b>				
3-Methylbutanoic acid	834	1681	417	0.24
2-Methylbutanoic acid	845	1687	874	0.50
( <i>Z</i> )-3-Hexenoic acid	992	1940	80	0.05
2-Methyl-4-pentenoic acid	996	–	315	0.18
2-Ethylhexanoic acid	1115	1129	165	0.09
Octanoic acid	1171	2064	665	0.38
Nonanoic acid	1268	2165	836	0.48
Decanoic acid	1365	2267	386	0.22
All			3738	2.14
<b>Esters</b>				
3-Methyl-1-butyl acetate	876	1121	290	0.17
Pentyl 2-methylpropanoate	1056	1243	254	0.15
Phenyl acetate	1064	1660	86	0.05
Methyl octanoate	1127	1411	1162	0.67
Carveyl acetate	1314	2071	150	0.09
Octyl 2-methylpropanoate	1347	1547	89	0.05
Benzyl 3-methylbutanoate	1392	1852	121	0.07
1-Methylethyl decanoate	1428	1615	409	0.23
1-Octen-3-yl hexanoate	1507	–	328	0.19
1-Methylethyl tetradecanoate	1826	2017	57	0.03
Methyl hexadecanoate	1926	2216	1563	0.90
Methyl linoleate	2095	2480	76	0.04
Methyl linolenate	2101	2503	357	0.20
All			4790	2.83
<b>Terpenes</b>				
$\alpha$ -Pinene	933	1025	149	0.09
$\beta$ -Pinene	978	1108	333	0.19
p-Cymene	1025	1270	600	0.34
Limonene	1029	1193	3632	2.20
Eucalyptol	1033	1206	715	0.41
$\alpha$ -Isophorone	1124	1621	805	0.46
Safranal	1200	1639	451	0.26
$\beta$ -Cyclocitral	1220	1623	530	0.30
Citronellol	1232	1757	68	0.04
Carvacrol	1299	2225	110	0.06
Orivone	1354	–	133	0.08

(continued)

Table 2. Continued.

Compounds	LRI <sup>a</sup> on DB-5ms	LRI <sup>a</sup> on VF-WAXms	Amount <sup>b</sup>	Percentage
All			7740	4.43
Hydrocarbons				
Heptadecane	1700	1700	59	0.03
Octadecane	1800	1800	40	0.02
1-Eicosene	1994	2051	69	0.04
All			168	0.10

<sup>a</sup>Linear retention indexes calculated according to the Van Den Dool and Kratz equation.

<sup>b</sup>Peak area arbitrary scale.

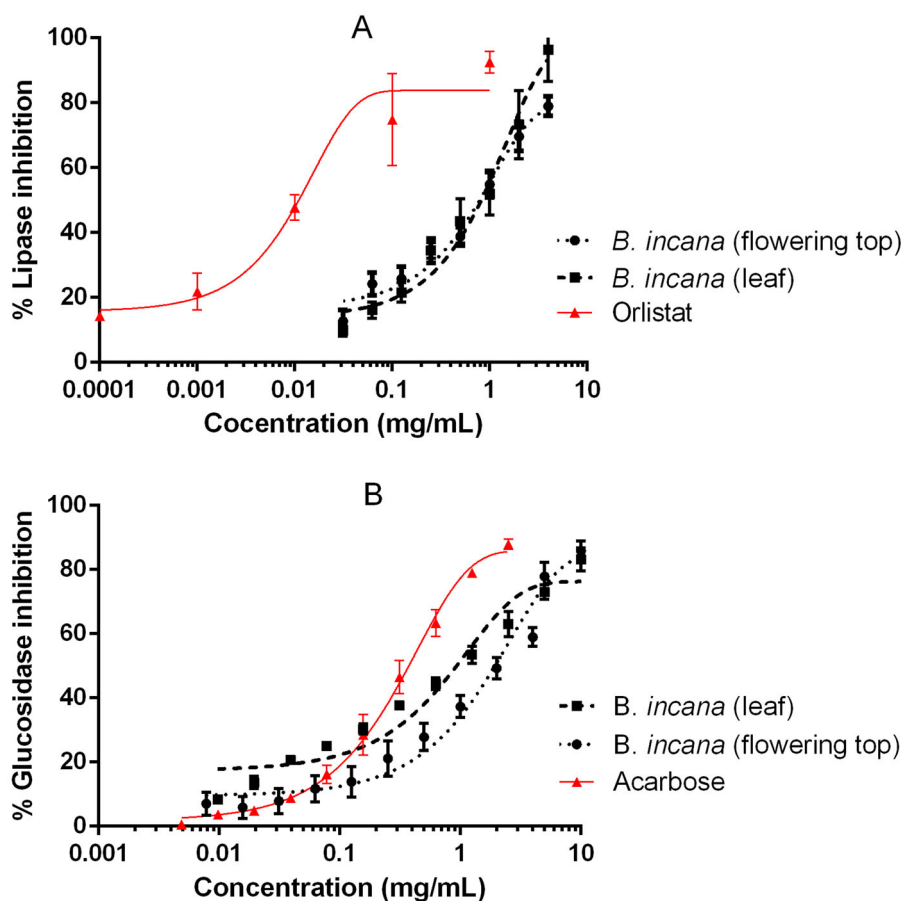


Figure 1. Inhibition of pancreatic lipase (A) and  $\alpha$ -glucosidase (B) by *B. incana* leaf and flowering top hydroalcoholic extracts. Orlistat and acarbose were used as positive control substances.

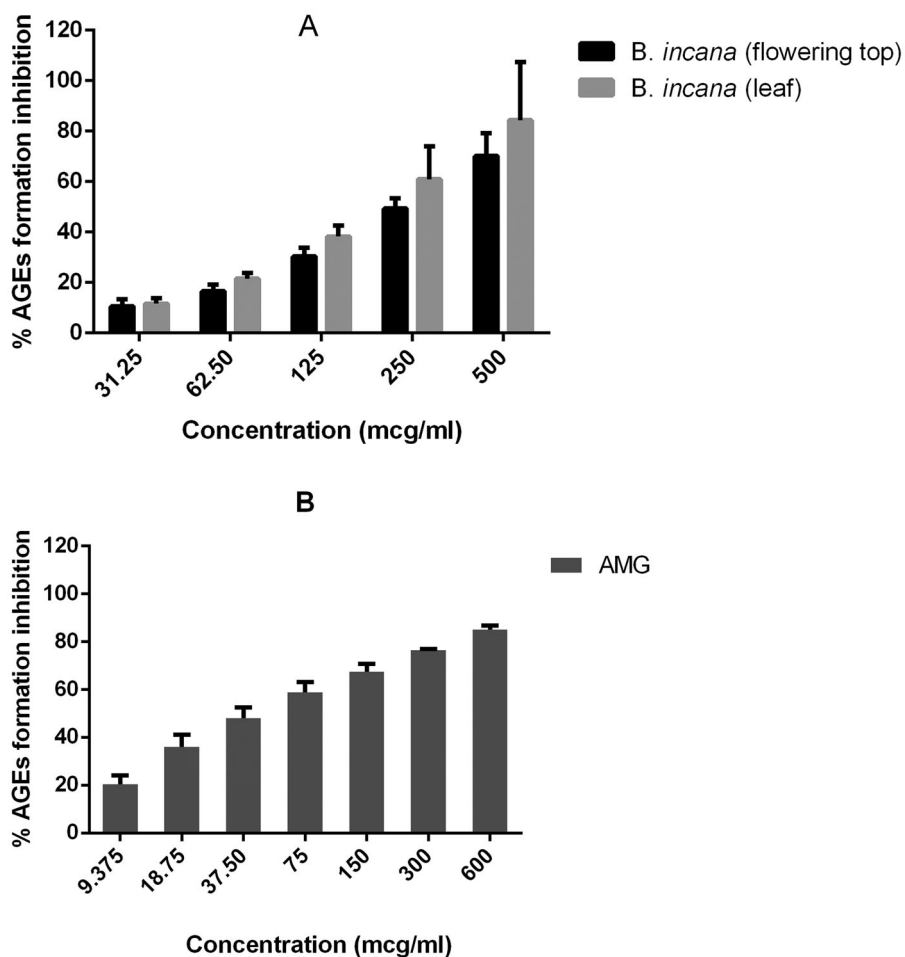
Table 3. IC<sub>50</sub> values for *B. incana* leaf and flowering top hydroalcoholic extracts and drug compounds used as references.

Samples	IC <sub>50</sub> values (mg/mL) in different bioassays			
	AGEs	Superoxide	Glucosidase	Lipase
<i>B. incana</i> (leaf)	0.192 ± 0.024 <sup>a</sup>	0.022 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.968 ± 0.141 <sup>a</sup>	1.086 ± 0.319 <sup>a</sup>
<i>B. incana</i> (flowering top)	0.262 ± 0.020 <sup>a</sup>	0.038 ± 0.012 <sup>a</sup>	1.921 ± 0.321 <sup>a</sup>	0.939 ± 0.131 <sup>a</sup>
AMG	0.0744 ± 0.017 <sup>b</sup>	–	–	–
Trolox	–	0.028 ± 0.001 <sup>a</sup>	–	–
Acarbose	–	–	0.306 ± 0.039 <sup>b</sup>	–
Orlistat	–	–	–	0.0277 ± 0.015 <sup>b</sup>

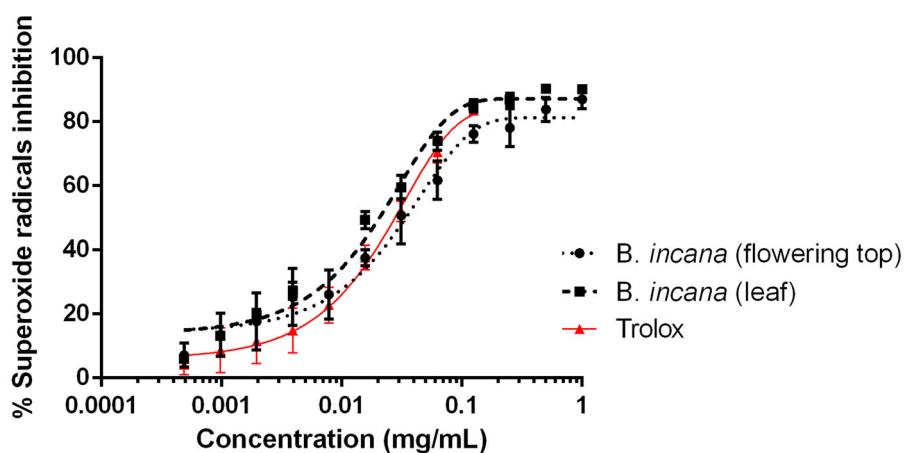
Results are expressed as average ± SEM of at least three independent experiments. <sup>a,b</sup> Different letters within the same column indicate significant differences between mean values ( $P < 0.05$ ). No significant differences were found between leaves and flowering tops using ANOVA and Tukey for multiple comparison statistical analyses.

slightly better for the leaf extract, whose IC<sub>50</sub> values are lower than the values obtained for the flowering top one (Table 3). The antioxidant activity of *B. incana* has already been published (Miceli et al. 2020; Picchi et al. 2020) but this is the first time that is performed against superoxide radicals generated by

xanthine oxidase and compared with trolox using non-linear regression analysis. Our results are in accordance with the previous work made by the authors as the leaf extract is better as radical scavenger than the flowering top (Miceli et al. 2020); nevertheless, it is surprising that the capacity of our extracts to



**Figure 2.** Inhibition of advanced glycation end-products (AGEs) by *B. incana* leaf and flowering top hydroalcoholic extracts (A) compared to aminoguanidine (B), used as positive control substance.



**Figure 3.** Antioxidant activity against superoxide radicals by *B. incana* leaf and flowering top hydroalcoholic extracts. Trolox was used as positive control substance.

inhibit superoxide radicals is even better than the activity displayed by Trolox (Figure 3 and Table 3). Previous work, as by Miceli et al. (2020), have also dealt with the presence of phenolics and have demonstrated the absence of toxicity against *A. salina* nauplii, which is also important to recommend a plant matrix as a healthy functional food. Considering that these extracts act as enzyme inhibitors of pancreatic lipase and  $\alpha$ -glucosidase and as antioxidant and anti-AGEs agents, they could represent an interesting source of bioactive molecules.

## Conclusions

Herein, the volatile profile and the antidiabetic and anti-obesity potential of leaves and flowering tops from *Brassica incana* grown wild in Sicily (Italy) are reported. Significant differences in the volatile composition of the leaf and flowering top hydroalcoholic extracts have been highlighted. In particular, among sulphur compounds, isothiocyanates prevailed in the former, being 3-butenyl isothiocyanate the main component. Both extracts

have been shown for the first time to inhibit pancreatic lipase,  $\alpha$ -glucosidase, advanced glycation end-products and superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system, although the flowering top extract displayed better pancreatic lipase inhibiting activity, there were not significant differences between the leaf extract and the flowering top. The present findings indicate that leaves and flowering tops from *B. incana* are a source of functional ingredients that could act as antidiabetic and anti-obesogenic agents.

## Acknowledgments

The authors gratefully thank Prof. Salvatore Ragusa for plant collection and identification. Universidad San Jorge and Gobierno de Aragón are also thanked for financial support (Phyto-Pharm Group B44\_20D). Sonia Núñez received a PhD grant from Industrias Químicas del Ebro.


## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## ORCID

Maria Fernanda Taviano  <http://orcid.org/0000-0002-4314-5598>

Concetta Conurso  <http://orcid.org/0000-0003-2799-7712>

Antonella Verzera  <http://orcid.org/0000-0002-6162-9297>

Maria Merlino  <http://orcid.org/0000-0003-3888-1811>

Natalizia Miceli  <http://orcid.org/0000-0002-1611-6564>

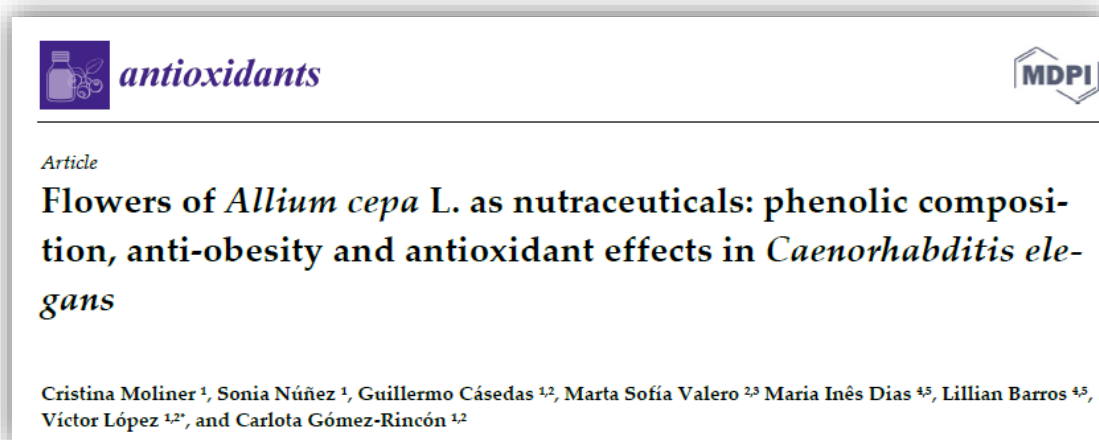
## References

- Ahmad B, Friar EP, Vohra MS, Garrett MD, Serpell CJ, Fong IL, Wong EH. 2020. Mechanisms of action for the anti-obesogenic activities of phytochemicals. *Phytochemistry*. 180:112513.
- Carullo G, Cappello AR, Frattaruolo L, Badolato M, Armentano B, Aiello F. 2017. Quercetin and derivatives: useful tools in inflammation and pain management. *Future Med Chem*. 9(1):79–93.
- Cincotta F, Verzera A, Tripodi G, Conurso C. 2018. Non-intentionally added substances in PET bottled mineral water during the shelf-life. *Eur Food Res Technol*. 244(3):433–439.
- El-Nashar HAS, Mostafa NM, El-Shazly M, Eldahshan OA. 2021. The role of plant-derived compounds in managing diabetes mellitus: a review of literature from 2014 To 2019. *Curr Med Chem*. 28(23):4694–4730.
- Esteve M. 2020. Mechanisms underlying biological effects of cruciferous glucosinolate-derived isothiocyanates/indoles: a focus on metabolic syndrome. *Front Nutr*. 7:111.
- Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ, VanEtten CH. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 18(2):123–201.
- Garay-Sevilla ME, Rojas A, Portero-Otin M, Uribarri J. 2021. Dietary AGEs as exogenous boosters of inflammation. *Nutrients*. 13(8):2802.
- Heaney RK, Fenwick GR, Mithen RF, Lewis BG. 1987. Glucosinolates of wild and cultivated *Brassica* species. *Phytochemistry*. 26(7):1969–1973.
- Heywood VH. 1964. *Brassica* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, editors. *Flora Europaea*. Cambridge: Cambridge University Press; p. 335–339.
- Horn PJ, Vaughan JG. 1983. Seed glucosinolates of fourteen wild *Brassica* species. *Phytochemistry*. 22(2):465–470.
- Les F, Cásedas G, Valero MS, Arbonés-Mainar JM, López V. 2020. Rock tea (*Jasania glutinosa* (L.) DC.) polyphenolic extract inhibits triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocyte-like cells and obesity related enzymes *in vitro*. *Food Funct*. 11(10):8931–8938.
- Liu S, Xiao P, Kuang Y, Hao J, Huang T, Liu E. 2021. Flavonoids from sea buckthorn: a review on phytochemistry, pharmacokinetics and role in metabolic diseases. *J Food Biochem*. 45(5):e13724.
- Marhold KB. 2011. Euro + Med Plantbase – the Information Resource for Euro-Mediterranean Plant Diversity [accessed on 1 February 2020]. <http://www.emplantbase.org/home.html>.
- Melim C, Lauro MR, Pires IM, Oliveira PJ, Cabral C. 2022. The role of glucosinolates from cruciferous vegetables (Brassicaceae) in gastrointestinal cancers: from prevention to therapeutics. *Pharmaceutics*. 14(1):190.
- Miceli N, Cavò E, Ragusa M, Cacciola F, Mondello L, Dugo L, Acquaviva R, Malfa GA, Marino A, D'Arrigo M, et al. 2020. *Brassica incana* Ten. (Brassicaceae): phenolic constituents, antioxidant and cytotoxic properties of the leaf and flowering top extracts. *Molecules*. 25(6):1461.
- Mustafa AM, Mazzara E, Abouelenein D, Angeloni S, Nunez S, Sagratini G, López V, Cespi M, Vittori S, Caprioli G, et al. 2022. Optimization of solvent-free microwave-assisted hydrodiffusion and gravity extraction of *Morus nigra* L. fruits maximizing polyphenols, sugar content, and biological activities using central composite design. *Pharmaceutics*. 15(1):99.
- Nasri I, Chawech R, Girardi C, Mas E, Ferrand A, Vergnolle N, Fabre N, Mezghani-Jarraya R, Racaud-Sultan C. 2017. Anti-inflammatory and anti-cancer effects of flavonol glycosides from *Diplotaxis harra* through GSK3 $\beta$  regulation in intestinal cells. *Pharm Biol*. 55(1):124–131.
- Picchi V, Lo Scalzo R, Tava A, Doria F, Argento S, Toscano S, Treccarichi S, Branca F. 2020. Phytochemical characterization and *in vitro* antioxidant properties of four *Brassica* wild species from Italy. *Molecules*. 25(15):3495.
- Robertson GW, Griffiths DW, Smith WM, Butcher RD. 1993. The application of thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry to the analyses of flower volatiles from five varieties of oilseed rape (*Brassica napus* spp. *oleifera*). *Phytochem Anal*. 4(4):152–157.
- Silveira Rossi JL, Barbalho SM, Reverete de Araujo R, Bechara MD, Sloan KP, Sloan LA. 2022. Metabolic syndrome and cardiovascular diseases: going beyond traditional risk factors. *Diabetes Metab Res Rev*. 38(3):e3502.
- Spínola V, Castilho PC. 2017. Evaluation of Asteraceae herbal extracts in the management of diabetes and obesity. Contribution of caffeoylquinic acids on the inhibition of digestive enzymes activity and formation of advanced glycation end-products (*in vitro*). *Phytochemistry*. 143:29–35.
- Sriramavaratharajan V, Murugan R. 2018. Cumin scented leaf essential oil of *Cinnamomum chemungianum*: compositions and their *in vitro* antioxidant,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activities. *Nat Prod Res*. 32(17):2081–2084.
- Taviano MF, Miceli N, Acquaviva R, Malfa GA, Ragusa S, Giordano D, Cásedas G, Les F, López V. 2020. Cytotoxic, antioxidant, and enzyme inhibitory properties of the traditional medicinal plant *Matthiola incana* (L.) R. Br. *Biology*. 9(7):163.
- Tripodi G, Verzera A, Dima G, Conurso C, Ragusa S. 2012. *Brassica fruticulosa* Cyr. and *Brassica incana* Ten. (Brassicaceae) as Mediterranean traditional wild vegetables: a valuable source of bioactive compounds. *J Essent Oil Res*. 24(6):539–545.
- Velasco L, Becker HC. 2000. Variability for seed glucosinolates in a germplasm collection of the genus *Brassica*. *Genet Resour Crop Evol*. 47(3):231–238.

---

**ARTÍCULO 2**

---



**Flores de *Allium cepa* L. como nutraceuticos: composición fenólica, efectos anti-obesidad y antioxidantes sobre *Caenorhabditis elegans*.**

Resumen:

*Allium cepa* L., denominada comúnmente cebolla, es uno de los vegetales más consumidos. Los beneficios del consumo de su bulbo han sido extensamente estudiados y se relacionan con su elevado contenido en polifenoles. Las flores de cebolla son también comestibles, sin embargo, no existen estudios sobre sus propiedades biológicas. Nuestro objetivo fue determinar el perfil polifenólico y evaluar la capacidad antioxidante y anti-obesidad de un extracto etanólico de flores frescas de *A. cepa*. Los compuestos fenólicos se identificaron a través de LC-DAD-ESI/MSn. Para estudiar el potencial anti-obesidad, se cuantificó la capacidad inhibitoria frente a enzimas digestivas. Se realizaron diferentes ensayos in vitro para determinar la capacidad antioxidante. El modelo *Caenorhabditis elegans* fue usado para evaluar el efecto del extracto sobre la resistencia al estrés y la acumulación de grasa. Por primera vez se identificaron los glicósidos de kaempferol y isorhamnetina en las flores. El extracto redujo en el nemátodo la acumulación de grasa y mostró elevada inhibición de lipasa y  $\alpha$ -glucosidasa. En cuanto a la actividad antioxidante, el extracto incrementó la supervivencia de *C. elegans* expuesto a estrés oxidativo letal. Además, el extracto logró potenciar las actividades de las enzimas catalasa y óxido dismutasa. Nuestros resultados demuestran por primera vez la capacidad antioxidante y anti-obesidad de las flores de cebolla, así como su potencial uso como alimento funcional y nutraceutico.





# Flowers of *Allium cepa* L. as nutraceuticals: phenolic composition, anti-obesity and antioxidant effects in *Caenorhabditis elegans*

Cristina Moliner <sup>1</sup>, Sonia Núñez <sup>1</sup>, Guillermo Cásedas <sup>1,2</sup>, Marta Sofía Valero <sup>2,3</sup> Maria Inês Dias <sup>4,5</sup>, Lillian Barros <sup>4,5</sup>, Víctor López <sup>1,2\*</sup>, and Carlota Gómez-Rincón <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Universidad San Jorge, 50830 Villanueva de Gállego (Zaragoza), Spain; [acmoliner@usj.es](mailto:acmoliner@usj.es) (C.M.); [ilopez@usj.es](mailto:ilopez@usj.es) (V.L.); [snunez@usj.es](mailto:snunez@usj.es) (S.N.); [gcasedas@usj.es](mailto:gcasedas@usj.es) (G.C.); [cgomez@usj.es](mailto:cgomez@usj.es) (C.G.R.)

<sup>2</sup> Instituto Agroalimentario de Aragón, IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50830 Zaragoza, Spain.

<sup>3</sup> Departamento de Farmacología, Fisiología y Medicina Legal y Forense, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain; [mvalero@unizar.es](mailto:mvalero@unizar.es) (M.S.V.)

<sup>4</sup> Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal; [lillian@ipb.pt](mailto:lillian@ipb.pt) (L.B.); [maria.ines@ipb.pt](mailto:maria.ines@ipb.pt) (M.I.D.)

<sup>5</sup> Laboratório Associado para a Sustentabilidade e Tecnologia em Regiões de Montanha (SusTEC), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

\* Correspondence: [ilopez@usj.es](mailto:ilopez@usj.es) (V.L.); Tel.: +34 976 060 100

**Abstract:** *Allium cepa* L., commonly known as onion, is one of the most consumed vegetables. The benefits of the intake of its bulb are well studied and are related to its high polyphenol content. The flowers of onion are also edible, however, there are no studies about their biological properties. Our aim was to determine the polyphenolic profile and assess the antioxidant and anti-obesity capacity of an ethanolic extract from fresh flowers of *A. cepa*. The phenolic constituents were identified through LC-DAD-ESI/MSn. For the anti-obesity potential, the inhibitory activity against digestive enzymes were measured. Several *in vitro* assays were carried out to determinate the antioxidant capacity. *Caenorhabditis elegans* model was used to evaluate the effect of the extract on stress resistance and fat accumulation. For the first time, kaempferol and isorhamnetin glucosides were identified in the flowers. The extract reduced fat accumulation in the nematode and had a high lipase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. Regarding to the antioxidant activity, the extract increased the survival rate on *C. elegans* exposed to a lethal oxidative stress. Moreover, the activities of superoxide dismutase and catalase were enhanced by the extract. Our results demonstrate for the first time the antioxidant and anti-obesity activity of onion flowers and its potential use as functional foods and nutraceuticals.

**Keywords:** edible flowers; onion; flavonoids; polyphenols; obesity; *C. elegans*

**Citation:** To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Accepted: date

Published: date



**Copyright:** © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Bioactive compounds or extracts from plants have been used for health maintenance, control, and prevention of diseases since the earliest times. An example of this can be found in the management of overweight and obesity.

According to a report from the World Health Organization (WHO), overweight and obesity affect 60% of adults and are also the leading risk factor for disability [1]. They are linked to an increased risk for many non-communicable diseases such as metabolic syndrome, osteoarthritis, or respiratory disorders, which make them a major concern for public health. Pathogenic pathways of comorbidities associated to obesity are interconnected

by different factors, specially important is the oxidative stress [2]. Thus, attenuating oxidative stress is a potential therapeutic target for obesity-associated diseases.

The current approach to counteract overweight and obesity comprises lifestyle modification (nutritional and exercise interventions), and if it is necessary also include the use of drugs and bariatric surgery. Even so, in most cases the long-term results are modest. In this context have arisen the use of functional foods and nutraceuticals as complement to the classic therapeutical strategy [3,4].

The patterns of food consumption are changing during the last years, it has emerged an interest for ingredients and dietary supplements beneficial to well-being that go further than normal healthy diet [5]. The pursuit of new functional ingredients is very challenging due to the difficulty of carried out clinical trials to prove health benefits [6]. So, several *in vivo* systems are used for the study of efficacy and the mechanisms involved. *Caenorhabditis elegans* has emerged as a convenient model in nutrition research. Besides the ease of handling, there is molecular conservation in signaling pathways between invertebrates and vertebrates, making this nematode specie a powerful model organism [7]

Edibles flowers are promising candidates for being used as nutraceuticals or functional foods due to its rich content in bioactive compounds. Flowers are a source of polyphenols, alkaloids and carotenoids, which are non-nutritive health-promoting compounds [8]. Despite this, its use is not widespread among the general population [9], although more and more are being consumed.

*Allium cepa*, popularly called onion, is one the most consumed species over the world. Several studies have been carried out to determinate the composition and biological activities of the bulb and other plant parts of this species, while their flowers remain poorly studied, even though they are also edible. Different plant parts of this species have demonstrated positive results in the treatment and prevention of obesity and associated disorders as diabetes, hypertension or hyperlipidemia [10–12].

For this reason, the present study aims to determinate the polyphenolic composition of *A. cepa* flowers. As well as the assessment of its anti-obesity and antioxidant capacity by exploring the effect on fat accumulation and protective against oxidative stress in *C. elegans* for first time.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Standards and Reagents

Acetonitrile (99.9%) was of HPLC grade from Fisher Scientific (Lisbon, Portugal). Phenolic compound standards (Isorhamnetin-3-*O*-glucoside, kaempferol-3-*O*-glucoside, and quercetin-3-*O*-glucoside) were from Extrasynthèse (Genay, France). Formic acid, bovine serum albumin (BSA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), trolox, 2-2'-azobis(2-methyl-propionamide)-di-hydrochloride (AAPH), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ), xanthine, ferrous sulfate (FeSO<sub>4</sub>), CuSO<sub>4</sub>,  $\alpha$ -Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*, 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG), lipase from porcine pancreas, 4-nitrophenyl butyrate (NPB) and bicinchoninic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Superoxide dismutase (SOD) assay kit and catalase (CAT) assay kit were bought from Invitrogen (Barcelona, Spain), while RIPA buffer lysis was obtained from Thermo Scientific (Madrid, Spain). 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone) was from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA) and Folin-Ciocalteu reagent was purchased from Chem-Lab (Zeldelgem, Belgium). cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail, nitroblue tetrazolium (NBT) and xanthine oxidase were acquired from Vidrafoc (Barcelona, Spain). All other general laboratory reagents were purchased from Panreac Química S.L.U. (Barcelona, Spain). Water was treated in a Milli-Q water purification system (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA).

## 2.2. Plant material and soxhlet extraction

Fresh flowers of *A. cepa* were harvested from an organic garden in the region of Zaragoza (Spain). The extract was prepared with a soxhlet apparatus using ethanol as solvent for 4 hours. After extraction, the solvent was removed with a rotatory evaporator and resulted extracts were stored in the dark at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 2.3. Analysis of Phenolic Compounds

The phenolic profile was determined by LC-DAD-ESI/MSn (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). These compounds were separated and identified as previously described by Bessada, Barreira, Barros, Ferreira, & Oliveira (2016). The obtained extracts were re-dissolved at a concentration of 10 mg/mL with the methanol: water (80:20, v/v) mixture. A double online detection was performed using a DAD (280, 330 and 370 nm as preferred wavelengths) and a mass spectrometer (MS). The MS detection was performed in negative mode, using a Linear Ion Trap LTQ XL mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) equipped with an ESI source.

The identification of the phenolic compounds was performed based on their chromatographic behaviour and UV-vis and mass spectra by comparison with standard compounds, when available, and data reported in the literature giving a tentative identification. Data acquisition was carried out with Xcalibur® data system (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). For quantitative analysis, a calibration curve for each available phenolic standard was constructed based on the UV-vis signal. For the identified phenolic compounds for which a commercial standard was not available, the quantification was performed through the calibration curve of the most similar available standard. The results were expressed as mg/g of extract.

## 2.4. In vitro determination of enzyme inhibitory effects

### 2.4.1 Inhibition of pancreatic Lipase assay

The ability of the extract to inhibit lipase was measured in 96 well plates [14]. The enzyme was diluted at concentration 2.5 mg/mL in buffer 0.1 M TRIS base buffer with 5mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.0) and centrifugated at 2000 g for 7 minutes. 40  $\mu\text{L}$  of extract solution, 40  $\mu\text{L}$  of enzyme and 20  $\mu\text{L}$  of substrate solution (10 mM of p-NPB) were mixed and incubated for 15 minutes at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Absorbance was read at 405 nm and enzyme inhibition was calculated in percentage using the following formula, Eq. 1.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[ \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs sample})}{\text{Abs control}} \right] \times 100$$

### 2.4.2 Inhibition of $\alpha$ -glucosidase assay

$\alpha$ -glucosidase inhibition was performed following the procedure of Casedas et al. [15] in a 96-well micropate reader at 405 nm. Each well contained 50  $\mu\text{L}$  sample and 100  $\mu\text{L}$  enzyme (1 U/mL). After 10 min, 50  $\mu\text{L}$  pNPG were added and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 20 min. Control wells contained 50  $\mu\text{L}$  of solvent (buffer 12.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH = 6.9). Absorbance was read and inhibition was calculated using Eq. 1.

## 2.5. In vitro Antioxidant Activity Assays

### 2.5.1. Determination of Folin-Ciocalteu Reducing Capacity

The Folin-Ciocalteu Reducing Capacity was determined with the Folin-Ciocalteu method in a 96 well microplate as described by Zhang [16] with minor modification. Briefly, Folin-Ciocalteu reagent (201  $\mu\text{L}$ ) was mixed with diluted extract in ethanol (9  $\mu\text{L}$ ) for 5 minutes in the dark at room temperature. Thereafter, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (90  $\mu\text{L}$ ) drop by drop to the mixture. The reaction was allowed to proceed for 40 minutes at room temperature in darkness. The absorbance of the solution was measured at 752 nm. Pyrogallol was

used as standard to prepare a calibration curve; therefore, results were expressed as mg of pyrogallol equivalents (PE)/ g extract.

#### 2.5.2. DPPH· Scavenging Activity

DPPH· assay was carried out following the description of Lopez [17]. The reaction was started by adding 150 µL of DPPH· dissolved in ethanol (0.04 mg/mL) to 150 µL of sample dilutions in ethanol. The absorbance values were measured at 518 nm after 30 min of incubation in darkness at room temperature. The radical scavenging activity was determined in percentage, according to Eq. 1.

#### 2.5.3. Superoxide radical scavenging activity assay

The superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) radical was produced by the xanthine/xanthine oxidase system. This assay was performed according to the producer described in the literature adapted to 96 well microplate [18]. 30 µL of diluted extract or phosphate buffer (pH = 6.9) were mixed with 240 µL of 22.8 µM nitroblue tetrazolium (NBT), 90 µM xanthine, and 16 mM  $Na_2CO_3$  in phosphate buffer. The reaction was started by adding 30 µL of xanthine oxidase (168 U/L). The mixture was allowed to stand for 5 min at 37 °C and the absorbance was measured at 560 nm. The inhibitory xanthine oxidase activity of the extract was also assayed at 295 nm. The radical scavenging activity was calculated using Eq. 1.

#### 2.5.4. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay

This ferric reducing ability of the extract was evaluated using FRAP assay as described by Pulido [19] with minor modifications. The FRAP reagent was prepared daily and contained 10 mmol of TPTZ solution in 40 mmol/HCl, 20 mmol/L  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  and sodium acetate buffer (300 mmol/L, pH 3.6) in a volume ratio of 1:1:10, respectively. 30 µL of sample (1 mg/mL) was mixed with 90 µL of distilled water and 900 µL of FRAP reagent. The mixture was allowed to stand for 30 min at 37 °C. The absorbance was measured at 595 nm. A calibration curve was made with  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ . FRAP value was expressed as µmol  $Fe^{2+}$ /g extract.

#### 2.5.5. Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC) assay

The peroxy radical scavenging activity of the extract was estimated by ORAC assay [20]. The ORAC assay was conducted using 96 black bottom well microplates using Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (Winooski, VT, USA). In each well, 120 µL of fluorescein (70 mM), 20 µL of a dilution of extract, trolox (standard) or PBS (blank) were placed. The reaction was started by adding 60 µL of AAHH (12 nM). The fluorescence was measured every 70 s for 93 minutes at 37 °C. The area under the curve (AUC) was calculated and ORAC value was obtained by interpolation in a calibration curve made with Trolox. The results were expressed as µmol trolox-equivalent (TE)/ mg extract.

### 2.6. *C. elegans* assays

#### 2.6.1. Strains and maintenance conditions

The wild type *C. elegans* strain (N2) and *Escherichia coli* OP50 were obtained from Caenorhabditis Genetics Center (CGC, Minnesota). *C. elegans* were propagated at 20°C on petri dishes containing Nematode Growth Medium (NGM) with a lawn of *E. coli* OP50 as food source. Synchronization of worms was achieved by preparing eggs from gravid adults using an alkali-bleaching method [21].

### 2.6.2. Assessment of Acute Toxicity

This assay has been carried out following the method of Donkin and Williams with minor modifications [22]. After synchronization, wild type worms were allowed to develop in NGM agar plates until larva stage 4 at 20°C. At this moment, the plates were washed with K-medium ((32 mM KCl, 51 mM NaCl) and re-suspended the worms at a concentration of 80-120 worms/mL. 200 µL of the worm/K-medium solution were transferred into each well of a 96 well plate. Fifty microliters of extract dilutions or K-medium (control) were added to the well. The survival of the worms was recorded after 24 hours, and the results were expressed as a percentage of survival rate. Approximately 40 worms per conditions were tested in each assay.

### 2.6.3. Analysis of body fat accumulation in *C. elegans* obesity model

An obese *C. elegans* model was designed after exposing the wild-type N2 worms to an excess of 5% glucose in NGM. The conditions studied were: 5% glucose as positive control, 5% glucose and 250 µg/mL of *A. cepa* flower extract, and plates without adding glucose as control. As negative control substance, orlistat was used at 6 µg/mL [23], the fat-reduction obtained by this drug compared to the obese worm (positive control) is considered the maximum effect (100% reduction).

The effects of the extracts on *C. elegans* fat storages were studied by Nile Red staining and fluorimetry on L4 stage. Synchronized L1 *C. elegans* (at least 300 individuals per condition) were grown for 48 hours at 20 °C under different dietary conditions previously described. Total fat content was measured in nematodes by quantifying Nile Red staining images according to the previously described method [24]. This dye emits fluorescence when exposed to ultraviolet light (Nikon Intensilight C-HGFI) allowing observation of lipids accumulated in intracellular droplets in worms. 30-40 worms per condition were captured with a Nikon camera attached to an inverted microscope Nikon Eclipse TS100 after exposure to UV lightning using a GFP filter that captures at 395nm excitation and 508 nm emission wavelength. All worms were photographed at 100 x magnification and 20 seconds of exposure time. Images were analyzed using the image processing program ImageJ to obtain the relative fluorescence per area value of each worm.

### 2.6.4. Evaluation of Resistance to Oxidative Stress

Oxidation stress resistance assay was based on the method described by Surco-Laos with modifications [25], using juglone to induce a lethal oxidative stress. In brief, synchronized L1 worms were transferred to Petri dishes containing different concentration of flower extract (0, 50, 100, 250 and 500 µg/mL) and were cultivated for 48 hours at 20°C. After the exposure period, the worms were washed twice with sterile water and were transferred into new wells containing 150 µM of juglone. After 24 hours, the survivors were scored. At least, 120 worms per condition were evaluated in each assay.

### 2.6.4. Endogenous antioxidant enzymes

L1 larvae (50 nematodes/condition) were incubated in the presence of a range of concentrations of the extract (50-500 µg/mL) or in the absence of it at 20 °C. In addition, 48 hours later, the nematodes were directly lysed or were subjected to sublethal oxidative stress (juglone 150 µM in NGM, 1 h or 3h) and were subsequently lysed. In order to lysis, nematodes were washed twice with M9 and then mix with RIPA buffer and cOmplete™ protease inhibitor cocktail. Then, the worms were disrupted by two cycles of freezing/thawing and centrifugated at 14000 xg 10 min at 4 °C. After centrifugation, the protein content of the supernatants was determinate by the bicinchoninic acid (BCA) assays.

SOD and CAT activities were measure spectrophotometrically using kits commercially available. The activities of SOD and catalase were expressed as U/mg protein.

### 2.7. Statistical Analysis

All data come from three independent replicates. The results are reported as mean  $\pm$  standard error means (SEM). IC<sub>50</sub> values were estimated by using a non-linear regression. A one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison and unpaired Student's *t* test were used to analyze statistical significance using GraphPad Prism version 6.0c (San Diego, CA, USA). Differences with  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Polyphenolic composition of *A. cepa* flowers

The extract was prepared from fresh flowers of *A. cepa* with a yield of 7.14% (mass of extract/mass of fresh flowers).

The phenolic composition of the ethanolic extract of fresh flowers of *A. cepa* was performed using an LC-DAD-ESI/MSn and the tentative identification and quantification are present in Table 1. Seven phenolic compounds were identified, being all identified as flavonols, mainly kaempferol and isorhamnetin glycoside derivatives. Peaks 5 (kaempferol-3-*O*-glucoside), 6 (isorhamnetin-3-*O*-glucoside), and 1 (kaempferol-*O*-dihexoside) were the major compounds found in the extract. The phenolic profile of this part of the sample is slightly different from those reported for the bulb and peel, in which the main compounds present were quercetin glycosides [26,27].

Table 1. Retention time (Rt), wavelengths of maximum absorption in the visible region ( $\lambda_{max}$ ), mass spectral data, tentative identification, and quantification (mg/g of extract) of the phenolic compounds present in *A. cepa* flowers.

Peak	Rt (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	Molecular ion [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentative identification	
1	14.46	350	609	447(72),285(100)	Kaempferol- <i>O</i> -dihexoside	0.887 $\pm$ 0.001
2	16.44	346	609	429(100),285(73)	Kaempferol- <i>O</i> -dihexoside	0.52 $\pm$ 0.01
3	18.38	341	593	285(100)	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	0.276 $\pm$ 0.001
4	21.27	343	609	285(100)	Kaempferol- <i>O</i> -dihexoside	0.447 $\pm$ 0.001
5	22.39	347	447	285(100)	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside	1.12 $\pm$ 0.01
6	23.34	353	477	315(100)	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside	0.93 $\pm$ 0.01
7	24.23	317	623	477(10),315(100)	Isorhamnetin- <i>O</i> -coumaroylhexaside	0.333 $\pm$ 0.004
Total phenolic compounds						4.50 $\pm$ 0.01

### 3.2. *In vitro* inhibition of $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase

The antiobesogenic potential was firstly evaluated through the *in vitro* inhibition of the enzymes lipase and  $\alpha$ -glucosidase. IC<sub>50</sub> values of samples and control substances (acarbose and orlistat) are presented in Table 1.

Table 1. Anti-obesity activity of flower extract. The results are presented as mean  $\pm$  SEM.

Sample	$\alpha$ -Glucosidase IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	Lipase IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
<i>A. cepa</i> flower extract	412.1 $\pm$ 0.4	677.1 $\pm$ 68.4
Acarbose	297.2 $\pm$ 15.8	-

Orlistat	-	27.7 ± 13.3
----------	---	-------------

*A. cepa* flower extract showed  $\alpha$ -glucosidase inhibition and pancreatic lipase inhibition; the percentages of inhibition were not as higher as the control substances but this activity should be taken in consideration.

Through the targeting of these digestive enzymes, the absorption of sugars and lipids can be reduced or controlled and therefore be useful in the management of parameters related to obesity, cardiovascular diseases and diabetes. As stated by the European Medicines Agency [28], *A. cepa* has been seldom traditionally used to treat diabetes, but there are reports for antihyperglycemic activity, cardiovascular and lipid-lowering effects. Various studies have shown that the onion extracts can exhibit inhibitory activity against the enzymes connected to metabolic syndrome and oxidative stress [29–32]. There are precedents for the inhibition of lipase and  $\alpha$ -glucosidase by diverse parts of *A. cepa* such as leaves [33], skin [32] and pulp [34], but to the best of our knowledge it is the first time that these bioactivities are proven in the flower extract. Although the IC<sub>50</sub> values for both enzymes obtained in our study are higher than those observed by other authors for pulp or skin extracts, our results suggest for the first time that *A. cepa* flowers extract may serve as a potential source of natural lipase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors.

### 3.3. *In vitro* antioxidant activity

To quantitatively evaluate the antioxidative effect, *A. cepa* flower extract was first tested *in vitro* through several assays. The results are summarized in Table 2.

Table 2. Antioxidant and reducing activity of flower extract. Results are presented as mean ± SEM

Assay	DPPH· IC <sub>50</sub> (µg/mL)	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Folin- Ciocalteu mg PE/g extract	FRAP mmol Fe <sup>2+</sup> / g extract	ORAC µmol TE/ mg extract.
<i>A. cepa</i> flower extract	471 ± 46	229 ± 39	17 ± 2	6 ± 2	1 ± 0.1
Ascorbic acid	1.5 ± 0.1	-	-	-	-
Trolox	-	28 ± 1	-	-	-

DPPH· and O<sub>2</sub><sup>-</sup> assays were used to assess the radical scavenging activity of the extract. *A. cepa* extract exhibited moderate activity in DPPH assay, the maximum percentage of inhibition of DPPH· was 94% ± 1 at 1000 µg/mL. Higher power was found neutralizing the superoxide radical. This is an important fact because this radical is one the most prevalent ROS in biological systems [35].

Beyond scavengers of oxidants, the reduction ability, especially Fe<sup>2+</sup>, is also considered an important antioxidant mechanism [36]. To evaluate it, FRAP and Folin-Ciocalteu assays were carried out. The FRAP value was 6 ± 2 mmol Fe<sup>2+</sup>/ g extract, while the reducing capacity quantified by the Folin-Ciocalteu method was 17 ± 2 mg PE/g extract. This method is known as a measure of the total phenolic content, however due to the non-specificity of the reaction, it is more valuable to assess the total antioxidant reducing activity. Folin-Ciocalteu reagent is not only reduced by phenolic compounds as flavonoids

also other compound can react against it such as vitamins or proteins [37]. As a consequence of it, there is an overestimation of the total phenolic content compared with the value obtained with LC-DAD-ESI/MSn.

ORAC is one of the main assays to assess the hydrogen atom transfer of extracts. The ORAC value of the flower extract was  $1 \pm 0.1 \mu\text{mol TE}/\text{mg extract}$ . Xiong et al. determinate the ORAC value of acetone extracts of 10 common edible flowers and most of them shown a lower value than our data [38].

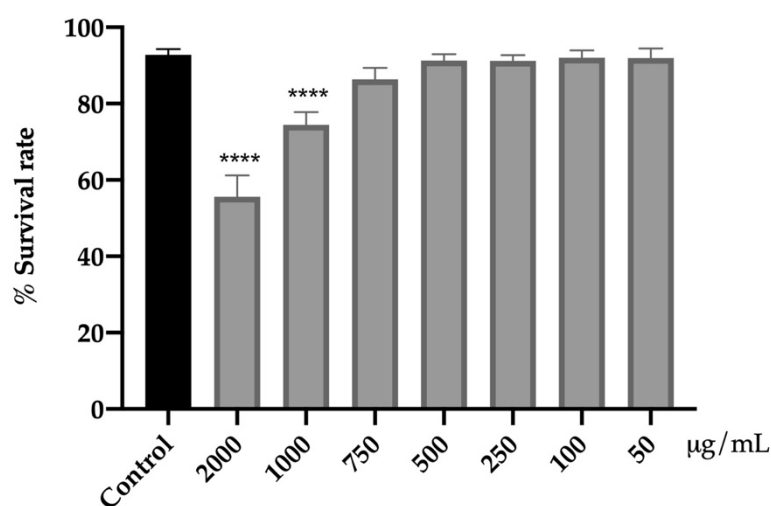
The comparison of our results with others reported in the literature about other parts of *A. cepa* is difficult due to the use of different units and methods for the antioxidant activity evaluation. These studies shown an strong antioxidant activity of skin, pulp and essential oil. [39–42]. Our findings shown a promising activity also for the flowers of this specie.

### 3.4. *C. elegans* assays

In order to better understand the biological effects of this extract, the antioxidant and anti-obesity activity was assessed in *C. elegans* as this nematode offers the possibility of detecting phenotypic changes.

#### 3.3.1. Assessment of acute toxicity of fresh flowers

Initially, the effect of the extract in the viability of *C. elegans* N2 was carried out to evaluate its acute toxicity and to establish the range of non-toxic concentrations (Fig. 1). The range of concentrations of 50–750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 24 h did not affect viability as compared to the control group. However, the higher concentrations tested (1000 and 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) had a negative impact in the viability of the nematodes ( $p < 0.0001$ ). The mortality rate was increased a 19% (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and 37% (2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) respect the control, without reaching the lethal dose 50 (LD50).



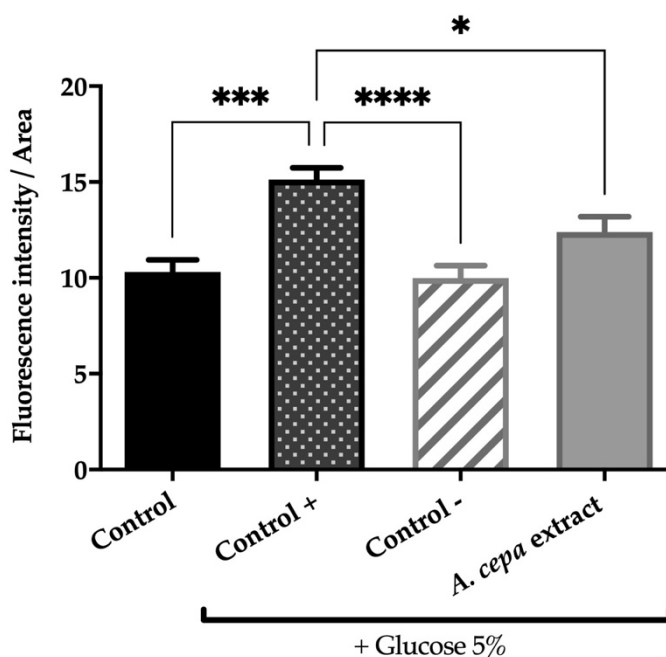
**Figure 1.** Effect of the extract from fresh flowers of *A. cepa* on *C. elegans* N2 viability. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Differences compared to the control group were considered significant at  $p < 0.0001$ (\*\*\*\*).

The nematicide power of the flower extract is scarce. This is the first time that the impact on *C. elegans* viability of *A. cepa* flowers has been described. No other studies have been found that evaluate this activity in other nematodes species, however there are two studies about the nematocidal action of two aised oligosaccharides of the bulb and onion oil [43,44]. As commented previously, there is difference in the phytochemicals presents in different parts of the plant and also depending on the extraction technique.

### 3.3.2. *A. cepa* flower extract decreased fat accumulation.

*C. elegans* is a great model for exploring lipid metabolism because the regulatory pathways of energy homeostasis are highly conserved between mammals and this nematode. Numerous studies have shown that *C. elegans* is an excellent tool in the search for bioactive compounds that allow modulating lipid metabolism, contributing to the control of obesity [45–47].

As can be seen in **Figure 2**, glucose supplementation increases fat deposits in obese control worms by 31.8% compared to control animals ( $p < 0.001$ ) validating the designed *in vivo* model. On the other hand, our results show that treatment with orlistat, the reference drug, or the extract of *A. cepa* flowers effectively reverses this effect. Dietary addition of 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of *A. cepa* flower extract reduced by 18.2% the fat deposits in the treated worms compared to the obese control without treatment ( $p < 0.05$ ). Similar effect was observed in the group treated with orlistat, the reference drug, which produced a reduction in lipid content of 34.6% ( $p < 0.0001$ ). For both treatments, no statistical differences were achieved in the non-obese worms (control group) which suggests that onion flower extract as orlistat, allows to reduce fatty deposits to physiological levels in *C. elegans* N2 strain.



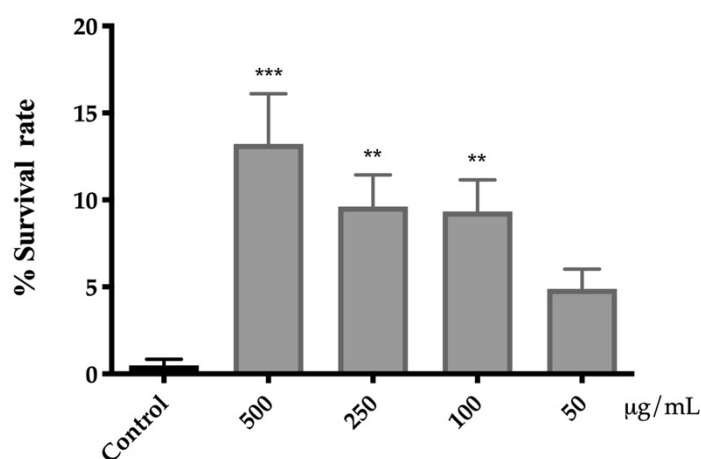
**Figure 2.** Effect of the extract from fresh flowers of *A. cepa* on *C. elegans* N2 total fat. Control group was nematodes without supplementation of glucose; while *A. cepa* extract (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), control + (orlistat, 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and control – groups were cultivated in presence of 5% of glucose. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. ( $n = 50$ – $60$  worms). Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$  (\*) and  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

Energy homeostasis is a highly complex phenomenon whose regulation is influenced by numerous factors. In *C. elegans*, more than 400 genes involved in the maintenance of body reserves have been described. Many of these pathways are highly conserved in humans, so in recent years a considerable number of authors have used this model in the study of fat metabolism and obesity [46]. Recent research has shown that phenolic compounds can reduce fatty deposits in *C. elegans* by increasing lipolysis or reducing lipogenesis through different mechanisms controlled by several genetic pathways. The *in vivo* obesity model used in this study does not allow the identification of a specific mechanism of action for the decrease in total fat observed in worms treated with *A. cepa*. However, the identification in the extract of kaempferol and isorhamnetin derivatives as major components suggests that these compounds, whose anti-obesity effect has been previously described, could be responsible for the observed activity [45,46]. Thereby, Farrias-Pereira et

al. showed that isorhamnetin reduces fat accumulation in *C. elegans* by increasing fat oxidation [46]. This effect was dependent on *nhr-49* pathway, which are involved in fatty acid  $\beta$ -oxidation and lipolysis. As is well known well fat accumulation increase the oxidative stress damage, and on contrary, an increase in ROS production leads to an excessive accumulation of fat [48]. The clear antioxidant effect shown by the extract could contribute to the observed anti-obesity effect.

### 3.3.3. Onion flower extract attenuates the oxidative stress toxicity induced by juglone

The protective activity of the extract of *A. cepa* flowers against oxidative stress was evaluated exposing *C. elegans* to a lethal dose of juglone. Juglone is a powerful pro-oxidant, which increase the generation of intracellular superoxide radicals that can damage cellular components [49]. As shown in **Figure 3**, the pre-treatment with *A. cepa* significantly increased the survival rate of nematodes, protecting them from oxidative stress. The best response was found in the group treated with 500  $\mu\text{g/mL}$  of flower extract for which the survival rate was increased from 0.4%  $\pm$  0.3 (control group) to 13%  $\pm$  3.



**Figure 3.** Effect of *A. cepa* flower extract on the response to a lethal oxidative stress induced by juglone on *C. elegans*. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Differences compared to control group were considered significant at  $p < 0.01$  (\*\*) and  $p < 0.001$  (\*\*\*).

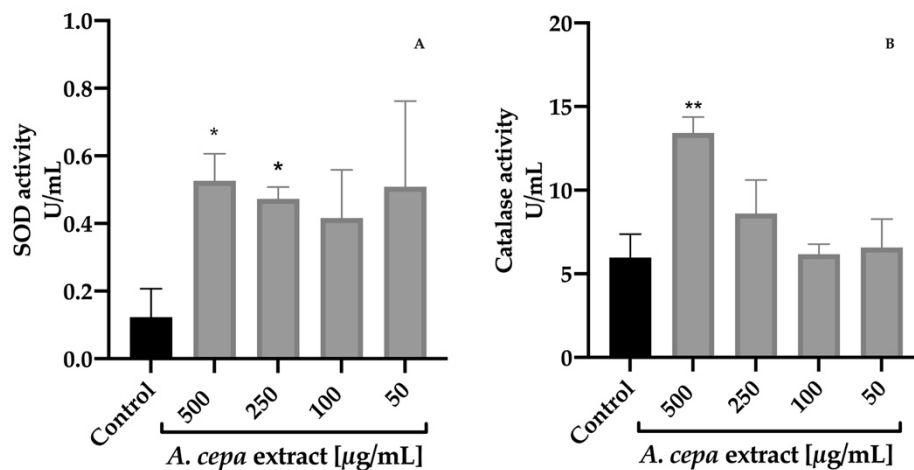
Our results reveal a protective potential for *A. cepa* flowers against oxidative stress, which is in concordance with the *in vitro* assays described above and the phenolic composition. To the best of our knowledge, this is the first study of the antioxidant potential of *A. cepa* using *C. elegans*. The polyphenols present in the extract have shown protective effect against stress oxidative on this model organism. Kampkötter et al. shown that kaempferol decrease the accumulation of ROS and oxidative stress [50]. Similar findings were also made in assays performed with isoharmentin, which increased around 15% the survival rate of nematodes after juglone exposition [51].

### 3.3.4. Impact of the extract on endogenous antioxidant enzymes activities

The antioxidant enzyme catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) are the main defense system against oxidative injury. The inductions of these antioxidant enzymes are potential pharmacology targets to attenuate ROS induced damage related to cardiovascular or neurodegenerative disorders [52]. Both enzymes are highly conserved in the nematode *C. elegans* [53].

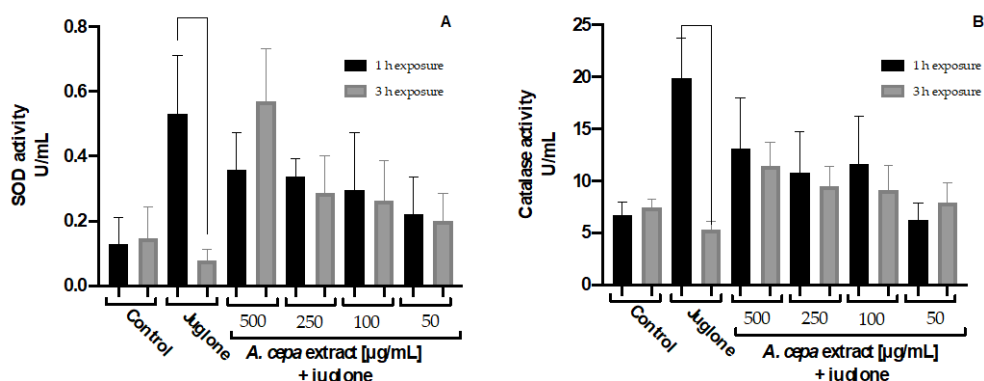
The effect of *A. cepa* extract on SOD and CAT activities was determined on *C. elegans* (**Figure 4**). After 48 hours of treatment with the extract, the results revealed a significantly increase of the activity of both enzymes respect to the control group. The best response

was found in the group treated with 500 µg/mL leading to a 4.3 and 2.3 -fold increment for SOD and CAT activity compared to the control worms, respectively. The 250 µg/mL group also increased SOD activity (3.8-fold) without having a significant effect on the CAT activity against control group.



**Figure 4.** Effect of *A. cepa* flower extract on SOD (A) and CAT (B) activity on *C. elegans*. Results are represented as mean ± SEM. Differences compared to control group were considered significant at  $p \leq 0.05$  (\*) and  $p < 0.01$  (\*\*).

To deepen in the protective effect of the extract against juglone damage. The activity of these endogenous antioxidant enzymes was determinate after induced a sublethal oxidative stress. In order to observe the differences along time, worms were exposed to juglone 150 µM for 1 hour or 3 hours and the results are shown in Fig. 4. In both cases, the exposition to juglone for 1 hour causes a significant increase of their activity to counteract the free radicals generated by juglone. However, after 3 hours of exposition to it, the assessment showed a significant reduction of SOD and CAT. This fact was not observed in the nematodes treated with the extracts, in which no statistical differences in enzymatic activity between the different time were found. CAT and SOD levels remained constant. This could be related with the positive effect in the survival rate on nematodes exposed to a lethal oxidative stress. Although no statistics differences were found between the different groups in the same exposure time.



**Figure 5.** Effect of *A. cepa* flower extract on SOD (A) and CAT (B) activity after a sublethal oxidative stress induced by exposure *C. elegans* to juglone for 1 o 3 hours. Results are represented as mean ± SEM. Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$  (\*) and  $p < 0.01$  (\*\*).

Previous studies found similar effects in SOD and CAT activities of other parts of the plant using cell cultures, rats and rabbits [54–56]. These enzymes are biomarkers of antioxidant defenses of the organisms.

*A. cepa* flowers exhibit a protective effect against juglone toxicity supported by *in vitro* assays. However, the results obtained from the endogenous enzymes are insufficient to explain the antioxidant mechanism implied, which should be further clarified in the future.

The use of functional foods and nutraceuticals as a non-pharmacological intervention has a great potential for reducing obesity, oxidative stress, and associated comorbidities. Certain clinical trials are using *A. cepa* as a dietary intervention like the study performed by Jeon et al; in this study, overweight South Korean patients received a supplementation with steamed onion which causes a decrease of total body fat and an improvement of metabolic parameters [12]. These encouraging results supports the need to continue the research with the different edible parts of onions and related vegetables.

#### 4. Conclusions

We demonstrated, for the first time, the potential use of onion flowers as functional food due to the presence of polyphenols and its antioxidant and anti-obesity activities demonstrated *in vitro* and *in vivo*. This work put forward the idea of using certain flowers of plant foods as edible healthy ingredients with health-promoting properties.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.M., G.C., C. G.R., L.B. and V. L.; methodology, C.M., G.C., S.N. and C. G.R.; formal analysis, C.M., S.N, M.S.V. and C. G.R. ; investigation, C.M., S.N., G. C., M.I.D and LB; writing—original draft preparation, C.M. G.C. and S.N; writing—review and editing, C. G.R. and V.L.; visualization, V.L.; supervision, C.M., C. G.R., L.B. and V. L; project administration, V.L.; funding acquisition, V.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The authors thank Gobierno de Aragón for their financial support (Phyto-Pharm Group B44\_20D). Universidad San Jorge is also thanked for giving financial support through Proyecto Interno 2223025.

**Acknowledgements:** To the Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal) for financial support to CIMO (UIDB/00690/2020 and UIDP/00690/2020) and SusTEC (LA/P/0007/2021); national funding by F.C.T. and P.I., through the institutional scientific employment program-contract for L. Barros and M.I. Dias contracts. We also thank Clara Berges and Miguel Monreal for collaborating in certain experiments.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. World Health Organization *WHO European Regional Obesity Report 2022*; Copenhagen, 2022;
2. Marseglia, L.; Manti, S.; Angelo, G. D.; Nicotera, A.; Parisi, E.; Rosa, G. Di; Gitto, E.; Arrigo, T. Oxidative Stress in Obesity : A Critical Component in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 378–400, doi:10.3390/ijms16010378.
3. Payab, M.; Aletaha, A.; Aminjan, H. H. Effect of the herbal medicines in obesity and metabolic syndrome : A systematic review and meta - analysis of clinical trials. *Phyther. Res.* **2019**, *34*, 526–545, doi:10.1002/ptr.6547.
4. Wallner, M.; Sandner, G.; Ko, A.; Weghuber, J. Functional foods - dietary or herbal products on obesity: application of selected bioactive compounds to target lipid metabolism. *Curr. Opin. Food Sci.* **2020**, *34*, 9–20, doi:10.1016/j.cofs.2020.09.011.
5. Boccia, F.; Punzo, G. Nutraceuticals : Some remarks by a choice experiment on food , health and new technologies. *Food Res. Int.* **2020**, *130*, 108888, doi:10.1016/j.foodres.2019.108888.
6. Brown, L.; Caligiuri, S. P. B.; Brown, D.; Pierce, G. N. Clinical trials using functional foods provide unique challenges. *J. Funct. Foods* **2018**, *45*, 233–238, doi:10.1016/j.jff.2018.01.024.

7. Wang, Y.; Guo, K.; Wang, Q.; Zhong, G. *Caenorhabditis elegans* as an emerging model in food and nutrition research: importance of standardizing base diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *0*, 1–19, doi:10.1080/10408398.2022.2130875. 508 509
8. Pires, E. D. O.; Gioia, F. Di; Roupheal, Y.; Ferreira, I. C. F. R.; Caleja, C.; Barros, L.; Petropoulos, S. A. The Compositional Aspects of Edible Flowers as an Emerging Horticultural Product. *Molecules* **2021**, *26*, 6940, doi:10.3390/molecules26226940. 510 511
9. Rodrigues, H.; Cielo, D. P.; Silveira, A. A. S.; Marchesan, T. A.; Galmarini, M. V.; Richards, N. S. P. S. Eating flowers? Exploring attitudes and consumers' representation of edible flowers. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 227–234, doi:10.1016/j.foodres.2017.08.018. 512 513
10. Marrelli, M.; Amodeo, V.; Statti, G.; Conforti, F. Biological Properties and Bioactive Components of *Allium cepa* L.: Focus on Potential Benefits in the Treatment of Obesity and Related Comorbidities. *Molecules* **2019**, *24*, 119, doi:10.3390/molecules24010119. 514 515 516
11. Sargin, S. A. Plants used against obesity in Turkish folk medicine: A review. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, *270*, 113841. 517
12. Jeong, S.; Chae, J.; Lee, G.; Shin, G.; Kwon, Y.; Shin, D. Y.; Lee, J. H. Effect of Steamed Onion ( ONIRO ) Consumption on Body Fat and Metabolic Profiles in Overweight Subjects: A 12-Week Randomized , Double-Blind , Placebo-Controlled Clinical Trial. *J. Am. Coll. Nutr.* **2019**, *39*, 206–215, doi:10.1080/07315724.2019.1635052. 518 519 520
13. Bessada, S. M. F.; Barreira, J. C. M.; Barros, L.; Ferreira, I. C. F. R.; Oliveira, M. B. P. P. Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* ( L . ) Rchb . f .: An underexploited and highly disseminated species. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *89*, 45–51, doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.065. 521 522 523
14. Kim, Y. S.; Lee, Y. M.; Kim, H.; Kim, J.; Jang, D. S.; Kim, J. H.; Kim, J. S. Anti-obesity effect of *Morus bombycis* root extract: Anti-lipase activity and lipolytic effect. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *130*, 621–624, doi:10.1016/j.jep.2010.05.053. 524 525
15. Cásedas, G.; Les, F.; Gómez-Serranillos, M. P.; Smith, C.; López, V. Bioactive and functional properties of sour cherry juice (*Prunus cerasus*). *Food Funct.* **2016**, *7*, doi:10.1039/c6fo01295g. 526 527
16. Zhang, Q.; Zhang, J.; Shen, J.; Silva, A.; Dennis, D. A.; Barrow, C. J. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J. Appl. Phycol.* **2006**, *18*, 445–450, doi:10.1007/s10811-006-9048-4. 528 529
17. López, V.; Akerreta, S.; Casanova, E.; García-mina, J.; Cavero, R.; Calvo, M. Screening of Spanish Medicinal Plants for Antioxidant and Antifungal Activities. *Pharm. Biol.* **2008**, *46*, 602–609, doi:10.1080/13880200802179634. 530 531
18. Rodríguez-Chávez, J. L.; Coballase-Urrutia, E.; Nieto-Camacho, A.; Delgado-Lamas, G. Antioxidant capacity of “mexican arnica” *heterotheca inuloides* cass natural products and some derivatives: Their anti-inflammatory evaluation and effect on *C. elegans* life span. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, doi:10.1155/2015/843237. 532 533 534
19. Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing / Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3396–3402, doi:10.1021/jf9913458. 535 536
20. Dávalos, A.; Gómez-Cordovéz, C.; Bartolomé, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 48–54, doi:10.1021/jf0305231. 537 538
21. Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* **1999**, *2*, 51–67, doi:10.1895/wormbook.1.101.1. 539
22. Donkin, S. G.; Williams, P. L. Influence of developmental stage, salts and food presence on various end points using *Caenorhabditis Elegans* for aquatic toxicity testing. *Environmental Toxicol. Chem.* **1995**, *14*, 2139–2147, doi:10.1002/etc.5620141218. 540 541 542
23. Martorell, P.; Llopis, S.; Gonza, N.; Monto, F.; Ortiz, P.; Genove, S. *Caenorhabditis elegans* as a Model To Study the Effectiveness and Metabolic Targets of Dietary Supplements Used for Obesity Treatment: The Specific Case of a Conjugated Linoleic Acid Mixture (Tonalin). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11071–11079, doi:10.1021/jf3031138. 543 544 545
24. Escorcia, W.; Ruter, D. L.; Nhan, J.; Curran, S. P. Quantification of lipid abundance and evaluation of lipid distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile red and Oil Red O staining. *J. Vis. Exp.* **2018**, e57352, doi:10.3791/57352. 546 547
25. Surco-Laos, F.; Dueñas, M.; González-Manzano, S.; Cabello, J.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A. M. Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis* 548 549

- elegans and epicatechin uptake. *Food Res. Int.* **2012**, *46*, 514–521, doi:10.1016/j.foodres.2011.10.014. 550
26. Veiga, A. A.; Irioda, A. C.; Mogharbel, B. F.; Bonatto, S. J. R.; Souza, L. M. Quercetin-Rich Extracts from Onions ( *Allium cepa* ) Play Potent Cytotoxicity on Adrenocortical Carcinoma Cell Lines , and Quercetin Induces Important Anticancer Properties. *pharmaceuticals* **2022**, *15*, 754. 551  
552  
553
27. Zhao, X.; Lin, F.; Li, H.; Li, H.; Wu, D.; Geng, F. Recent Advances in Bioactive Compounds , Health Functions , and Safety Concerns of Onion ( *Allium cepa* L .). *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 669805, doi:10.3389/fnut.2021.669805. 554  
555
28. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) *Assessment report on Allium cepa L ., bulbus*; London, 2012; 556
29. Kim, H. Y. Effects of onion (*Allium cepa*) skin extract on pancreatic lipase and body weight-related parameters. *FOOD Sci. Biotechnol.* **2007**, *16*, 434–438. 557  
558
30. Oboh, G.; Ademiluyi, A. O.; Agunloye, O. M.; Ademosun, A. O.; Ogunsakin, B. G. Inhibitory Effect of Garlic, Purple Onion, and White Onion on Key Enzymes Linked with Type 2 Diabetes and Hypertension. *J. Diet. Suppl.* **2019**, *16*, 105–118, doi:10.1080/19390211.2018.1438553. 559  
560  
561
31. Nile, A.; Nile, S. H.; Kim, D. H.; Keum, Y. S.; Seok, P. G.; Sharma, K. Valorization of onion solid waste and their flavonols for assessment of cytotoxicity, enzyme inhibitory and antioxidant activities. *FOOD Chem. Toxicol.* **2018**, *119*, 281–289, doi:10.1016/j.fct.2018.02.056. 562  
563  
564
32. Stoica, F.; Aprodu, I.; Enachi, E.; Stanciuc, N.; Condurache, N. N.; Duta, D. E.; Bahrim, G. E.; Rapeanu, G. Bioactive's Characterization, Biological Activities, and In Silico Studies of Red Onion (*Allium cepa* L.) Skin Extracts. *PLANTS-BASEL* **2021**, *10*, 2330, doi:10.3390/plants10112330. 565  
566  
567
33. Slanc, P.; Doljak, B.; Kreft, S.; Lunder, M.; Janes, D.; Strukelj, B. Screening of Selected Food and Medicinal Plant Extracts for Pancreatic Lipase Inhibition. *Phyther. Res.* **2009**, *23*, 874–877, doi:10.1002/ptr.2718. 568  
569
34. Trisat, K.; Wong-on, M.; Lapphanichayakool, P.; Tiyafoonchai, W.; Limpeanchob, N. Vegetable Juices and Fibers Reduce Lipid Digestion or Absorption by Inhibiting Pancreatic Lipase, Cholesterol Solubility and Bile Acid Binding. *Int. J. Veg. Sci.* **2017**, *23*, 260–269, doi:10.1080/19315260.2016.1258604. 570  
571  
572
35. Pisoschi, A. M.; Pop, A.; Iordache, F.; Stanca, L.; Predoi, G.; Serban, A. I. Oxidative stress mitigation by antioxidants - an overview on their chemistry and influences on health status Aurelia. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112891, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112891. 573  
574  
575
36. Santos, J. S.; Alvarenga Brizola, V. R.; Granato, D. High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. *Food Chem.* **2017**, *214*, 515–522, doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.091. 576  
577
37. Everette, J. D.; Bryant, Q. M.; Green, A. M.; Abbey, Y. A.; Wangila, G. W.; Walker, R. B. A thorough study of reactivity of various compound classes towards the Folin-Ciocalteu. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *58*, 8139–8144, doi:10.1021/jf1005935.A. 578  
579
38. Xiong, L.; Yang, J.; Jiang, Y.; Lu, B.; Hu, Y.; Zhou, F.; Mao, S.; Shen, C. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacities of 10 Common Edible Flowers from China. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, 517–525, doi:10.1111/1750-3841.12404. 580  
581
39. Nuutila, A. M.; Puupponen-pimia, R.; Aarni, M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food* **2003**, *81*, 485–493. 582  
583
40. Santas, J.; Almajano, M. P.; Carbó, R. Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2010**, *45*, 403–409, doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02169.x. 584  
585
41. Ye, C.; Dai, D.; Hu, W. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion ( *Allium cepa* L .). *Food Control* **2013**, *30*, 48–53, doi:10.1016/j.foodcont.2012.07.033. 586  
587
42. Kim, M.; Jo, S.; Jang, H.; Lee, M. S.; Kwon, Y. Antioxidant Activity and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Potential of Onion ( *Allium cepa* L . ) Extracts. *Food Sci. Biotechnol.* **2010**, *19*, 159–164, doi:10.1007/s10068-010-0022-1. 588  
589
43. Amaral, D. R.; Da Rocha Oliveira, F. E.; Oliveira, D. F.; Campos, V. P. Purification of two substances from bulbs of onion (*Allium cepa* L.) with nematicidal activity against *Meloidogyne exigua* Goeldi. *Nematology* **2003**, *5*, 859–864, 590  
591

- doi:10.1163/156854103773040763. 592
44. Hoi, I. C.; Hin, S. S.; Ark, I. P. Nematicidal activity of onion ( *Allium cepa* ) oil and its components against the pine wood nematode ( *Bursaphelenchus xylophilus* ). *Nematology* **2007**, *9*, 231–235. 593  
594
45. Aranaz, P.; Navarro-Herrera, D.; Zabala, M.; Romo-Hualde, A.; López-Yoldi, M.; Vizmanos, J. L.; Milagro, F. I.; González-Navarro, C. J. Phenolic compounds reduce the fat content in *Caenorhabditis elegans* by affecting lipogenesis, lipolysis, and different stress responses. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 355, doi:10.3390/ph13110355. 595  
596  
597
46. Farias-Pereira, R.; Savarese, J.; Yue, Y.; Lee, S.; Park, Y. Fat-lowering effects of isorhamnetin are via NHR-49-dependent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Res. Food Sci.* **2020**, *2*, 70–76, doi:10.1016/j.crfs.2019.11.002. 598  
599
47. Shen, P.; Yue, Y.; Kim, K. H.; Park, Y. Piceatannol Reduces Fat Accumulation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Med. Food* **2017**, *20*, 887–894, doi:10.1089/jmf.2016.0179. 600  
601
48. Guerrero-Rubio, M. A.; Hernández-García, S.; García-Carmona, F.; Gandía-Herrero, F. Flavonoids' effects on *Caenorhabditis elegans*' longevity, fat accumulation, stress resistance and gene modulation involve mTOR, SKN-1 and DAF-16. *Antioxidants* **2021**, *10*, 438, doi:10.3390/antiox10030438. 602  
603  
604
49. Pluci, B.; Kuczy, P. The oxidative stress in allelopathy : Participation of prenyl lipid antioxidants in the response to juglone in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* **2017**, *144*, 171–179, doi:10.1016/j.phytochem.2017.09.012. 605  
606
50. Kampkötter, A.; Gombitang, C.; Ruben, N.; Zurawski, F.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl, R. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Toxicol.* **2007**, *81*, 849–858, doi:10.1007/s00204-007-0215-4. 607  
608  
609
51. Surco-Laos, F.; Cabello, J.; Gómez-Orte, E.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A. M.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M. Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food Funct.* **2011**, *2*, 445–56, doi:10.1039/c1fo10049a. 610  
611  
612
52. Porres-Martínez, M.; González-Burgos, E.; Carretero, M. E.; Gómez-Serranillos, M. P. Protective properties of *Salvia lavandulifolia* Vahl. essential oil against oxidative stress-induced neuronal injury. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *80*, 154–162, doi:10.1016/j.fct.2015.03.002. 613  
614  
615
53. Zhu, A.; Zheng, F.; Zhang, W.; Li, L.; Li, Y.; Hu, H.; Wu, Y. Oxidation and Antioxidation of Natural Products in the Model Organism *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants* **2022**, *11*, 705, doi:10.3390/antiox11040705. 616  
617
54. Kim, J.; Kim, J.; Kim, S.; Jeong, S.; Jeong, U.; Jung, J.; Lee, S.; Lee, S. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Ethanol Extract from Whole Onion ( *Allium cepa* L. ) with Leaves. *Agriculture* **2022**, *12*, 963. 618  
619
55. Lee, B.; Jung, J.; Kim, H. Assessment of red onion on antioxidant activity in rat. *FOOD Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 3912–3919, doi:10.1016/j.fct.2012.08.004. 620  
621
56. Ogunmodede, O. S.; Saalu, L. C.; Babatunde, O.; Akunna, G. G. An Evaluation of the Hypoglycemic , Antioxidant and Hepatoprotective Potentials of Onion ( *Allium cepa* L. ) on Alloxan-induced Diabetic Rabbits. *Int. J. Pharmacol.* **2012**, *8*, 21–29, doi:10.3923/ijp.2012.21.29. 622  
623  
624  
625



# RESUMEN DE RESULTADOS



**Nomenclatura de los extractos de flores:**

*T. erecta* amarillo Soxhlet '17 → extracto de *Tagetes erecta* variedad amarilla obtenido mediante Soxhlet en 2017.

*T. erecta* naranja Soxhlet '17 → extracto de *Tagetes erecta* variedad naranja obtenido mediante Soxhlet en 2017.

*T. erecta* amarillo Soxhlet '22 → extracto de *Tagetes erecta* variedad amarilla obtenido mediante Soxhlet en 2022.

*T. erecta* naranja Soxhlet '22 → extracto de *Tagetes erecta* variedad naranja obtenido mediante Soxhlet en 2022.

*T. erecta* amarillo UAE → extracto de *Tagetes erecta* variedad amarilla obtenido mediante UAE.

*T. erecta* naranja UAE → extracto de *Tagetes erecta* variedad naranja obtenido mediante UAE.

*V. x wittrockiana* → extracto de *Viola x wittrockiana* obtenido mediante Soxhlet.

*A. cepa* → extracto de *Allium cepa* obtenido mediante Soxhlet.

*B. incana* → extracto de *Brassica incana* obtenido mediante maceración y ultrasonidos.

Las plantas, en particular las flores comestibles, son fuente de compuestos fenólicos y otros fitoquímicos, presentando gran diversidad de bioactividades, las cuales les confieren capacidad de ejercer beneficios saludables, siendo interesantes en la prevención de patologías relacionadas con la obesidad, DM2 y favoreciendo un envejecimiento saludable.

A continuación, se expone de manera breve un resumen de los ensayos realizados y resultados obtenidos con los distintos extractos de flores comestibles. Adicionalmente, presentamos una tabla resumen de los resultados *in vitro* al final del apartado (Tabla 12).

## 1. Perfil fitoquímico

El contenido fenólico de *Tagetes erecta* varió en función del método de extracción empleado para la obtención de los extractos y de la variedad floral (amarillo y naranja) (Artículos 4 y 5). Los ácidos fenólicos mayoritarios en los 4 extractos fueron los ácidos **elágico**, **gálico** y **vanílico**, y los flavonoides mayoritarios **quercetina** e **isorhamnetina**. Otros compuestos fenólicos detectados en menores proporciones fueron kampferol, ácido clorogénico, hiperósido y derivados de quercetina. Respecto a los compuestos carotenoides y tocoferoles (Artículo 2), hay una tendencia hacia un mayor contenido de estos compuestos en los extractos obtenidos por Soxhlet, mayoritariamente  **$\alpha$**  y  **$\gamma$ -tocoferoles**. Destacando la presencia de  **$\beta$ -caroteno** en mayor concentración en los extractos naranjas, mientras que **luteína** estuvo presente en todos los extractos en cantidades similares.

*Allium cepa* mostró un contenido fenólico total de 4,5 mg/g de extracto, siendo el compuesto mayoritario **kaempferol-3-O-glucósido** (1,12  $\pm$  0,01 mg/g de extracto) seguido por **isorhamnetina-3-O-glucósido** (0,93  $\pm$  0,01 mg/g de extracto) (Artículo 2).

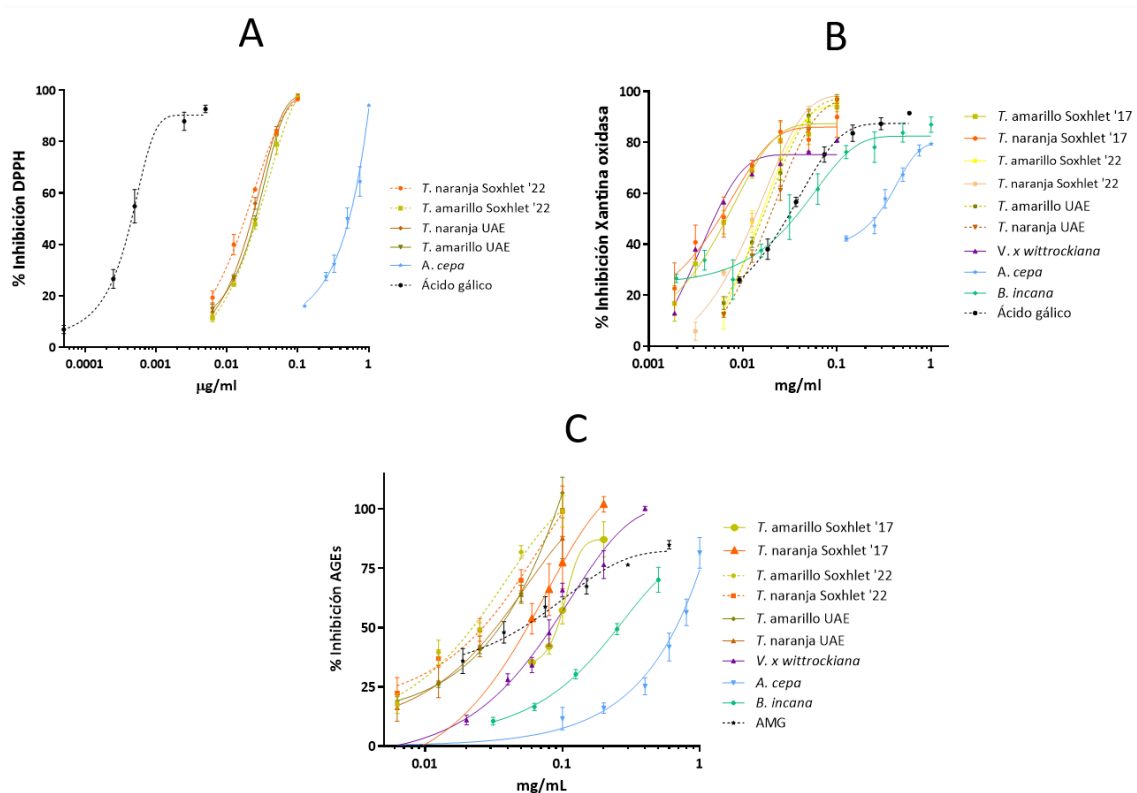
El perfil fitoquímico de *Brassica incana* fue estudiado a través de sus compuestos volátiles, de los cuales un 4,43% fueron terpenos. Detectando en mayor concentración el **limoneno** (2,2%),  **$\alpha$ -isoforona** (0,46%) y **eucaliptol** (0,41%) (Artículo 1). Además, sus principales polifenoles fueron flavonoides heterósidos de **quercetina**, **kaempferol** e **isorhamnetina**.

## 2. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue realizada comparando los diversos métodos de extracción de *T. erecta*, los extractos de *V. x wittrockiana*, *A. cepa* y *B. incana* también fueron testados.

### 2.1 Ensayos *in vitro*

Las diferentes capacidades antioxidantes de los extractos de flores se pueden observar en la Figura 28. En la tabla 9 se recogen las IC<sub>50</sub> obtenidas de diferentes extractos para los dos ensayos de actividad antioxidante realizados, así como su capacidad anti-glicante. Como puede observarse, hay una tendencia por parte de todos los extractos a mostrar una menor IC<sub>50</sub> en el ensayo de la xantina oxidasa que en el de DPPH.



**Figura 28.** Inhibición de radicales libres mediante dos métodos: (A) DPPH y (B) xantina oxidasa. Ácido gálico sustancia control. (C) Inhibición no enzimática de la formación de AGEs. Resultados expresados como media  $\pm$  SEM. Se realizaron tres replicados independientes. AMG: aminoguanidina, sustancia control.

De los extractos de *Tagetes*, el que mayor potencial antioxidante mostró fue la variedad naranja extraída por Soxhlet; mientras que, atendiendo a todas las flores comestibles, la que más actividad antioxidante demostró fue *V. x wittrockiana*. El extracto de *A. cepa* fue el que menos actividad presentó a pesar de haberse reportado previamente propiedades antioxidantes.

La capacidad anti-glicante de los extractos cual fue testada mediante un ensayo no enzimático *in vitro* (Figura 28C). Todos los extractos de flores comestibles salvo **A. cepa** y **B. incana** obtuvieron valores inferiores a la sustancia de referencia AMG. Los extractos que mejor respuesta mostraron en este ensayo fueron los de flores amarillas y naranjas de **T. erecta** obtenidos por Soxhlet ('22).

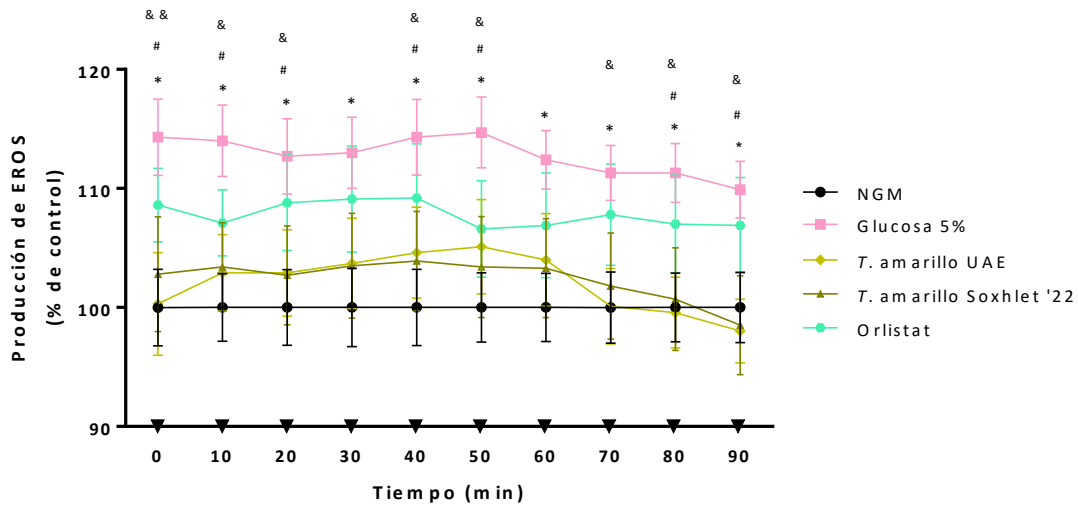
**Tabla 9.** Potencia antioxidante y anti-glicante de los extractos de *T. erecta*, *V. x wittrockiana*, *A. cepa* y *B. incana*. Ácido gálico y aminoguanidina como controles positivos.

Extractos	DPPH (µg/mL)	Xantina Oxidasa (µg/mL)	AGEs (µg/mL)
<i>T. erecta</i> amarillo Soxhlet '17	-	9,12 ± 1,5	77,82 ± 6,86
<i>T. erecta</i> amarillo Soxhlet '22	26,49 ± 1,2	19,9 ± 1,9	25,29 ± 3,25
<i>T. erecta</i> amarillo UAE	25,34 ± 1,4	18,3 ± 1,7	36,71 ± 2,44
<i>T. erecta</i> naranja Soxhlet '17	-	7,23 ± 1,7	47,19 ± 17,71
<i>T. erecta</i> naranja Soxhlet '22	17,96 ± 0,9	15,1 ± 0,5	29,75 ± 4,91
<i>T. erecta</i> naranja UAE	22,64 ± 0,9	21,7 ± 1,8	32,37 ± 3,96
<i>V. x wittrockiana</i>	-	8,25 ± 1,9	73,93 ± 5,12
<i>A. cepa</i>	471 ± 46	229 ± 39	623,66 ± 19,4
<i>B. incana</i>	-	38,41 ± 11	191,61 ± 10,9
Ácido gálico	0,47 ± 0,08	0,036 ± 0,01	-
Aminoguanidina	-	-	78,06 ± 6,59

## 2.2 Ensayos *in vivo*

La capacidad antioxidante está ampliamente relacionada con la prevención de daño causado por los radicales libres. Una de las manifestaciones nocivas que produce el exceso de glucosa en el medio de cultivo en *C. elegans* es el incremento en la producción de radicales libres. Se evaluó el impacto que la presencia del exceso de glucosa produce en el nematodo mediante la **producción de EROS** en *C. elegans*, así como el efecto que

produce el tratamiento con el extracto de *T. erecta* sobre la respuesta al estrés térmico subletal (35°C durante 2 h) en el modelo de gusano obeso (Figura 29).



**Figura 29.** Producción de EROS en *C. elegans* (cepa SS104) tras la exposición durante 7 días a extracto de *T. erecta* amarillo (TA) extraído por Soxhlet (SOX) y UAE. Extractos estudiados a concentración 250 µg/mL. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 70 - 90 gusanos). Se realizaron tres replicados independientes. \* $p < 0,05$  Glucosa vs NGM; # $p < 0,05$  Glucosa vs Soxhlet; & $p < 0,05$ , && $p < 0,001$  Glucosa vs UAE.

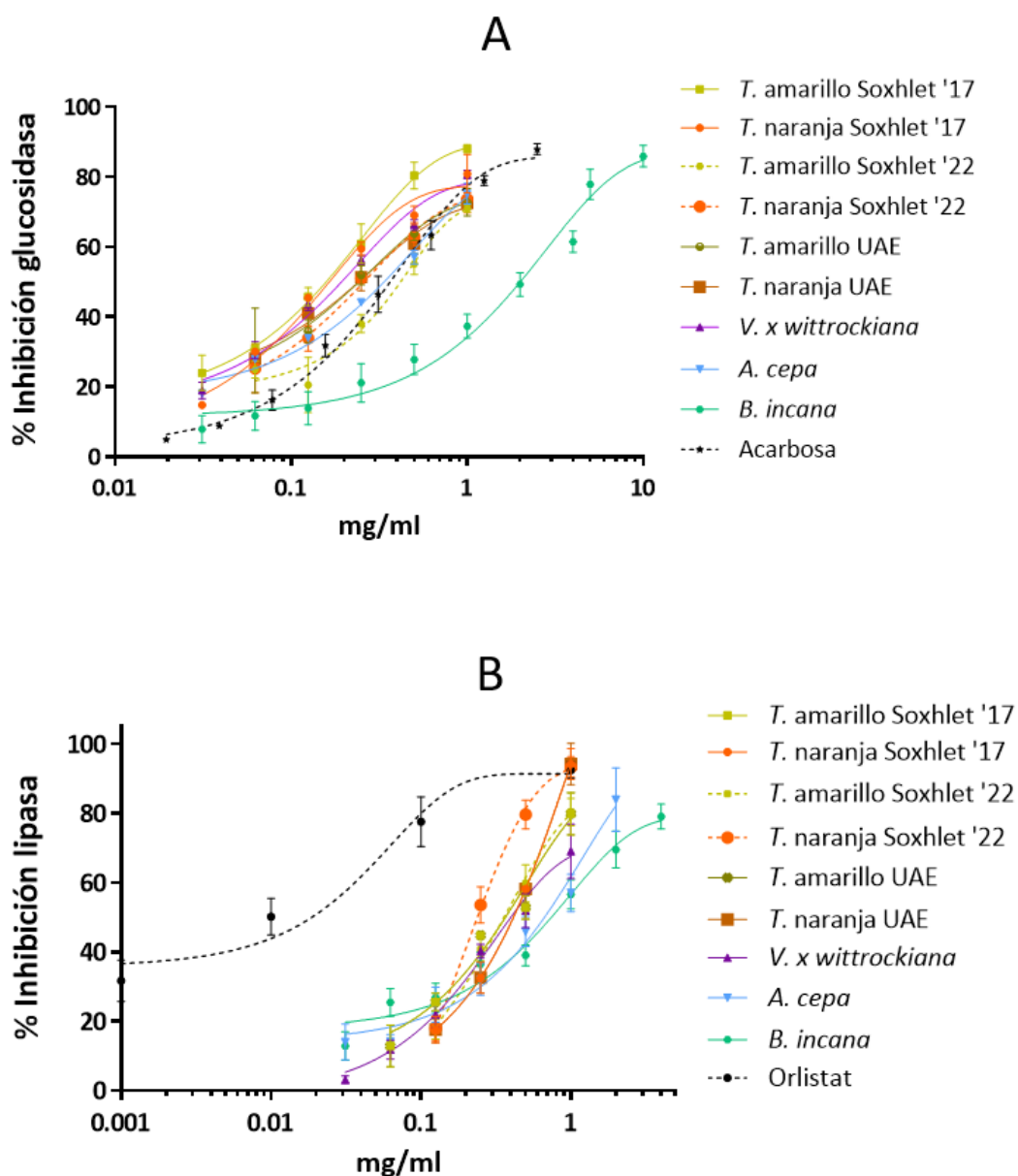
Como puede observarse, los gusanos expuestos a un exceso de glucosa en el medio produjeron mayor cantidad de EROS tras ser sometidos a estrés térmico subletal que aquellos gusanos no obesos. La exposición de los gusanos a los extractos de *T. erecta*, independientemente del método de extracción, redujeron significativamente la producción de EROS hasta niveles similares a los gusanos no obesos. No hubo diferencias significativas entre los dos métodos de extracción. El tratamiento con la sustancia de referencia **orlistat** no produjo un descenso significativo en la producción de EROS en los gusanos.

### 3. Actividad antidiabética y anti-obesidad

La capacidad antidiabética y anti-obesidad de los extractos florales se evaluó inicialmente a través de ensayos *in vitro* y más adelante mediante un modelo *in vivo*.

#### 3.1 Ensayos *in vitro*

Los extractos de flores comestibles mostraron actividad inhibitoria sobre las enzimas digestivas  $\alpha$ -glucosidasa (**Figura 30A**) y lipasa pancreática (**Figura 30B**). En la **tabla 8** encontramos las IC<sub>50</sub> calculadas por regresión no lineal de los ensayos enzimáticos relacionados con la diabetes.



**Figura 30.** Inhibición de enzimas relacionadas con la obesidad y DM2:  $\alpha$ -glucosidasa (A) y lipasa (B). Resultados expresados como media  $\pm$  SEM. Se realizaron tres replicados independientes. Acarbosa y orlistat como controles positivos.

En el ensayo de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa los extractos de *T. erecta* (salvo Soxhlet '22), junto con el de *V. x wittrockiana*, obtuvieron IC<sub>50</sub> inferiores al compuesto de referencia **acarbosea**. Siendo también los dos extractos que lograron los mejores resultados en la inhibición de la lipasa pancreática. Mientras tanto, el extracto de *A. cepa* mostró actividades intermedias en ambas enzimas, y el extracto de *Brassica*, no mostro actividad significativa en ninguna de ellas (Tabla 10).

**Tabla 10.** Capacidad anti-diabesidad de los extractos de flores comestibles.

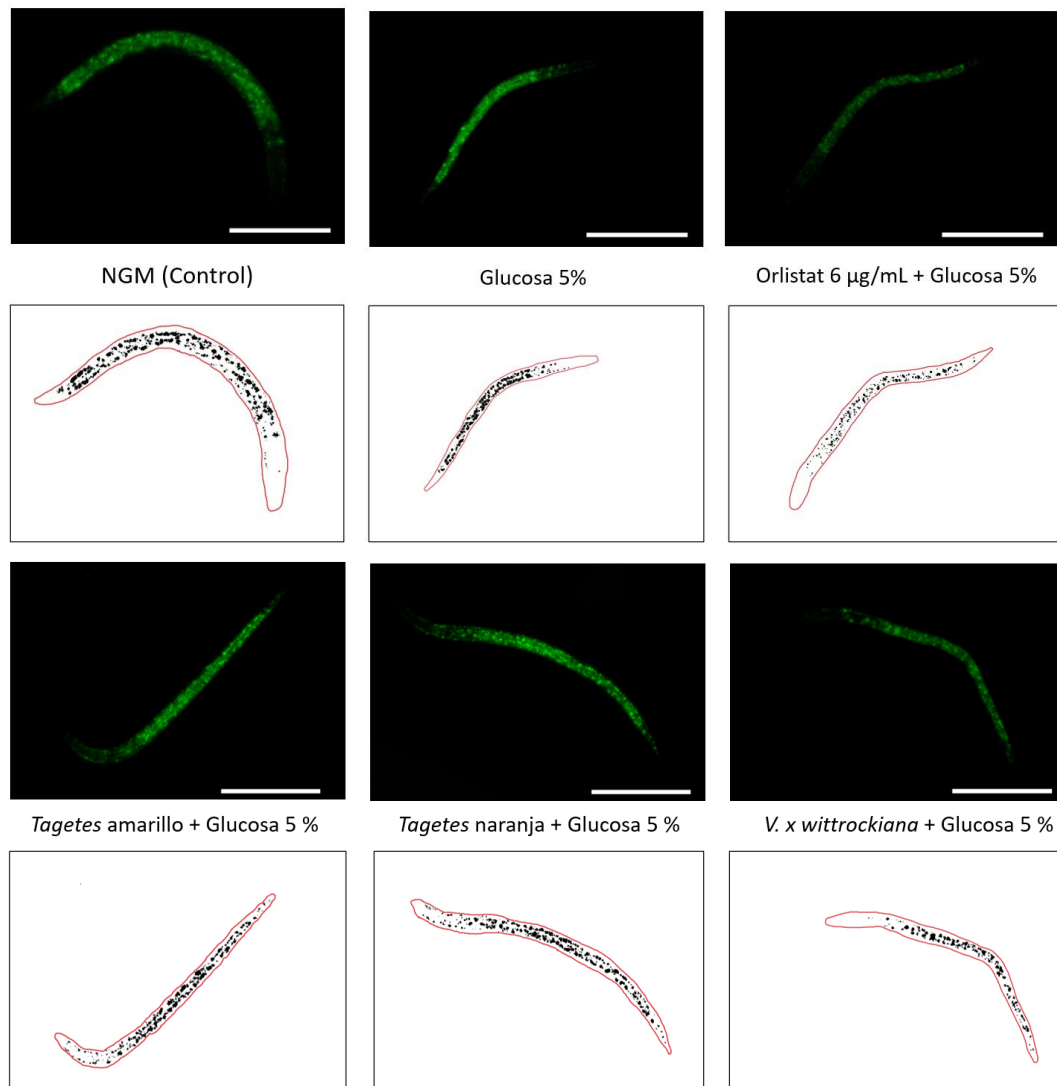
Extracto	$\alpha$ -glucosidasa ( $\mu\text{g/mL}$ )	Lipasa ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>T. erecta</i> amarillo Soxhlet '17	201,83 $\pm$ 38,89	479,46 $\pm$ 59,05
<i>T. erecta</i> amarillo Soxhlet '22	391,68 $\pm$ 34,62	397,06 $\pm$ 30,07
<i>T. erecta</i> amarillo UAE	292,23 $\pm$ 34,34	334,06 $\pm$ 39,54
<i>T. erecta</i> naranja Soxhlet '17	275,86 $\pm$ 11,89	473,75 $\pm$ 59,96
<i>T. erecta</i> naranja Soxhlet '22	342,54 $\pm$ 56,62	319,13 $\pm$ 51,69
<i>T. erecta</i> naranja UAE	288,74 $\pm$ 19,48	373,56 $\pm$ 40,81
<i>V. x wittrockiana</i>	288,73 $\pm$ 16,06	477,90 $\pm$ 83,85
<i>A. cepa</i>	412,1 $\pm$ 0,4	677,1 $\pm$ 68,4
<i>B. incana</i>	1921 $\pm$ 321	939 $\pm$ 131
Control	296,34 $\pm$ 56,46 <sup>a</sup>	27,68 $\pm$ 15,31 <sup>b</sup>

Control positivo: a: Acarbosea; b: Orlistat.

## 3.2 Ensayos *in vivo*: modelo obeso de *C. elegans*

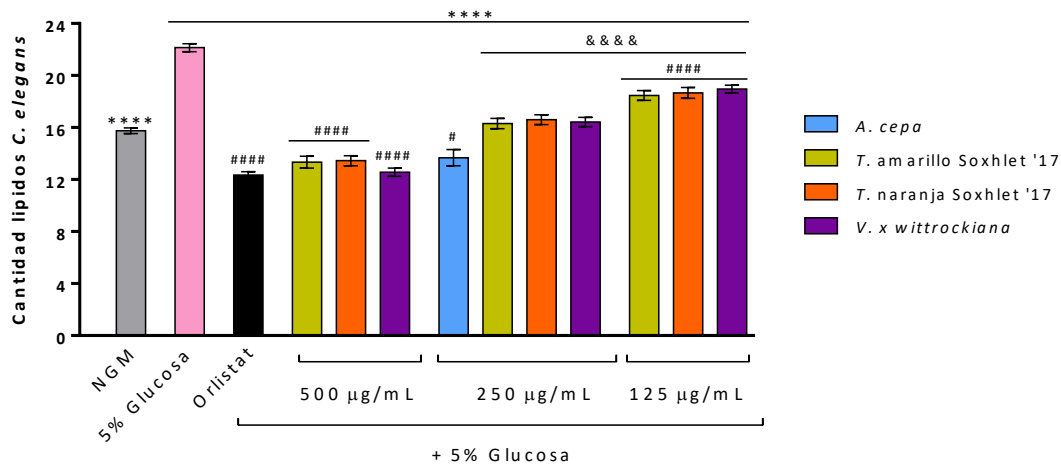
### 3.2.1 Cuantificación de lípidos

El efecto de los extractos de flores comestibles de *T. erecta*, *V. x wittrockiana* y *A. cepa* fueron testados en la cepa wild type (cepa N2) del modelo obeso del nemátodo *C. elegans* (Figura 31).



**Figura 31.** Imágenes de fluorescencia y perfil de gotas lipídicas de *C. elegans* (cepa N2). Imágenes tomadas tras exposición a las diferentes condiciones, tinción con Nile Red y exposición a luz ultravioleta. Sólo se muestran imágenes de los extractos a la concentración 500 µg/mL. Barra de escala = 120 µm.

La cuantificación del contenido lipídico se realizó mediante la medida de la intensidad de fluorescencia emitida por área del gusano tras la exposición durante 48h a los extractos de *T. erecta* y *V. x wittrockiana* a las concentraciones de 125, 250 y 500 µg/mL (Figura 32). El extracto de *A. cepa* fue testado únicamente a la concentración 250 µg/mL.



**Figura 32.** Cuantificación del contenido lipídico en *C. elegans* (cepa N2) obeso tras la exposición a diversos extractos de flores comestibles. Control de referencia orlistat. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 80 - 100$  gusanos). Se realizaron tres replicados independientes. \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs Glucosa; # $p < 0,05$ , #### $p < 0,0005$ , ##### $p < 0,0001$  vs NGM; &&&& $p < 0,0001$  vs Orlistat.

**Tabla 11.** Reducción del contenido lipídico expresado en porcentaje (%) obtenido por los distintos extractos de flores comestibles sobre *C. elegans* (cepa N2). Control de referencia orlistat.

Tratamiento		Reducción del contenido lipídico
Orlistat 6 µg/mL		100 % *
<i>T. erecta</i> amarillo Soxhlet '17	500 µg/mL	88,65 %
	250 µg/mL	54,28 %
	125 µg/mL	29,33 %
<i>T. erecta</i> naranja Soxhlet '17	500 µg/mL	87,27 %
	250 µg/mL	50,77 %
	125 µg/mL	26,97 %
<i>V. wittrockiana</i>	500 µg/mL	97,48 %
	250 µg/mL	52,87 %
	125 µg/mL	23,64 %
<i>A. cepa</i>	250 µg/mL	84,61 %

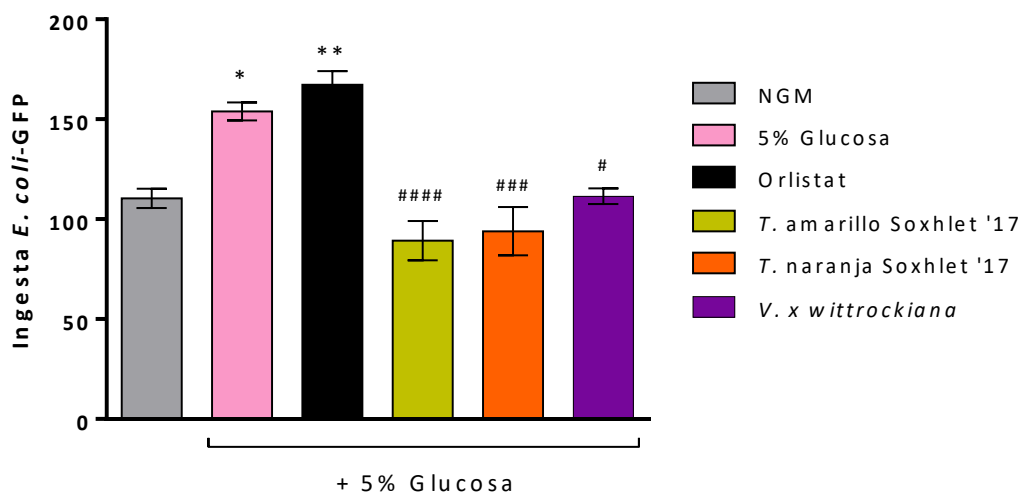
\* Reducción de sustancia de referencia orlistat tomada como 100%.

El efecto reductor sobre los depósitos de grasa de *C. elegans* de los extractos de flores fue dependiente de la dosis administrada. Como se muestra en la tabla 11, ambos extractos de *T. erecta*, amarillo y naranja, así como el extracto de *V. x wittrockiana* a la

máxima concentración, 500 µg/mL, lograron reducir los niveles de grasa sin diferencias significativas con la sustancia anti-obesidad de referencia **orlistat**, mientras que el extracto de **A. cepa** lo logró en la única concentración testada de 250 µg/mL. El resto de los extractos a la concentración de 250 µg/mL lograron reducir entre un 50 y 54% los niveles de grasa en los gusanos obesos, obteniendo niveles similares al grupo control (**NGM**); y por último la concentración más baja ensayada, 125 µg/mL, produjo una reducción significativa del contenido lipídico en los tres extractos testados ( $p < 0,0001$ ).

### 3.2.2 Efecto sobre la ingesta

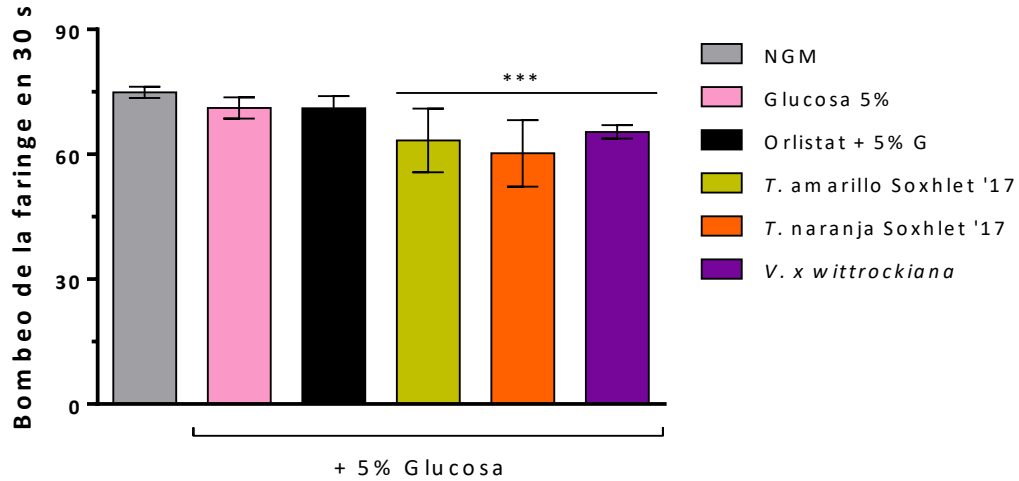
Para evaluar un posible mecanismo de acción del efecto anti-obesidad de los extractos de flores comestibles de **T. erecta** y **V. x wittrockiana**, se realizó un ensayo de cuantificación de la ingesta. Para realizar este ensayo se alimentaron los gusanos con la bacteria recombinante *Escherichia coli*, la cual expresa la proteína verde fluorescente (GFP), y tras 48 horas se cuantificó la intensidad de fluorescencia en los gusanos (Figura 33). La exposición a un exceso de glucosa en el medio incrementó significativamente la ingesta en *C. elegans*, incremento que no fue disminuido mediante el tratamiento con la sustancia referencia **orlistat**. Sin embargo, los tres extractos de flores comestibles lograron reducir significativamente esa ingesta hasta niveles similares a los observados en el gusano no obeso; siendo el extracto de **T. erecta amarillo** el más potente.



**Figura 33.** Fluorescencia de *C. elegans* (cepa N2) tras exposición a las diferentes condiciones y ser alimentados por *E. coli*-GFP durante 48 horas. Extractos expuestos a concentración 500 µg/mL. Control de referencia orlistat. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 30 - 40 gusanos). Se realizaron tres replicados independientes. \* $p < 0,05$ , \*\* $0,001 < p < 0,005$  vs NGM; # $p < 0,05$ , ### $p < 0,0005$ , #### $p < 0,0001$  vs Glucosa.

Para reforzar los hallazgos sobre el mecanismo de acción, se realizó una cuantificación del bombeo de faringe de *C. elegans*. En la figura 34 se muestra el efecto de los extractos

de flores comestibles sobre la capacidad contráctil de la faringe de *C. elegans* tras exposición a los extractos durante 48 h. Como puede verse la exposición de los nemátodos obesos a los extractos de flores de *T. erecta* y *V. wittrockiana* redujeron de manera significativa la frecuencia de bombeo de su faringe. Sin embargo, este efecto no se observó con la exposición de los gusanos al fármaco **orlistat**.



**Figura 34.** Número de bombeos promedio de la faringe de *C. elegans* (cepa N2) durante 30 segundos. Extractos de flores expuestos a concentración 500 µg/mL durante 48 h. Los resultados se expresan como media + SEM (n = 50 - 70 gusanos). Control de referencia orlistat. Se realizaron tres replicados independientes. \*\*\* $p < 0,001$  vs NGM.

## 4. Actividad antihipertensiva

### 4.1 Ensayos *ex vivo*: miografía

El efecto antihipertensivo fue testado *ex vivo* mediante estudios de miografía en músculo liso de aorta de rata en un baño de órganos. Para estos ensayos se emplearon los extractos de *T. erecta* obtenidos mediante UAE, ya que su contenido en polifenoles fue superior a los obtenidos mediante el método Soxhlet.

#### 4.1.1 Efecto vasorrelajante frente a agentes contráctiles

Para estudiar el papel antihipertensivo se evaluó primero si los extractos presentaban **actividad relajante**. Para ello los extractos de *T. erecta* fueron testados sobre anillos aórticos con endotelio intacto, previamente pre-contraídos con dos agentes contráctiles, la fenilefrina (PE) y el KCl.

El menor efecto relajante encontrado en los anillos pre-contraídos con KCl comparado con la PE podría indicar que la actividad vasorrelajante podría estar relacionada con la **apertura de canales de potasio**.

#### 4.1.2 Implicación del endotelio en la vasorrelajación

Se estudió el papel que juega el **tejido endotelial** en la relajación producida por los extractos de *T. erecta*. Para ello se evaluó la capacidad de los extractos para producir relajación en anillos de aorta sin endotelio eliminado de manera física y química.

La incubación de los anillos con endotelio intacto con **L-NAME** (un inhibidor no selectivo de la óxido nítrico sintasa) y **ODQ** (inhibidor de la guanilil ciclasa) redujeron significativamente la respuesta de los extractos de *T. erecta* a bajas concentraciones (0,1 – 0,5 mg/mL), sin embargo, no tuvieron efecto sobre las dosis elevadas. Este mismo efecto fue observado en los anillos sin endotelio.

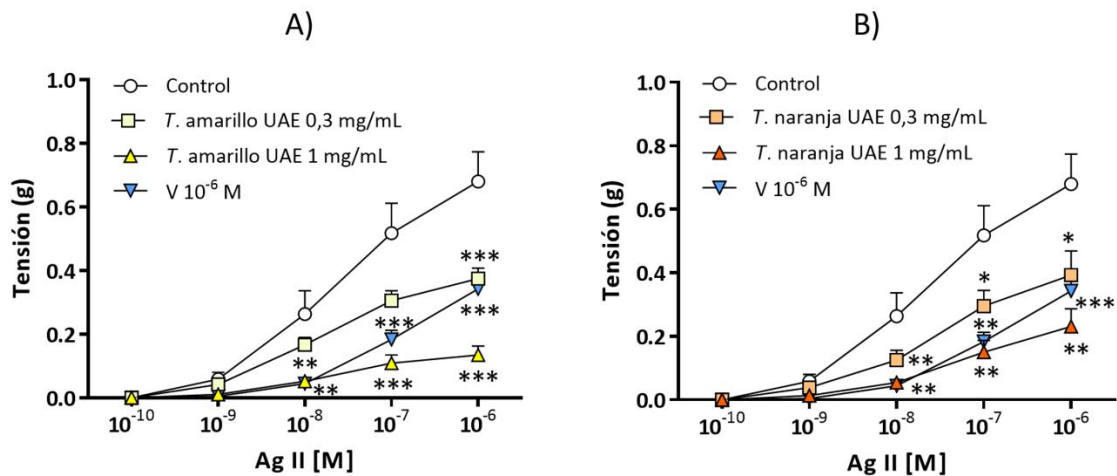
En conjunto, los resultados sugieren que el efecto vasorrelajante de *T. erecta* parece depender, aunque no exclusivamente, a través de la vía **NO/cGMP**.

#### 4.1.3 Efecto de los extractos sobre la contracción generada por Ag II

La angiotensina II (Ag II) es una de las moléculas involucradas en la vasoconstricción más importantes, y es por ello por lo que la inhibición de su síntesis o bloqueo de sus receptores suponen uno de los pilares del tratamiento farmacológico antihipertensivo.

Como muestra la figura 35, la incubación previa de los anillos aórticos intactos con los extractos de *Tagetes* bloquearon la capacidad contráctil de la Ag II de manera dosis dependiente. Siendo el efecto del extracto a 0,3 mg/mL similar al efecto producido por

el verapamilo (antagonista canales de calcio voltaje dependiente), y la dosis de 1 mg/mL más potente que el efecto producido por este fármaco hipotensor.



**Figura 35.** Efecto de los extractos de *T. erecta* amarillo (A) y naranja (B) sobre la tensión producida por diferentes concentraciones de angiotensina II (Ag-II,  $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  M) en anillos de aorta intactos. Verapamilo (V) como sustancia control. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6-8). \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  vs. control (disolvente solo).

#### 4.1.4 Papel del $\text{Ca}^{2+}$ en el efecto relajante

Para comprender el papel del calcio en el efecto vasorrelajante producido por los extractos de *T. erecta* se evaluó tanto el efecto del calcio extracelular como intracelular.

Los anillos de aorta se incubaron en un medio libre de calcio. El estudio del calcio extracelular se llevó a cabo mediante una curva creciente de  $\text{CaCl}_2$  en anillos pre-incubados previamente con diferentes concentraciones de extracto. Mientras que el papel del calcio intracelular se realizó por el estudio de la capacidad contráctil de los anillos a la fenilefrina.

Los resultados obtenidos podrían indicar que los extractos **bloquean la entrada de calcio** desde el medio extracelular y que podría estar implicada la vía de señalización  $\text{IP}_3$  en la respuesta vasorrelajante al **impedir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$**  desde el retículo sarcoplasmático.

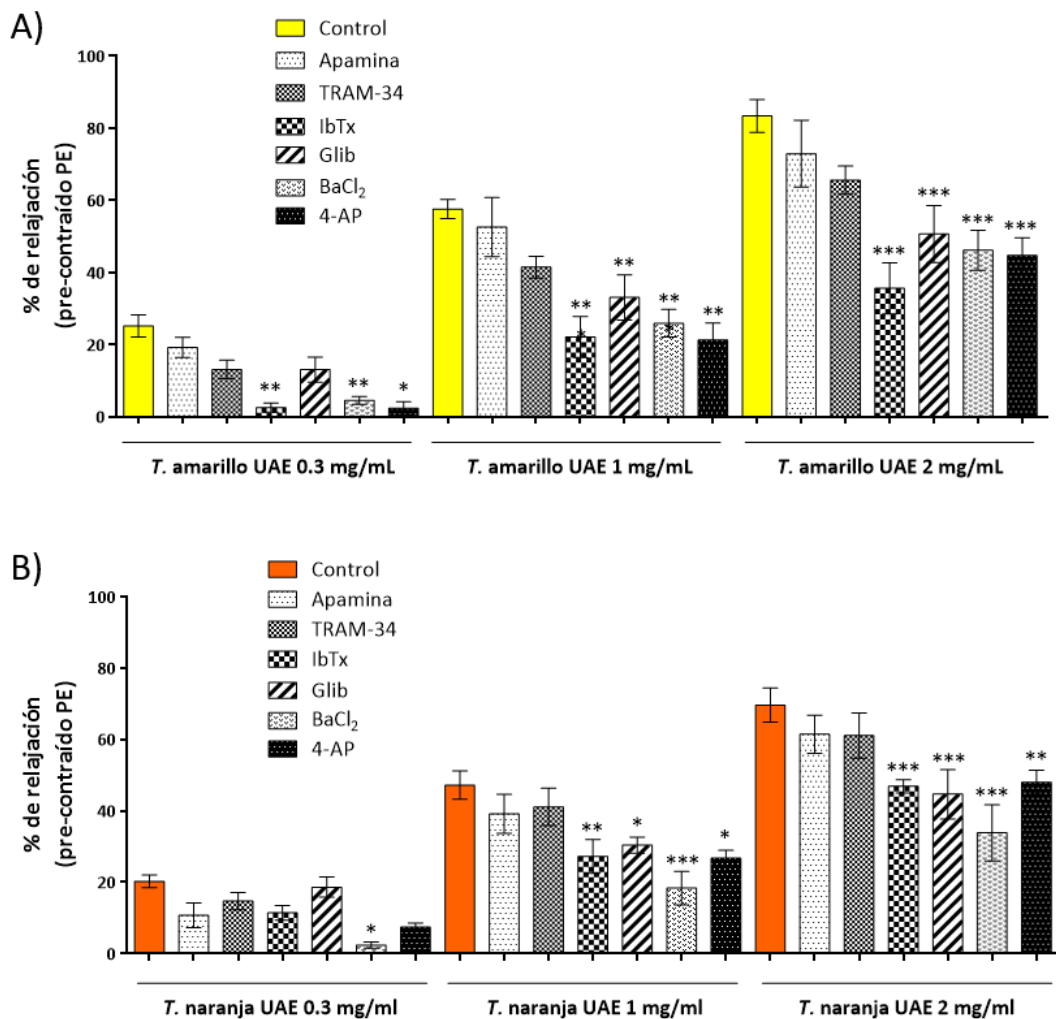
#### 4.1.5 Implicación de los canales de $\text{K}^+$ en la vasorrelajación

Se estudiaron diferentes agentes bloqueadores de canales de potasio para evaluar el papel de estos canales en la respuesta relajante de los extractos de *T. erecta*. Se emplearon agentes como apamina, TRAM-34 e iberotoxina, inhibidores selectivos de canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  de pequeña ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ), media ( $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ) y elevada conductancia ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) respectivamente; glibenclamida un inhibidor de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de

ATP ( $K_{ATP}$ ), cloruro de bario un inhibidor del canal de potasio rectificador anómalo ( $K_{IR}$ ), y 4-aminopiridina un inhibidor de canales de  $K^+$  dependientes de voltaje ( $K_V$ ).

Como se observa en la figura 36, la respuesta vasorrelajante de ambos extractos se redujo, pero no significativamente, tras la incubación de los anillos con apamina y TRAM-34 en comparación con el control en las tres dosis ensayadas, 0,3, 1 y 2 mg/mL. Sin embargo, el efecto relajante de los extractos fue inhibido significativamente por la iberotoxina, glibenclamida,  $BaCl_2$  y apamina, de manera dosis dependiente.

Estos resultados sugieren que el efecto vasorrelajante de *T. erecta* está mediado principalmente por los canales de potasio localizados en el músculo liso:  $BK_{Ca}$ ,  $K_{ATP}$ ,  $K_{IR}$  y  $K_V$ , y en menor medida por los canales de potasio endoteliales  $SK_{Ca}$  and  $IK_{Ca}$ .



**Figura 36.** Efecto de la pre-incubación con apamina (AP,  $10^{-6}$  M), TRAM-34 ( $10^{-6}$  M), IbTX ( $3 \cdot 10^{-8}$  M), Glibenclamida (Glib,  $10^{-5}$  M),  $BaCl_2$  ( $3 \cdot 10^{-5}$  M) y 4-aminopiridina (4-AP,  $10^{-1}$  M) de anillos intactos de aorta pre-contraídos con PE  $10^{-6}$  M, sobre la respuesta vasorrelajante de los extractos de *T. erecta* A) amarillo y B) naranja (0,3, 1 y 2 mg/mL). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6 - 8). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. control (extracto solo).

## 5. Actividad antienvjecimiento

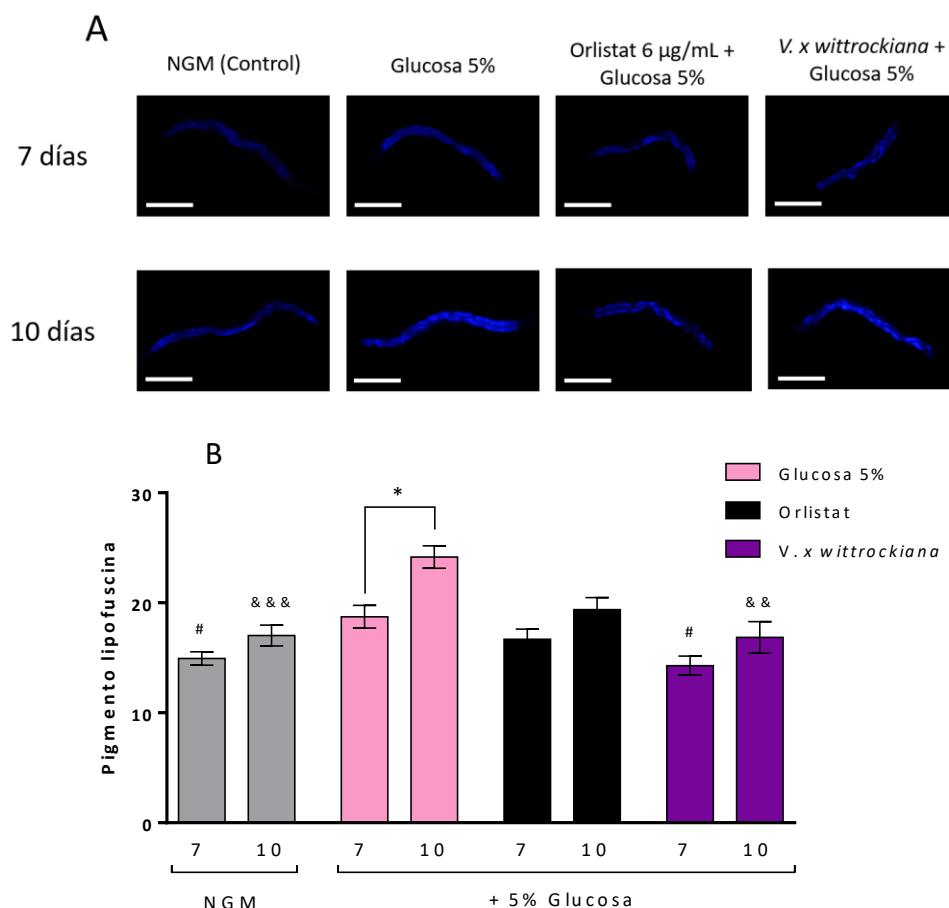
### 5.1 Ensayos *in vivo*:

#### 5.1.1 Cuantificación de lipofuscina

El pigmento fluorescente lipofuscina se acumula en las células de los organismos a lo largo de su vida, por lo que puede emplearse como un biomarcador del envejecimiento.

Como se ha ido observando en esta tesis, el exceso de glucosa produce efectos nocivos sobre el gusano *C. elegans* que se manifiestan de diversas formas, una de ellas es la acumulación del pigmento lipofuscina. Como se observa en la figura 37, en el modelo de gusano obeso se observó como la incubación solo con glucosa produjo la mayor acumulación de lipofuscina, así como el mayor aumento en su acúmulo entre los días 7 y 10. Mientras que el tratamiento de los gusanos del modelo obeso con extracto de *V. x wittrockiana* redujo la acumulación del pigmento fluorescente a niveles similares a los observados en gusanos no obesos (NGM). La sustancia de referencia **orlistat** no fue capaz de revertir el efecto de la glucosa a la situación control a pesar de reducir la acumulación de lipofuscina.

Estos datos sugieren que los gusanos obesos tratados con el extracto de la flor tendrán un envejecimiento más saludable que los gusanos no tratados, asemejándose al comportamiento al de los *C. elegans* no obesos.



**Figura 37.** Imágenes del pigmento fluorescente lipofuscina (A) y su cuantificación en *C. elegans* (cepa SS104) tras la exposición a diferentes condiciones a los días 7 y 10 de vida (B). Extractos de *V. x wittrockiana* expuesto a concentración 500 µg/mL. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 30 - 40 gusanos). Se realizaron tres replicados independientes. \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$  vs Glucosa 7; && $p < 0,01$ , &&& $p < 0,005$  vs Glucosa 10.

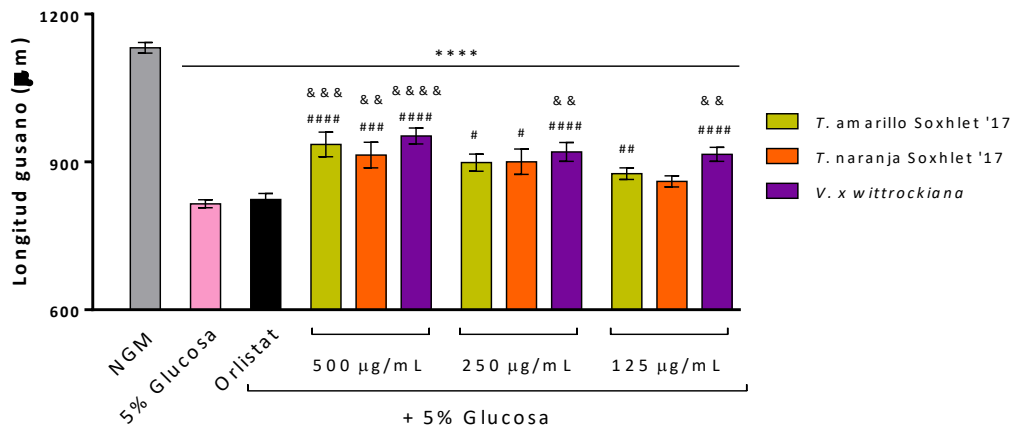
### 5.1.2 Efecto sobre el ciclo de vida y crecimiento del gusano

Otra manifestación de la toxicidad mostrada en el nematodo *C. elegans* por la exposición a elevadas concentraciones de glucosa de manera crónica, es el detenimiento en su crecimiento y la alteración en su capacidad reproductiva.

Como puede observarse en la figura 38, los nematodos expuestos a elevadas concentraciones de glucosa en el medio retrasan su crecimiento y alcanzan tallas menores. La exposición a los distintos extractos de flores comestibles redujo drásticamente los efectos negativos producidos por la presencia de glucosa en el medio de manera dosis dependiente. La concentración más elevada de los extractos de ***T. erecta* amarillo, naranja y *V. x wittrockiana*** ensayados lograron aumentar el tamaño de los gusanos en un 14,77%, 12,13% y 16,85% respectivamente.

Además, la exposición del gusano obeso a 500 µg/mL de extracto de ***Viola*** incrementó

el número de larvas depositadas y su viabilidad, al incrementar de forma significativa el porcentaje de eclosión de 39,36 a 77,17%.



**Figura 38.** Longitud *C. elegans* (cepa N2) en µm tras la exposición a diferentes condiciones durante 48h. Resultados expresados como media ± SEM. (n = 80 - 100 gusanos). Tres replicados independientes fueron realizados. \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs NGM; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,001$ , ### $p < 0,0005$ , #### $p < 0,0001$  vs Glucosa; && $p < 0,001$ , &&& $p < 0,0005$ ; &&&& $p < 0,0001$  vs Orlistat.

**Tabla 12.** Resumen de resultados de los ensayos *in vitro*.

Extracto	$\alpha$ -glucosidasa ( $\mu\text{g/mL}$ )	Lipasa ( $\mu\text{g/mL}$ )	AGEs ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPPH ( $\mu\text{g/mL}$ )	Xantina Oxidasa ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>T. erecta</i> amarillo Soxhlet '17	201,83 $\pm$ 38,89	479,46 $\pm$ 59,05	77,82 $\pm$ 6,86	-	9,12 $\pm$ 1,5
<i>T. erecta</i> amarillo Soxhlet '22	391,68 $\pm$ 34,62	397,06 $\pm$ 30,07	25,29 $\pm$ 3,25	26,49 $\pm$ 1,2	19,9 $\pm$ 1,9
<i>T. erecta</i> amarillo UAE	292,23 $\pm$ 34,34	334,06 $\pm$ 39,54	36,71 $\pm$ 2,44	25,34 $\pm$ 1,4	18,3 $\pm$ 1,7
<i>T. erecta</i> naranja Soxhlet '17	275,86 $\pm$ 11,89	473,75 $\pm$ 59,96	47,19 $\pm$ 17,71	-	7,23 $\pm$ 1,7
<i>T. erecta</i> naranja Soxhlet '22	342,54 $\pm$ 56,62	319,13 $\pm$ 51,69	29,75 $\pm$ 4,91	17,96 $\pm$ 0,9	15,1 $\pm$ 0,5
<i>T. erecta</i> naranja UAE	288,74 $\pm$ 19,48	373,56 $\pm$ 40,81	32,37 $\pm$ 3,96	22,64 $\pm$ 0,9	21,7 $\pm$ 1,8
<i>V. x wittrockiana</i>	288,73 $\pm$ 16,06	477,90 $\pm$ 83,85	73,93 $\pm$ 5,12	-	8,25 $\pm$ 1,9
<i>A. cepa</i>	412,1 $\pm$ 0,4	677,1 $\pm$ 68,4	623,66 $\pm$ 19,4	471 $\pm$ 46	229 $\pm$ 39
<i>B. incana</i>	1921 $\pm$ 321	939 $\pm$ 131	191,61 $\pm$ 10,9	-	38,41 $\pm$ 11
<b>Controles</b>	296,34 $\pm$ 56,46 <sup>a</sup>	27,68 $\pm$ 15,31 <sup>b</sup>	78,06 $\pm$ 6,59 <sup>c</sup>	0,47 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>	0,036 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>

Sustancias control empleadas: A: acarbosa, b: Orlistat, c: aminoguanidina, d: ácido gálico

# DISCUSIÓN GENERAL



El incremento de la esperanza de vida durante las últimas décadas, sumado con la creciente incidencia de patologías cardiovasculares como la DM2 y obesidad han puesto en entredicho el alcanzar una edad avanzada con una buena calidad de vida. La medicina preventiva se teoriza como la base para evitar el desarrollo de multitud de patologías no transmisibles, siendo la dieta su pilar central.

Las flores comestibles suponen una interesante fuente de fitoquímicos, entre los que podemos destacar los polifenoles, cuyas propiedades bioactivas han demostrado ser muy variadas y útiles.

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han estudiado las composiciones fitoquímicas y propiedades bioactivas *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* de extractos de las flores comestibles ***Tagetes erecta* L.**, ***Viola x wittrockiana* Gams**, ***Allium cepa* L.** y ***Brassica incana* Ten.**

El consumo de vegetales ricos en polifenoles ha demostrado ser efectivo en la prevención y mejora de condiciones tan diversas como diabetes, cáncer, osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas o enfermedades cardiovasculares <sup>1</sup>. Las flores son una fuente de fitoquímicos diferentes al resto de estructuras de las plantas debido a su coloración y diferencia de funciones. Esta variedad de fitoquímicos no solo confiere a las flores sus atractivos colores y aromas, sino que también las convierte en candidatas prometedoras para aplicaciones en salud y nutrición. Las cuatro especies de flores analizadas mostraron elevado contenido polifenólico y variedad de compuestos.

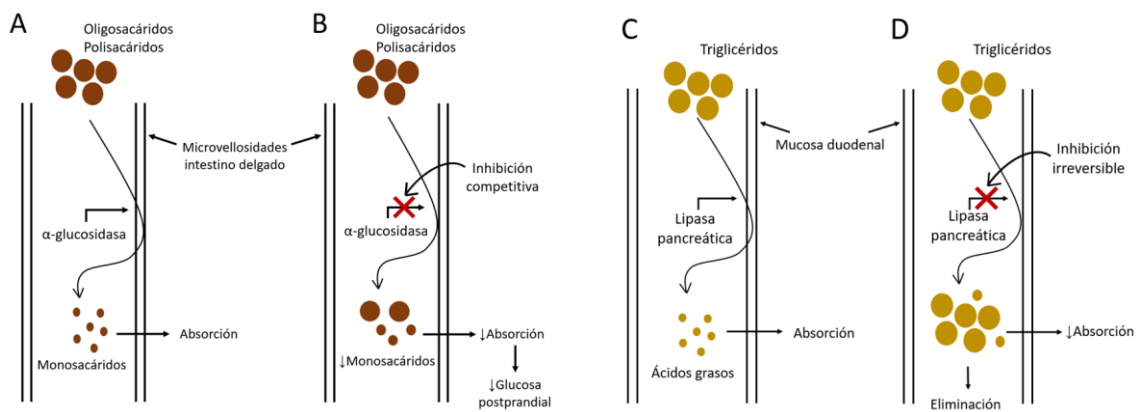
El contenido total de polifenoles en los extractos de ***T. erecta*** fueron 10,51 mg/g extracto amarillo y 8,11 mg/g extracto naranja <sup>2</sup>. Los compuestos detectados en las dos variedades de ***Tagetes*** (amarillo y naranja) fueron los flavonoides quercetina, hiperósido e isoquercetina, y los ácidos fenólicos ácido elágico y ácido vanílico. También destacable la presencia de la antocianina delfinidina-3,5-diglucósido. La detección de estos compuestos va en concordancia con estudios fitoquímicos previos de ***T. erecta*** <sup>3,4</sup>. En lo referente al contenido en carotenoides y tocoferoles, las diferencias entre las dos variedades se deben principalmente a que estos compuestos ejercen su función como pigmento, especialmente el  $\beta$ -caroteno <sup>5</sup>.

En el extracto de ***V. x wittrockiana*** el contenido polifenólico total fueron 69,05 mg/g extracto. Los componentes mayoritarios detectados en el extracto de ***Viola*** fueron quercetina-3-*O*-(6-*O*-rhamnosilglucósido)-7-*O*-rhamnósido, miricetina-3-*O*-(6-*O*-rhamnosilglucósido)-7-*O*-rhamnósido y quercetina-3-*O*-rutinósido <sup>6</sup>. Una antocianina derivada de la petunidina también fue detectada y cuantificada, compuesto relacionado con la pigmentación de la flor. En general, la composición fitoquímica obtenida fue en concentraciones mayores que en estudios previos <sup>7,8</sup>.

Los flavonoides mayoritarios detectados en el extracto de flor de cebolla, ***A. cepa***, fueron glucósidos de kaempferol (kaempferol-*O*-dihexósido y kaempferol-3-*O*-glucósido) y derivados de isorhamnetina como el isoramnetina-3-*O*-glucósido mostrando un contenido fenólico total de 4,50 mg/g de extracto <sup>9</sup>.

En el caso de *B. incana* el contenido total de polifenoles se cuantificó en 27,98 mg equivalentes de ácido gálico/ g extracto, siendo los compuestos mayoritarios flavonoides derivados de quercetina, kaempferol e isorhamnetina. Los compuestos detectados están muy presentes en diferentes especies de *Brassica*<sup>10-12</sup>.

Los niveles elevados de glucosa en sangre mantenidos de manera crónica en el tiempo producen numerosos efectos nocivos y tóxicos sobre el organismo como las complicaciones micro y macrovasculares. El control de estos niveles de glucemia se puede realizar a través de diversos mecanismos de acción, uno de los más sencillos es modulando la absorción de la ingesta. La inhibición de las enzimas digestivas  $\alpha$ -glucosidasa y lipasa, siguen siendo fundamentales en la búsqueda de nuevos tratamientos en el control de patologías como la obesidad y DM2, ya que permiten la modulación de la absorción de glucosa y lípidos<sup>13,14</sup>. Los mecanismos de acción de estas enzimas se muestran en la Figura 45.



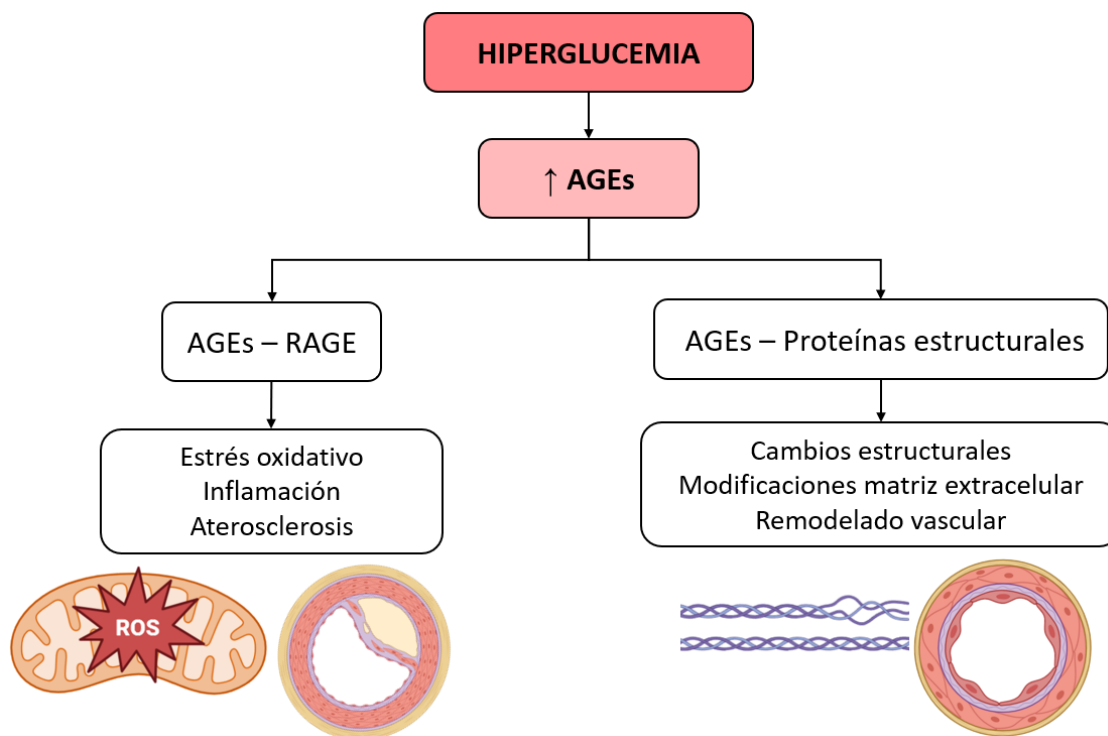
**Figura 39.** Mecanismo de acción de las sustancias inhibitoras de las enzimas digestivas  $\alpha$ -glucosidasa (A y B) y lipasa (C y D). A) Rotura de polisacáridos y oligosacáridos en el intestino delgado en monosacáridos por la enzima, permitiendo su fácil absorción. B) Una sustancia ejerce inhibición competitiva sobre la  $\alpha$ -glucosidasa impidiendo la correcta digestión de los oligosacáridos y polisacáridos, resultado en menor absorción de monosacáridos y en reducción de los niveles de glucosa postprandial. C) Digestión de los triglicéridos en ácidos grasos simples por la lipasa pancreática para su absorción en la mucosa duodenal. D) Inhibición irreversible de la enzima lipasa pancreática que impide la digestión de los triglicéridos y reduce su absorción, resultando en su eliminación por heces. *Adaptado de: Arungarinathan, McKay & Fisher (2011); Chan et al (2021).*

Las intervenciones nutricionales son la clave para el éxito en el tratamiento y prevención de DM2 y obesidad, ya que una pérdida moderada de peso ha demostrado mejorar la presión arterial, niveles glucémicos, resistencia a la insulina y la dislipemia<sup>15</sup>. La ingesta de alimentos ricos en moléculas bioactivas puede enmarcarse en la medicina preventiva como estrategia sanitaria; diversos autores han expresado que la ingesta de productos naturales con elevado contenido polifenólico puede jugar un papel beneficioso en la

prevención y mejora de patologías relacionadas con el estilo de vida como obesidad y diabetes <sup>16-18</sup>, o bien, relacionadas con el envejecimiento <sup>19-21</sup>. La búsqueda de nuevos tratamientos y terapias individualizadas se están basando en el estudio de moléculas de origen vegetal y natural debido a su amplitud de bioactividades <sup>22</sup>. Polifenoles como **hiperósido, quercetina, isoquercetina y rutina**, muy presentes en los diferentes extractos, han demostrado ser buenos inhibidores de la enzima digestiva  $\alpha$ -glucosidasa <sup>23-26</sup>, y otros como el **ácido elágico** han mostrado actividad antidiabética <sup>27</sup>. En este contexto, el potencial antidiabético y anti-obesidad no había sido estudiado previamente en las flores comestibles de ***V. x wittrockiana*, *A. cepa* y *B. incana***; mientras que las flores de ***T. erecta*** habían mostrado capacidad inhibitoria frente la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, pero nunca frente a lipasa pancreática.

Los extractos de ***T. erecta*** mostraron las mejores respuestas en la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, obteniendo valores de IC<sub>50</sub> inferiores a estudios previos; siendo además la primera vez que un extracto de flor de ***T. erecta*** muestra inhibición de la enzima lipasa <sup>28</sup>. Otras especies de ***Viola***, así como compuestos extraídos de las mismas, han mostrado actividad antidiabética, bien inhibiendo  $\alpha$ -glucosidasa <sup>29,30</sup>, o mostrando efecto anti-obesidad <sup>31-33</sup>. Es por ello por lo que los resultados obtenidos por ***V. x wittrockiana*** en los ensayos de inhibición de las enzimas digestivas resultan coherentes con los resultados obtenidos por otros autores. ***Allium cepa***, según manifiesta la EMA <sup>34</sup>, raramente se ha utilizado en la medicina tradicional como antidiabético, pero existen informes previos sobre su capacidad hipoglucémica e hipolipemiante. Extractos de hojas <sup>35</sup>, piel <sup>36</sup> y pulpa <sup>37</sup> han mostrado actividad inhibiendo  $\alpha$ -glucosidasa, siendo esta tesis la primera vez que se testaba el extracto de flor en ambas enzimas, antidiabéticas y anti-obesidad. En cuanto a ***Brassica incana***, fue la primera vez que estas bioactividades fueron reportadas, a pesar de que su potencial inhibitorio no resultó muy elevado en los ensayos antidiabéticos y anti-obesidad *in vitro*.

La reducción de los niveles de glucosa en sangre favorece la prevención en la formación de AGEs <sup>38</sup>, moléculas muy relacionadas con la formación de EROS y el endurecimiento y la pérdida de función de tejidos endoteliales como vasos sanguíneos y miocardio <sup>39</sup> entre otros daños (Figura 46). La inhibición en la formación de AGEs fue estudiada por primera vez en las cuatro flores comestibles, siendo por orden de bioactividad ***T. erecta* naranja, *V. x wittrockiana*, *T. erecta* amarillo, *B. incana* y *A. cepa***. Todos los extractos salvo ***Allium*** y ***Brassica*** obtuvieron un IC<sub>50</sub> inferior a la sustancia de referencia AMG demostrando elevada capacidad antiglicante. Los valores de IC<sub>50</sub> de ***A. cepa*** y ***B. incana*** fueron los más elevados, pero destacables de cualquier modo.



**Figura 40.** Variedad de daños fisiológicos producidos por las AGEs en el organismo. Adaptado de: Chawla & Kumar Tripathi (2019); Lui et al (2022).

La producción de EROS está relacionada con los elevados niveles de AGEs <sup>40</sup>, por ello cabía esperar que las flores *A. cepa* y *B. incana* fueran también las que menos capacidad antioxidante presentasen. El elevado contenido en compuestos bioactivos, principalmente polifenoles, está muy relacionado con la capacidad antioxidante de las flores comestibles. De los extractos testados, *V. x wittrockiana* mostró el mayor potencial antioxidante, seguido por ambos extractos de *Tagetes*. Polifenoles como el **hiperósido** poseen una notable capacidad antiglicante, ayudando a prevenir la formación de AGEs, compuestos implicados en el envejecimiento y diversas patologías crónicas <sup>23,41,42</sup>. Además, tanto el hiperósido como quercetina, ácido vanílico y ácido elágico poseen potentes propiedades antioxidantes, actuando como neutralizadores de EROS y protegiendo a las células del daño oxidativo <sup>27,43,44</sup>. Estos polifenoles presentan asimismo un destacado efecto antiinflamatorio, inhibiendo mediadores proinflamatorios, lo que contribuye a reducir el riesgo de enfermedades asociadas a la inflamación crónica como DM2 y ECV.

El papel de la **glucosa** en el organismo es esencial, ya que es la fuente de energía principal para los músculos y cerebro, por lo que su ingesta y consumo son necesarios en la correcta medida. El **exceso de glucosa** en el organismo es una de las principales causas de las complicaciones asociadas a multitud de patologías (DM2, retinopatía, nefropatía, obesidad) como se ha expresado anteriormente, además de generar **toxicidad** <sup>45</sup>. *Caenorhabditis elegans* es uno de los modelos de investigación *in vivo* más interesantes

y científicamente consolidados, siendo un buen modelo para el estudio de la obesidad, su prevención y su tratamiento <sup>46</sup>. Para poder estudiar los efectos de los extractos de flores comestibles sobre el manejo de la obesidad, se generó un modelo de investigación *in vivo* con el nemátodo *C. elegans* al exponerlo a un 5% de glucosa en el medio. Denominamos a este modelo **gusano obeso** debido a que la exposición a este exceso de glucosa induce numerosas modificaciones en la fisiología del nemátodo. La principal y más visible es el **incremento en la acumulación de lípidos** <sup>46</sup>, así como un **atraso en su desarrollo y crecimiento** <sup>47-49</sup>. También se induce la **formación de EROS**, relacionada con los AGEs <sup>50</sup>, y daños funcionales como la apoptosis y disfunción mitocondrial <sup>47,51</sup>. Como resultado, el exceso de glucosa reduce la esperanza de vida de *C. elegans* <sup>47-50</sup>.

La exposición del gusano obeso a los extractos de flores de *Tagetes* y *Viola* produjo una reducción en el contenido graso de manera dosis-dependiente comparado con el control obeso (sólo glucosa). La concentración más elevada testada, 500 µg/mL, produjo una reducción sin diferencias significativas a la sustancia de referencia **orlistat**. La concentración intermedia, 250 µg/mL, redujo los niveles de grasa en el modelo obeso hasta valores de *C. elegans* no obeso en todos los extractos testados, incluido *A. cepa*. Y, por último, la concentración más baja de los extractos de *Tagetes* y *Viola* disminuyó los niveles de grasa significativamente comparado con el control obeso.

El potencial anti-obesidad de estos extractos puede deberse en parte a su composición rica en **polifenoles**, ya que existen precedentes de compuestos fenólicos con capacidad de reducir los niveles de grasa almacenados en *C. elegans* <sup>52,53</sup>. Algunos de los mecanismos de acción por los que los compuestos fenólicos ejercen estas actividades sobre los niveles de grasa son mediante el incremento de la lipólisis <sup>52</sup>, inhibición de la lipogénesis <sup>54</sup> u otros <sup>55-59</sup>.

La **quercetina**, presente en todos los extractos de flores comestibles, ha mostrado actividad neuro-protectora, e incremento de la esperanza de vida en *C. elegans* <sup>20,60</sup>. Este flavonol ha demostrado protección frente a toxicidad e inflamación producidas por exceso de glucosa <sup>61,62</sup>. Además, la quercetina ejerce actividad antidiabética e hipolipemiente <sup>63,64</sup>. Otros derivados de la quercetina también han logrado reducir los niveles de grasa *in vivo* en modelos de *C. elegans* y ratón <sup>22,58,65</sup>. Además, flavonoides como la **isorhamnetina** son capaces de reducir los niveles de grasa a través de la vía del *nhr-49* incrementando la oxidación de β-ácidos grasos <sup>66</sup>, o inducir la lipólisis en *C. elegans* a través de la vía central de la serotonina (IIS) como la **luteolina** <sup>67</sup>. **Kaempferol**, **miricetina** y sus flavonoides derivados también demostraron reducción de la grasa y capacidad de protección frente al exceso de glucosa para evitar el desarrollo de obesidad <sup>52,55,68-70</sup>.

Un mecanismo de acción diferente por el que polifenoles también han demostrado disminuir los niveles de grasa es mediante la **reducción en la ingesta**, como realiza el diterpeno kahweol <sup>66</sup>. Para testar este mecanismo de acción en los extractos de flores, se estudió su efecto sobre la ingesta de *E. coli* empleando bacterias macadas con GFP fluorescente. *E. coli* es el alimento base de *C. elegans*, y debido a su transparencia es sencillo cuantificar la cantidad de bacterias ingeridas mediante fluorimetría al emplear

una bacteria con GFP. En el modelo obeso, el exceso de glucosa produjo un incremento significativo en la ingesta <sup>48</sup>. Tanto los extractos de *Tagetes* como el de *Viola* redujeron significativamente la ingesta de bacterias hasta niveles similares al gusano no obeso, reducción que el fármaco de referencia **orlistat** no fue capaz de producir, ya que su mecanismo de acción es mediante la inhibición de las enzimas lipasa pancreática <sup>71,72</sup> y colesterol esterasa <sup>73</sup>. Una vía relacionada con el control de la ingesta es la vía de la serotonina <sup>74</sup>, cuya modulación a través del gen *daf-16* puede producir cambios en la alimentación del nemátodo <sup>75,76</sup>. Vinculado con la ingesta encontramos también la **velocidad de bombeo** de la faringe de *C. elegans*. Se ha considerado la faringe de *C. elegans* como un homólogo del corazón de los vertebrados debido a su bombeo constante esencial para la vida del organismo y al circuito encargado de su control <sup>77</sup>. Tanto el corazón como la faringe poseen canales de potasio y calcio dependientes de voltaje. Este órgano se ha considerado como modelo del bombeo cardiaco debido a su contracción rítmica y posibilidad de introducción de mutaciones para generar arritmias <sup>78,79</sup>. Por lo tanto, si la exposición a los extractos de flores comestibles induce alguna modificación en la velocidad de contracción de la faringe, se podría teorizar la capacidad antihipertensiva de estos extractos. La exposición de exceso de glucosa en el modelo obeso no incrementó ni disminuyó significativamente el bombeo de la faringe comparado con el modelo no obeso, al igual que el tratamiento con la sustancia de referencia **orlistat**, la cual no produjo modificaciones en el gusano obeso. Sin embargo, ambos extractos de *Tagetes* y *Viola* produjeron una reducción en la cantidad de bombeos tras la exposición a la concentración de 500 µg/mL, siendo *T. erecta* naranja el que mayor descenso logró. Esta capacidad, además de corroborar la reducción en la ingesta observada, sugiere el poder **antihipertensivo** de los extractos de flores comestibles. Para testar esta capacidad antihipertensiva más extensamente se realizaron ensayos *ex vivo* de miografía con aorta de rata.

El potencial antioxidante y antienvjecimiento de las flores de *Tagetes* había sido estudiado previamente <sup>80-84</sup>. Extractos obtenidos mediante soxhlet demostraron ejercer un efecto protector en *C. elegans* sobre el estrés oxidativo subletal <sup>84</sup>, resultados en concordancia con la reducción en producción de EROS demostrada durante los estudios con los diversos extractos de *T. erecta*.

La capacidad antioxidante de *V. x wittrockiana* y el efecto protector sobre estrés oxidativo subletal habían sido estudiados con anterioridad <sup>6</sup>, pero los efectos beneficiosos sobre la salud y antienvjecimiento del extracto de flores de *Viola* fueron demostrados por primera vez *in vivo* durante el curso de esta tesis doctoral. El tratamiento de *C. elegans* obeso con el extracto de *V. x wittrockiana* indujo mejoras en la calidad de vida cuantificables en el pigmento fluorescente **lipofuscina** y la **progenie** del nemátodo. La **lipofuscina** es un pigmento que se acumula de manera natural en el organismo y sirve como biomarcador del envejecimiento <sup>85</sup>. Conforme *C. elegans* envejece, la auto fluorescencia del nemátodo se incrementa debido a la acumulación de este pigmento. En el modelo obeso con exceso de glucosa, el incremento de lipofuscina entre los días 7 y 10 fue superior al gusano no obeso. La presencia del extracto de *Viola*

se tradujo en una limitación de ese incremento de fluorescencia siguiendo el comportamiento del *C. elegans* no obeso. En lo referente a la **progenie**, la exposición a niveles elevados de glucosa redujo significativamente la capacidad de puesta de huevos y la viabilidad de estos. El extracto de *V. x wittrockiana* revertió ese efecto tóxico mejorando la viabilidad de los huevos y su eclosión del 39,36 al 77,17%. El polifenol **miricetina**, presente en el extracto de *V. x wittrockiana*, demostró incremento en la esperanza de vida y en la reducción en la acumulación de lipofuscina modulando el gen *daf-16*<sup>75</sup>.

Otro efecto nocivo del exceso de glucosa fue la considerable reducción en el tamaño de los individuos de *C. elegans*<sup>86</sup>. Estas capacidades de prevención del daño por EROS, y mejora en la calidad de vida producidas por los extractos de *Tagetes* y *Viola* se muestran además en el efecto que produjeron sobre el tamaño y **longitud** de *C. elegans* obeso. El tratamiento con los extractos de flores comestibles logró revertir parcialmente esa reducción en una manera dosis-dependiente. Previos estudios con productos naturales y moléculas como el **hiperósido** han demostrado la capacidad de proteger al nemátodo *C. elegans* frente a la toxicidad causada por el exceso de glucosa<sup>87,88</sup>, el ácido fenólico **elágico** incrementó la esperanza de vida de *C. elegans*<sup>89</sup>, al igual que la flavona **apigenina**, que además previno la formación de AGEs<sup>90,91</sup>.

El perfil bioactivo global de *T. erecta* fue el más interesante debido a su capacidad de reducción en el bombeo de la faringe de *C. elegans*, reducción en la producción de AGEs junto con estudios previos de capacidad antiinflamatoria y antioxidante<sup>84,92,93</sup>; es por ello por lo que *T. erecta* se consideró un buen candidato para el testado de capacidades **antihipertensivas**. La vasodilatación es uno de los tres grupos de actuación principales para el tratamiento de la HTA, es por ello por lo que mediante el estudio de miografía se puede evaluar la capacidad vasorrelajante de estos extractos, así como intentar dilucidar el mecanismo de acción por el cual pueden ejercerla. Los ensayos de miografía demostraron la capacidad vasodilatadora de *T. erecta* al lograr relajar las contracciones provocadas por agentes contráctiles como fenilefrina o cloruro de potasio (KCl).

Como se mencionó anteriormente, los compuestos fenólicos son capaces de ejercer una notable actividad antioxidante al reducir la producción de EROS. Diversos estudios han demostrado el potencial protector cardiovascular de estos polifenoles gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antihipertensivas y anti-proliferativas<sup>94,95</sup>. La **disfunción endotelial**, que consiste en la pérdida de la capacidad del tejido endotelial para regular el tono vascular a través de la liberación de factores vasodilatadores, es uno de los marcadores clave del deterioro cardiovascular. Esta disfunción surge de diversidad de mecanismos como la activación de PKC o la glicación de proteínas, en numerosas ocasiones inducidos por el exceso de glucosa presente en las patologías relacionadas con la diabetes. En este contexto, los extractos de *T. erecta* mostraron una capacidad significativa para relajar los anillos de aorta pre-contraídos con fenilefrina, tanto en presencia como ausencia del endotelio. No obstante, dicha actividad fue parcialmente

reducida a dosis bajas en los anillos sin endotelio, alcanzando el mismo porcentaje de relajación a dosis altas tanto en presencia como en ausencia de endotelio. Del mismo modo, la actividad vasorrelajante de los extractos, a dosis bajas, fue reducida en presencia de L-NAME (inhibidor de la síntesis de NO) y ODQ (inhibidor de la guanilato ciclasa), pero no por indometacina. Estos datos indicarían que la relajación vascular producida por los extractos está parcialmente mediada por la vía NO/cGMP/PKG <sup>96</sup>. Este hallazgo es interesante para el tratamiento de patologías con disfunción endotelial como la HTA, donde la biodisponibilidad del NO se reduce y/o se alteran sus funciones celulares.

La angiotensina II es una hormona vasoconstrictora clave en el sistema renina-angiotensina-aldosterona, que desempeña un papel crucial en la regulación de la presión arterial al incrementar el calcio citosólico. Ese efecto fue atenuado por *T. erecta*, indicando que su mecanismo de acción podría implicar la inhibición del calcio intracelular o la apertura de canales de potasio. Dado que la homeostasis del calcio es crucial para la regulación del tono vascular, esta interacción explica su potencial para intervenir en patologías como la HTA <sup>97</sup>.

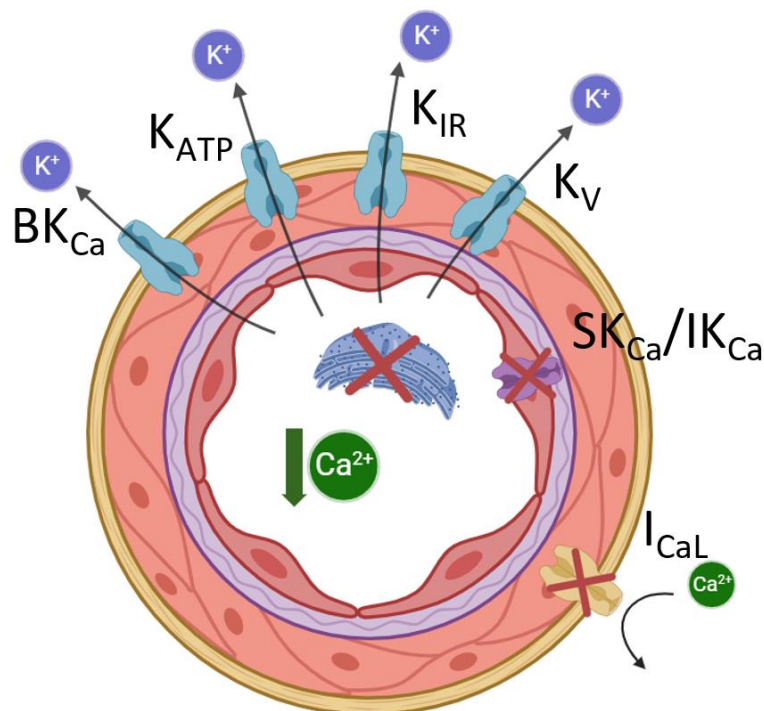
El pretratamiento con extracto de *T. erecta* redujo significativamente la vasoconstricción inducida por la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular a través de la adición de CaCl<sub>2</sub> en un medio libre de Ca<sup>2+</sup> y rico en potasio. Este efecto espasmolítico, aunque más leve que el producido por verapamilo, sugiere una acción sobre los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje <sup>98</sup>. Estos resultados son consistentes con estudios previos en *T. lucida*, donde se observó un mecanismo de acción similar a través del bloqueo de dichos canales <sup>96</sup>. Además, los extractos de *T. erecta* inhibieron la contracción producida por fenilefrina en un medio libre de Ca<sup>2+</sup>. Este agente al unirse a los receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1 en el músculo liso vascular, desencadena un incremento en el calcio citosólico al liberar el calcio del retículo sarcoplásmico debido al aumento de IP<sub>3</sub> y al aumento del influjo de Ca<sup>2+</sup> extracelular. Por lo tanto, estos resultados implicarían que *T. erecta* inhibe la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico a través de la vía de señalización del IP<sub>3</sub>.

A parte de la disminución del calcio citosólico, la activación de los canales de K<sup>+</sup> también es crucial para la vasodilatación, al inducir hiperpolarización y dilatar así la vasculatura. La relajación obtenida por el extracto fue menor en los anillos pre-contraídos con KCl que con fenilefrina. Estos resultados sugieren que la vasodilatación del extracto de *T. erecta* estaría asociada a la **activación del canal de K<sup>+</sup>**.

Los resultados del estudio del papel de los canales de potasio en la respuesta relajante de los extractos revelan la implicación de la apertura de al menos cuatro canales de potasio ubicados en la membrana de las células del músculo liso arterial: BK<sub>Ca</sub>, K<sub>ATP</sub>, K<sub>IR</sub> y Kv. Mientras que los canales IK<sub>Ca</sub> y SK<sub>Ca</sub>, que se encuentran en las células endoteliales

vasculares, no presentaron un papel significativo en la vasorrelajación de los extractos. De nuevo estos resultados refuerzan la teoría de que el principal efecto vasorrelajante de *T. erecta* es **independiente del endotelio**. La inhibición de la relajación inducida por los extractos mediante el bloqueador de la PKA (H-89) sugiere que el incremento de PKA intracelular podría mediar la apertura de canales de potasio ( $K_{Ca}$ ,  $K_{ATP}$ ,  $K_{IR}$  y  $K_V$ ), resultando en la hiperpolarización de la membrana y el consecuente efecto vasodilatador<sup>99</sup>.

Ciertos polifenoles presentes en los extractos, como el **ácido cafeico**, **ácido elágico**, **kaempferol** y **luteolina**, pueden contribuir a la actividad vasorrelajante actuando directamente sobre las células del músculo liso vascular o indirectamente a través de la modulación de canales de potasio, lo que conduce a la hiperpolarización de las células y la inhibición de la entrada de calcio<sup>100-103</sup>. Además, algunos flavonoides como la **quercetina** han demostrado modular la actividad de la PKC, lo que podría contribuir a una disminución de la contracción al reducir la fosforilación de proteínas contráctiles en el músculo liso vascular<sup>104</sup>. Por otro lado, pigmentos como los carotenoides y **tocoferoles**, también presentes en los extractos, han mostrado beneficios para la salud cardiovascular, mejorando tanto la función endotelial como el perfil metabólico. Los  **$\beta$ -carotenos**, en particular, actúan como agentes hipotensores al aumentar la actividad del sistema NO y ejercer sus propiedades antioxidantes.



**Figura 41.** Diagrama del mecanismo de acción de la actividad vasodilatadora de *T. erecta* sobre el tejido endotelial.  $BK_{Ca}$ : canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de elevada conductancia;  $I_{CaL}$ : canales  $Ca^{2+}$  de tipo L;  $IK_{Ca}$ : canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de media conductancia;  $K_{ATP}$ : canales de  $K^+$  dependientes de ATP;  $K_{IR}$ : canales de  $K^+$  rectificadores internos;  $K_V$ : canales de  $K^+$  dependientes de voltaje;  $SK_{Ca}$ : canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de pequeña conductancia. *Realización propia.*

En conclusión, los extractos de *T. erecta* han demostrado un notable efecto **vasorrelajante**, mediado tanto por mecanismos dependientes del endotelio, como la producción de óxido nítrico, como por mecanismos endotelio-independientes, a través de la modulación de canales de calcio y potasio. Estos resultados subrayan el potencial terapéutico de los polifenoles, carotenoides y tocoferoles presentes en *T. erecta* para la mejora de la salud cardiovascular, especialmente en el contexto de la hipertensión arterial. La acción combinada de estas moléculas bioactivas sugiere que *T. erecta* podría desempeñar un papel importante como agente natural en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares relacionadas con la **disfunción endotelial**.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García-Conesa, M.-T., & Larrosa, M. (2020). Polyphenol-rich foods for human health. *Nutrients*, *12*(2), 400. <https://doi.org/10.3390/nu12123738>
2. Núñez, S., Moliner, C., Sofía, M., Mustafa, A. M., Maggi, F., Rincón, C. G., & López, V. (2023). Antidiabetic and anti-obesity properties of a polyphenol-rich flower extract from *Tagetes erecta* L. and its effects on *Caenorhabditis elegans* fat storages. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13105-023-00953-5>
3. Navarro-González, I., González-Barrio, R., García-Valverde, V., Bautista-Ortín, A. B., & Periago, M. J. (2015). Nutritional composition and antioxidant capacity in edible flowers: Characterisation of phenolic compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(1), 805–822. <https://doi.org/10.3390/ijms16010805>
4. Xu, L. wei, Chen, J., Qi, H. yang, & Shi, Y. ping. (2012). Phytochemicals and Their Biological Activities of Plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicines*, *4*(2), 103–117. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-6384.2012.02.004>
5. Zhang, H., Zhang, S., Zhang, H., Chen, X., Liang, F., Qin, H., Zhang, Y., Cong, R., Xin, H., & Zhang, Z. (2020). Carotenoid metabolite and transcriptome dynamics underlying flower color in marigold (*Tagetes erecta* L.). *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73859-7>
6. Moliner, C., Barros, L., Dias, M. I., Reigada, I., Ferreira, I. C. F. R., López, V., Langa, E., & Rincón, C. G. (2019). *Viola cornuta* and *Viola x wittrockiana*: Phenolic compounds, antioxidant and neuroprotective activities on *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Food and Drug Analysis*, *27*(4), 849–859. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.05.005>
7. González-Barrio, R., Periago, M. J., Luna-Recio, C., Garcia-Alonso, F. J., & Navarro-González, I. (2018). Chemical composition of the edible flowers, pansy (*Viola wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*) as new sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, *252*(October 2017), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.102>
8. Vukics, V., Kery, A., & Guttman, A. (2008). Analysis of polar antioxidants in heartsease (*Viola tricolor* L.) and garden pansy (*Viola x wittrockiana* Gams.). *Journal of Chromatographic Science*, *46*(9), 823–827. <https://doi.org/10.1093/chromsci/46.9.823>
9. Moliner, C., Núñez, S., Casedas, G., Valero, M. S., Dias, M. I., Barros, L., López, V., & Gómez-Rincón, C. (2023). Flowers of *Allium cepa* L. as Nutraceuticals : Phenolic Composition and Anti-Obesity and Antioxidant Effects in *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants*, *12*(3), 720. <https://doi.org/10.3390/antiox12030720>
10. Ferreres, F., Sousa, C., Vrchovska, V., Valentão, P., Pereira, J. A., Seabra, R. M., & Andrade, P. B. (2006). Chemical composition and antioxidant activity of tronchuda cabbage internal leaves. *European Food Research and Technology*, *222*(1), 88–98. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0104-0>
11. Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, *16*(1), 251–280. <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>

12. Li, Z., Lee, H. W., Liang, X., Liang, D., Wang, Q., Huang, D., & Ong, C. N. (2018). Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of 12 cruciferous vegetables. *Molecules*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/molecules23051139>
13. Arungarinathan, G., McKay, G. A., & Fisher, M. (2011). Drugs for diabetes: part 4 acarbose. *British Journal of Cardiology*, 18, 78–81.
14. Chan, Y., Ng, S. W., Tan, J. Z. X., Gupta, G., Negi, P., Thangavelu, L., Balusamy, S. R., Perumalsamy, H., Yap, W. H., Singh, S. K., Caruso, V., Dua, K., & Chellappan, D. K. (2021). Natural products in the management of obesity: Fundamental mechanisms and pharmacotherapy. *South African Journal of Botany*, 143(August), 176–197. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.07.026>
15. Care, D., & Suppl, S. S. (2018). Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in Diabetes2018. *Diabetes Care*, 41(January), S13–S27. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>
16. Dragan, S., Andrica, F., Serban, M.-C., & Timar, R. (2015). Polyphenols-Rich Natural Products for Treatment of Diabetes. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 14–22. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140826115422>
17. Meydani, M., & Hasan, S. T. (2010). Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients*, 2(7), 737–751. <https://doi.org/10.3390/nu2070737>
18. Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. M., Elkhayat, E. S., & El Dine, R. S. (2014). Natural anti-obesity agents. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 52(2), 269–284. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2014.05.001>
19. McGrattan, A. M., McGuinness, B., McKinley, M. C., Kee, F., Passmore, P., Woodside, J. V., & McEvoy, C. T. (2019). Diet and Inflammation in Cognitive Ageing and Alzheimer’s Disease. *Current Nutrition Reports*, 8(2), 53–65. <https://doi.org/10.1007/s13668-019-0271-4>
20. Deepika, & Maurya, P. K. (2022). Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. *Molecules*, 27(8), 2498. <https://doi.org/10.3390/molecules27082498>
21. Shen, C. Y., Jiang, J. G., Yang, L., Wang, D. W., & Zhu, W. (2017). Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: pharmacological mechanisms and implications for drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1395–1425. <https://doi.org/10.1111/bph.13631>
22. Saad, B., Ghareeb, B., & Kmail, A. (2021). Metabolic and Epigenetics Action Mechanisms of Antiobesity Medicinal Plants and Phytochemicals. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 9995903. <https://doi.org/10.1155/2021/9995903>
23. Lin, Y. T., Lin, H. R., Yang, C. S., Liaw, C. C., Sung, P. J., Kuo, Y. H., Cheng, M. J., & Chen, J. J. (2022). Antioxidant and Anti- $\alpha$ -Glucosidase Activities of Various Solvent Extracts and Major Bioactive Components from the Fruits of *Crataegus pinnatifida*. *Antioxidants*, 11(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox11020320>
24. Lui, Jie; Wang, Fang-Fang; Jiang, Zheng-Meng; Liu, E.-H. (2022). Identification of antidiabetic components in *Uncariae Rammulus Cum Uncis* based on phytochemical isolation and spectrum-effect relationship analysis. *Phytochemical Analysis: PCA*. <https://doi.org/10.1002/pca.3118>

25. Li, Y. Q., Zhou, F. C., Gao, F., Bian, J. S., & Shan, F. (2009). Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(24), 11463–11468. <https://doi.org/10.1021/jf903083h>
26. Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., & Kang, W. (2014).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*, *3*(3–4), 136–174. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003>
27. Derosa, G., Maffioli, P., & Sahebkar, A. (2016). Ellagic Acid and Its Role in Chronic Diseases. In *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases* (Vol. 928, pp. 473–479). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41334-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41334-1_15)
28. Wongsap, P., & Rattanapanone, N. (2021). <sup>1</sup>H-NMR analysis, antioxidant activity, and  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory potential of ten common Thai edible flowers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *101*(10), 4380–4389. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11079>
29. Lee, B. B., Park, S. R., Han, C. S., Han, D. Y., Park, E., Park, H. R., & Lee, S. C. (2008). Antioxidant activity and inhibition activity against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, *37*(4), 405–409. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2008.37.4.405>
30. Wang, Y. L., Zhang, L., Li, M. Y., Wang, L. W., & Ma, C. M. (2019). Lignans, flavonoids and coumarins from *Viola philippica* and their  $\alpha$ -glucosidase and HCV protease inhibitory activities. *Natural Product Research*, *33*(11), 1550–1555. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1423305>
31. Sung, Y. Y., Kim, D. S., & Kim, H. K. (2014). *Viola mandshurica* ethanolic extract prevents high-fat-diet-induced obesity in mice by activating AMP-activated protein kinase. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *38*(1), 41–50. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2014.04.028>
32. Sung, Y. Y., Kim, S. H., Yoo, B. W., & Kim, H. K. (2015). The nutritional composition and anti-obesity effects of an herbal mixed extract containing *Allium fistulosum* and *Viola mandshurica* in high-fat-diet-induced obese mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *15*(1), 370. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0875-1>
33. Sung, Y. Y., Kim, D. S., Kim, S. H., & Kim, H. K. (2017). Anti-obesity activity, acute toxicity, and chemical constituents of aqueous and ethanol *Viola mandshurica* extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *17*(1), 297. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1810-4>
34. HMPC. (2011). Assessment report on *Allium cepa* L., bulbus. In *European Medicine Agency* (Vol. 44, Issue July).
35. Slanc, P., Doljak, B., Kreft, S., Lunder, M., Janeš, D., & Štrukelj, B. (2009). Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. *Phytotherapy Research*, *23*(6), 874–877. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ptr.2718>
36. Stoica, F., Aprodu, I., Enachi, E., Stănciuc, N., Condurache, N. N., Duță, D. E., Bahrim, G. E., & Râpeanu, G. (2021). Bioactive's Characterization, Biological Activities, and In Silico Studies of Red Onion (*Allium cepa* L.) Skin Extracts. *Plants*, *10*(11), 2330. <https://doi.org/10.3390/plants10112330>

37. Kanittaporn Trisat Matusorn Wong-on, P. L. W. T., & Limpeanchob, N. (2017). Vegetable Juices and Fibers Reduce Lipid Digestion or Absorption by Inhibiting Pancreatic Lipase, Cholesterol Solubility and Bile Acid Binding. *International Journal of Vegetable Science*, 23(3), 260–269. <https://doi.org/10.1080/19315260.2016.1258604>
38. Khangholi, S., Majid, F. A. A., Berwary, N. J. A., Ahmad, F., & Aziz, R. B. A. (2015). The Mechanisms of Inhibition of Advanced Glycation End Products Formation through Polyphenols in Hyperglycemic Condition. *Planta Medica*, 82(1–2), 32–45. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1558086>
39. Luévano-Contreras, C., Gómez-Ojeda, A., Macías-Cervantes, M. H., & Garay-Sevilla, M. E. (2017). Dietary Advanced Glycation End Products and Cardiometabolic Risk. *Current Diabetes Reports*, 17(8). <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0891-2>
40. Moldogazieva, N. T., Mokhosev, I. M., Mel’Nikova, T. I., Porozov, Y. B., & Terentiev, A. A. (2019). Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3085756>
41. Beaulieu, L.-P., Harris, C. S. ;, Saleem, A., Alain, C., Haddad, P. S. ;, Martineau, L. C. ;, Bennett, S. A. L. ;, & Arnason, J. T. ; (2010). Inhibitory Effect of the Cree Traditional Medicine Wiishichimanaan (Vaccinium vitis-idaea) on Advanced Glycation Endproduct Formation: Identification of Active Principles. *Phytotherapy Research*, 24, 741–747. <https://doi.org/10.1002/ptr.3025>
42. Gao, Y., Fang, L., Wang, X., Lan, R., Wang, M., Du, G., Guan, W., Liu, J., Brennan, M., Guo, H., Brennan, C., & Zhao, H. (2019). Antioxidant Activity Evaluation of Dietary Flavonoid Hyperoside Using *Saccharomyces Cerevisiae* as a Model. *Molecules*, 24(4), 788. <https://doi.org/10.3390/molecules24040788>
43. Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase and xanthine oxidase inhibitory activity of bioactive compounds from maize (*Zea mays* L.). *Chemical Biology and Drug Design*, 83(1), 119–125. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12205>
44. Valentová, K., Vrba, J., Bancířová, M., Ulrichová, J., & Křen, V. (2014). Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 267–282. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.018>
45. Campos, C. (2012). Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: Pathology and clinical sequelae. *Postgraduate Medicine*, 124(6), 90–97. <https://doi.org/10.3810/pgm.2012.11.2615>
46. Zheng, J., & Greenway, F. L. (2011). *Caenorhabditis elegans* as a model for obesity research. *International Journal of Obesity*, 36(2), 186–194. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.93>
47. Choi, S. S. (2011). High glucose diets shorten lifespan of *Caenorhabditis elegans* via ectopic apoptosis induction. *Nutrition Research and Practice*, 5(3), 214–218. <https://doi.org/10.4162/nrp.2011.5.3.214>
48. Franco-Juárez, B., Gómez-Manzo, S., Hernández-Ochoa, B., Cárdenas-Rodríguez, N., Arreguin-Espinosa, R., de la Cruz, V. P., & Ortega-Cuellar, D. (2021). Effects of high dietary carbohydrate and lipid intake on the lifespan of *c. Elegans*. *Cells*, 10(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/cells10092359>

49. Lee, S. J., Murphy, C. T., & Kenyon, C. (2009). Glucose Shortens the Life Span of *C. elegans* by Downregulating DAF-16/FOXO Activity and Aquaporin Gene Expression. *Cell Metabolism*, *10*(5), 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.003>
50. Schlotterer, A., Kukudov, G., Bozorgmehr, F., Hutter, H., Du, X., Oikonomou, D., Ibrahim, Y., Pfisterer, F., Rabbani, N., Thornalley, P., Sayed, A., Fleming, T., Humpert, P., Schwenger, V., Zeier, M., Hamann, A., Stern, D., Brownlee, M., Bierhaus, A., ... Morcos, M. (2009). *C. elegans* as model for the study of high glucose-mediated life span reduction. *Diabetes*, *58*(11), 2450–2456. <https://doi.org/10.2337/db09-0567>
51. Alcántar-Fernández, J., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Andrade, M. E. P., Alain de, J. H. V., Velázquez-Arellano, A., & Miranda-Ríos, J. (2019). High-glucose diets induce mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, *14*(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652>
52. Aranaz, P., Navarro-Herrera, D., Zabala, M., Romo-Hualde, A., López-Yoldi, M., Vizmanos, J. L., Milagro, F. I., & González-Navarro, C. J. (2020). Phenolic compounds reduce the fat content in *caenorhabditis elegans* by affecting lipogenesis, lipolysis, and different stress responses. *Pharmaceuticals*, *13*(11), 1–33. <https://doi.org/10.3390/ph13110355>
53. Qin, X., Wang, W., & Chu, W. (2021). Antioxidant and reducing lipid accumulation effects of rutin in *Caenorhabditis elegans*. *BioFactors*, *47*(4), 686–693. <https://doi.org/10.1002/biof.1755>
54. Upadhyay, J., Farr, O., Perakakis, N., Ghaly, W., & Mantzoros, C. (2018). Obesity as a Disease. *Medical Clinics of North America*, *102*(1), 13–33. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.08.004>
55. Bhattacharya, S., Christensen, K. B., Olsen, L. C. B., Christensen, L. P., Grevsen, K., Færgeman, N. J., Kristiansen, K., Young, J. F., & Oksbjerg, N. (2013). Bioactive components from flowers of *Sambucus nigra* L. increase glucose uptake in primary porcine myotube cultures and reduce fat accumulation in *caenorhabditis elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(46), 11033–11040. <https://doi.org/10.1021/jf402838a>
56. Peng, H., Wei, Z., Luo, H., Yang, Y., Wu, Z., Gan, L., & Yang, X. (2016). Inhibition of Fat Accumulation by Hesperidin in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(25), 5207–5214. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02183>
57. Shen, C. Y., Wan, L., Wang, T. X., & Jiang, J. G. (2019). Citrus aurantium L. var. amara Engl. inhibited lipid accumulation in 3T3-L1 cells and *Caenorhabditis elegans* and prevented obesity in high-fat diet-fed mice. *Pharmacological Research*, *147*(June), 104347. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104347>
58. Lin, Y., Yang, N., Bao, B., Wang, L., Chen, J., & Liu, J. (2020). Luteolin Reduces Fat Storage in *Caenorhabditis elegans* through Promoting Central Serotonin Pathway. *Food and Function*, *11*(1), 730–740. <https://doi.org/10.1039/C9FO02095K>
59. Yan, Lin; Yang, Nan; Bao, Bin; Wang, Lu; Chen, Juan; Lui, Jian. (2020). Luteolin reduces fat storage in *Caenorhabditis elegans* by promoting the central serotonin pathway. *Food and Function*, *11*, 730–740. <https://doi.org/10.1039/c9fo02095k>
60. Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R. F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P., & Wätjen, W. (2008). Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin.

*Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 149(2), 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.10.004>

61. Matacchione, G., Valli, D., Silvestrini, A., Giuliani, A., Sabbatinelli, J., Giordani, C., Coppari, S., Rippo, M. R., Albertini, M. C., & Olivieri, F. (2022). Curcumin, Polydatin and Quercetin Synergistic Activity Protects from High-Glucose-Induced Inflammation and Oxidative Stress. *Antioxidants*, 11(6), 1037. <https://doi.org/10.3390/antiox11061037>
62. Civelek, M., Flory, S., Meloh, H., Fitzenberger, E., & Wenzel, U. (2020). The polyphenol quercetin protects from glucotoxicity depending on the aggresome in *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Nutrition*, 59(2), 485–491. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01917-6>
63. Haddad, P., & Eid, H. (2016). The Antidiabetic Potential of Quercetin: Underlying Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*, 24(4), 355–364. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160909153707>
64. Wang, W., Xu, H., Chen, H., Tai, K., Liu, F., & Gao, Y. (2016). In vitro antioxidant, anti-diabetic and antilipemic potentials of quercetagenin extracted from marigold (*Tagetes erecta* L.) inflorescence residues. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 2614–2624. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2228-6>
65. Dong, J., Zhang, X., Zhang, L., Bian, H. X., Xu, N., Bao, B., & Liu, J. (2014). Quercetin reduces obesity-associated ATM infiltration and inflammation in mice: A mechanism including AMPK $\alpha$ 1/SIRT. *Journal of Lipid Research*, 55(3), 363–374. <https://doi.org/10.1194/jlr.M038786>
66. Farias-Pereira, R., Park, C. S., & Park, Y. (2020). Kahweol Reduces Food Intake of *Caenorhabditis elegans*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 68, Issue 36, pp. 9683–9689). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03030>
67. Lin, C., Lin, Y., Meng, T., Lian, J., Liang, Y., Kuang, Y., Cao, Y., & Chen, Y. (2020). Anti-fat effect and mechanism of polysaccharide- enriched extract from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja in *Caenorhabditis elegans*. *Food and Function*, 11(Issue 6), 5320–5332. <https://doi.org/10.1039/c9fo03058a>
68. Nasri, R., Bidel, L. P. R., Rugani, N., Perrier, V., Carrière, F., Dubreucq, E., & Jay-Allemand, C. (2019). Inhibition of CplIP2 Lipase Hydrolytic Activity by Myricetin ) Compared to Orlistat and Their Binding. *Molecules*, 24(16), 2888. <https://doi.org/doi:10.3390/molecules24162888>
69. Su, H. ming, Feng, L. na, Zheng, X. dong, & Chen, W. (2016). Myricetin protects against diet-induced obesity and ameliorates oxidative stress in C57BL/6 mice. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 17(6), 437–446. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600074>
70. Zang, Y., Igarashi, K., & Li, Y. L. (2016). Anti-diabetic effects of luteolin and luteolin-7-O-glucoside on KK-Ay mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(8), 1580–1586. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1116928>
71. Heck, Amy M.; Yanovski, Jack A.; Anton Calis, K. (2000). Orlistat, a New Lipase Inhibitor for the Management of Obesity. *Pharmacotherapy*, 20(3), 270–279.

72. Saunders, K. H., Umashanker, D., Igel, L. I., Kumar, R. B., & Aronne, L. J. (2018). Obesity Pharmacotherapy. *Medical Clinics of North America*, 102(1), 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.08.010>
73. Sulistiyani, Purwakusumah, E. P., & Andrianto, D. (2017). In Vivo Inhibition of Lipid Accumulation in *Caenorhabditis elegans*. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci*, 58, 12067. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/58/1/012067>
74. Song, B. mi, & Avery, L. (2012). Serotonin activates overall feeding by activating two separate neural pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 32(6), 1920–1931. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2064-11.2012>
75. Büchter, C., Ackermann, D., Havermann, S., Honnen, S., Chovolou, Y., Fritz, G., Kampkötter, A., & Wätjen, W. (2013). Myricetin-mediated lifespan extension in *caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11895–11914. <https://doi.org/10.3390/ijms140611895>
76. Martel, J., Wu, C. Y., Peng, H. H., Ko, Y. F., Yang, H. C., Young, J. D., & Ojcius, D. M. (2020). Plant and fungal products that extend lifespan in *caenorhabditis elegans*. *Microbial Cell*, 7(10), 255–269. <https://doi.org/10.15698/MIC2020.10.731>
77. Mango, S. E. (2007). The *C. elegans* pharynx: a model for organogenesis. *WormBook : The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–26. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.129.1>
78. Schüler, C., Fischer, E., Shaltiel, L., Steuer Costa, W., & Gottschalk, A. (2015). Arrhythmogenic effects of mutated L-Type Ca<sup>2+</sup>-channels on an optogenetically paced muscular pump in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, 5(May), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep14427>
79. Jensen, H. H., Frantzen, M. T., Wesseltoft, J. L., Busuioc, A. O., Møller, K. V., Brohus, M., Duun, P. R., Nyegaard, M., Overgaard, M. T., & Olsen, A. (2023). Human calmodulin mutations cause arrhythmia and affect neuronal function in *C. elegans*. *Human Molecular Genetics*, 32(12), 2068–2083. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddad042>
80. Bashir, Samra; Gilani, A. H. (2008). Studies on the antioxidant and analgesic activities of Aztec marigold (*Tagetes erecta*) flowers. *Phytotherapy Research*, 22(4), 1692–1694. <https://doi.org/10.1002/ptr.2550>
81. Burlec, A. F., Pecio, Ł., Kozachok, S., Mircea, C., Corciovă, A., Vereștiuc, L., Cioancă, O., Oleszek, W., & Hăncianu, M. (2021). Phytochemical profile, antioxidant activity, and cytotoxicity assessment of *Tagetes erecta* L. flowers. *Molecules*, 26(5), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules26051201>
82. Gopi, G., Elumalai, A., & Jayasri, P. (2012). A Concise Review on *Tagetes Erecta*. *International Journal of Phytopharmacy Research*, 3(1), 16–19.
83. Meurer, M. C., Mees, M., Mariano, L. N. B., Boeing, T., Somensi, L. B., Mariott, M., da Silva, R. de C. M. V. de A. F., dos Santos, A. C., Longo, B., Santos França, T. C., Klein-Júnior, L. C., de Souza, P., de Andrade, S. F., & da Silva, L. M. (2019). 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. *Nutrition Research*, 66, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.03.005>

84. Moliner, C., Barros, L., Dias, M. I., López, V., Langa, E., Ferreira, I. C. F. R., & Gómez-Rincón, C. (2018). Edible flowers of *tagetes erecta* l. As functional ingredients: Phenolic composition, antioxidant and protective effects on *caenorhabditis elegans*. *Nutrients*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/nu10122002>
85. Yin, D. (1996). Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radical Biology and Medicine*, *21*(6), 871–888. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00175-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00175-X)
86. Pattarachotanant, N., Sornkaew, N., Warayanon, W., Rangsinth, P., Sillapachaiyaporn, C., Vongthip, W., Chuchawankul, S., Prasansuklab, A., & Tencomnao, T. (2022). Aquilaria crassna Leaf Extract Ameliorates Glucose-Induced Neurotoxicity In Vitro and Improves Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nutrients*, *14*(17), 1–28. <https://doi.org/10.3390/nu14173668>
87. Ku, S. K., Kwak, S., Kwon, O. J., & Bae, J. S. (2014). Hyperoside Inhibits High-Glucose-Induced Vascular Inflammation In Vitro and In Vivo. *Inflammation*, *37*(5), 1389–1400. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9863-8>
88. Bianchin dos Santos, F., Quines, C. B., Eduardo Ben Pilissão, L., Helena de Castro Dal Forno, A., Rodrigues, C. F., Denardin, C. C., Farias, F. M., & Ávila, D. S. (2020). Aqueous Bark Extract of *Ceiba speciosa* (A . St . -Hill ) Ravenna Protects against Glucose Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*, 1321354.
89. Saul, N., Pietsch, K., Stürzenbaum, S. R., Menzel, R., & Steinberg, C. E. W. (2011). Diversity of polyphenol action in *Caenorhabditis elegans*: Between toxicity and longevity. *Journal of Natural Products*, *74*(8), 1713–1720. <https://doi.org/10.1021/np200011a>
90. Elkhedir, A. E., Iqbal, A., Zogona, D., Mohammed, H. H., Murtaza, A., & Xu, X. (2022). Apigenin glycosides from green pepper enhance longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Nutrition Research*, *102*, 23–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nutres.2022.02.003>
91. Yoon, S., Kim, M., Shin, S., Woo, J., Son, D., Ryu, D., Yoo, J., Park, D., & Jung, E. (2022). Effect of *Cirsium japonicum* Flower Extract on Skin Aging Induced by Glycation. *Molecules*, *27*(7), 2093. <https://doi.org/10.3390/molecules27072093>
92. Zheng, J., Lu, B., & Xu, B. (2021). An update on the health benefits promoted by edible flowers and involved mechanisms. *Food Chemistry*, *340*(August 2020), 127940. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127940>
93. Benvenuti, S., Bortolotti, E., & Maggini, R. (2016). Antioxidant power, anthocyanin content and organoleptic performance of edible flowers. *Scientia Horticulturae*, *199*, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.052>
94. Behl, T., Bungau, S., Kumar, K., Zengin, G., Khan, F., Kumar, A., Kaur, R., Venkatachalam, T., Tit, D. M., Vesa, C. M., Barsan, G., & Mosteanu, D. E. (2020). Pleiotropic Effects of Polyphenols in Cardiovascular System. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 130). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110714>
95. Bieganska-Hensoldt, S., & Rosolowska-Huszcz, D. (2017). Polyphenols in preventing endothelial dysfunction. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, *71*, 227–235. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.3808>

96. Estrada-Soto, S., González-Trujano, Ma. E., Rendón-Vallejo, P., Arias-Durán, L., Ávila-Villarreal, G., & Villalobos-Molina, R. (2021). Antihypertensive and vasorelaxant mode of action of the ethanol-soluble extract from *Tagetes lucida* Cav. aerial parts and its main bioactive metabolites. *Journal of Ethnopharmacology*, 266, 113399. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113399>
97. Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., & Montezano, A. C. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovascular Research*, 114(4), 529–539. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy023>
98. Ventura-Martínez, R., Ángeles-López, G. E., Rodríguez, R., González-Trujano, M. E., & Déciga-Campos, M. (2018). Spasmolytic effect of aqueous extract of *Tagetes erecta* L. flowers is mediated through calcium channel blockade on the guinea-pig ileum. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 103(3000), 1552–1556. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.166>
99. Jackson, W. F. (2017). Chapter Three - Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. In R. A. Khalil (Ed.), *Advances in Pharmacology* (Vol. 78, pp. 89–144). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.07.001>
100. Dh ChiWORORO, W., & Ojewole, Jo. A. (2010). Cardiovascular topics dual effect of quercetin on rat isolated portal vein smooth muscle contractility. In *CARDIOVASCULAR JOURNAL OF AFRICA* • (Vol. 21, Issue 3). [www.cvja.co.za](http://www.cvja.co.za)
101. Luna-Vázquez, F. J., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., Rojas-Molina, I., & Zavala-Sánchez, M. Á. (2013). Vasodilator compounds derived from plants and their mechanisms of action. In *Molecules* (Vol. 18, Issue 5, pp. 5814–5857). <https://doi.org/10.3390/molecules18055814>
102. Grosso, G., Godos, J., Currenti, W., Micek, A., Falzone, L., Libra, M., Giampieri, F., Forbes-Hernández, T. Y., Quiles, J. L., Battino, M., La Vignera, S., & Galvano, F. (2022). The Effect of Dietary Polyphenols on Vascular Health and Hypertension: Current Evidence and Mechanisms of Action. In *Nutrients* (Vol. 14, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu14030545>
103. Ajay, M., Hassan Gilani, A., & Rais Mustafa, M. (2003). Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*, 5(75). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.06.039>
104. Suri, S., Liu, X. H., Rayment, S., Hughes, D. A., Kroon, P. A., Needs, P. W., Taylor, M. A., Tribolo, S., & Wilson, V. G. (2010). Quercetin and its major metabolites selectively modulate cyclic GMP-dependent relaxations and associated tolerance in pig isolated coronary artery. *British Journal of Pharmacology*, 159(3), 566–575. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00556.x>



**CONCLUSIONES/  
CONCLUSIONS**



1. Las flores de *Brassica incana* son fuente de compuestos funcionales con propiedades antidiabéticas y anti-obesidad. Por primera vez, flores de *B. incana* demostraron capacidad inhibitoria frente a enzimas digestivas empleadas como diana terapéutica en patologías como la diabetes mellitus y obesidad. También se mostró por primera vez la neutralización de radicales mediante el sistema de xantina/xantina oxidasa y la inhibición en formación de AGEs.
2. El extracto de flores de *Allium cepa* demostró una importante actividad antioxidante *in vitro*. Además, logró inhibir dianas farmacológicas para el tratamiento de patologías metabólicas como la obesidad y diabetes mellitus ( $\alpha$ -glucosidasa y lipasa) así como prevenir la formación de productos finales de glicación avanzada. En el modelo *in vivo*, *A. cepa* mostró una marcada actividad anti-obesidad reduciendo los niveles de depósitos de grasa. Se demostró por primera vez el potencial uso de las flores de *A. cepa* como alimentos funcionales.
3. Las flores de *Viola x wittrockiana* mostraron propiedades anti-obesidad y antienvjecimiento al reducir los niveles de lípidos e ingesta de bacterias en el modelo de *C. elegans* obeso, incrementando además su calidad de vida al reducir la acumulación del pigmento lipofuscina y revertir los efectos nocivos sobre el desarrollo y la progenie causados por el exceso de glucosa. Estas propiedades antienvjecimiento y anti-obesidad permiten considerar las flores de *V. x wittrockiana* como nutraceuticos e ingredientes saludables.
4. Los extractos de ambas flores de *Tagetes erecta* son fuente de moléculas bioactivas hidrosolubles como polifenoles y liposolubles como carotenoides y tocoferoles. Estos fitoquímicos han demostrado actividad inhibiendo dianas terapéuticas de los tratamientos anti-obesidad y diabéticos como lipasa y  $\alpha$ -glucosidasa, considerándolas candidatas para la prevención y manejo de enfermedades metabólicas crónicas.
5. Los dos métodos de extracción empleados sobre las flores de *Tagetes erecta*, Soxhlet y UAE, obtuvieron compuestos bioactivos con propiedades interesantes como agentes antioxidantes, antilipolíticos y antidiabéticos. En términos de rendimiento, el método sostenible UAE obtuvo los mejores resultados, así como un mayor contenido de polifenoles. Sin embargo, la técnica tradicional Soxhlet sigue siendo una técnica interesante para la extracción de pigmentos lipofílicos como los carotenoides y precursores de vitamina E (tocoferoles).
6. Este es el primer estudio que demuestra que el extracto de *Tagetes erecta* induce un efecto vasorrelajante de manera dosis dependiente. El mecanismo de acción de esta actividad es potencialmente independiente del endotelio al actuar directamente sobre las células del músculo liso mediante la apertura de los canales de potasio, la activación de la PKA y la disminución del calcio citosólico al bloquear la entrada de calcio extracelular y su liberación desde el retículo sarcoplásmico.

Pero, además, parte del efecto vasorrelajante depende del endotelio a través de la vía NO/sGC. Este hallazgo puede ser importante para el tratamiento de enfermedades asociadas con la pérdida/disfunción de células endoteliales como la HTA, DM y SM.

1. *Brassica incana* flowers are a source of healthy ingredients with anti-obesity and antidiabetic properties. For the first time, *B. incana* flowers were reported to inhibit digestive enzymes used as therapeutic target in pathologies such as diabetes mellitus and obesity. It was also shown for the first time the neutralization of free radicals through the xanthine/xanthine oxidase system and the inhibition of AGEs formation.
2. *Allium cepa* flower extract displayed an important *in vitro* antioxidant activity. Furthermore, it was able to inhibit pharmacological targets in the treatment of metabolic pathologies such as obesity and diabetes mellitus ( $\alpha$ -glucosidase and lipase). In the *in vivo* model, *A. cepa* showed a noticeable anti-obesity activity by reducing the levels of fat deposits. It was proven for the first time the potential of *A. cepa* flowers as functional food.
3. *Viola x wittrockiana* flowers displayed anti-obesity and anti-ageing properties by reducing lipid levels and bacteria intake in the *C. elegans* obese model, also increasing its health span by reducing the accumulation of lipofuscin pigment and reverting the harmful effects over development and offspring caused by the excess of glucose. Considering its anti-ageing and anti-obesity features, *V. x wittrockiana* can be considered as nutraceutical and healthy ingredient.
4. Both extracts from *Tagetes erecta* are source of bioactive molecules, hydro-soluble such as polyphenols and liposoluble as carotenoids and tocopherols. These phytochemicals have shown activity inhibiting therapeutic targets of anti-obesity and diabetic treatments, for instance lipase and  $\alpha$ -glucosidase, considering them as candidate products for the prevention and improvement of chronic metabolic diseases.
5. The two extraction methods applied to *Tagetes erecta* flowers, Soxhlet and UAE, achieved to obtain bioactive compounds with interesting properties as antioxidant, antidiabetic and anti-lipolytic agents. The green technique UAE obtained the best yield results as well as polyphenol content. Meanwhile, the traditional method Soxhlet proved to remain as an interesting option for the extraction of lipophilic pigments like carotenoids and vitamin E precursors (tocopherols).
6. This is the first study to demonstrate that *Tagetes erecta* extract induces a dose-dependent vasorelaxant effect. The mechanism of action for this activity is potentially endothelium-independent, acting directly on smooth muscle cells through the opening of potassium channels, activation of PKA, and reduction of cytosolic calcium by blocking extracellular calcium influx and its release from the sarcoplasmic reticulum. Additionally, part of the vasorelaxant effect depends on the endothelium through the NO/sGC pathway. This finding could be important for the treatment of diseases associated with endothelial loss/dysfunction, such as hypertension, diabetes mellitus, and metabolic syndrome.



**ANEXOS**





**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	12058800
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Barros, Lillian
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Centro de Investigaçãõ de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Investigadora Principal
<b>Doctor/a</b>	<input type="radio"/> Sí / <i>Yes</i>
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Flowers of <i>Allium cepa</i> L. as nutraceuticals: phenolic composition, anti-obesity and antioxidant effects in <i>Caenorhabditis elegans</i> .
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En Bragança, a 16 de outubro de 2024

Firma / *Signature*

**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*



**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL  
TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research  
publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	72973737G
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Cásedas, Guillermo
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad San Jorge
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Profesor Contratado Doctor / Profesor Permanente Laboral
<b>Doctor/a</b>	<input type="radio"/> Sí / <i>Yes</i>
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Flowers of <i>Allium cepa</i> L. as nutraceuticals: phenolic composition, anti-obesity and antioxidant effects in <i>Caenorhabditis elegans</i> .
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En Villanueva de Gállego, a 17 de octubre de 2024

Firma / *Signature*

**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO  
PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research  
publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*





**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	YA9952251
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Caprioli, Giovanni
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	University of Camerino School of Pharmaceutical Sciences and Health Products CHemistry Interdisciplinary Project (CHIP)
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	ASSOCIATE PROFESSOR
<b>Doctor/a</b>	<input checked="" type="radio"/> X Sí / <i>Yes</i> <input type="radio"/> No (rellenar el apartado de renuncia / <i>please fill in the resignation below</i> )
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Ultrasound Assisted Extraction (UAE) versus traditional Soxhlet apparatus for the obtention of polyphenols, carotenoids and tocopherols from <i>Tagetes erecta</i> L. flowers.  Ultrasound Assisted Extraction (UAE) versus traditional Soxhlet apparatus for the obtention of polyphenols, carotenoids and tocopherols from <i>Tagetes erecta</i> L. flowers.
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	

Accepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En \_\_\_\_\_, a 2nd de november de 2024

Firma / *Signature*

**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*





**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	U159D1647J (driving licence)
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Concurso, Concetta
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Department of Veterinary Sciences
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Associate Professor
<b>Doctor/a</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>Sí / Yes</b> <input type="checkbox"/> No (rellenar el apartado de renuncia / <i>please fill in the resignation below</i> )
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Volatile composition, antidiabetic, and anti-obesity potential of <i>Brassica incana</i> leaf and flowering top extracts.
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En MESSINA, a 23 de Octubre de 20 24

Firma / *Signature*

**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*





**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	13433157
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Días, Maria Ines
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	CIMO, LA SusTEC, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300- 253 Bragança, Portugal.
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Investigadora
<b>Doctor/a</b>	<input type="radio"/> Sí / <i>Yes</i> <input type="radio"/> No (rellenar el apartado de renuncia / <i>please fill in the resignation below</i> )
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Flowers of <i>Allium cepa</i> L. as nutraceuticals: phenolic composition, anti-obesity and antioxidant effects in <i>Caenorhabditis elegans</i> .
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En Bragança, a 18 de Octubre de 2024

Firma / *Signature*

**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*



**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	70241744c
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Gómez-Rincón, Carlota
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Facultad de Ciencias de la Salud Universidad San Jorge
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Profesora Titular de Universidad
<b>Doctor/a</b>	<input checked="" type="checkbox"/> Sí / <i>Yes</i> <input type="checkbox"/> No (rellenar el apartado de renuncia / <i>please fill in the resignation below</i> )
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Flowers of <i>Allium cepa</i> L. as nutraceuticals: phenolic composition, anti-obesity and antioxidant effects in <i>Caenorhabditis elegans</i> .  Lipid lowering and anti-ageing effects of edible flowers of <i>Viola x wittrockiana</i> Gams in a <i>Caenorhabditis elegans</i> obese model.  Antidiabetic and anti-obesity properties of a polyphenol-rich flower extract from <i>Tagetes erecta</i> L. and its effects on <i>Caenorhabditis elegans</i> fat storages  Ultrasound Assisted Extraction (UAE) versus traditional Soxhlet apparatus for the obtention of polyphenols, carotenoids and tocopherols from <i>Tagetes erecta</i> L. flowers.
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En Zaragoza, a 4 de Noviembre de 2024

Firma / *Signature*

**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*



Firma / *Signature*



**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	29134339D
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	López, Víctor
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Farmacia. Universidad San Jorge
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Profesor Titular
<b>Doctor/a</b>	<input type="radio"/> Sí / <i>Yes</i> <input type="radio"/> No (rellenar el apartado de renuncia / <i>please fill in the resignation below</i> )
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	<p>Volatile composition, antidiabetic, and anti-obesity potential of <i>Brassica incana</i> leaf and flowering top extracts.</p> <p>Flowers of <i>Allium cepa</i> L. as nutraceuticals: phenolic composition, anti-obesity and antioxidant effects in <i>Caenorhabditis elegans</i>.</p> <p>Lipid lowering and anti-ageing effects of edible flowers of <i>Viola x wittrockiana</i> Gams in a <i>Caenorhabditis elegans</i> obese model.</p> <p>Antidiabetic and anti-obesity properties of a polyphenol-rich flower extract from <i>Tagetes erecta</i> L. and its effects on <i>Caenorhabditis elegans</i> fat storages</p> <p>Ultrasound Assisted Extraction (UAE) versus traditional Soxhlet apparatus for the obtention of polyphenols, carotenoids and tocopherols from <i>Tagetes erecta</i> L. flowers.</p>
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Firma / *Signature*

**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*





**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	ID CA87995DM
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Maggi, Filippo
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Chemistry Interdisciplinary Project (ChIP), School of Pharmacy, University of Camerino
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Full Professor
<b>Doctor/a</b>	<input type="radio"/> <b>Sí</b> / <i>Yes</i>
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Antidiabetic and anti-obesity properties of a polyphenol-rich flower extract from <i>Tagetes erecta</i> L. and its effects on <i>Caenorhabditis elegans</i> fat storages  Ultrasound Assisted Extraction (UAE) versus traditional Soxhlet apparatus for the obtention of polyphenols, carotenoids and tocopherols from <i>Tagetes erecta</i> L. flowers.
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

Camerino, 27 October 2024

Firma / *Signature*

**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*



**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	CA84125IJ
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	MERLINO, MARIA
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	UNIVERSITY OF MESSINA, DEPARTMENT OF VETERINARY SCIENCES
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	RTD-A
<b>Doctor/a</b>	<input type="radio"/> Sí / <i>Yes</i>
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Volatile composition, antidiabetic, and anti-obesity potential of <i>Brassica incana</i> leaf and flowering top extracts.
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En Messina, a 17 de Octubre de 2024

Firma / *Signature*

**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*



**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL  
TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research  
publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Miceli, Natalizia
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Viale Ferdinando Stagno d'Alcontres 31, 98166 Messina, Italy
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Associate professor
<b>Doctor/a</b>	<input type="radio"/> Sí / <i>Yes</i> <input type="radio"/> No (rellenar el apartado de renuncia / <i>please fill in the resignation below</i> )
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Volatile composition, antidiabetic, and anti-obesity potential of <i>Brassica incana</i> leaf and flowering top extracts.
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

Messina, 17/10 /2024

Firma / *Signature*







**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	73027090C
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Millán-Laleona, Adrián
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Universidad San Jorge, facultad de ciencias de la salud
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Estudiante de doctorado
<b>Doctor/a</b>	<input type="radio"/> Sí / <i>Yes</i> <input checked="" type="radio"/> No (rellenar el apartado de renuncia / <i>please fill in the resignation below</i> )
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Volatile composition, antidiabetic, and anti-obesity potential of <i>Brassica incana</i> leaf and flowering top extracts.
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En \_\_\_\_\_ Zaragoza \_\_\_\_\_, a \_\_17\_\_ de \_\_\_\_\_ Octubre \_\_\_\_\_ de 2024\_\_

Firma / *Signature*



**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO  
PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research  
publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the  
mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*

**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	72994022A
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Moliner, Cristina
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Universidad San Jorge
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Profesor Ayudante Doctor
<b>Doctor/a</b>	Sí
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Flowers of <i>Allium cepa</i> L. as nutraceuticals: phenolic composition, anti-obesity and antioxidant effects in <i>Caenorhabditis elegans</i> .  Lipid lowering and anti-ageing effects of edible flowers of <i>Viola x wittrockiana</i> Gams in a <i>Caenorhabditis elegans</i> obese model.  Antidiabetic and anti-obesity properties of a polyphenol-rich flower extract from <i>Tagetes erecta</i> L. and its effects on <i>Caenorhabditis elegans</i> fat storages
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En Villanueva de Gállego a 18 de octubre de 2024.

Firma / *Signature*

**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*



**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Mustafa, Ahmed M
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Associate Professor
<b>Doctor/a</b>	<input type="radio"/> <b>Sí / Yes</b> <input type="radio"/> No (rellenar el apartado de renuncia / <i>please fill in the resignation below</i> )
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	<p>Antidiabetic and anti-obesity properties of a polyphenol-rich flower extract from <i>Tagetes erecta</i> L. and its effects on Caenorhabditis elegans fat storages</p> <p>Ultrasound Assisted Extraction (UAE) versus traditional Soxhlet apparatus for the obtention of polyphenols, carotenoids and tocopherols from <i>Tagetes erecta</i> L. flowers.</p>
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Núñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En \_\_\_\_\_, a 30th de october de 2024

Firma / *Signature*



**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*



**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL  
TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research  
publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	Identify Card: CA71020SP
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Ragusa, Monica
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Azienda Sanitaria Provinciale di Messina
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	
<b>Doctor/a</b>	<input type="radio"/> Sí / <i>Yes</i>
<b>Título de las publicaciones afectadas</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Volatile composition, antidiabetic, and anti-obesity potential of <i>Brassica incana</i> leaf and flowering top extracts.
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En \_\_\_Messina (IT)\_\_\_, a \_03 November 2024

Firma / *Signature*



**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO  
PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research  
publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*





Firma / *Signature*

**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	Identity card N° CA20265RO
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Taviano, Maria Fernanda
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences (ChiBioFarAm), University of Messina, Italy.
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Associate professor
<b>Doctor/a</b>	<input checked="" type="checkbox"/> Sí / <i>Yes</i> <input type="checkbox"/> No (rellenar el apartado de renuncia / <i>please fill in the resignation below</i> )
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Volatile composition, antidiabetic, and anti-obesity potential of <i>Brassica incana</i> leaf and flowering top extracts.
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En Messina, a 17 de octubre de 2024

Firma / *Signature*

**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*

Maria Fernanda Taviano



**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	73261147Y
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Valero Gracia, Marta Sofía
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Facultad de Ciencias de la Salud. Departamento de Farmacología, Fisiología y Medicina Legal y Forense. Universidad de Zaragoza.
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	Profesora Titular de Universidad
<b>Doctor/a</b>	<input type="radio"/> Sí / <i>Yes</i> <input type="radio"/> No (rellenar el apartado de renuncia / <i>please fill in the resignation below</i> )
<b>Título de las publicaciones</b> <i>Title of the research publications affected</i>	<p>Flowers of <i>Allium cepa</i> L. as nutraceuticals: phenolic composition, anti-obesity and antioxidant effects in <i>Caenorhabditis elegans</i>.</p> <p>Lipid lowering and anti-ageing effects of edible flowers of <i>Viola x wittrockiana</i> Gams in a <i>Caenorhabditis elegans</i> obese model.</p> <p>Antidiabetic and anti-obesity properties of a polyphenol-rich flower extract from <i>Tagetes erecta</i> L. and its effects on <i>Caenorhabditis elegans</i> fat storages</p> <p>Ultrasound Assisted Extraction (UAE) versus traditional Soxhlet apparatus for the obtention of polyphenols, carotenoids and tocopherols from <i>Tagetes erecta</i> L. flowers.</p>
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

En Zaragoza, a 3 de noviembre de 2024

Firma / *Signature*

**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

Firma / *Signature*



**ACEPTACIÓN ESCRITA DE LOS COAUTORES PARA QUE EL DOCTORANDO PRESENTE EL TRABAJO COMO TESIS DOCTORAL / *Written acceptance of the co-authors of a research publication for its presentation as part of a PhD Thesis***

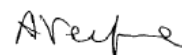
Datos del coautor / *co-author data*

<b>DNI/NIE/PASAPORTE</b> <i>Identity number</i>	
<b>Apellidos, nombre del coautor</b> <i>Coauthor's surname, name</i>	Verzera, Antonella
<b>Institución, departamento, universidad de pertenencia</b> <i>Affiliation, Department, University</i>	Department of Veterinary science, University of Messina
<b>Categoría</b> <i>Academic category</i>	
<b>Doctor/a</b>	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/>
<b>Título de las publicaciones afectadas</b> <i>Title of the research publications affected</i>	Volatile composition, antidiabetic, and anti-obesity potential of <i>Brassica incana</i> leaf and flowering top extracts.
<b>Apellidos, nombre del doctorando</b> <i>PhD student's surname, name</i>	Nuñez Alonso, Sonia

Acepto que la publicación mencionada sea presentada por el doctorando como trabajo que forma parte de su tesis doctoral / *Hereby I accept that the above mentioned research publication is presented by the PhD student as part of its PhD Thesis.*

Messina 17 10 2024

Antonella Verzera



**RENUNCIA DEL COAUTOR NO DOCTOR A PRESENTAR EL TRABAJO COMO PARTE DE OTRA TESIS DOCTORAL / *Resignation of the co-author to use the research publication as part of my PhD Thesis***

Renuncio a presentar las publicaciones mencionadas como parte de otra tesis doctoral / *I resign to use the mentioned publications as part of my PhD Thesis*

/ Signature

