



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN NUTRICIÓN HUMANA E DIETÉTICA

Carla Cameselle Llanos

Valorización de los compuestos funcionales de la baya de saúco (*Sambucus nigra, L.*) cultivada en Galicia mediante el desarrollo de un producto funcional

Traballo Fin de Grao

Julio 2022

Indice

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	6
3. OBJETIVOS	9
3.1. OBJETIVO GENERAL	9
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
4. METODOLOGÍA.....	10
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CAPACIDADES FUNCIONALES DE LA BAYA	10
4.1.1. <i>Materia prima</i>	10
4.1.2. <i>Determinación de compuestos fenólicos</i>	10
4.1.3. <i>Determinación de la capacidad antioxidante</i>	12
4.1.4. <i>Determinación de la capacidad de prevenir la osteoporosis</i>	16
4.2. DESARROLLO DE UN PRODUCTO FUNCIONAL A BASE DE ZUMO DE SAÚCO.....	19
4.2.1. <i>Desarrollo de prototipos del producto funcional a base de saúco</i>	21
4.2.2. <i>Evaluación del diseño</i>	25
4.2.2.1. <i>Análisis físico-químico</i>	25
4.2.2.2. <i>Análisis de perfil de textura (TPA)</i>	25
4.2.2.3. <i>Evaluación sensorial</i>	27
4.3. <i>Validación de la funcionalidad del prototipo seleccionado</i>	27
4.4. <i>Estudio de etiquetado, alegaciones nutricionales y de salud</i>	28
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
5. RESULTADOS E DISCUSIÓN	31
5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CAPACIDADES FUNCIONALES DEL SAÚCO.....	31
5.1.1. <i>Compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante</i>	31
5.1.2. <i>Capacidad de prevenir la osteoporosis</i>	33
5.2. EVALUACIÓN DEL PROTOTIPO DE LA GOMINOLA FUNCIONAL.....	35
5.2.1. <i>Análisis físico-químico</i>	35
5.2.2. <i>Análisis de perfil de textura</i>	36
5.2.3. <i>Evaluación sensorial</i>	37
5.3. VALIDACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL PROTOTIPO SELECCIONADO	37
5.3.1. <i>Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante</i>	37
5.3.2. <i>Capacidad protectora contra la osteoporosis</i>	38
5.3.3. <i>Análisis nutricional y estudio de etiquetado</i>	39
6. CONCLUSIONES	43
7. BIBLIOGRAFÍA	44

1. RESUMEN

“Valorización de los compuestos funcionales de la baya de saúco (*Sambucus nigra*, L.) cultivada en Galicia mediante el desarrollo de un producto funcional”

Las bayas de saúco (*Sambucus nigra*, L.) son un alimento históricamente utilizado por sus propiedades medicinales, debidas fundamentalmente a su contenido en compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas, compuestos antioxidantes de gran interés en la actualidad. En el presente trabajo, se estudian las características bioactivas de las bayas de saúco, el zumo y su subproducto (piel liofilizada), cultivadas en el Norte de la Península Ibérica por la empresa Veigas de Sabugueiro, S.L. para optimizar su uso en el desarrollo de una gominola funcional.

Los datos confirman que las matrices de saúco analizadas contienen mayor cantidad de compuestos fenólicos totales y mayor capacidad antioxidante que los datos encontrados en la bibliografía y que otras frutas antioxidantes, por los tres métodos (TEAC, ORAC-FI y FRAP). Además, los resultados mostraron efectos biológicos en el ensayo *in vitro* con el modelo celular de preosteoblastos de ratón (MC3T3-E1), que sugiere la capacidad de prevenir la osteoporosis de los compuestos presentes en estas matrices.

Se utilizó el zumo de saúco para el desarrollo de una gominola funcional que sirve para enriquecer la dieta con compuestos antioxidantes, en particular con antocianinas. Se obtuvo una formulación final que cuenta con buena valoración del panel de consumidores y que contiene el 100% de la ingesta recomendada de antocianinas en EEUU y el 80% de la ingesta recomendada en EU. Además, contiene inulina como fuente de fibra y es baja en azúcar (<5g/100g), lo que la diferencia de productos similares que se encuentran actualmente en el mercado. Para valorizar la gominola funcional, se caracterizó por su perfil de compuestos bioactivos, capacidad antioxidante y antiosteoporótica; los resultados indicaron que, en comparación con los productos similares encontrados en la bibliografía, la gominola funcional sería un buen complemento antioxidante a una dieta saludable que esté acompañada de ejercicio físico diario.

Harían falta más estudios para establecer una relación directa entre el consumo de las gominolas funcionales y sus beneficios sobre la salud.

Palabras clave

Sambucus nigra, L., compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, capacidad antiosteoporótica, alimento funcional.

RESUMO

“Valorización dos compostos funcionais da boga de sabugueiro (*Sambucus nigra*, L.) cultivada en Galicia mediante o desenvolvemento dun produto funcional”

As bagas de sabugueiro (*Sambucus nigra*, L.) son un alimento historicamente utilizado polas súas propiedades medicinais, debidas fundamentalmente ao seu contido en compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas, compostos antioxidantes de gran interese na actualidade. No presente traballo, estúdanse as características bioactivas das bagas de sabugueiro, o zume e o seu subproduto (pel liofilizada), cultivadas no Norte da Península Ibérica pola empresa Veigas de Sabugueiro, S.L. para optimizar o seu uso no desenvolvemento dunha gominola funcional.

Os datos confirman que as matrices de sabugueiro analizadas conteñen maior cantidade de compostos fenólicos totais e maior capacidade antioxidante que os datos atopados na bibliografía e que outras froitas antioxidantes, polos tres métodos (TEAC, ORAC-Fl e FRAP). Ademais, os resultados mostraron efectos biolóxicos no ensaio *in vitro* co modelo celular de preosteoblastos de rato (MC3T3-E1), que suxire a capacidade de previr a osteoporose dos compostos presentes nestas matrices.

Utilizouse o zume de sabugueiro para o desenvolvemento dunha gominola funcional que serve para enriquecer a dieta con compostos antioxidantes, en particular con antocianinas. Obtívose unha formulación final que conta con boa valoración do panel de consumidores e que contén o 100% da inxesta recomendada de antocianinas en EEUU e o 80% da inxesta recomendada en EU. Ademais, contén inulina como fonte de fibra e é baixa en azucre (<5g/100g), o que a diferencia de produtos similares que se atopan actualmente no mercado. Para valorizar a gominola funcional, caracterizouse polo seu perfil de compostos bioactivos, capacidade antioxidante e antiosteoporótica; os resultados indicaron que, en comparación cos produtos similares atopados na bibliografía, a gominola funcional sería un bo complemento antioxidante a unha dieta saudable que estea acompañada de exercicio físico diario.

Farían falta máis estudos para establecer unha relación directa entre o consumo das gominolas funcionais e os seus beneficios sobre a saúde.

Palabras clave

Sambucus nigra, L., compostos fenólicos, capacidade antioxidante, capacidade antiosteoporótica, alimento funcional.

SUMMARY

“Valorization of functional compounds from Galician elderberry (*Sambucus nigra, L.*) by the development of a functional food product”

Elderberries (*Sambucus nigra, L.*) are a food historically used for their medicinal properties, mainly due to their content of phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins, antioxidant compounds of great interest nowadays. In the present work, the bioactive characteristics of elderberries, the juice and its by-product (freeze-dried skin), cultivated in the North of the Iberian Peninsula by the company Veigas de Sabugueiro, S.L., are studied in order to optimise their use in the development of a functional gummy jelly.

Data confirm that the elderberry samples analysed contain higher amounts of total phenolic compounds and higher antioxidant capacity than the data found in the literature and than other antioxidant fruits by the three methods (TEAC, ORAC-FI and FRAP). In addition, the results showed positive biological effects in the *in vitro* assay with mouse preosteoblast cell model (MC3T3-E1), suggesting the osteoporosis prevention capacity of the compounds present in these matrices.

Elderberry juice was used to develop a functional gummy that serves to enrich the diet with antioxidant compounds, in particular anthocyanins. A final formulation that is well rated by the consumer panel was obtained and contains 100% of the recommended intake of anthocyanins in the USA and 80% of the recommended intake in the EU. In addition, it contains inulin as a source of fibre and is low in sugar (<5g/100g), which differentiates it from similar products currently available on the market. To assess the functional gummy, it was characterised for its bioactive compound profile, antioxidant and anti-osteoporotic capacity; the results indicated that, compared to similar products found in the literature, the functional jelly bean would be a good antioxidant complement to a healthy diet accompanied by daily physical exercise.

Further studies are needed to establish a direct link between the consumption of functional gummies and their health benefits.

Keywords

Sambucus nigra, L., phenolic compounds, antioxidant capacity, antiosteoporotic capacity, functional food.

2. INTRODUCCIÓN

La planta de saúco es un arbusto caducifolio que crece en zonas húmedas, como boscosas, matorrales, setos o márgenes de los ríos y arroyos. La variedad que se cultiva en Europa es el *Sambucus nigra*, L., perteneciente a la familia de las Adoxáceas, y su uso histórico se debe en gran parte a sus propiedades medicinales.



Figura 1. (A) Planta de saúco, (B) flor de saúco, (C) baya de saúco cultivada en Dalvares, Portugal. Fuente: Correia Salvador (2017).

Las flores y las bayas (Figura 1) se han utilizado desde la antigua Roma para aliviar o curar múltiples enfermedades, principalmente resfriados, y como remedio laxante, diaforético y diurético, siendo consideradas como “el baúl medicinal de la gente común” (Dawidowicz et al., 2003). Actualmente, se ha demostrado que las bayas de saúco mitigan los síntomas de los trastornos respiratorios durante la infección de la gripe y varios productos farmacéuticos a base de saúco producidos industrialmente (Rubini®, Sambucol®, Sinupret®) ya se han testado clínicamente (Boroduske et al., 2021).

Las propiedades terapéuticas de las bayas de saúco se deben principalmente al contenido en compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas, compuestos caracterizados por su alta capacidad antioxidante. Son reconocidos como eliminadores de radicales libres capaces de proteger al cuerpo humano contra el estrés oxidativo, evitar el desarrollo de procesos inflamatorios, proteger los órganos humanos y los componentes celulares contra los daños y contra los procesos de peroxidación lipídica (Sidor & Gramza-Michalowska, 2015). Además, estos y otros compuestos volátiles le aportan el aroma característico del saúco, y los metabolitos primarios (azúcares y ácidos orgánicos) el sabor dulce y astringente (Vujanovic et al., 2020). Del color púrpura son responsables las antocianinas, que se sintetizan por la vía de los flavonoides y están muy extendidas en la naturaleza. Se consideran las principales responsables de los vibrantes colores rojo, azul y púrpura que presentan las verduras, las frutas y sus derivados, y que cambia en función del pH. Por ello, es un compuesto muy utilizado como colorante natural y como suplemento para productos alimenticios con valor añadido. A nivel industrial, es muy interesante la utilización de fuentes de antocianinas, por su valor nutricional, su perfil farmacocinético, sus mecanismos farmacológicos y sus propiedades beneficiosas para la salud, como la reducción de las enfermedades coronarias, efectos anticancerígenos/antitumorales, antidiabéticos y neuronales, como podemos ver en la Figura 2 (Gonçalves et al., 2021).

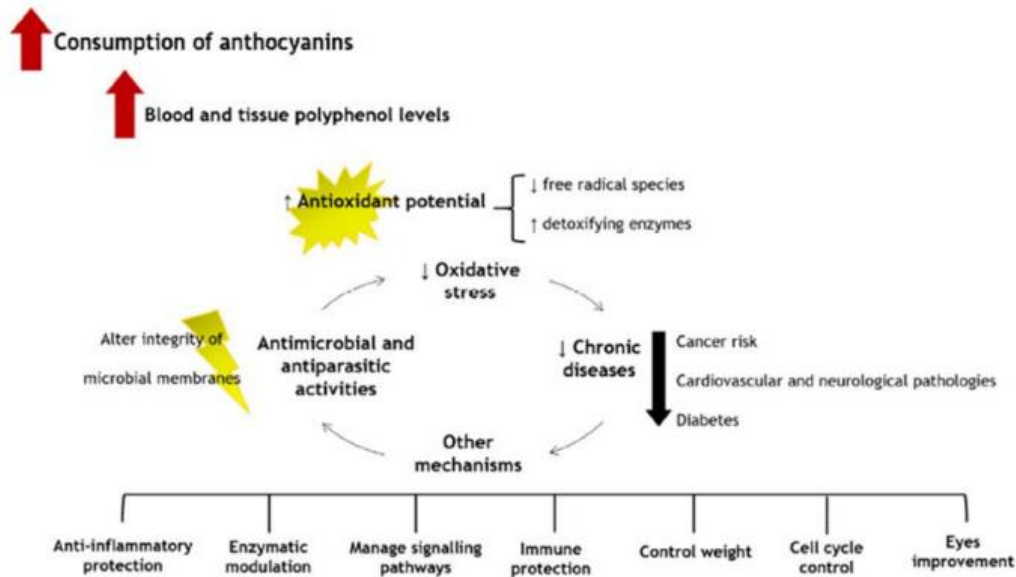


Figura 2. Descripción gráfica de los beneficios de las antocianinas según Gonçalves et al. (2021).

El estrés oxidativo y la inflamación son los mayores contribuyentes a la pérdida de densidad ósea (DMO), un importante problema de salud al que se enfrentan las poblaciones envejecidas (Manolagas, 2010). La pérdida progresiva de masa ósea y el deterioro de los tejidos se traduce en la enfermedad conocida como osteoporosis, por la que se calcula que una de cada tres mujeres y uno de cada seis hombres sufrirá una fractura osteoporótica a lo largo de su vida (Kanis et al., 2021). La baja adherencia a los tratamientos farmacológicos y los efectos secundarios han fomentado la investigación de las plantas medicinales ricas en antioxidantes y su relación con la salud ósea (Azam et al., 2020), en donde las antocianinas representan un importante papel. En Sakaki et al. (2020) concluyen que los alimentos ricos en antocianinas presentan un gran potencial para mejorar indicadores claves de la salud ósea, inhibiendo la actividad y diferenciación de los osteoclastos a la vez que promueven la actividad y formación de los osteoblastos.

Actualmente, las bayas de saúco están siendo objeto de una intensa investigación de mejora de su cultivo para incrementar el contenido de antocianinas. En concreto, investigadores portugueses publicaron recientemente los resultados de un estudio de tres años sobre cómo las condiciones de manejo agrícola afectan al contenido en compuestos antioxidantes de los frutos (Ferreira et al., 2020a). La bioquímica de la maduración del fruto del saúco es un programa genético que implica la degradación de la clorofila, la biosíntesis de antocianinas y su acumulación en vacuolas, con lo cual las bayas de saúco verdes abundan en flavonoides y sodio, mientras las bayas de saúco maduras registraron las mayores concentraciones de antocianinas (Martis et al., 2021). La optimización de los cultivos es muy interesante de cara a la utilización del saúco en el desarrollo de productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios.

En estudios recientes, se puede ver que los suplementos y productos a base de plantas están en expansión a nivel global (Figura 3). Entre 2018 y 2019 este mercado se estimó en 12 mil millones de euros con una proyección de crecimiento entre 18 y 45 mil millones de euros en 2026, con una tasa de crecimiento estimado de entre 4,89% y el 6,5% (Baladia et al., 2021). El creciente interés de los consumidores por su salud y por los beneficios de los alimentos funcionales con ingredientes naturales incentiva la creación e innovación en torno a estos productos y aplicar soluciones alternativas para mejorar su biodisponibilidad. En el caso de las antocianinas, Alvarez-Suarez et al. (2021) establece que factores como el procesamiento térmico y no térmico, el almacenamiento, la degradación oxidativa y los sistemas de encapsulación influyen estrechamente en su estabilidad y efectos biológicos. Por tanto, es necesario desarrollar sistemas efectivos que aumenten la estabilidad y la biodisponibilidad, mediante el uso de diferentes sistemas como la nanoencapsulación, la microencapsulación o los complejos de proteínas (Herrera-Blandrano et al., 2021).

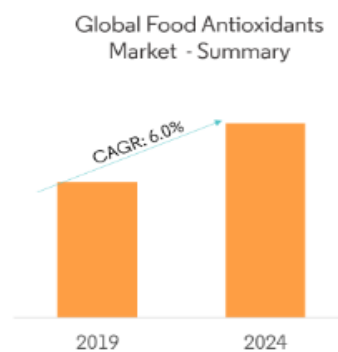


Figura 3. Tasa de crecimiento anual del mercado global de antioxidantes alimenticios. Fuente: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/food-antioxidants-market>

En el presente trabajo se estudia el contenido en compuestos polifenólicos de las bayas de saúco cultivadas en Galicia, con el objetivo de determinar cuál es la matriz más adecuada para su aplicación en el desarrollo de un producto funcional que enriquezca la dieta con compuestos antioxidantes. Siguiendo la información encontrada en la bibliografía, se decide elaborar una gominola funcional que contenga los ingredientes utilizados en Akhavan Mahdavi et al. (2016) para la microencapsulación de antocianinas naturales, que son maltodextrina y gelatina. Este formato de productos alimenticios son bien recibidos por un grupo amplio y heterogéneo de consumidores, desde niños a ancianos disfrutan con su consumo ocasional, y pueden ser un buen vehículo de compuestos funcionales (De Moura et al., 2019). Con el fin de que el producto tuviera las mejores características nutricionales, se estableció como objetivo un bajo contenido de azúcares, es decir, que no supere los 5 g de azúcares por cada 100 g de producto, como establece el Reglamento (CE) n° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Este trabajo final de carrera se enmarca en un proyecto colaborativo entre la empresa Veigas de Sabugueiro y ANFACO-CECOPESCA bajo el marco del programa Innovapeme, que busca financiar proyectos para mejorar la capacidad de innovación de pequeñas y medianas empresas en Galicia. El objetivo general es estudiar las características bioactivas de las bayas de saúco cultivadas en el Noroeste de la Península Ibérica y sus subproductos, para averiguar cuáles de las partes vegetativas del saúco podrían ser fuentes relevantes de metabolitos secundarios con alta actividad antioxidante, con la perspectiva de utilizarlos en formulaciones alimentarias o farmacéuticas.

3.2. Objetivos específicos

Primer objetivo

Caracterización del contenido en compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos totales, flavonoides y antocianinas) del extracto de baya de saúco, y los subproductos generados tras su obtención, mediante métodos espectrofotométricos.

Segundo objetivo

Caracterización funcional de los productos y subproductos del saúco, a través de la determinación de la capacidad antioxidante (CAO) por métodos espectrofotométricos (ORAC-FL, TEAC y FRAP) y estudio de la capacidad anti-osteoporótica en líneas celulares de pre-osteoblastos de ratón (MC3T3-L1).

Tercer objetivo

Estudio de la aplicación de los productos o subproductos del saúco en el desarrollo de un alimento funcional, desde la formulación, el análisis organoléptico, la caracterización nutricional, hasta el estudio de alegaciones nutricionales y de salud que enriquezca la dieta con compuestos antioxidantes.

4. METODOLOGÍA

4.1. Caracterización de las capacidades funcionales de la baya

4.1.1. Materia prima

Las muestras de bayas utilizadas para este estudio las proporcionó la empresa Veigas de Sabugueiro, SL, provenientes de sus plantaciones de saúco silvestre situadas en Vilar de Santos (Ourense). Cuenta con 500 plantas de saúco de la variedad autóctona: *Sambucus nigra*, L. Variedad Atlántica (Galicia y Norte de Portugal). Se cultivan siguiendo la normativa europea Reglamento (UE) 2018/848 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos y cuentan con el sello del Consello Regulador da Agricultura Ecolóxica en Galicia (CRAEGA) y se recogen en unas características óptimas de madurez (pH 3,2-3,8; Grados Brix: 6,5-7,2), factor importante debido al contenido de cianuro de las bayas verdes, que podrían ser tóxicas.

Se recibieron muestras de bayas frescas, de zumo y de bayas secas sometidas a un secado a 30°C, para proteger estas matrices percederas de los procesos de deterioro. A lo largo del proyecto se consideró también la evaluación del contenido en compuestos bioactivos en la baya liofilizada, para excluir que el proceso de secado alterara su composición en compuestos antioxidantes. Para analizar los compuestos bioactivos del bagazo obtenido tras la extracción del zumo (pieles y pepitas), se liofilizó y se trituró para no afectar a la repetibilidad de los análisis. A continuación, se separaron las pepitas de las pieles, que quedaron intactas, y se determinaron los compuestos bioactivos presentes solamente en la piel de baya liofilizada.

4.1.2. Determinación de compuestos fenólicos

Marco teórico

Los **compuestos fenólicos totales (CFT)** y los **flavonoides totales** se determinaron mediante el método espectrofotométrico en microplaca de Folin-Ciocalteu. El fundamento químico de este método es una reacción redox de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, que está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que se reduce por la oxidación de los fenoles (Muñoz-Bernal et al., 2017). Como patrones se seleccionaron el ácido gálico (AG) y la quercetina (QE), siendo respectivamente el ácido fenólico y el flavonoide mayormente utilizados para la cuantificación de CFT y flavonoides totales en estas matrices vegetales. Con los patrones preparados a la concentración de 1 mg/mL se realizaron los espectros de absorbancia de las moléculas, para determinar a qué longitud de onda se registraba la mayor absorbancia y por lo tanto optimizar la sensibilidad del método de detección. Los valores de absorbancia más altos se registraron a las longitudes de onda de 750 y 670 nm, respectivamente para AG y QE.

La determinación de **antocianinas** totales se realizó mediante un método espectrofotométrico basado en la transformación estructural reversible de las antocianinas que se produce en función del pH (coloreado a pH 1,0 e incoloro a pH 4,5; Figura 4). El contenido en antocianinas se determinó diluyendo los extractos en buffers de cloruro de potasio (pH=1.0) y acetato de sodio (pH=4,5), y midiendo la absorbancia a 500 y 700 nm (Zhu et al., 2015).

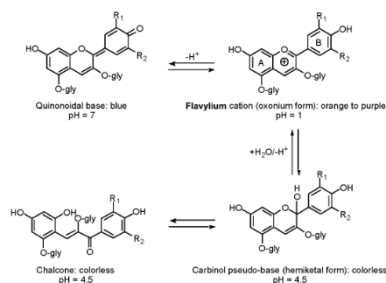


Figura 4. Formas estructurales predominantes de las antocianinas presentes en diferentes niveles de pH. Adaptado de Giusti & Wrolstad (2001)

Reactivos

Etanol (EtOH), ácido clorhídrico (HCl), cloruro de potasio (KCl), acetato de sodio (NaC₂H₃O₂), agua milli-Q, metanol (MeOH), reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), bicarbonato de sodio (Na₂CO₃), ácido gálico (GA), ácido fórmico 98-100% (Scharlau) y quercetina (Sigma-Aldrich).

Determinación de Compuestos Fenólicos Totales (CFT)

Sobre las muestras de saúco (0,1g) se añadieron 25 ml de metanol:agua (1:1) con un 0.1% de ácido fórmico. Esta mezcla se trató con ultrasonidos (JP Selecta™ ultrasons 1L) durante 5 minutos (Medina-Torres et al., 2007) y se agitó mecánicamente durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó a 3220xg (Eppendorf Centrifuge 5804 R), a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se conservó en refrigeración hasta que se llevó a cabo el ensayo.

El montaje de la placa se realizó según Bobo-García et al. (2015), con modificaciones de Sánchez-Rangel et al. (2013). Se procedió a añadir 20 µl de muestra a la microplaca de 96 pocillos, 100 µl de reactivo Folin-Ciocalteu (6/24 v/v), se agitó 30 segundos y se dejó reposar 4 minutos. A continuación, se añadieron 75 µl de solución Na₂CO₃ (7.5% m/v). Se observó el cambio de color amarillo, propio del Folin-Ciocalteu, a un color verde/azulado, perteneciente al molibdeno que indica que se está produciendo la reacción. Se dejó reposar en oscuridad durante 90 minutos y se leyó en el espectrofotómetro a 750 nm.

Los ensayos de extracción se realizaron por triplicado y, como parámetro de control interno de la precisión del método, se estableció que los valores de desviación estándar porcentual (RSD%), calculada para las tres repeticiones, se quedaran por debajo del 10%.

Determinación de flavonoides totales

Las muestras de saúco (0,1g) se mezclaron con 5ml de NaOH, según el método optimizado por Bonoli Vito et al. (2004) y se dejó reposar durante 20 horas. El siguiente paso es añadir 19 ml de metanol:agua (80:20) con 1 ml de ácido fórmico. Esta mezcla se trató con ultrasonidos (JP Selecta™ ultrasons 1L) durante 5 minutos y se agitó con vórtex durante 45

minutos. A continuación, se centrifugó a 3220xg, temperatura ambiente, por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se depositó en tubo falcon hasta llevar a cabo el ensayo.

La cuantificación de flavonoides totales se realizó mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu en microplaca según Meneses-Reyes et al. (2008) con modificaciones. Se procedió como está descrito en el apartado de determinación de compuestos fenólicos totales, con la lectura en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 670 nm.

También en este caso, los ensayos de extracción se realizaron por triplicado, y se aceptaron los datos que permitieran obtener una RSD% por debajo del 10%.

Determinación de antocianinas

Las muestras de saúco (0,2g) se mezclaron con 3 ml de solvente de extracción, 50% etanol (v/v) 0,6 mM HCl, y se mantuvieron en agitación mecánica (Eppendorf ThermoMixer® C) a 23°C durante 40 minutos. Se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5804 R) a 3050xg, durante 10 minutos. Mientras, se preparó el buffer de solución 0.025M KCl a pH 1 y el buffer de solución al 0.4M de acetato a pH 4,5 (Giusti & Wrolstad, 2001). Una vez estabilizado el pH, se separaron 3 ml de cada buffer por muestra en tubos diferentes. Sobre estos tubos, se añadieron 200 µl de sobrenadante de la extracción y se dejaron reposar durante 30-40 minutos. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia por triplicado a 500 nm y 700 nm de todos los tubos en placas de 96 pocillos, cargando 200 µl por pocillo. De esta manera, se determinó la absorbancia de la muestra a pH 1 y pH 4,5. Con los datos del espectrofotómetro, se calcula el total de antocianinas monoméricas (mg/100g) mediante la ecuación:

$$A \times MW \times 1000 / (e \times C)$$

Donde A es la absorbancia = (A500 – A700) pH1.0 - (A500 – A700) pH4.5; MW es el peso molecular del Cianidin-3-glucósido = 449,2, e es la absorción molar del Cianidin-3-glucósido = 26900 y C es el factor de dilución de las muestras en los buffers (Lee et al., 2005).

Los ensayos de extracción se realizaron por triplicado y como parámetro de precisión interno se estableció que los valores de RSD%, calculada para las tres repeticiones, se quedara por debajo del 15%. El resultado se expresa en mg antocianinas/100g muestra.

4.1.3. Determinación de la capacidad antioxidante

Marco teórico

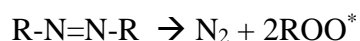
Para la determinación de la capacidad antioxidante (CAO) se empleó el método TEAC, el método ORAC-Fluoresceína y se puso a punto el método FRAP. Estas técnicas espectrofotométricas se caracterizan por tener diferentes mecanismos de reacción (transferencia de electrones o transferencia de átomos de hidrógeno) y sensibilidad. Además, los radicales tienen diferentes potenciales antioxidantes al reaccionar con los compuestos fenólicos, pueden disolverse de forma diferente y pueden tener diferentes afinidades por otros compuestos presentes en las muestras. Los métodos también difieren en su punto final, el

método de cuantificación y la posibilidad de medir antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (Shahidi & Zhong, 2015).

El valor del cálculo de la CAO se expresa en la unidad de medida “equivalentes de Trolox (TE)”, que es un análogo hidrosoluble de la vitamina E.

El **método TEAC** (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) permite detectar la presencia de compuestos antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos en alimentos, sustancias puras, así como antioxidantes de plasma (Re et al., 1999). Este ensayo mide la capacidad de los antioxidantes de neutralizar el radical catiónico ABTS^{o+}, que es un cromógeno soluble con color verde que se puede determinar espectrofotométricamente a 405 nm. Este catión se genera a partir de su precursor ABTS (2,2-azinobis- (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)) en presencia de persulfato de potasio, el oxidante más utilizado para esta reacción, tras un reposo de 12-16 horas en ausencia de luz (Zulueta et al., 2009). La cantidad de dicho radical disminuye en presencia de compuestos antioxidantes donadores de electrones o de átomos de hidrógeno, equilibrio determinado por la estructura del antioxidante y el pH del medio (Prior et al., 2015). Este radical ABTS^{o+} se decolora en presencia de compuestos antioxidantes y se mide la disminución de la absorbancia a 734 nm mediante cinética o punto final (Shahidi & Zhong, 2015).

El **método ORAC-FI** (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) determina la CAO mediante un método fluorimétrico. Se basa en la oxidación de la fluoresceína (FI) por un radical peroxil-ROO generado por la descomposición térmica en presencia de oxígeno del agente oxidante AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro), como se indica a continuación:



La generación de radicales peroxilo es sensible a la temperatura, siendo este uno de los factores principales que interfieren con los resultados. Se recomienda incubar el tampón a 37° antes de la disolución del AAPH para reducir la variabilidad intra-ensayo (Prior et al., 2015).

Los antioxidantes presentes en la muestra a analizar retrasan la oxidación de la fluoresceína por el radical peroxilo, que conforme se va oxidando pierde la fluorescencia. Este decaimiento de la fluorescencia permite construir un conjunto de curvas cinéticas que se representan gráficamente en la Figura 5 y que permite comparar el área bajo la curva en presencia de antioxidantes con el área de un ensayo en blanco sin antioxidantes. A mayor concentración de compuestos antioxidantes, el decaimiento de la fluorescencia se va desplazando a la derecha, aumentando el área bajo la curva (Shahidi & Zhong, 2015). Para el cálculo de la CAO se utilizan las fórmulas expuestas en Ou et al. (2001).

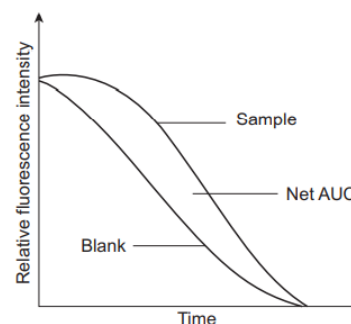


Figura 5. Representación de la curva de decaimiento de la fluoresceína en el ensayo ORAC-FI (Zhong & Shahidi, 2015).

El **método FRAP** (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) se empleó originalmente para medir el poder reductor en el plasma, pero su uso se ha extendido para evaluar la actividad antioxidante en otros fluidos biológicos, alimentos y zumos de plantas (Benzie & Strain, 1996). Al igual que el método TEAC, se basa en la capacidad de los antioxidantes de reducir un compuesto, en este caso un complejo ligando-Fe³⁺ a ligando-Fe²⁺, en medio ácido. La reacción de reducción del hierro se produce a través del reactivo FRAP, formado por buffer de acetato de sodio (300 mM, pH 3,5), una solución de FeCl₃ (20 mM en agua) y una solución de TPTZ (2, 4, 6-tripiridyltriazine) (10 mM en 40 mM HCl), que es donde se forma el complejo ligando de unión al hierro Fe-TPTZ (Mustafa, Sezai, & Murat, 2009). Esta reacción genera una coloración azul/morada, con una intensidad proporcional a la capacidad reductora de la muestra, que se cuantifica por espectrofotometría a una longitud de onda de 593 nm (Shahidi & Zhong, 2015).

Reactivos

Acetona, agua milli-Q, ABTS (2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametocromano-2-carboxílico) (Alfa Aesar), persulfato de potasio (K₂S₂O₈) (Scharlau), PBS (tablet Calbiochem®), etanol absoluto (CH₃OH), AAPH (2, 2'-azobis(2-methylpropionamide)) (Cientisol), RMC (Random methyl-BCD (DS~12)) (Cientisol), sodio de fluoresceína (Sigma), hidrogenofosfato de sodio dihidratado (Na₂HPO₄·2H₂O y KH₂PO₄), acetato de sodio (C₂H₃NaO₂), TPTZ (2, 4, 6-tripiridyltriazine), cloruro de hierro (FeCl₃), ácido acético (C₂H₄O₂), ácido clorhídrico (HCl).

Método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

El ensayo se ha llevado a cabo siguiendo el método desarrollado por Re et al. (1999), y adaptado según el protocolo del kit Oxiselect™ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assay Kit (ABTS) (Cell Biolabs, inc).

Se realizó una doble extracción sobre las muestras. En primer lugar, con una solución 100 mM tampón fosfato (PBS) (pH 7,4) a una concentración de 100 mg/ml y, en segundo lugar, sobre el pellet restante, el mismo volumen de acetona 100%. El patrón de referencia fue una solución de Trolox (análogo sintético de la vitamina E) en un rango de 9,4-300 μM. Se probaron 5 diluciones por muestra, en función de su CAO, para que el porcentaje de inhibición quedara en el rango entre 20-80% (Zulueta et al., 2009). El ensayo se realizó en microplaca transparente de 96 pocillos y se leyó la absorbancia durante 6 minutos a 734 nm. El resultado final se expresa en μTE/g de muestra.

Método ORAC-FL (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

El método ORAC-FL, que se desarrolló originalmente para medir antioxidantes hidrofílicos, se ha adaptado para detectar la capacidad antioxidante de las muestras en su fracción hidrofílica y lipofílica alternando la fuente de radicales y el disolvente utilizado (Prior et al., 2003). Para la fracción lipofílica se utilizó la β-ciclodextrina metilada al azar como potenciador de la solubilidad, en concreto una solución al 7% de RMCD (Random methyl-

BCD (DS~12)) en acetona/agua (50:50, v/v) (Huang et al., 2002). Para la fracción hidrofílica se utilizó una solución en tampón fosfato (PBS).

Tras buscar en la bibliografía la forma idónea de preparar las muestras de zumo de baya de saúco se encontró que en Ou et al. (2001) seguían un protocolo diferente al que se tenía estandarizado. Se llevó a cabo el ensayo con las dos formas de preparación de muestras y el resultado fue bastante similar, por lo que se decidió seguir el mismo protocolo. Por tanto, se realizó en primer lugar una doble extracción con hexano 100% para la fracción lipofílica y una solución de acetona/agua/ácido acético (70:29,5:0,5, v/v) sobre el pellet restante para la fracción hidrofílica. Esta última se utilizó directamente mediante cinco diluciones seriadas en tampón fosfato, mientras que la primera se evaporó en un baño termostataado a 30° bajo flujo de nitrógeno. Para llevar a cabo la determinación, se resuspendió en acetona y, a continuación, en solución al 7% de RMCD. Se analizaron en series de cinco diluciones en el mismo solvente utilizando una solución de Trolox como patrón antioxidante de referencia.

El ensayo se realizó en microplaca de fluorescencia de 96 pocillos manteniendo una temperatura 37°C durante la lectura.

Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La primera fase de la puesta a punto de un método es realizar una búsqueda bibliográfica actualizada. En este caso, todos los estudios revisados utilizan la misma solución para llevar a cabo la reacción de reducción, que es el agente FRAP. Esta solución está compuesta por una proporción 10:1:1 de, respectivamente, buffer de acetato de sodio (300 mM, pH 3,5), FeCl₃ (20 mM en agua) y TPTZ (10 mM en 40 mM HCl) (Benzie & Strain, 1996).

Son varios los compuestos que se utilizan para el patrón, siendo los más habituales Trolox y FeSO₄ (Pulido et al., 2000). Se realizan pruebas comparativas con Trolox vs Quercetina, y como se puede observar en la Figura 6, el Trolox se mantiene estable a lo largo del tiempo, mientras que la quercetina sigue reaccionando. Se decide utilizar la solución de Trolox, que tras varias pruebas, se establece una recta patrón de 500-25 µM (Granato et al., 2015). Se han hecho pruebas de cinéticas hasta 150 minutos y la diferencia es despreciable, como se puede ver en la Figura 7.

El tiempo de lectura en la bibliografía varía entre 30-60 minutos, aunque, por lo que se ha comprobado, todo dependerá de la CAO de la muestra. Para los productos del *Sambucus nigra* se ha decidido tomar una medida de la absorbancia cada 30 minutos hasta 120 minutos.

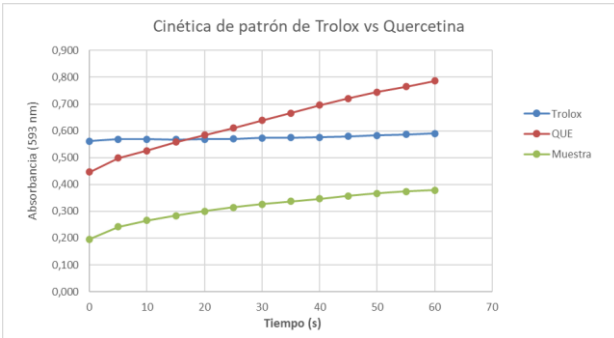


Figura 6. Gráfica que representa la absorbancia (nm) del patrón de TE y QE hasta t=60 minutos en el ensayo FRAP

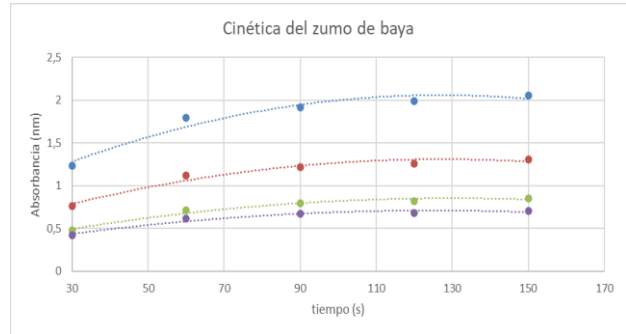


Figura 7. Gráfica que representa la absorbancia (nm) de las muestras de zumo de baya a lo largo de 60 minutos en el ensayo FRAP

Tabla 1. Esquema de los diferentes métodos de extracción utilizados para las muestras de saúco en el ensayo FRAP.

Única extracción	Doble extracción	Doble extracción sin Ultrasonido	Doble extracción con Ultrasonido
Solución 50% (v/v) etanol:agua pH 3,6 70°C 30 min	1ª Buffer de acetato 60°C, 30 min	1ª 50% etanol pH 3,5 60°C 30 min	1ª 50% etanol pH 3,5 60°C 30 min
	2ª solución al 70% acetona sobre el pellet 60°C, 30 min	2ª solución al 70% acetona sobre el pellet 60°C, 30 min	2ª solución al 70% acetona sobre el pellet 60°C, 30 min

Se probaron cuatro métodos de extracción para las muestras de saúco que se especifican en la Tabla 1. Después de varias pruebas, se estableció un protocolo para el método FRAP que consiste en la extracción de las muestras por: doble extracción sin ultrasonidos a una concentración de 100 mg/ml con una primera fase con una solución al 50% etanol a pH 3,5 (acidificado con ácido fórmico) durante 30 minutos a 60°C con agitación (Dominguez et al., 2020). Tras la centrifugación (10 minutos a 3220xg) se retira el sobrenadante, que se usó para la determinación de esta fracción, con sus diluciones correspondientes. A continuación, se añadió el mismo volumen de una solución al 70% de acetona sobre el pellet, y se agitó durante 30 minutos a 60°C. Tras la centrifugación (mismas condiciones) se retiró el sobrenadante que se utilizó para determinar la fracción acetónica (para compuestos menos polares).

El ensayo se llevó a cabo en microplaca de 96 pocillos, siguiendo la adaptación de Firuzi et al. (2005), y se leyó a una longitud de onda de 593 nm.

4.1.4. Determinación de la capacidad de prevenir la osteoporosis

Marco teórico

Para determinar la capacidad de un compuesto de prevenir la osteoporosis se realizaron una serie de ensayos *in vitro* que estudian su actividad biológica respecto a cómo estimulan la

proliferación y diferenciación de los preosteoblastos (células de preosteoblastos de ratón no sexuadas), frente a un control negativo.

La **proliferación celular** se midió por el ensayo de citotoxicidad con metil tiazoyl terazolium (MTT), que mide tanto la tasa de proliferación celular como la reducción de su viabilidad. El MTT se reduce y forma cristales de formazán, un compuesto de color azul, por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (SDH). Tras un tiempo de reposo, los cristales de formazán se disuelven y se cuantifican mediante espectrofotometría. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, por lo que se calcula el % de viabilidad mediante la ecuación: $\% \text{ viabilidad} = \text{ABS}_{\text{células tratadas}} / \text{ABS}_{\text{células control}} \times 100$. Este ensayo, siendo el más rápido, se realizó en las células MC3T3-E1 como test de screening, para eliminar del ensayo los tratamientos en concentraciones citotóxicas y determinar cuáles someter a los ensayos siguientes (Huang et al., 2018).

En caso de que los tratamientos aumenten la proliferación celular, se midió su **capacidad de estimular la diferenciación** de los preosteoblastos en osteoblastos maduros (Chung et al., 2016). Este ensayo parece ser el más informativo sobre el efecto preventivo contra la osteoporosis en células MC3T3-E1. Para ello, se realizó la prueba de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), que se considera un marcador temprano e inequívoco de la diferenciación de los osteoblastos y una medida directa del grado de actividad celular (Xu et al., 2011; Huang et al., 2018). Se trata de un marcador específico de células óseas que es expresado por las células durante la fase de maduración de la matriz. La expresión de la enzima ALP por parte de las células refleja que éstas se están diferenciando para realizar la formación y mineralización del hueso (Mohammad et al., 2016).

Reactivos

Línea celular de pre-osteoblastos de ratón (*Mus musculus*) MC3T3-E1 Subclone 4 (ATCC[®] CRL2593), medio de crecimiento (α Minimum Essential Medium (α MEM) suplementado), suero fetal bovino (FBS), mix de antibióticos (penicilina y estreptomina) (Sigma, P4333), medio de diferenciación (MD), ácido ascórbico (Sigma), β -glicerofosfato, desametasona, metil tiazoyl terazolium (MTT Cell Proliferation Assay Kit, Cayman chemicals), cristal disolver (MTT *cell proliferation assay kit*, Cayman chemicals), PBS (P3813, Sigma), tritón X-100, Trizma[®] hydrochloride (Sigma), cloruro de sodio (NaCl), Alkaline Phosphatase Activity Colorimetric Assay kit (K412-500, BioVision), Pierce 660nm Protein Assay Reagent (22660, Thermo Scientific), albúmina bovina (BSA, Sigma).

Preparación de las muestras

Se prepararon las muestras siguiendo el protocolo utilizado para la determinación de CFT, se evaporaron, se resuspendieron en medio de crecimiento y se ajustó el pH a $7,4 \pm 0,2$ para poder trabajar con un pH compatible con la fisiología celular. Posteriormente, se esterilizaron las muestras con filtros de jeringa ($0,2 \mu\text{m}$), y se prepararon cuatro diluciones seriadas en condiciones de esterilidad.

Ensayo de proliferación de los osteoblastos

Este ensayo se realizó en microplaca de 96 pocillos, empezando con la adición de suspensión celular a una concentración de $1,6 \times 10^5$ células/ml en el medio de crecimiento, medida mediante citómetro (Shrecker, Millipore), y se dejó incubando durante 96 horas. Pasado ese tiempo, se añadieron los tratamientos a estudio (muestra de piel liofilizada y zumo de baya) mediante cuatro diluciones seriadas y, tanto el tratamiento y los controles, se replicaron por cuatriplicado. Se dejaron incubar 7 días en óptimas condiciones de crecimiento. Para evaluar la proliferación se adicionó el reactivo MTT a la microplaca, como indica en el protocolo del kit (MTT Cell Proliferation Assay Kit), y se mide la absorbancia (Figura 8) a 570 nm mediante espectrofotómetro.

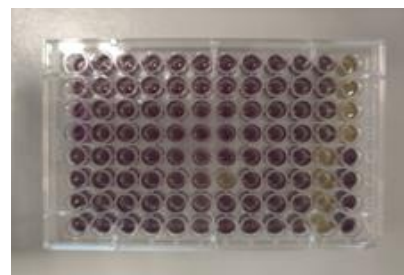


Figura 8. Imagen del ensayo en microplaca de MTT. Fuente: elaboración propia.

Ensayo de diferenciación de los osteoblastos

El ensayo de diferenciación se realizó en microplaca de 24 pocillos, con la adición de suspensión celular a $1,8 \times 10^5$, en el medio de diferenciación sugerido por la literatura, y se deja incubar durante 24h hasta confirmar visualmente la confluencia de las células MC3T3-E1 en el pocillo. Pasado ese tiempo, se reemplazaron los pocillos con los tratamientos y los controles por medio de diferenciación y de crecimiento. Se dejaron incubar en condiciones óptimas de crecimiento durante 7 días, cambiando los tratamientos y controles cada 2/3 días. En la bibliografía se encontraron ensayos de 7, 14 a 21 días (Chung et al., 2016; Fu et al., 2017; Hong et al., 2010; Mohammad et al., 2016) pero en este caso al séptimo día se pudo comprobar la diferenciación celular por observación directa de las células al microscopio invertido. Esto podría ser debido al número de pases a los que se ha sometido la línea celular, factor muy importante en las células MC3T3-E1, por el cual se debe evitar utilizar células sometidas a un número de pases mayor a 30 (Yan et al., 2014).

Se retiraron las células de los pocillos según el protocolo descrito en el trabajo de Liu et al. (2015):

1. Lavar los pocillos dos veces con tampón fosfato (PBS) (pH 7,4)
2. Añadir 0,4 ml de la solución tampón de lisis celular
3. Dejar actuar el tampón en ligera agitación y a temperatura ambiente durante 30 minutos
4. Retirar el contenido de los pocillos en unos tubos Eppendorf no estériles, prestando atención en retirar también restos de sólidos eventuales
5. Centrifugar las muestras a 13000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente

Medición de la producción de fosfatasa alcalina (ALP test)

Para medir la actividad de la fosfatasa alcalina se utilizó el ensayo Alkaline Phosphatase Activity Colorimetric Assay Kit (K412-500, BioVision) en microplaca de 96 pocillos. Este kit utiliza p-nitrofenil fosfato (pNPP) como sustrato de fosfatasa, que se vuelve amarillo al ser convertido en la forma desfosforilada, el p-nitrofenol (pNP) por la enzima ALP. La cantidad de fosfatasa alcalina puede, por tanto, cuantificarse de forma fiable mediante la lectura de la cantidad de pNP acumulada tras la reacción catalítica a 405 nm en un espectrofotómetro.

Determinación del contenido total de proteínas

Para tratar los resultados del ensayo ALP se normalizó el contenido de células entre los pocillos, según el número de células presentes en cada pocillo. Se normalizó mediante la cuantificación del contenido total de proteínas con el kit Pierce 660 nm Protein Assay Reagent. método espectrofotométrico en microplaca de 96 pocillos. El ensayo se basa en la unión de un complejo de metal-colorante que cambia la absorción máxima del tinte (de marrón a verde) al unirse a la proteína. El cambio de color se produce mediante la desprotonación del colorante a pH bajo, facilitada por interacciones con grupos de aminoácidos de las proteínas cargados positivamente. El color producido en el ensayo es estable y aumenta en proporción a una amplia gama de concentraciones crecientes de proteína. Como patrón se utilizó albumina bovina (BSA) (200-0,0625 mg/ml) y se leyó la absorbancia a 660 nm.

4.2. Desarrollo de un producto funcional a base de zumo de saúco

El primer paso del proceso de desarrollo de la gominola funcional fue realizar una búsqueda de productos similares que se encuentran actualmente en el mercado, específicamente de gominolas a base de zumo concentrado de saúco, para tener una idea de porcentaje de saúco e ingredientes adicionales que contienen. Se ha utilizado la base de datos Mintel GNDP, que estudia el lanzamiento de nuevos productos a nivel mundial. El zumo de saúco no tiene una ingesta diaria recomendada, por lo que la cantidad que contienen los productos revisados presenta un rango muy amplio que va desde 8 a 500 mg/unidad de producto. El saúco se incorpora como zumo, concentrado de zumo y zumo en polvo concentrado.

Este tipo de productos se encuentran siempre suplementados con vitamina C, normalmente cubriendo la ingesta diaria recomendada, vitaminas del grupo B, minerales como el zinc, magnesio, y habitualmente con extractos de hierbas como la equinácea o la hiedra. El porcentaje de azúcar suele representar el 40-60% del producto, en forma de azúcar blanco o sirope de glucosa o fructosa, y la cantidad de fibra es despreciable.

Selección del alimento base e ingredientes funcionales

Lo que hace a un producto ser funcional es la presencia de ingredientes que van a proporcionar un efecto beneficioso sobre la salud humana más allá de su papel nutricional en

condiciones de uso estándar. Los ingredientes, y la justificación de su uso, utilizados para el desarrollo de la gominola funcional son:

ZUMO DE SAÚCO. Como matriz y base principal del producto se utilizó el zumo de baya de saúco por su contenido en antocianinas. Esta matriz cumple, además, la función de aportar el contenido acuoso, necesario para disolver los agentes gelificantes, edulcorantes y otros ingredientes funcionales.

GELATINA. La gelatina es uno de los agentes gelificantes más utilizados, se elabora a partir de colágeno presente en la piel y huesos de animales (en este caso, ganado bovino), por lo que está formada fundamentalmente por aminoácidos, pero también por minerales y cenizas (Harris et al., 2003). Es uno de los agentes gelificantes más utilizados para las gominolas, ya que proporciona cualidades gelificantes que no se obtienen con otros productos y que dependen de factores fácilmente controlables como la concentración de gelatina, la fuerza (Bloom) y el punto de fusión.

Se realizaron pruebas con pectina, para que el producto fuera apto para consumidores veganos, pero no fue posible por la dificultad para obtener un producto gelificado y que cumpliera las condiciones establecidas.

SACAROSA (AZÚCAR BLANCO DE CAÑA). Las gominolas, aunque sea un producto funcional, deben tener una sensación dulce en boca. En este caso, se decidió utilizar la sacarosa, no solo por ser uno de los azúcares más utilizados en estos productos (junto con el jarabe de glucosa), sino también por las características que aporta a la textura, ya que los azúcares simples pueden contribuir a un aumento en la resistencia del gel, propiedad importante para este producto.

MALTODEXTRINA. La maltodextrina se usa generalmente como espesante o para aumentar el volumen de un alimento procesado y conservante que aumenta la vida útil del producto. En este caso, se utilizó para sustituir la función de retención de humedad y la texturización que aporta la sacarosa. Además, la maltodextrina en presencia de inulina produce un efecto sinérgico que mejora la textura de los productos (Barazandegan et al., 2013).

INULINA. Para el aporte de fibra se utilizó inulina de achicoria, ingrediente habitual en los productos funcionales para reemplazar azúcares, como edulcorante de contenido calórico reducido, y grasas, como agente de relleno, por su capacidad de retención de agua, de formar gel o por su capacidad para modificar la textura (Ilievska et al., 2018). Se suele utilizar tanto por sus propiedades tecnológicas, como por sus ventajas nutricionales de alimento prebiótico (Handa et al., 2012). La fibra no es degradada por los enzimas del estómago y del intestino delgado, influyendo en la absorción de nutrientes, aumenta la viscosidad del contenido

gástrico retrasando el vaciado del estómago y prolongando la sensación de saciedad (Escudero Álvarez & González Sánchez, 2006).

ÁCIDO L-ASCÓRBICO. Es un compuesto con actividad vitamínica, eliminadora de radicales libres y es capaz de proteger el cuerpo humano contra el estrés oxidativo y los procesos de peroxidación lipídica (Lutsenko et al., 2002; Taniguchi et al., 2012). Se usa principalmente como suplemento dietético y como antioxidante, para proteger los alimentos de la oxidación y los agentes patógenos.

ÁCIDO CÍTRICO. El ácido cítrico se utiliza en estos productos por dos razones principalmente: para disminuir el pH a un rango adecuado para la conservación de las antocianinas y con el fin de evitar el crecimiento bacteriano, y para aportar sabor.

VITAMINA B₆. La piridoxina se utiliza como suplemento vitamínico al producto, por sus propiedades beneficiosas para la salud y por los estudios recientes que confirman que posee capacidad antioxidante y que puede aumentar la resistencia de un organismo al estrés oxidativo (Škorňa et al., 2016).

4.2.1. Desarrollo de prototipos del producto funcional a base de saúco

Ingredientes

Zumo de baya proporcionado por Veigas de Sabugueiro S.L, gelatina Halal 250 bloom de origen bovino (Inka foods, Cientisol), sacarosa (Azucarera), maltodextrina (Cientisol), inulina de achicoria (Orafti® GR, Beneo-Orafti, Bélgica), ácido ascórbico (E-300, Panreac ITW companies, food grade), ácido cítrico (E-330, Scharlau) y vitamina B₆ (Scharlau).

Formulaciones

Antes de comenzar con las formulaciones funcionales, se utilizó una formulación control para ajustar los métodos de elaboración con la tecnología disponible en la planta piloto. Se estudiaron diferentes variables de temperatura, tiempo, velocidad de agitación, orden de adición de ingredientes y condiciones de secado.

Se realizaron varias formulaciones en las que se probaron diferentes ingredientes y porcentajes de cada uno de ellos para conseguir la formulación final. Como criterio de exclusión de cada formulación se utilizaron las respuestas del análisis organoléptico que se llevó a cabo entre el personal de I+D de ANFACO-CECOPECA.

Dado que la formulación de la gominola funcional es confidencial, se representará mediante símbolos la inclusión o exclusión y aumento o disminución de los ingredientes seleccionados (Tabla 2). Todas las formulaciones se hicieron siguiendo el mismo proceso de elaboración descrito a continuación.

Tabla 2. Composición de ingredientes de las formulaciones estudiadas en las pruebas de gominolas funcionales

Ingredientes	Formulación 1		Formulación 2		Formulación 3	
	1A	1B	2A	2B	3A	3B
Zumo de baya de saúco	●	●	●	●	●	●
Gelatina	●	●	●	●	●	●
Azúcar	●	●	●	●	●	●
Maltodextrina	○	○	○	○	○	●
Inulina	○	○	●	●	●	●
Ácido ascórbico	○	●	●	●	●	●
Ácido cítrico	●	●	●	●	●	●
Vitamina B ₆	○	○	○	○	●	●

Representación de los ingredientes que conforman las distintas formulaciones: el símbolo ● representa la presencia del ingrediente y el símbolo ○ representa su ausencia.

Proceso de elaboración

Los productos funcionales se elaboraron a escala laboratorio en las instalaciones de la planta piloto del Centro de Tecnologías Avanzadas de Investigación para la Industria Marina y Alimentaria (CYTMA), siguiendo un procedimiento adaptado de la elaboración industrial (que se detalla en la Tabla 2). A continuación, se describen las etapas del proceso de fabricación.

PREPARACIÓN PREVIA. Tras la descongelación de la materia prima, se trata el zumo a temperatura cercana a 100°C, durante 35 minutos, con agitación a 3220xg. Este paso lo introducimos para eliminar la carga microbiológica que pueda tener el zumo y eliminar cualquier resto de ácido cianhídrico que pudiese quedar. La baya verde del saúco es ligeramente tóxica debido a la presencia de glucósidos cianogénicos, sambunigrina en el caso del saúco, que actúan como defensa de la planta frente a depredadores y que al ingerirse liberan ácido cianhídrico (cianuro). Los glucósidos cianogénicos se reducen durante la maduración y el cianuro se destruye con el proceso térmico. La baya puede contener 3 mg de ácido cianhídrico HCN/100 g de baya fresca (Ciocoiu et al., 2016) y que se puede reducir en un 44% en el zumo de saúco con el tratamiento térmico (Senica et al., 2016). Por lo tanto, un extracto obtenido a partir de bayas maduras y sometido a tratamiento térmico es poco probable que exceda la dosis de cianhídrico que resulta potencialmente tóxica (20 µg/Kg de peso). Se embotelló en porciones de 500 ml y se congeló a -19,0°C.

ACONDICIONAMIENTO. Previo a la adición del resto de ingredientes, se atemperó el zumo de baya en el robot de cocina Companion XL (Moulinex), hasta 50°C (que es la

temperatura mínima para disolver la inulina) y se añadió la cantidad elegida de sacarosa. Una vez disuelto el azúcar, se añadió la maltodextrina y se agitó a velocidad 2 durante 4 minutos, manteniendo la temperatura.

GELATINIZACIÓN. Se añadió la gelatina en dos partes, para evitar apelmazamiento. Se agitó a velocidad 4, durante 5 minutos, manteniendo la temperatura.

AGITACIÓN. Los factores que influyen en la formación del gel de inulina son: la velocidad de agitación, la temperatura, el pH, la concentración de inulina y el tiempo. Según la bibliografía, la inulina comienza a disolverse a partir de 50°C (1.2% (m/v)), y la temperatura más favorable para ello sería 90°C (logrando disolver el 34% (m/v)) durante 5 minutos. Llegar a esta temperatura no es beneficioso para este producto, porque se ha comprobado que a temperaturas mayores a 70°C la presencia de azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa) aumenta la degradación de antocianinas (Cao et al., 2009), por lo que se opta por aumentar la velocidad de agitación hasta la máxima disponible robot de cocina Companion XL (Moulinex). Bajo estas condiciones (50°C, velocidad máxima, a la concentración que contiene el producto, a pH<4), se lograría formar el gel de inulina al 100% (Kim et al., 2001).

Por tanto, para la formación del gel de inulina en este producto, se aumentó la agitación hasta el máximo nivel disponible (velocidad 10) durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se redujo la velocidad de agitación (300 rpm) para estabilizar la formación del gel y que la capa de burbujas que se forma se elimine.

ADICIÓN DE VITAMINAS. Una vez esté estable la solución, se reduce la temperatura a 20°C, momento en el que se añade el ácido ascórbico, la vitamina B₆ y el ácido cítrico. El procesamiento y la cocción provocan la degradación de vitaminas, siendo la vitamina C (ácido ascórbico) la más termolábil y la que más interesa preservar. Su degradación aumenta entre los 20°C y los 50°C (Bauernfeind & Pinkert, 1970), pero la gelatina se gelifica a temperaturas en torno a los 15°C, por lo que se establece que disminuir a 20°C es la mejor opción. Según Akyildiz et al. (2021) el uso de una temperatura relativamente suave (75 °C) para el tratamiento térmico y una temperatura de almacenamiento inferior a 25 °C es óptimo para mantener el contenido de ácido ascórbico del producto.

MOLDEADO. Para el moldeado de las gominolas funcionales se utilizaron cuatro moldes antiadherentes de silicona de grado A con forma de cilindros de 2x2. Se añadió el producto líquido decantando la jarra del robot en todos los recipientes y se nivela el contenido con un cuchillo de carnicero de acero inoxidable. En la industria, el moldeado se lleva a cabo en moldes impresos de harina de maíz previamente acondicionada para provocar un secado superficial.

ENFRIADO. Se mantuvieron los bordes en una superficie plana a temperatura ambiente hasta que se solidificó, aproximadamente tres horas. Se conservaron en un refrigerador a 4°C

durante 24 horas sin ventilación. En la industria, durante el enfriado se someten a un secado en cámaras climáticas con aire circulante (30% H.R. y 25°C).

DESMOLDADO. Pasado ese tiempo, las gominolas se desmoldaron mediante el volteo de cada recipiente individual y estirando los moldes, con especial cuidado de que no se rompan. Se probó a añadir harina de maíz (maicena) para que se produjera un secado superficial previo, pero no dio los resultados esperados. Complicó el desmoldado de las gominolas.

SECADO. En la planta piloto no se disponía de las herramientas necesarias para producir un secado controlado de las gominolas funcionales. Esta fase es fundamental para estos productos, ya que, según las condiciones de humedad relativa, temperatura, ventilación y tiempo se puede modificar la textura final. Lewis (1993) concluye que las gominolas elaboradas con los mismos ingredientes, pero distintas condiciones de fabricación dieron resultados de textura diferentes.

Para estas elaboraciones se probaron dos métodos de secado en frío. El primero en cámara de refrigeración a 4°C sin control de humedad relativa durante 72 horas. El segundo, en un desecador (Inpromar) a la temperatura ambiente de la planta industrial, 17°C, sin control de humedad relativa. El mejor resultado se dio con la cámara de refrigeración.

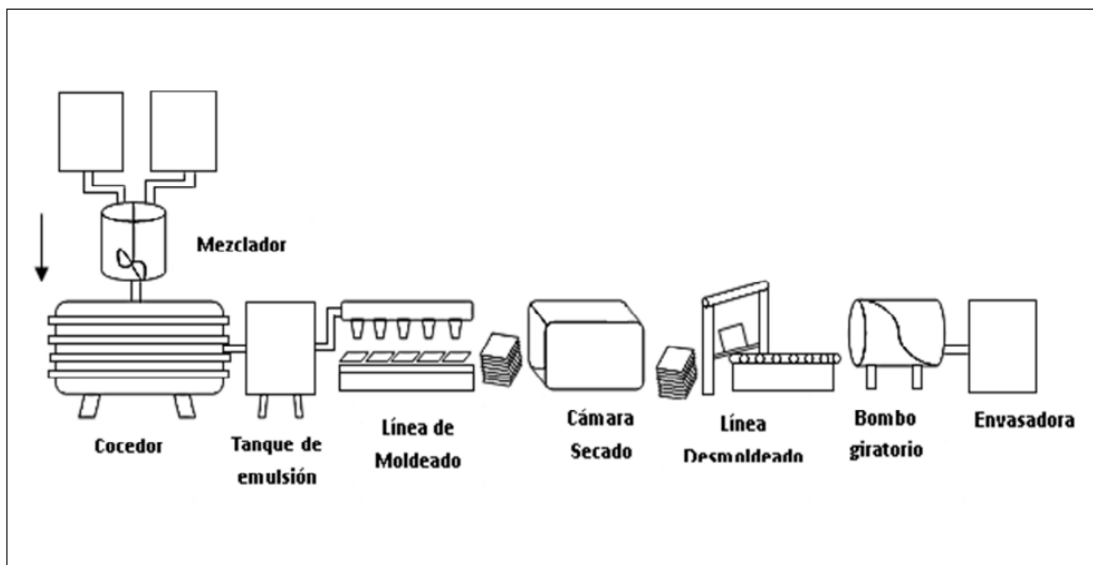


Figura 9. Esquema del proceso industrial de fabricación de gominolas. Fuente: Delgado Estrella (2017).

4.2.2. Evaluación del diseño

4.2.2.1. Análisis físico-químico

Determinación del pH

Para la determinación del pH de las gominolas funcionales se trituraron en agua destilada en proporción 1:1 con un homogeneizador Ultra-Turrax® y se midió mediante pHmetro (SensION™ PH3, Cienytech) previamente calibrado con solución tampón pH 4,01 y pH 7,00.

Determinación de la humedad

El contenido de humedad se determinó mediante un analizador de humedad (Denver instrument, Cienytech), que recoge la sustancia seca que queda tras un proceso de secado con energía infrarroja de la sustancia previamente pesada (2,0g). Calcula por diferencia de pesada la disminución del contenido de humedad y devuelve el valor en porcentaje (%humedad).

Determinación del color

El color se midió empleando un colorímetro (PCE instrument, Cienytec) que funciona mediante espectrofotometría, es decir, se encarga de medir las propiedades de reflexión de un color mediante funciones de longitud de onda de la luz. Recoge las medidas en función de los valores CIEL*a*b* (Commission Internationale de L'Eclairage), que es un modelo cromático usado usualmente para describir los colores que percibe el ojo humano. Los parámetros que representa este modelo son: Luminosidad (L^*) (0-negro a 100-blanco), a^* para su posición entre rojo y verde ($-a^*$ indica verde, $+a^*$ indica rojo) y b^* que indica la posición entre amarillo y azul ($-b^*$ para azul y $+b^*$ para amarillo). Las medidas se tomaron directamente de la superficie superior de la gominola funcional y se realizaron tres repeticiones por muestra en cinco muestras de la misma formulación.

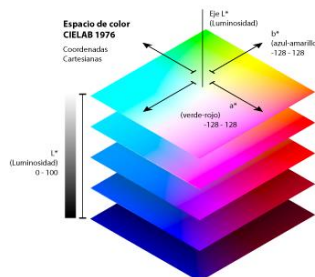


Figura 10. Diagrama del espacio de color CIEL*a*b*. Fuente: http://www.glosariografico.com/categoria_espacio_color el 08/06/2022

4.2.2.2. Análisis de perfil de textura (TPA)

Para realizar el análisis de perfil de textura se utilizó un texturómetro modelo Taxt plus, texture analyser (Aname). El TPA se basa en el reconocimiento de la textura como un atributo multiparamétrico. La prueba consiste en comprimir dos veces la gominola del tamaño de un bocado, en este caso los cilindros de 2x2 cm, con un movimiento de vaivén o doble compresión, que imita la acción de la mandíbula y extraer de la curva fuerza-

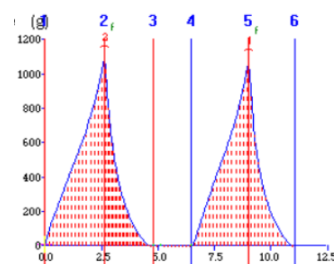


Figura 11. Gráfica de perfil sensorial (TPA). Fuente: elaboración propia.

tiempo resultante según el método descrito por Mochizuki (2001), y se obtuvieron una serie de parámetros de textura que se correlacionan con la evaluación sensorial de esos parámetros:

Dureza (N). Es la fuerza máxima durante el primer ciclo de compresión, es decir la primera mordida. Se expresa en unidades de fuerza (g) y se denomina también firmeza. En la Figura 11, la fuerza se señala con el punto 2.

Adhesividad (gxseg). Es el trabajo necesario para vencer las fuerzas atractivas entre la superficie del alimento y la superficie de otro material, en este caso la sonda del equipo, cuando cede la compresión. Se corresponde con el área negativa del primer ciclo de compresión. En la Figura 11 es el área sobre la curva entre los puntos 3 y 4. En el caso de matrices con alta adhesividad y baja cohesividad, es probable que parte de la muestra se adhiera a la sonda cuando retrocede.

Resiliencia. Es la capacidad de recuperación en términos de velocidad y fuerza. En la Figura 11 se corresponde con el cociente entre el área bajo la curva entre 2 y 3 y el área bajo la curva entre 1 y 2.

Cohesividad (adimensional). Es el cociente entre el área positiva bajo la curva de fuerza de la segunda compresión y el área bajo la curva de la primera compresión. Representa la fuerza con la que están unidas las partículas, límite hasta el cual se puede deformar antes de romperse. En la Figura 11 corresponde al cociente entre el área bajo la curva entre 5 y 6 y el área bajo la curva entre 1 a 3. Si la adhesividad es baja en comparación con la cohesividad, es probable que la sonda permanezca limpia, ya que el producto tiene la capacidad de mantenerse unido.

Elasticidad (mm). La elasticidad se refiere a la altura que recupera el alimento durante el tiempo que transcurre entre el final del primer bocado y el inicio del segundo. En la Figura 11 corresponde al cociente entre la diferencia de tiempo de 4 a 5 y la diferencia de tiempo de 1 a 2. La elasticidad se refiere a la altura que recupera el alimento durante el tiempo que transcurre entre el final del primer bocado y el inicio del segundo.

Masticabilidad (N.mm). Es el producto de la dureza por la cohesividad y por la elasticidad. Representa el trabajo necesario para desintegrar un alimento sólido hasta que esté listo para ser deglutido.

El TPA se puede utilizar como una herramienta de control de calidad para ajustar el tiempo de secado de las gominolas (Delgado & Bañón, 2015).

4.2.2.3. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial de las gominolas funcionales se realizó mediante un análisis organoléptico que se realiza a través de una escala hedónica. Los atributos analizados fueron: color, textura, sabor y olor, y para su valoración se empleó una escala de 5 puntos que va de 1 (no me gusta nada/muy desagradable) a 5 (me gusta mucho/muy agradable).

La prueba se llevó a cabo en la Sala de Cata de ANFACO-CECOPECA, equipada con 6 cabinas individuales y que cumple los requisitos de la Norma UNE-EN ISO 8589:2010. Se llevó a cabo por un panel de consumidores voluntarios, formado por 32 participantes del personal de ANFACO-CECOPECA que estaban familiarizados con productos elaborados con saúco. La representación del panel de consumidores fue de 24 mujeres y 8 hombres. Esta proporción (Figura 12) es representativa del personal de la empresa, que es mayoritariamente femenino.



Figura 12. Gráfico del porcentaje de voluntarios de ANFACO-CECOPECA por género.

Las muestras se conservaron en cámara de refrigeración con el fin de mantener intactas las propiedades organolépticas a valorar hasta la realización de los oportunos análisis. Los diversos juegos de muestras se presentaron de manera idéntica y con la misma disposición en platos, como aparece en la Figura 13.



Figura 13. Fotografía de disposición de las gominolas funcionales en la cata.

4.3. Validación de la funcionalidad del prototipo seleccionado

Determinación de compuestos fenólicos

Tras comprobar mediante bibliográfica que existen posibles interferentes entre los ingredientes utilizados y los compuestos del reactivo de Folin-Ciocaltau, se encontró que los azúcares reductores (glucosa y fructosa), ácido dehidroascórbico (DHA) y el ácido ascórbico

(AA) son considerados interferentes (Sánchez-Rangel et al., 2013). Estos compuestos reaccionan con el reactivo y generan pigmentación, detectable a nivel espectrofotométrico, que da lugar a una sobreestimación del contenido en compuestos fenólicos y flavonoides. Las formulaciones probadas contienen ácido ascórbico en cantidad conocida; sin embargo, no se dispone de forma para cuantificar la cantidad de sacarosa, maltosa e inulina que se transforma en azúcares reductores por hidrólisis de estos compuestos. Esto impide que se hayan podido utilizar fórmulas teóricas que establecen una ratio entre ácido ascórbico y ácido gálico (Ramaiya et al., 2013). Por tanto, dado que la fuente de antioxidantes es el zumo de baya, se decide eliminar las interferencias elaborando una formulación que mantenga la misma cantidad de zumo, pero sustituya los posibles interferentes por agua. El azúcar utilizado para esta formulación sin interferentes es sacarosa, un disacárido que no tiene poder reductor, pero el proceso de elaboración puede haber provocado su hidrólisis en glucosa y fructosa.

Por lo tanto, para cuantificar los CFT, flavonoides y antocianinas presentes en las gominolas se utilizó una formulación control sin aditivos y se aplicó el método detallado en el apartado 1.2.

Determinación de la actividad antioxidante

Para las determinaciones de actividad antioxidante de las formulaciones de gominola funcional se utilizaron los protocolos de los métodos descritos anteriormente en el apartado 1.3, TEAC, FRAP y ORAC-Fl, sin modificaciones.

Determinación de la capacidad de prevenir osteoporosis

Para las determinaciones de la capacidad anti-osteoporótica de las formulaciones de gominola funcional se utilizó el protocolo descrito anteriormente en el apartado 1.4, sin modificaciones.

4.4. Estudio de etiquetado, alegaciones nutricionales y de salud

El análisis proximal y de minerales fue realizado de acuerdo a las metodologías oficiales de la AOAC en el departamento de análisis físico-químico de ANFACO-CECOPECA.

Las siguientes normativas recogen la legislación vigente para establecer el etiquetado nutricional, alegaciones nutricionales y de salud para los alimentos funcionales y las normativas consultadas para establecer las características del producto:

- Reglamento (CE) 1924/2006, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos y su modificación.
- Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.
- Reglamento (UE) No 432/2012 de la comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los

alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.

- Reglamento (CE) No 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos.
- Real Decreto 1487/2009, del 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios.
- Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios.

Sobre este producto se pueden establecer declaraciones nutricionales, relativas a la presencia o ausencia de un macro o micronutriente incluido en el alimento, y declaraciones de propiedades saludables (Health claims) que deben ser comprendidas por el consumidor y sin mensajes engañosos. Los productos funcionales han de cumplir una serie de requisitos en cuanto al contenido de dosis mínimas de ingredientes funcionales, garantizar su biodisponibilidad, demostrar con evidencias científicas acreditadas y con probada solvencia que poseen las propiedades declaradas en el producto final desarrollado y que la cantidad de consumo para aportar el efecto publicitado sea razonable. En el artículo 4 del Reglamento (CE) 1924/2006, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos y su modificación, se indica que: *“Se entenderá por «declaración nutricional» cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee propiedades nutricionales benéficas específicas con motivo de: a) el aporte energético (valor calórico): i) que proporciona, ii) que proporciona en un grado reducido o incrementado, o iii) que no proporciona, y/o de b) los nutrientes u otras sustancias: i) que contiene, ii) que contiene en proporciones reducidas o incrementadas, o iii) que no contiene”* y *“Para garantizar la veracidad de las declaraciones efectuadas, es necesario que la sustancia objeto de la declaración esté presente en el producto final en cantidades que sean suficientes, o que la sustancia esté ausente o presente en las cantidades reducidas adecuadas, para producir el efecto nutricional o fisiológico declarado. La sustancia también debe ser asimilable por el organismo. Además, y cuando proceda, una cantidad de alimento que sea razonable esperar que se consuma debe proporcionar una cantidad significativa de la sustancia que produce el efecto nutricional o fisiológico declarado”*.

La información nutricional obligatoria en el etiquetado debe incluir, por este orden: Valor energético (expresado en Kilojulios -kJ- y Kilocalorías -kcal-), cantidad de grasa, especificando grasas saturadas, hidratos de carbono, especificando la cantidad de azúcares, proteínas y sal. También puede completarse con la indicación de la cantidad de una o varias de las siguientes sustancias: grasas monoinsaturadas, grasas poliinsaturadas, polialcoholes, almidón, fibra alimentaria, vitaminas y minerales (presentes en cantidades significativas).

4.5. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron, como mínimo, por triplicado, y los datos se analizaron con el programa Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO (versión 2205 compilación 16.0.15225.20028) de 32 bits. En concreto, se calcularon los promedios y su desviación estándar, y, cuando fue necesario, se identificaron diferencias estadísticamente significativas a través del test “T de Student”, mediante el complemento de análisis de datos del mismo programa.

5. RESULTADOS E DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de las capacidades funcionales del saúco

5.1.1. Compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante

Los resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y antocianinas se presentan en la Tabla 3 junto con su desviación estándar. Los primeros se calculan mediante ajuste lineal enfrentando la concentración de la recta patrón con su absorbancia. Mediante la ecuación de la recta (R^2 de 0,99) se despejaron los valores de las muestras en mg equivalentes de compuesto patrón por 100 g de muestra (ácido gálico y quercetina, respectivamente). Para el cálculo de antocianinas se utilizó la ecuación detallada en la metodología.

Tabla 3. Contenido de compuestos fenólicos en las bayas de saúco

Muestra	Compuestos fenólicos totales	Flavonoides totales	Antocianinas
Baya seca	5895±617	2598±138	148±20
Baya fresca	1221±30	754±90	337±35
Piel liofilizada	3000±124	1552±216	516±33
Zumo de baya	1213±47	472±59	208±1

Datos expresados como resultados promedio \pm desviación estándar del contenido en CFT (en mg eq. AG/100 g muestra), en flavonoides totales (expresados en mg eq. QE/100 g muestra) y en antocianinas (en mg eq. cyanidin 3-glucoside/100 g muestra).

Los resultados obtenidos se compararon con los valores encontrados en la bibliografía científica. En concreto, los **compuestos fenólicos totales** de las bayas frescas superan los encontrados en la bibliografía, que Ferreira et al. (2020a) reporta entre 515±52 mg eq. AG/100 g y Martis et al. (2021) de 679 mg eq. AG/100 g, al igual que los datos de baya seca obtenidos en Viapiana & Wesolowski (2017) (1981 y 2390 mg AG/100g). También superan los datos bibliográficos relativos al zumo de baya de saúco publicados por Vujanovic et al. (2020) que indicaron valores de 194,5 mg/100 ml eq. AG.

Por otro lado, los valores de **flavonoides totales** de este estudio se encuentran por encima de los indicados en Martis et al. (2021) para la baya fresca (635 mg eq. QE/100 g), de los indicados en Viapiana & Wesolowski (2017) para la baya seca (207-948 mg eq. QE/100 g) y de los indicados en Granato et al. (2015) para el zumo de baya, 6 a 119 mg QE/100 ml.

En cuanto a las **antocianinas**, la familia de compuestos de mayor interés, se obtienen valores superiores a los indicados en Gonçalves et al. (2021) (317,51 mg CGE/100 g muestra fresca), pero inferiores en el caso de las bayas secas (409–1067 mg CGE/100 g de muestra seca). En da Silva et al. (2019) se indica un valor inferior de antocianinas totales, de 109,0 mg/100 ml en el zumo de baya, con respecto a los datos de este estudio. No se pudieron comparar los valores de la piel de saúco liofilizada con datos bibliográficos porque, según nuestro

conocimiento, no existen estudios de este tipo. Este es el primero que indaga en este tipo de subproducto.

Para poner en valor los resultados de la baya de saúco se realizó una comparativa con otras frutas que también son fuente de antioxidantes, donde podemos ver que las bayas y el zumo de Veigas de Sabugueiro (Figura 14 y Figura 15) es la fruta que mayor contenido de CFT contiene por mg eq. AG/ 100 g de muestra.

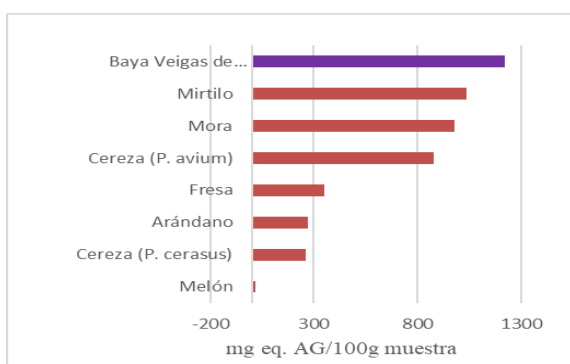


Figura 14. Comparación del contenido en CFT de las bayas de Veigas de sabugueiro, S.L con el contenido de CFT de fruta (Rimpapa et al., 2007; Zapata et al., 2014).

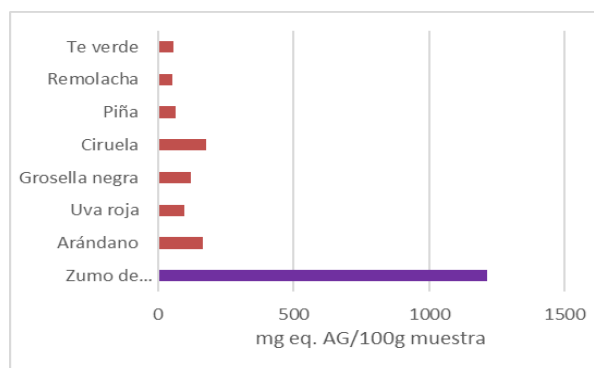


Figura 15. Comparación del contenido en CFT del zumo de baya con el contenido de CFT de bebidas a base de vegetales (Lugasi & Hovarie, 2003; Horszwald & Andlauer, 2011).

Una vez obtenidos estos resultados, se decide continuar con las determinaciones de capacidad antioxidante solamente en el zumo y su subproducto (piel liofilizada). Esto se hace, no solo por su mayor interés para la industria alimentaria y de cara a su utilización en el desarrollo del producto funcional, sino por la dificultad añadida de obtener una muestra homogénea en la baya entera (que están formadas por piel, semillas y zumo).

Para poder validar los resultados de CAO se realiza una búsqueda bibliográfica en productos de saúco y una comparativa con otros frutos rojos, que ponen en valor los resultados de estas muestras y que confirman las sospechas de que las bayas de saúco están entre los alimentos con mayor capacidad antioxidante (Tabla 4. Datos de capacidad antioxidante (CAO) obtenidos de los subproductos de saúco).

Tabla 4. Datos de capacidad antioxidante (CAO) obtenidos de los subproductos de saúco

Muestra	TEAC	ORAC-FI	FRAP
Piel liofilizada	487±58	561±64	704±59
Zumo de saúco	68±5	173±18	60±8

Datos expresados como promedio de los resultados de los ensayos de TEAC, ORAC y FRAP para la piel liofilizada (expresados en μ moles TE/g muestra) y para el zumo de saúco (en μ moles TE/ml muestra)

Para poder comparar los datos obtenidos con referencias bibliográficas, se utilizaron valores de muestra seca de Imenšek et al. (2021), dado que, en nuestro conocimiento, no hay valores de CAO en piel de saúco liofilizada. Los valores de **TEAC**, desde $57 \pm 8,8$ a 137 ± 11 $\mu\text{mol TE/g}$ en peso seco, los valores del **FRAP**, desde 99 ± 8 a 221 ± 24 $\mu\text{mol TE/g p.s.}$ y los valores del ensayo **ORAC-FI**, desde 279 ± 18 a 588 ± 48 $\mu\text{mol TE/g p.s.}$ son menores a los obtenidos con las muestras de saúco de Veigas de Sabugueiro, por lo que la CAO de las muestras de este estudio presentan mayor capacidad antioxidante por los tres métodos de análisis.

Para comparar los valores del zumo de saúco, se utilizaron los datos del estudio de Flores et al. (2017) que obtuvieron un valor de **TEAC** 3 veces inferior (20 $\mu\text{moles eq. TE/ml}$ de muestra). Para los valores de **FRAP** se utilizó el estudio Granato et al. (2015) de donde se extraen valores de $2,12$ – $41,10$ $\mu\text{moles eq. TE/ml}$, también inferiores a las muestras de este estudio. No se han encontrado

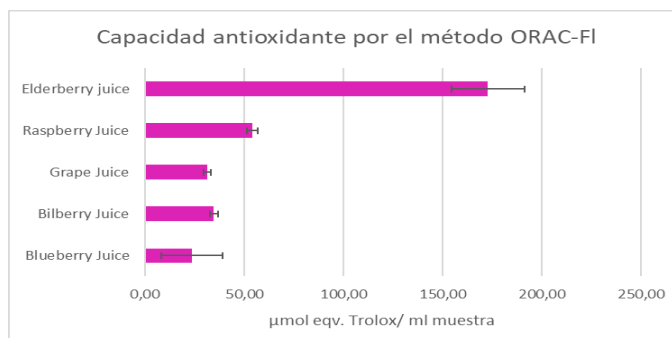


Figura 16. Comparación de los valores de CAO obtenidos en el zumo de saúco con valores de otros zumos de frutas (en $\mu\text{mol eq. TE/ml}$ muestra) por el método ORAC-FI, con datos de Ou et al. (2001).

referencias de datos para zumo de saúco con ensayos **ORAC-FI**, por lo que en la Figura 16 se han puesto en valor los resultados de este estudio respecto a otros zumos de frutas antioxidantes (Ou et al., 2001) donde se puede ver que el valor del zumo de saúco de Veigas de Sabugueiro, S.L es mucho mayor.

5.1.2. Capacidad de prevenir la osteoporosis

Los resultados del ensayo de proliferación celular se muestran en la Figura 17, donde se puede observar que las dos muestras a estudio, en diferentes concentraciones, presentan un aumento en la proliferación celular (modelo de preosteoblastos de ratón, MC3T3), frente al control negativo (con solo medio de cultivo). En las muestras más concentradas aumentó en un 149% en la piel liofilizada y un 118% en el zumo de baya, datos estadísticamente significativos (Test T de Student, $P < 0,05$). Los valores están expresados como promedio de dos ensayos distintos, realizados en días diferentes (por cuatuplicado), para reducir la variabilidad debida a la variación intrínseca del ensayo celular (como el número de pases celulares, por

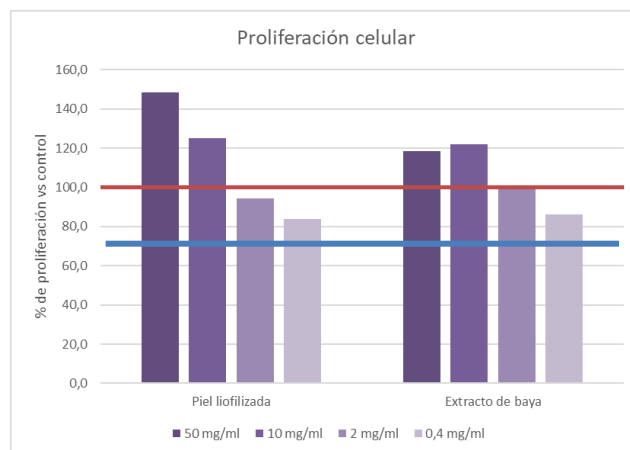


Figura 17. Resultados del ensayo de determinación de la capacidad de prevención de la osteoporosis. Los datos están expresados en porcentaje de proliferación. La línea roja indica el 100% de proliferación.

ejemplo). En general, el ensayo mostró una excelente repetibilidad ($CV < 12\%$) entre las dos repeticiones.

Dado que las muestras de piel liofilizada y zumo de baya presentaron resultados positivos en la promoción de la proliferación celular de los pre-osteoblastos, se realizó la prueba de diferenciación celular con las dos concentraciones más altas (50 mg/ml y 10 mg/ml).

A continuación, en la Figura 18 y la Figura 19, se puede apreciar visualmente como ha cambiado la disposición celular y la aparición de depósitos tras 7 días.

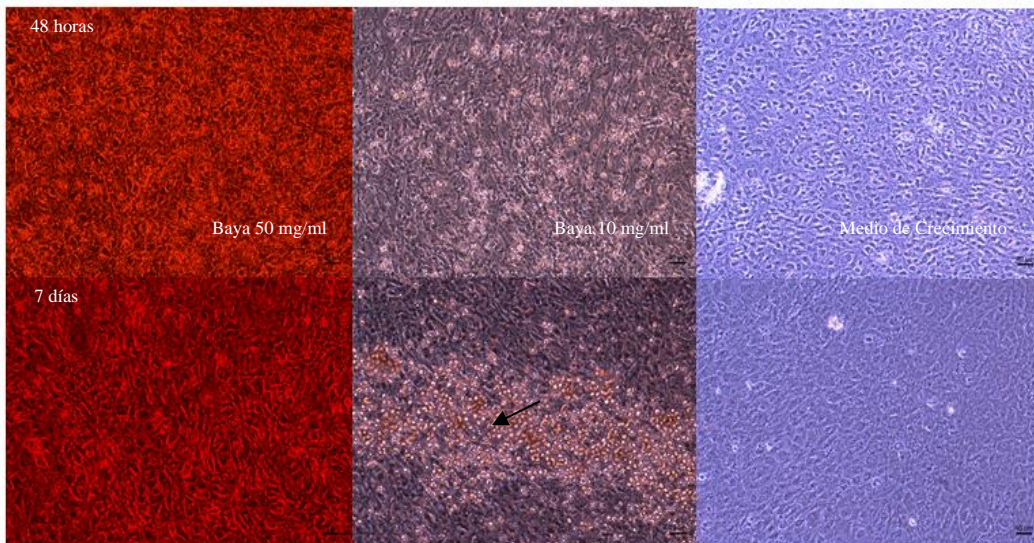


Figura 18. Ensayo de diferenciación celular de 7 días de duración en muestras de piel liofilizada en comparación con un control

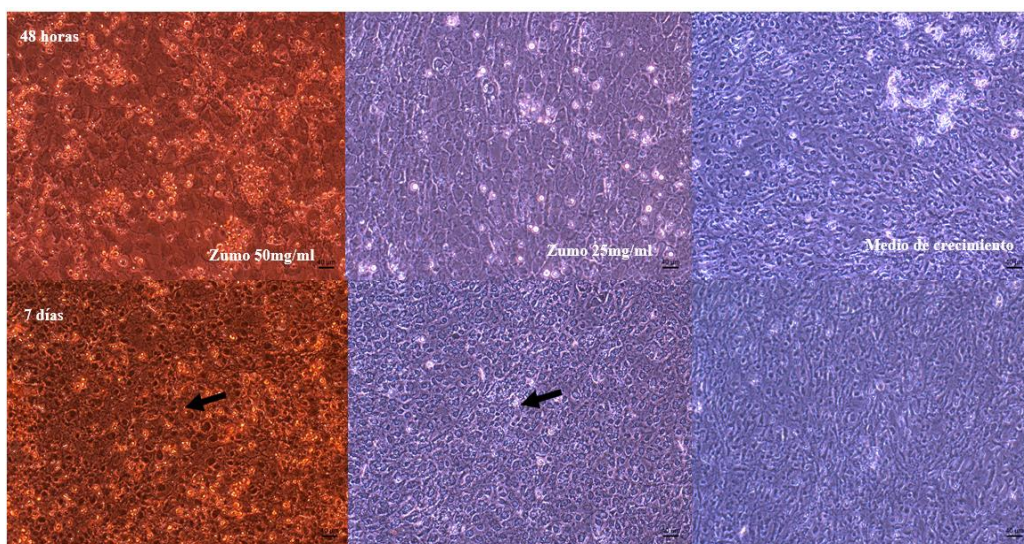


Figura 19. Ensayo de diferenciación celular de 7 días de duración en muestras de zumo de baya en comparación con un control.

En la Figura 20 se puede ver el resultado del ensayo de diferenciación celular, del que se concluye que el zumo de baya de saúco de Veigas de Sabugueiro, S.L, en la dilución 10 mg/ml, presenta capacidad de prevenir la osteoporosis, empleando el ensayo de proliferación y de diferenciación celular en modelo de preosteoblastos de ratón (MC3T3). Las muestras de piel de baya de saúco sólo proporcionaron un aumento en la proliferación de los preosteoblastos, pero no de su diferenciación.

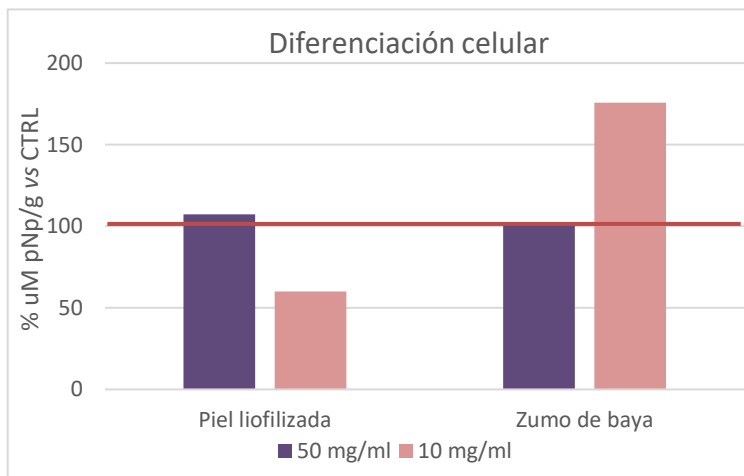


Figura 20. Resultados del ensayo diferenciación celular. Los datos están expresados en porcentaje de $\mu\text{M pNp/g}$ muestra vs el control. La línea roja indica el 100% de proliferación.

Se requieren más estudios para aclarar si las deposiciones extracelulares que se identificaron al final del ensayo se refieren a una posible actividad biológica referida a una capacidad de prevención de las osteoporosis de las células estimuladas por las muestras.

5.2. Evaluación del prototipo de la gominola funcional

5.2.1. Análisis físico-químico

Se presentan en la Tabla 5 los resultados de pH, humedad y color de la formulación de gominola funcional a estudio. Estas características, junto con otras como la temperatura, la presencia de oxígeno, el tiempo de tratamiento y el almacenamiento, influyen en el grado de degradación de las vitaminas y compuestos antioxidantes (Lešková et al., 2006).

El pH de las muestras está en el rango habitual de este tipo de productos y, al ser pH bajo, favorece la conservación de antocianinas (Giusti et al., 2003). Sería interesante disminuirlo hasta que se encuentre en el rango de 1-3. Respecto al contenido de humedad, es mucho mayor que el que habitualmente se encuentra en este tipo de productos (8-22%). Esto afecta a la conservación y a la aparición de moho, como se pudo comprobar en la planta piloto. Al no tener capacidad para imitar el proceso industrial de doble secado con humedad controlada que se aplica en las fábricas especializadas, el contenido de humedad queda entre 10 y 20 puntos por encima del rango aceptable para este producto, por lo que su vida útil es mucho menor. En cuanto al color, se mantiene en valores similares entre todas las formulaciones, dato esperable dado que la pigmentación del saúco en la gominola adquiere un tono muy intenso y opaco que difícilmente se verá modificado por factores externos, cualidad interesante para la aceptación del consumidor.

Tabla 5. Presentación de resultados del análisis físico-químico

Muestras	pH	Humedad (%)	Color (CIELab)			Color (RGB)
			L*	a*	b*	
Formulación elegida	3,61±0,01	33,1±0,05	14,87±4,14	1,08±0,41	0,20±0,91	39:37:37

Los resultados obtenidos se presentan en promedio de cinco mediciones.

5.2.2. Análisis de perfil de textura

En la Tabla 6 se presentan los datos, resultado del análisis de perfil de textura de las formulaciones estudiadas. Se comparan los resultados mediante el “test de Student” para comprobar si hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre los valores ($n=5$) de las diferentes formulaciones (los ingredientes están reflejados en la Tabla 2).

Tabla 6. Resultados del análisis de perfil de textura (TPA) de las gominolas funcionales

	Dureza (g)	Adhesividad g·sec	Resiliencia %	Cohesión	Elasticidad %	Masticabilidad
F1A	422±12	-19±3	92±1	0,97±0,04	98±0	404±11
F1B	373±38	-19±6	88±3	0,97±0,03	98±1	357±38
F2A	476±53	-98±138	85±7	0,95±0,02	95±7	436±82
F2B	398±54	-21±4	80±2	0,94±0,01	98±1	366±50
F3A	437±15	-24±4	82±1	0,95±0,06	98±1	404±10
F3B	446±47	-30±10	79±3	0,93±0,01	98±0	408±42

Se representan los valores promedio de 5 mediciones junto con su desviación estándar

En las formulaciones F1A y F1B se analiza la diferencia en la textura al añadir ácido ascórbico, y se observa que no hay diferencias significativas en la adhesividad, cohesión y elasticidad. En cambio, influye significativamente en la dureza, la resiliencia y masticabilidad. Al añadirle a la formulación F1B inulina (F2A), con su correspondiente reducción de zumo de saúco, gelatina y azúcar, se concluye que la diferencia en la dureza es estadísticamente significativa. La dureza es el principal factor que afecta a la masticabilidad, y es la primera característica de textura que los consumidores perciben, lo que determina su aceptación por parte de los consumidores (Zhou et al., 2021).

Sobre la formulación F2A se quiso aumentar el contenido en inulina mediante la reducción de azúcar, resultando en la formulación F2B que presenta, respecto a su homóloga, diferencias significativas en dureza, pero no en las demás características. En la siguiente formulación (F3A), se aumentó ligeramente el contenido en gelatina y se redujo el ácido cítrico, porque los catadores declaraban un aumento en la sensación de acidez tras la adición

de inulina. Harían falta más pruebas para confirmar si es la reducción de azúcar o la adición de inulina lo que influye en la percepción del sabor ácido. Solo la resiliencia presenta diferencias significativas entre la F2B y la F3A.

La formulación elegida es la F3B, que se diferencia de la F3A en el contenido en azúcar, parcialmente sustituido por maltodextrina, y con la adición de vitamina B₆. Ningún parámetro presenta diferencias significativas, siendo la dureza la que más aumenta. Son resultados muy positivos porque permiten obtener un producto con bajo contenido en azúcar (<5 g/100 g producto) sin que afecte a la textura.

5.2.3. Evaluación sensorial

La puntuación de aceptabilidad sensorial de la formulación elegida (F3B) obtuvo más de 3,5 en una escala hedónica de 5 puntos, muy buena aceptación teniendo en cuenta que es una gominola sin un proceso de secado industrial. En la Figura 21 se pueden observar los resultados para cada atributo sensorial. Las respuestas de los 32 cuestionarios cubiertos por los voluntarios se procesaron manualmente.

A continuación, se citan algunos de los comentarios indicados por el panel de consumidores en relación con los distintos atributos evaluados durante la cata:

- De forma general en relación con la apariencia o el color de la muestra, el panel de consumidores ha indicado que es característico para el tipo de producto evaluado.
- De forma general el panel de consumidores ha definido el olor de la muestra como característico del producto, aunque cabe destacar que buena parte de los miembros del panel de consumidores ha descrito el olor como suave o poco intenso.
- La textura de la muestra ha sido descrita como ligeramente consistente, no adherente ni pegajosa.
- El sabor de la muestra ha sido definido como natural, afrutado con sabor característico de las bayas de saúco. La muestra presentaba un toque ácido agradable. Algunos miembros del panel a pesar de describir la muestra como agradable indicaron que mejoraría si tuviera mayor dulzor.

5.3. Validación de la funcionalidad del prototipo seleccionado

5.3.1. Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante

A continuación, en la Tabla 7 se presentan los resultados de compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante:

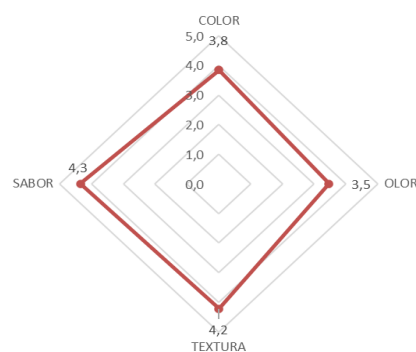


Figura 21. Diagrama de puntuaciones de atributos sensoriales de la gominola funcional.

Tabla 7. Contenido en compuestos fenólicos en mg/100 g de gominola funcional

Muestra	Compuestos fenólicos totales	Flavonoides totales	Antocianinas	TEAC	ORAC-FI	FRAP
Formulación elegida	750±90	296±14	93±0	5103±611	4095 ± 315	765 ± 38

Datos expresados como resultado promedio ± desviación estándar del contenido en CFT (en mg eq. AG por 100 g de muestra), en flavonoides totales (expresados en mg eq. QE por 100 g de muestra) y en antocianinas (en mg eq. cianidin 3-glucosido por 100 g muestra) y los resultados de CAO como promedio de los resultados de TEAC, ORAC y FRAP (expresados en μ moles TE/100 g muestra).

Obtenidos los resultados, se establece una comparación con productos similares encontrados en la bibliografía. En Carle et al. (2009) se describe un contenido muy inferior de CFT en gominolas a base de gelatina suplementadas con antocianinas (24 mg/100 g muestra). En Vergara et al. (2021), las gominolas de pitanga desarrolladas presentan 44 ± 1 mg de cianidine-3-glycoside cada 100 g muestra de gominola baja en calorías, también inferior a los valores de este trabajo.

En Sáenz et al. (2019) se estudia una gominola de nopal con una cantidad de CFT de 73 ± 1 mg GA/ 100 g muestra y capacidad antioxidante por el método ORAC-FL de 1795 ± 73 μ m eq. TE/100 g de muestra, valores inferiores a los de la formulación del presente trabajo.

Para este producto, establece la ración diaria recomendada de 4 unidades, con un tamaño de 3-4 g/unidad. Para la elección del peso ideal por gominola funcional se consultó a empresas españolas que fabrican este tipo de productos. Esta ración cubriría en torno a un contenido entre 11-14 mg antocianinas.

La estimación de ingesta diaria recomendada de antocianinas varía en función del país. En EE.UU fue de 12,5 mg/día (Wu et al., 2006), mientras que en Europa la ingesta media para los hombres varió de 19,8 (Países Bajos) a 64,9 mg/día (Italia), y para mujeres, de 18,4 (España) a 44,1 mg/día (Italia) (Zamora-Ros et al., 2011).

5.3.2. Capacidad protectora contra la osteoporosis

Los datos obtenidos se procesan comparando los promedios de las absorbancias de las dos repeticiones de cada tratamiento con las de los controles, definiendo el grado de proliferación celular como valor porcentual sobre el control. Además, se procesan los datos aceptando CV% <15% y se efectúa el “test T de Student” (P<0,05) para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos y los controles.

En la Figura 22 se puede observar que la viabilidad celular a la concentración más alta (50 mg de gominola/ml medio de cultivo) resultó ser menor al 70%, por lo que la muestra no se considera apta para ensayo celular. A menor concentración (10 mg/ml), las muestras resultan aptas para el ensayo, aunque los valores de proliferación se quedan por debajo del 80%. Se concluye que la formulación final de gominola funcional no presenta capacidad para prevenir la osteoporosis en el ensayo de proliferación en modelo celular de preosteoblastos de ratón (MC3T3); por lo tanto, no se procedió a realizar el ensayo de diferenciación celular.

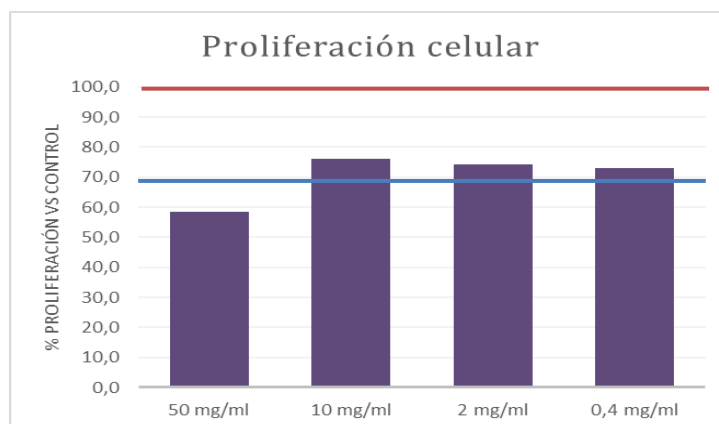


Figura 22. Resultados del ensayo de determinación de la capacidad de prevención de la osteoporosis. Los datos están expresados en porcentaje de proliferación. La línea roja indica el 100% de proliferación.

5.3.3. Análisis nutricional y estudio de etiquetado

En la Tabla 8 se presentan los resultados del análisis proximal en el que se han determinado los parámetros necesarios para el etiquetado de producto: kcal/kJ, hidratos de carbono, de los cuales azúcares, grasas, de las cuales, saturadas, fibra, proteína total, contenido en sodio y en la Tabla 9 el contenido en minerales y vitaminas de interés y su correspondiente declaración nutricional.

Tabla 8. Resultados del análisis nutricional de la gominola funcional y la declaración nutricional correspondiente

	Gominola funcional	Declaración nutricional
Valor energético (kcal/100g)	179 ± 6	No hay declaración nutricional porque el producto contiene más de 40 kcal/100 g
Valor energético (kJ/100g)	761 ± 25	No hay declaración nutricional porque el producto contiene más de 170 kJ/100 g
Grasa (Soxhlet)	<1,00	Bajo contenido en grasa. El producto contiene <3g grasa/100 g
- Saturados	<0,10	Sin grasas saturadas. El producto contiene <0,1g/100 g
- Monoinsaturados	0,08	No hay declaración nutricional porque el 45% de los ácidos grasos no provienen de grasas monoinsaturadas
- Poliinsaturados	0,01	No hay declaración nutricional porque el 45% de los ácidos grasos no provienen de grasas poliinsaturadas
EPA + DHA	<0,01	No hay declaración nutricional
Omega - 3	<0,01	No hay declaración nutricional porque no contiene más de 0,3g de ácido α -linolénico
Omega - 6	0,01	No hay declaración nutricional
Trans	<0,01	No hay declaración nutricional
Hidratos de carbono g/100g	37 ± 3	No hay declaración nutricional
De los cuales azúcares	4,08 ± 0,38	Bajo contenido en azúcares. El producto contiene <5 g/100 g
- Fructosa	0,76 ± 0,08	No hay declaración nutricional
- Glucosa	0,92 ± 0,10	No hay declaración nutricional
- Sacarosa	1,9 ± 0,2	No hay declaración nutricional
- Maltosa y Lactosa	< 0,50	No hay declaración nutricional
Fibra alimentaria (g/100g)	1,59 ± 0,18	No hay declaración nutricional porque no contiene como mínimo 3g fibra/100 g ó 1,5 g/100 kcal
Proteínas (Kjeldahl)	6,9 ± 0,6	Se considera fuente de proteínas porque >12% del valor energético proviene de las proteínas
Sodio (g/100g)	0,028 ± 0,005	Muy bajo contenido en sodio (<0,04 g/100 g)
Cenizas (Gravimetría)	<1,00	No hay declaración nutricional

Los resultados se presentan en valores de g/100 g, excepto el valor energético que se representa en kcal o kJ/100 g

A nivel nutricional, la gominola funcional se puede considerar un producto saludable que no provoca el desplazamiento en el consumo de otros alimentos ni perjudica la salud del individuo. El contenido calórico para la ración diaria recomendada es de aprox. 28 kcal, por lo que no supone un aumento en el consumo calórico diario. Se puede etiquetar como bajo en azúcares, lo cual la diferencia de los productos similares que están actualmente en el mercado. En contraposición, aunque el reglamento permita declarar el producto como fuente de proteínas, se debe tener en cuenta que la gelatina no contiene un valor biológico ni un perfil de aminoácidos equilibrado (proporción muy elevada de prolina e hidroxiprolina) y por ello no es posible afirmar que tenga un valor nutricional como proteínas que sea beneficioso.

Por último, cuando un alimento reúna de forma natural la condición o las condiciones establecidas para el uso de una declaración nutricional (el zumo es la fuente del contenido en antocianinas), podrá utilizarse el término «naturalmente/ natural» antepuesto a la declaración.

Tabla 9. Contenido en minerales y vitaminas en las gominolas funcionales y su correspondiente declaración nutricional

Minerales y vitaminas	CDR	Gominola funcional	Declaración nutricional
Potasio mg/100 g	2000 mg	144 ± 19	No hay declaración nutricional
Calcio mg/100 g	800 mg	34 ± 7	No hay declaración nutricional
Cobre mg/Kg	1 mg	0,44 ± 0,10	Alto contenido en cobre
Manganeso mg/Kg	2 mg	2,56	Alto contenido en manganeso
Zinc mg/kg	10 mg	1,61	Fuente de zinc
Magnesio mg/Kg	375 mg	289	Alto contenido en magnesio
Fósforo mg/100 g	700 mg	<50	No hay declaración nutricional
Hierro mg/100 g	14 mg	0,38 ± 0,10	No hay declaración nutricional
Vitamina C	80 mg	100	Alto contenido en vitamina C
Vitamina B ₆	1,4 mg	1,6	Alto contenido en vitamina B ₆

Sombreado en verde claro indica alegación “fuente de”, en verde oscuro indica la alegación “alto contenido en”, en blanco no llega al 15% de la cantidad mínima recomendada y no permite alegación. El porcentaje es respecto a la Cantidad Diaria recomendada (CDR) establecida en la legislación.

La gominola funcional contiene la cantidad suficiente para establecer la declaración de minerales de: alto contenido en magnesio (44%CDR), fuente de zinc (16% CDR), alto contenido en manganeso (128% CDR) y alto contenido en cobre (44% CDR). Respecto a las declaraciones de vitaminas analizadas: contiene un alto contenido en vitamina C (125% CDR) y en vitamina B₆ (114,3% CDR). Se debe tener en cuenta que el contenido en humedad la gominola es del 33%, un producto secado o concentrado concentraría también los minerales y permitiría mayor número de alegaciones.

Estos valores hacen de la gominola funcional un producto beneficioso para añadir como complemento a la dieta habitual.

Dosis máxima permitida

En el estudio de Senica et al. (2016) declaran que la sambunigrina fue el único glucósido cianogénico detectado en todos los productos de saúco que analizaron. La muestra de interés para este trabajo es el zumo de saúco, donde encontraron 11 mg/kg. Este compuesto podría tener un efecto cardiotoxico, por lo que es necesario darle un tratamiento previo a su uso (Laffita & Castillo, 2011), que en este caso se calentó a 110 °C por 35 min como paso previo al proceso de elaboración. El saúco fresco contiene 3 mg de cianuro de hidrógeno (HCN) (Ciocoiu et al., 2016) que pueden ser reducidos con tratamiento térmico en un 44% (Senica et al., 2016). De todas formas, las bayas se recolectan en un estado de maduración concreto para evitar la presencia de estos glucósidos cianogénicos. Según lo dictaminado por la European Food Safety Authority (2013), el consumo de antocianinas se considera seguro y no se ha encontrado ningún efecto adverso en relación con el consumo de antocianinas. No se han encontrado referencias de dosis máximas de inulina.

En cuanto al nivel de contaminantes, los valores de Cadmio y Plomo se encuentran por debajo de los niveles máximos permitidos (0,05 mg/Kg de plomo en zumos de frutas y 0,050 mg/Kg de cadmio en frutas) según REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. En la Tabla 10 se presentan los minerales contaminantes analizados:

Tabla 10. Contenido en contaminantes en gominolas funcionales

Contaminantes	
Cadmio mg/Kg	<0,010
Plomo mg/Kg	<0,020

6. CONCLUSIONES

De este estudio detallado se puede concluir que:

- Las bayas de saúco de Veigas de Sabugueiro, S.L son particularmente ricas en compuestos fenólicos, y, como observación interesante, es que el proceso de producción del zumo es capaz de concentrar las antocianinas presentes en las bayas frescas manteniendo el contenido total prácticamente inalterado.
- La capacidad antioxidante detectada en el zumo de saúco es mayor por los tres métodos estudiados que los datos publicados en bibliografía científica y también mayores que otros zumos de frutas con demostrada capacidad antioxidante. Además, el zumo se ha confirmado como bioactivo en prevenir la osteoporosis, mediante el ensayo celular *in vitro* en modelo celular de pre-osteoblastos de ratón (MC3T3-E1). Por lo tanto, este estudio ha puesto en valor el zumo de baya de saúco de Veigas de Sabugueiro S.L que lo hacen un buen producto para consumir diariamente por sus beneficios sobre la salud.
- Las gominolas funcionales pueden ser un buen complemento para aumentar el consumo de antioxidantes de manera sencilla y agradable, por todos los rangos de edad. Consiguen un contenido final de antocianinas que cubre el 80% y 100% de la ingesta recomendada (en Europa y EEUU, respectivamente) sin que suponga un aumento significativo en el consumo calórico ni de azúcar añadido.
- A nivel nutricional y, en base a los estudios publicados que asocian el consumo de antocianinas y su influencia en la salud, sería más recomendable el consumo de zumo de saúco sin pasar por el proceso de transformación a gominola funcional, pero quizás no contaría con la aprobación del público.

Como conclusión, se puede decir que estos estudios preliminares indican que la gominola funcional puede ser una buena fuente de antioxidantes que complementen una dieta saludable y variada que esté acompañada de ejercicio físico diario.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agudo Medina, L. (2010). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. *Revista de la educación en Extremadura*, 30-31.
- Akhavan Mahdavi, S., Mahdi Jafari, S., Assadpoor, E., & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85: 379-385.
- Akyildiz, A., Mertoglu, T., & Agcam, E. (2021). Kinetic study for ascorbic acid degradation, hydroxymethylfurfural and furfural formations in Orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 102: 103996.
- Alvarez-Suarez, J. M., Cuadrado, C., Ballesteros Redondo, I., Giampieri, F., González-Paramás, A. M., & Santos-Buelga, C. (2021). Novel approaches in anthocyanin research - Plant fortification and bioavailability issues. *Trends in Food Science & Technology*, 117: 92-105.
- Azam, Z., Pandey, V., Gupta, N., Sapra, L., Dar, H., Shokeen, N., . . . Srivastava, R. (2020). Phytoconstituents as novel osteo-protective agents: Implications in bone health. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*, 25(7): 1259–1296.
- Baladia, E., Moñino, M., Martínez-Rodríguez, R., Miserachs, M., Picazo, Ó., Fernández, T., . . . Russolillo, G. (2021). *Uso de suplementos nutricionales en la población española*. Madrid, España: Academia Española de Nutrición y Dietética. Fundación MAPFRE.
- Barazandegan, Y., Ali, Y., & Eslami, M. (2013). Studying on Effect of Inulin and Maltodextrin Usage as Fat Replacers on Color and Sensory Properties of Prebiotic Cocoa Ice cream. *World Science and Technology*, 1: 172-183.
- Bauernfeind, J., & Pinkert, D. (1970). Food processing with added ascorbic acid. *Advances in Food Research*, 18: 219-315.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Virseda, P., Marín-Arroyo, M., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1): 204-9.
- Bonoli, M., Vito, V., Marconi, E., & Fiorenza Caboni, M. (2004). Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16): 5195-5200.
- Boroduske, A., Jekabsons, K., Riekstina, U., Muceniece, R., Rostoks, N., & Nakurte, I. (2021). Wild *Sambucus nigra* L. from north-east edge of the species range: A valuable germplasm with inhibitory capacity against SARS-CoV2 S-protein RBD and hACE2 binding in vitro. *Industrial Crops and Products*, 165: 113438.

- Cao, S., Liu, L., Lu, Q., Xu, Y., Pan, S., & Wang, K. (2009). Integrated effects of ascorbic acid, flavonoids and sugars on thermal degradation of anthocyanins in blood orange juice. *European Food Research and Technology*, 228: 975-983.
- Carle, R., Rolf Kammerer, D., Schieber, A., Maier, T., & Fromm, M. (2009). Process and storage stability of anthocyanins and non-anthocyanin phenolics in pectin and gelatin gels enriched with grape pomace extracts. *European Food Research and Technology*, 229(2): 949-960.
- Chung, H.-J., Kim, W. K., Park, H. J., Cho, L., Kim, M., Kim, M. J., . . . Lee, S. K. (2016). Anti-osteoporotic activity of harpagide by regulation of bone formation in osteoblast cell culture and ovariectomy induced bone loss mouse models. *Journal of Ethnopharmacology*, 179: 66-75.
- Ciocoiu, M., Badescu, M., Badulescu, O., & Badescu, L. (2016). The beneficial effects on blood pressure, dyslipidemia and oxidative stress of *Sambucus nigra* extract associated with renin inhibitors. *Pharmaceutical Biology*, 54 (12): 3063-3067.
- Correia Salvador, Â. M. (2017). Chemical characterization and biological evaluation of *Sambucus nigra* L. berries and flowers in view of their valorization. (Doctorado). Universidade de Aveiro.
- da Silva, R., Barreira, J., Helen, S., Barros, L., Calhella, R., & Ferreira, I. (2019). Anthocyanin profile of elderberry juice: a natural-based bioactive colouring ingredient with potential food application. *Molecules*, 24(13): 2359.
- Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., Gawdzik, J., & Smolarz, D. H. (2003). Optimization of ASE Conditions for the HPLC Determination of Rutin and Isoquercitrin in *Sambucus nigra*, L. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26(14): 2381-2397.
- De Moura, S. C., Berling, C. L., García, A. O., Queiroz, M. B., Alvim, I. D., & Hubinger, M. D. (2019). Release of anthocyanins from the hibiscus extract encapsulated by ionic gelation and application of microparticles in jelly candy. *Food Research International*, 121: 542-552.
- Delgado Estrella, P. S. (2017). Aplicaciones tecnológicas para mejorar la calidad nutricional y sensorial de los caramelos de goma. (Doctorado), Universidad de Murcia. Universidad de Murcia.
- Delgado, P., & Bañón, S. (2015). Determining the minimum drying time of gummy confections based on their mechanical properties. *CyTA - Journal of Food*, 13(3): 329-335.
- Dominguez, R., Zhang, L., Rocchetti, G., Lucini, L., Pateiro, M., Munekata, P., & Lorenzo, J. (2020). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) as potential source of antioxidants. Characterization, optimization of extraction parameters and bioactive properties. *Food Chemistry*, 330: 127266.
- Escudero Álvarez, E., & González Sánchez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*, 21: 61-172.

- European Food Safety Authority. (2013). Scientific opinion on the re-evaluation of anthocyanins (E 163) as a food additive. 11: 3145.
- Ferreira, S. S., Silva, A. M., & Nunes, F. M. (2020a). Effect of harvesting year and elderberry cultivar on the chemical composition and potential bioactivity: A three-year study. *Food Chemistry*, 302: 125366.
- Ferreira, S., Silva, A., & Nunes, F. (2020b). Sambucus nigra L. Fruits and flowers: chemical composition and related bioactivities. *Food Reviews International*, 38(6): 1237-1265.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochemica et Biophysica acta*, 1721: 174-184.
- Flores, E. (2017). Extracción de Antioxidantes de las Bayas del Sauco (Sambucus nigra L. subsp. peruviana) con Ultrasonido, Microondas, Enzimas y Maceración para la obtención de Zumos Funcionales. *Información tecnológica*, 28: 1.
- Fu, C., Yang, X., Tan, S., & Song, L. (2017). Enhancing cell proliferation and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts by BMP-2 Delivery in graphene oxide-incorporated PLGA/HAbiodegradable microcarriers. *Scientific Reports*, 7: 12549.
- Giusti, M., & Wrolstad, R. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. En *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (págs. 1-13).
- Giusti, M., & Wrolstad, R. (2003). Acylated Anthocyanins from Edible Sources and Their Applications in Food Systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14: 217-225.
- Gonçalves, A., Nunes, A., Falcão, A., Alves, G., & Silva, L. (2021). Dietary Effects of Anthocyanins in Human Health: A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals*, 14: 690.
- Granato, D., Karnopp, A., & van Ruth, S. (2015). Characterization and comparison of phenolic composition, antioxidant capacity and instrumental taste profile of juices from different botanical origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95: 10.
- Handa, C., Goomer, S., & Siddhu, A. (2012). Physicochemical properties and sensory evaluation of fructoligosaccharide enriched cookies. *Journal of Food Science and Technology*, 49: 192–199.
- Harris, P., Normand, V., & Norton, I. (2003). Gelatin. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Trugo, L. and Finglas, P.M. (Eds.). *Academic Press*, 2865-2871.
- Herrera-Blandrano, D., Chai, Z., Beta, T., Feng, J., & Huang, W. (2021). Blueberry anthocyanins: An updated review on approaches to enhancing their bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 118: 808-821.
- Hong, D., Chen, H.-X., Yuc, H.-Q., Liang, Y., Wang, C., Lian, Q.-Q., . . . Ge, R.-S. (2010). Morphological and proteomic analysis of early stage of osteoblast differentiation in osteoblastic progenitor cells. *Experimental Cell Research*, 316: 2291-2300.

- Horszwald, A., & Andlauer, W. (2011). Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. *Journal of Berry Research*, 1: 189-199.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., & Deemer, E. (2002). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1815-1821.
- Huang, D., Zhang, M., Chen, W., Zhang, D., & al, e. (2018). Structural elucidation and osteogenic activities of two novel heteropolysaccharides obtained from water extraction residues of *Cibotium barometz*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121: 216-225.
- Ilievska, N., Pavlova, V., Kirovska, V., Ilievska, J., & Povlovska, M. (2019). Nutritional and health benefits of inulin as functional food and prebiotic. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 27: 45-48.
- Imenšek, N., Kristl, J., Šumenjak, T. K., & Ivancic, A. (2021). Antioxidant Activity of Elderberry Fruits during Maturation. *Agriculture*, 11: 555.
- Kanis, J. A., Norton, N., Harvey, N. C., Jacobson, T., Johansson, H., Lorentzon, M., . . . Borgström, F. (2021). SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. *Archives of Osteoporosis*, 16: 82.
- Kim, Y., Faqih, M., & Wang, S. (2001). Factors affecting gel formation of inulin. *Carbohydrate Polymers*, 46: 135-145.
- Laffita, O. C., & Castillo, A. A. (2011). Pharmaceutical-toxicological characterization of medicinal plant *Sambucus nigra* subsp. *canadensis* (L). R. Bolli. *Revista Cubana de Farmacia*, 45: 4.
- Lee, J., Durst, R., & Wrolstad, R. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC international*, 88: 1269-1278.
- Lešková, E., Kubíková, J., Kováčiková, E., Košická, M., Porubská, J., & Holčíková, K. (2006). Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 252-276.
- Lewis, D. (1993). Development of the food microscopist. *Food Structure*, 12(3): 275-284 .
- Liu, H., Jin, W., Fu, C., Dai, P., Yu, Y., Huo, Q., & Yu, L. (2015). Discovering anti-osteoporosis constituents of maca (*Lepidium meyenii*) by combined virtual screening and activity verification. *Food Research International*, 77: 215-220.
- Lugasi, A., & Hovari, J. (2003). Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahrung/Food*, 47(2): 79-86.
- Lutsenko, E., Carcamo, J., & Golde, D. (2002). Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 16895-16899.

- Manolagas, S. C. (2010). From Estrógeno-Centric to Aging and Oxidative Stress: A Revised Perspective of the Pathogenesis of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 31: 3.
- Martis, G. S., Muresan, V., Marc, R., Muresan, C. C., Pop, C. R., Buzgau, G., . . . Muste, S. (2021). The Physicochemical and Antioxidant Properties of *Sambucus nigra* L. and *Sambucus nigra* Haschberg during Growth Phases: From Buds to Ripening. *Antioxidants*, 10(7): 1093.
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2007). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7(3): 47.
- Meneses-Reyes, J., Soto-Hernández, R., Espinosa-Solares, T., Ramírez-Guzmán, & Martha, E. (2008). Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.). *Agrociencia*, 42(2): 425-433.
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., & Veberic, R. (2012). Composition of sugar, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *Journal of Food Science*, 77(10): C1064-70.
- Mochizuki, Y. (2001). Texture Profile Analysis. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, H2.3.1-H2.3.7.
- Mohammad, N. F., Othman, R., Abdullah, N. A., & Yeoh, F. Y. (2016). In vitro evaluation of mesoporous carbonated hydroxyapatite in MC3T3-E Osteoblast Cells. *Procedia Chemistry*, 19: 259-266.
- Mordorintelligence. (2022). *Mordorintelligence*. Obtenido de Food antioxidants market - growth, trends, Covid-19 impact, and forecast (2022 - 2027): <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/food-antioxidants-market>
- Muñoz-Bernal, Ó., Torres-Aguirre, G., Núñez-Gastélum, J., de la Rosa, L., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20: 2.
- Mustafa, A., Sezai, E., & Murat, T. (2009). Physico-chemical characteristics of some wild grown European elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes. *Pharmacognosy Magazine*, 5(20): 320-323.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4619-4626.
- Pintanela Vergara, L., Niemeyer Reissig, G., Zambiasi, R. C., Da Silva Rodrigues, R., & Freitas Chim, J. (2021). Red pitanga chewable candies: physicochemical, microbiological, and sensory characterization. *Food Science and Technology*, 23: 193-196.
- Prior, R., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., . . . Jacob, R. (2003). Assay for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC-FI)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11): 3273-9.

- Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2015). Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4290-302.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3396-3402.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1): 76-89.
- Ramaiya, S., Bujang, J., Zajaria, M., King, W., & Sahrir, M. (2013). Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 1198–1205.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.
- Rimpapa, Z., Toromanović, J., Tahirović, I., Sapcanin, A., & Sofić, E. (2007). Total content of phenols and anthocyanins in edible fruits from Bosnia. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 7(2): 117-20.
- Sáenz, C., Fabry, A. M., Contador, L., & Franck, N. (2019). Gummy confections from cactus pear: chemical characteristics, texture profile and sensory quality. *ActaHortic*, 1247: 207-212.
- Sakaki, J. R., Melough, M., & Chun, O. (2020). Anthocyanins and anthocyanin-rich food as antioxidants in bone pathology. *Pathology*, 14: 145-158.
- Sánchez-Rangel, J., Benavides, J., Heredia, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical methods*, 5: 5990.
- Senica, M., Stampar, F., Veberic, R., & Mikulic-Petkovsek, M. (2016). Processed elderberry (*Sambucus nigra* L.) products: A beneficial or harmful food alternative? *LWT - Food Science and Technology*, 72: 182-188.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18: 757-781.
- Sidor, A., & Gramza-Michalowska, A. (2015). Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. *Journal of Functional Foods*, 18: 914-958.
- Škorňa, P., Rimarčík, J., Poliak, P., Lukeš, V., & Klein, E. (2016). Thermodynamic study of vitamin B6 antioxidant potential. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1077: 32-38.
- Taniguchi, M., Arai, N., Kohno, K., Ushio, S., & Fukuda, S. (2012). Anti-oxidative and anti-aging activities of 2-O- α -glucopyranosyl-l-ascorbic acid on human dermal fibroblasts. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 674: 126–131.

- Teixeira-Lemos, E., Almeida, A., Vouga, B., Morais, C., Correia, I., Pereira, P., & Guiné, R. (2021). Development and characterization of healthy gummy jellies containing natural fruits. *Open Agriculture*, 6: 466-478.
- Viapiana, A., & Wesolowski, M. (2017). The Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Infusions of *Sambucus nigra* L. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(1): 82-87.
- Vujanovic, M., Majkic, T., Zengin, G., Beara, I., Tomovic, V., Sojic, B., . . . Radojkovic, M. (2020). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) juice as a novel functional product rich in health-promoting compounds. *Royal Society of Chemistry*, 10: 44805.
- Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., & Prior, R. (2006). Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11): 4069-4075.
- Xu, Z. S., Wang, X.-Y., Xiao, D.-M., Hu, L.-F., Lu, M., Wu, Z.-Y., & Bian, J.-S. (2011). Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H₂O₂-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 50: 1314-1323.
- Yan, X.-Z., Yang, W., Yang, F., Kersten-Niessen, M., Jansen, J. A., & Both, S. K. (2014). Effects of continuous passaging on mineralization of MC3T3-E1 cells with improved osteogenic culture protocol. *Tissue Engineering*, 20(3): 198-204.
- Zamora-Ros, R., Knaze, V., Luján-Barroso, L., Slimani, N., Romieu, I., Touillaud, M., . . . Grioni, S. (2011). Estimation of the intake of anthocyanidins and their food sources in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *British Journal of Nutrition*, 106(7): 1090-1099.
- Zapata, L., Heredia, A., Quinteros, C., Malleret, A., Clemente Polo, G., & Cárcel Carrión, J. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 25(49): 166-192.
- Zhong, Y., & Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, 287-333.
- Zhou, X.-y., Yu, J.-h., & Yu, Y. (2021). Effect of gelatin content and oral processing ability on vitamin C release in gummy jelly. *Journal of Food Science and Technology*, 59: 677-685.
- Zhu, Y., Li, T., Abbasi, A. M., Zheng, B., & Liu, R. H. (2015). Phenolics content, antioxidant and antiproliferative activities of dehulled highland barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Functional Foods*, 19: 439-450.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114: 310-316.