



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA

**Desarrollo de nuevos productos alimenticios de alto valor nutricional y
funcional con base en flores, frutos y tallos de plantas**

Tesis Doctoral

Tânia Cristina de São Pedro Pires

Directores

Dra. Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

Dr. Celestino Santos-Buelga

Dra. Lillian Bouçada de Barros

Salamanca, 2020

ABREVIATURAS

AY	Yogur coloreados con la antocianina comercial
BY	Yogur libre de aditivos
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Cy	Cianidina
CY	Yogures coloreados con centaurea
DAD	Detector de diodos
DHA	Ácido docosahexaenoico
Dp	Delfinidina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhydrazyl.
DY	Yogures coloreados con dalia
E163	Colorante comercial
EC ₅₀	Concentración con 50% de actividad antioxidante.
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EMM	Medias Marginales Estimadas
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ESBL	Spectrum Extended productor de β -lactamasas
ESI	interfaz de ionización por electropulverización
HeLa	Líneas de células tumorales para el cáncer cervical
HepG2	Líneas de células tumorales para el carcinoma hepatocelular
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento,
INT	cloruro de <i>p</i> -yodonitrotetrazolio
IT	Tipo de incorporación
LDA	Análisis discriminante lineal
MCF-7	Líneas de células tumorales para el cáncer mama
MS	Espectrometría de masas
Mv	malvidina
NCI-H460	Líneas de células tumorales para el cáncer de pulmón
OMS	Organización Mundial de la salud
P0	Muestra compuesto solo de frutos de arándano
P1	Mezclas a base de frutas de arándano combinadas con flores de rosa
P2	Mezclas a base de frutas de arándano combinadas con flores de calendula
P3	Mezclas a base de frutas de arándano combinadas con flores de manzana

Pg	Pelargonidina
PLP ₂	Cultivo primario de células de hígado
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RY	Yogures coloreados con rosa
SE	7 días de almacenamiento
SFA	Ácidos grasos saturados
SRB	sulforrodamina
ST	Tiempo de almacenamiento
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
UV	Ultra violeta
YF	Formulaciones de yogur

ÍNDICE

ABREVIATURAS	III
1. Introducción	6
1.1. Productos funcionales	6
1.2. Flores comestibles como fuente de alimentos e ingredientes funcionales.....	6
1.3. Las frutas como fuente de compuestos bioactivos con beneficios para la salud.	8
1.3.1. <i>Vaccinium myrtillus</i> L	8
1.3.2. <i>Lycium barbarum</i> L.	8
1.3.3. <i>Malus domestica</i> Borkh. cv Bravo de Esmolfe	9
2. Objetivos.....	11
3. Metodología.....	12
4. Resultados y discusión.....	13
4.1. Flores comestibles.....	13
4.2. Frutos	21
4.2.1. <i>Malus domestica</i> a Borkh. cv Bravo de Esmolfe.....	21
4.2.2. Frutos y tallos de <i>Lycium barbarum</i> L.	22
4.2.3. <i>Vaccinium myrtillus</i> L.	25
4.3. Mezclas a base de <i>Vaccinium myrtillus</i> L.....	28
5. Conclusiones.....	33

1. Introducción

1.1. Productos funcionales

El desarrollo de nuevos productos funcionales representa un desafío para la comunidad científica, las autoridades sanitarias y la industria alimentaria.

De acuerdo con Diplock & Aggott (1999) “un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que afecta de manera beneficiosa una o más las funciones del cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados, de una manera que sea relevante para el estado de bienestar y salud o la reducción del riesgo de una enfermedad”.

Además, un producto alimenticio puede hacerse funcional utilizando cualquiera de estos cinco enfoques: i) eliminar un componente que se sabe que causa o se identifica que causa un efecto nocivo cuando se consume; ii) aumentar la concentración de un componente naturalmente presente en el alimento hasta un punto en el que pueda inducir los efectos esperados o aumentar la concentración de un componente no nutritivo a un nivel que se sabe que produce un efecto beneficioso; iii) incorporar un componente que no esté normalmente presente en la mayoría de los alimentos del mismo tipo, que no es necesariamente un macronutriente o un micronutriente, pero para el cual se han demostrado efectos beneficiosos; iv) sustituir un componente, generalmente un macronutriente cuya ingesta suele ser excesiva y puede ser causa de efectos nocivos, por un componente para el que se han demostrado efectos beneficiosos, y v) aumentar la biodisponibilidad o la estabilidad de un componente del alimento que se sabe que produce un efecto funcional o que reduce el riesgo potencial de enfermedad (Henry, 2010).

1.2. Flores comestibles como fuente de alimentos e ingredientes funcionales

Las flores comestibles proporcionan color y vitalidad a cualquier plato, y, aparte del atractivo que confieren, pueden constituir nuevas fuentes de compuestos bioactivos. Aunque por el momento su empleo está sobre todo orientado a la cocina de diseño, en una búsqueda de nuevos colores, texturas y sabores (Kelley, Behe, Biernbaum, & Poff, 2001; Łuczaj et al., 2012), la gama de especies utilizadas en alimentación es cada vez más variada, conduciendo a la recuperación de hábitos anteriores en los que el uso culinario de las flores tenía un papel más destacado (Cunningham, 2015; Rop, Mlcek, Jurikova, Neugebauerova y Vabkova, 2012) y constituyendo un nicho de mercado inexplorado que podría llegar a tener gran importancia económica.

Las flores son empleadas con fines culinarios desde la antigüedad, en preparaciones como salsas, licores, ensaladas y postres (Koike et al., 2015; Mlcek & Rop, 2011), así como en tisanas e infusiones, utilizadas con fines medicinales (Navarro-González, González-Barrio, García-Valverde, Bautista-Ortín y Periago, 2015). Actualmente se pueden encontrar en el mercado flores comestibles embaladas para uso alimentario, así como en suplementos dietéticos o para uso como ingredientes funcionales (Loizzo et al., 2016; Rop et al., 2012). Los diferentes fitoquímicos presentes en flores se han relacionado con beneficios para la salud, como antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, agentes antiobesidad, hipoglucemiantes, y con propiedades neuro-, hepato- y gastro-protectoras (Loizzo et al., 2016; Lu, Li y Yin, 2016). Existen algunos estudios previos sobre composición fitoquímica en flores de rosa (*Rosa canina* L.) (Barros, Carvalho y Ferreira, 2011) y de caléndula (Miguel et al., 2016), composición de ácidos grasos en aceites de semillas de caléndula (Dulf, Pamfil, Baciú y Pintea, 2013), perfil nutricional y antioxidante en flores de dalia (Lara-Cortés et al., 2014) y contenido proteico en flores de *Centaurea cyanus* L. (Rop et al., 2012).

Diversas plantas y sus productos se han utilizado en alimentos como conservantes naturales o agentes aromatizantes, así como remedio para tratar algunas de las enfermedades más comunes. Estas propiedades curativas se atribuyen, en parte, a sus actividades antimicrobianas, de este modo su uso podría llegar a ser efectivo para reducir la dependencia de antibióticos y minimizar las resistencias de los microorganismos a los mismos, así como ayudar a controlar contaminaciones cruzadas por patógenos transmitidos por alimentos.

Las flores comestibles aportan un aroma fresco y exótico y un sabor delicado y son visualmente atractivas. *Dahlia mignon*, *Rosa damascena* "Alexandria" y *R. gallica* "francesa" injertada en *R. canina*, *Calendula officinalis* L. y *Centaurea cyanus* L. se encuentran entre las flores comestibles más populares (Fernandes, Casal, Pereira, Saraiva y Ramalhosa, 2017). Las flores pueden contener una variedad de compuestos fenólicos, incluyendo ácidos fenólicos y flavonoides, cuya presencia está relacionada con su color, ya sea directamente (por ejemplo, antocianos y otros pigmentos flavonoides) o indirectamente a través del proceso de copigmentación (Brouillard, 1988; Kaisoon, Siriamornpun, Weerapreeyakul y Meeso, 2011). Igualmente, este tipo de sustancias se han relacionado con la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas, como diabetes, deterioro cognitivo o enfermedad cardiovascular, así como de diferentes tipos de cáncer (Anantharaju, Gowda, Vimalambike y Madhunapantula, 2016; Gutiérrez-Grijalva et al., 2016).

Además de las flores comestibles, las frutas también son buenas fuentes de compuestos bioactivos, de interés para la industria, como es el caso de los frutos de *Vaccinium myrtillus* L., *Lycium barbarum* L. y *Malus domestica* Borkh. cv Bravo de Esmolfe, que se han empleado en el desarrollo de este estudio.

1.3. Las frutas como fuente de compuestos bioactivos con beneficios para la salud.

1.3.1. *Vaccinium myrtillus* L

Vaccinium myrtillus L., comúnmente denominado arándano, es una de las mejores fuentes naturales de antocianos, responsables del color rojo azulado del fruto y que también se han relacionado con beneficios para la salud, como efectos cardioprotectores, antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes o hipoglucémicos (Drózdź, Šèžienė, & Pyrzynska, 2017; Ashour et al., 2011). Los principales antocianos identificados en las bayas de arándano son 3-*O*-glucósidos, 3-*O*-galactósidos y 3-*O*-arabinósidos de cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina y malvidina (Aaby, Grimmer, & Holtung, 2013; Colak et al., 2017; Paes, Dotta, Barbero, & Martínez, 2014).

En los últimos años, el mercado de alimentos e ingredientes funcionales ha aumentado considerablemente, junto con la concienciación del consumidor sobre la importancia de una alimentación y un estilo de vida saludables, lo que ha conducido a una creciente preocupación por la sustitución de colorantes artificiales con homólogos naturales. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) permite el uso como aditivos colorantes de extractos de antocianos extraídos de frutas (E163) en varios tipos de alimentos, como productos lácteos, cereales y otros. Las fuentes de frutas utilizadas para producir E163 se detallan en el reglamento de la comisión 231/2012, siendo las más comunes hollejo de uva, grosella negra, maíz morado o col roja.

1.3.2. *Lycium barbarum* L.

En los últimos años, el consumo de plantas pertenecientes al género *Lycium* ha aumentado exponencialmente, no solo debido a su tradicional uso en medicina china, sino también por su amplia aceptación como ingredientes alimentarios. Las bayas se consumen comúnmente en sopas, con arroz o incorporadas a platos de carne y verduras (Potterat y Food, 2010), pueden también ser consumidas como tales, o empleadas para la elaboración de zumos, vinos o infusiones, así como ser procesadas como tinturas, polvos o tabletas (Potterat and Food, 2010). Una de las especies más estudiadas de este género es *Lycium barbarum* L., conocido con varios nombres, siendo el de "Goji" el más común. Desde el comienzo del siglo XXI, los

productos de Goji se han venido introduciendo extensamente en Europa y América del Norte y su consumo ha aumentado rápidamente, al atribuírseles propiedades beneficiosas para el bienestar y la longevidad (D'Amato et al., 2013). Las bayas de Goji se han asociado con una amplia gama de beneficios para la salud, como el tratamiento de enfermedades relacionadas con el hígado, riñón, vista, sistema inmune, circulación y longevidad, y también con actividad sexual (Tang et al., 2012). Las bayas Goji son fuentes ricas en micronutrientes y fitoquímicos como los polifenoles. Algunos de estos compuestos fenólicos, que pueden actuar como antioxidantes y antimicrobianos, han sido identificados por diferentes autores (Masci et al., 2018; Zheng et al., 2017; Liu et al., 2017). Las hojas de *L. barbarum* también han demostrado un amplio campo de aplicación en la industria alimentaria, debido a su riqueza en nutrientes, oligoelementos e ingredientes biológicamente activos (Liu et al., 2017). Sin embargo, en nuestro conocimiento, no hay información previa sobre la composición química y en sustancias bioactivas de los tallos de *L. barbarum*. Los resultados de este estudio servirán, por tanto, para establecer el potencial de los tallos como subproductos con potenciales propiedades funcionales de interés en la industria alimentaria y farmacéutica.

1.3.3. *Malus domestica* Borkh. cv Bravo de Esmolfe

‘Bravo de Esmolfe’ es una variedad de manzana portuguesa con aroma intenso muy apreciado por los consumidores. Esta variedad fue reconocida como producto con Denominación de Origen Protegida (DOP; No 1107/96, 2001), por lo que posee alto valor añadido con impacto en la economía local y nacional (Reis, Rocha, Barros, Delgadillo y Coimbra, 2009). Su producción se lleva a cabo en una pequeña región del interior restringida en el norte de Portugal, contando con una producción de unos 200.000 kg por año, aunque con una demanda comercial creciente, debido a sus atractivas propiedades sensoriales en cuanto a sabor y dulzura.

El consumo regular de frutas y hortalizas se ha asociado con un menor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas. Estos beneficios a menudo se atribuyen a su alto contenido fitoquímico y poder antioxidante (Feliciano et al., 2010). Las manzanas tienen una amplia variedad de componentes fitoquímicos y una composición equilibrada en contenido de azúcar y ácidos, lo que les da un sabor agradable, siendo moderadamente energéticas. La composición química de las manzanas varía según el cultivar, la región de producción y las prácticas hortícolas (Róth et al., 2007). En su mayoría están constituidas por agua (84%), pero en su fracción seca contienen cantidades destacadas de monosacáridos, fibra dietética, minerales,

vitaminas del complejo B, vitamina C y diversas sustancias biológicamente activas, como compuestos fenólicos (Róth et al., 2007; Wu et al., 2007; Feliciano et al., 2010). El perfil fenólico de diferentes cultivares de manzana ha sido objeto de estudio por diversos autores (Malec et al., 2014; Mayr, Treutter, Santos-Buelga, Bauer y Feucht, 1995; Scafuri et al., 2016; Shoji, Masumoto, Moriichi, Kanda y Ohtake, 2006; Shoji et al., 2003; Verdu et al., 2013; Wojdyło, Oszmiański y Laskowski, 2008), pero ninguno de ellos referido a los compuestos y propiedades bioactivas de la variedad 'Bravo de Esmolfe', sobre la cual existe poca información, lo que justifica el presente estudio.

2. Objetivos

Los hábitos de consumo están cada vez más diversificados y orientados hacia opciones alimentarias más sostenibles y con mayor valor funcional. La gama de especies y partes de plantas utilizadas para la alimentación es cada vez más variada, buscando no solo proporcionar ingredientes con posibles beneficios para la salud de los consumidores, sino también nuevos colores, texturas y sabores. Por lo tanto, en el desarrollo de nuevos productos alimenticios es cada vez más común incorporar elementos no tradicionales como flores comestibles, bayas o tallos exóticos, junto con otros productos más comunes para el consumidor, como frutas rojas o manzanas.

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo de productos alimenticios con valor nutricional y bioactivo añadido teniendo como base arándanos mezclados con flores y otras frutas.

Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- 1) Caracterización química y nutricional de las matrices individuales a aplicar en las mezclas: arándano (frutos de *Vaccinium myrtillus* L.), manzana (*Malus domestica* Borkh, cv Bravo-de-Esmolfe), bayas y tallos de goji (*Lycium barbarum* L.), y flores comestibles de *Dahlia mignon*, *Rosa damascena* 'Alexandria' y *Rosa gallica* 'French' injertada en *R. canina*, *Calendula officinalis* L y *Centaurea cyanus* L.
- 2) Estudio de la composición fenólica y propiedades bioactivas de las plantas individuales seleccionadas.
- 3) Caracterización química y nutricional y evaluación de propiedades bioactivas en infusiones de las flores comestibles y en los productos alimenticios obtenidos de mezclas de las diferentes matrices.
- 4) Evaluar la idoneidad de incorporación de los ingredientes naturales obtenidos a partir de las matrices estudiadas en un producto lácteo (yogur).

3. Metodología

Se realizó la evaluación nutricional de las muestras de las diferentes matrices vegetales estudiadas, así como en las distintas combinaciones preparadas. Se analizó la composición proximal en cuanto a contenido de proteínas, grasas, carbohidratos totales, cenizas y valor energético utilizando métodos oficiales de análisis de alimentos. Se analizó también la composición en azúcares libres, ácidos grasos, tocoferoles y ácidos orgánicos. También se midió el pH de las muestras y realizó una evaluación cromática de las mismas en el espacio de color CIELAB.

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante HPLC-DAD/ESI-MS. La identificación de los compuestos se realizó de acuerdo con comportamiento cromatográfico y espectros UV-visible y de masas (ion molecular y patrón de fragmentación MSⁿ)

La actividad antioxidante se evaluó a través de ensayos de captación de radicales DPPH, capacidad reductora, inhibición de la peroxidación lipídica a partir de la decoloración del β -caroteno e inhibición de la peroxidación de lípidos en homogeneizados de cerebro.

Para evaluar la actividad antibacteriana se emplearon microorganismos aislados de pacientes hospitalizados, tanto bacterias gram-negativas como gram-positivas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó por microdilución utilizando el método colorimétrico del cloruro de *p*-yodonitrotetrazolio (INT).

Se utilizó el ensayo de sulforrodamina (SRB) para evaluar la inhibición en el crecimiento en diversas líneas de células tumorales humanas: MCF-7 (cáncer de mama), HeLa (cáncer cervical), NCI-H460 (cáncer de pulmón) y HepG2 (carcinoma hepatocelular). Las muestras que presentaron actividad antitumoral fueron examinadas para establecer posible toxicidad en células no tumorales usando cultivos de células primarias de hígado porcino, consideradas el mejor modelo in vitro para el estudio de citotoxicidad humana.

4. Resultados y discusión

4.1. Flores comestibles

Composición proximal y valor energético de flores e infusiones. Los carbohidratos fueron los macronutrientes más abundantes en todas las muestras de flores, seguidos de proteínas y cenizas en dalia, rosa y centaurea. Rop et al. (2012) encontraron valores más bajos de proteína en muestras de flores de *C. officinalis* (0,673 g/100 g) originarias de la República Checa. Las flores de caléndula presentaron mayor cantidad de grasa y cenizas que las otras muestras, y también un mayor valor energético (421,58 kcal/100 g). Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Miguel et al. (2016), que obtuvieron valores similares de grasa y energía en flores de caléndula. En cuanto a las infusiones, rosa y dalia presentaron el mayor contenido de azúcares totales y consecuentemente valores energéticos más altos que caléndula y centaurea.

Componentes hidrofílicos en flores e infusiones. Las flores y las infusiones de dalia y rosa presentaron las concentraciones de azúcares totales más altas, mientras que las flores e infusión de centaurea presentaron los niveles más bajos. Como azúcares individuales se detectaron fructosa, glucosa y sacarosa, siendo la fructosa el azúcar mayoritario, excepto en las flores e infusión de caléndula, donde predominaba la sacarosa. Estos resultados están en acuerdo con los obtenidos por Barros et al. (2011) en flores de *Rosa canina*, donde también encontraron fructosa como azúcar principal. Sin embargo, en muestras de *Calendula officinalis*, Miguel et al. (2016) detectaron fructosa como azúcar principal, seguido, en su caso, de sacarosa y xilosa. Actualmente, la EFSA no realiza recomendaciones sobre ingesta diaria de azúcares, ya que el conocimiento disponible es insuficiente para establecer un límite superior de consumo para estos compuestos (EFSA, 2010). Por su parte, la OMS recomienda reducir la ingesta de azúcares a menos del 10% de la ingesta total de energía en una dieta diaria normal. Teniendo en cuenta el consumo que podría hacerse de estas flores, no puede considerarse que sus contenidos de azúcares puedan contribuir a superar este límite.

El perfil de ácidos orgánicos difiere notablemente entre las distintas muestras estudiadas. El mayor contenido total se encontró en flores de rosa, donde predominaron los ácidos quínico y málico, al igual que en dalia. Las flores de caléndula también presentaron una concentración alta de ácidos orgánicos totales, en este caso debido sobre todo a los ácidos succínico y málico. Miguel et al. (2016) también encontraron cantidades altas de ácido málico en flores de *C. officinalis*, aunque en su caso el principal ácido orgánico fue el

ácido cítrico, no detectado en nuestras muestras. Las flores de centaurea fueron las de menor contenido en ácidos orgánicos, mostrando solo presencia de los ácidos oxálico y siquímico. El ácido fumárico solo se encontró en pequeñas cantidades en las flores de dalia y centaurea. Entre las infusiones, las de caléndula y centaurea fueron las que presentaron las concentraciones más altas de ácidos orgánicos, principalmente debido a la presencia de los ácidos quínico y cítrico, respectivamente.

Compuestos lipofílicos en flores. Se identificaron veinticuatro ácidos grasos, siendo los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) predominantes en todas las muestras, con la excepción de dalia que mostró mayor concentración de ácidos grasos saturados (SFA). El ácido linoleico (C18:2n6) fue el principal ácido graso encontrado en las muestras de dalia y rosa (36,54 y 31,87%, respectivamente), seguido de ácido palmítico (C16:0) y ácido linolénico (C18:3n3), respectivamente. Las flores de caléndula presentaron ácido linolénico (36,90%) como principal ácido graso, seguido de ácido palmítico (21,70%), mientras que centaurea presentaba ácido eicosapentaenoico (C20:5n3, 26,93%) como ácido graso principal, seguido de ácido linolénico (18,75%). Los resultados obtenidos para *C. officinalis* están de acuerdo con los descritos por Dulf et al. (2013), que determinaron porcentajes de PUFA del 60-64% y una fracción saturada compuesta principalmente por ácido palmítico. Observaciones completamente diferentes fueron realizadas por Miguel et al. (2016), quienes encontraron en muestras de caléndula una proporción mucho mayor de la fracción de SFA que de PUFA (78% y 21%, respectivamente).

De acuerdo con las recomendaciones de EFSA (2010), la ingestión diaria recomendada de SFA debe ser la más baja posible. Asimismo, se recomienda que la ingestión diaria de ácido linoleico se sitúe en torno al 4% de la energía dietética total, así como el consumo diario de 250 mg de ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), especialmente para mujeres embarazadas (EFSA, 2010). Sólo las muestras de centaurea presentaron este último compuesto. Por su parte, la OMS recomienda un consumo de PUFA superior al 15% de la ingesta energética diaria en bebés (0-24 meses) y del 11% para niños y adolescentes (2-18 años) (Organización Mundial de la Salud, 2008). Tanto por sus contenidos totales de grasas y distribución de ácidos grasos como por el modo de consumo, no parece que el consumo de las flores analizadas pueda representar un riesgo en cuanto al aporte de SFA, ni tampoco que se puedan considerar fuentes destacadas de PUFA. A pesar del elevado porcentaje relativo de EPA encontrado en centaurea (única

muestra donde fue detectado entre las analizadas), los bajos contenidos de grasa en estas flores no permiten tampoco considerarlas una opción de cara al aporte de este ácido graso. Con respecto a tocoferoles, *C. officinalis* fue la muestra que reveló el contenido más alto, principalmente debido a la presencia de la isoforma α -tocoferol. Miguel et al. (2016) también describieron el α -tocoferol como la principal isoforma en flores de caléndula, aunque encontraron valores más bajos de tocoferoles totales. El α -tocoferol fue la isoforma mayoritaria en todas las flores estudiadas, mientras que δ -tocoferol no fue detectado en caléndula y centaurea, ni tampoco β -tocoferol en esta última. La dosis diaria recomendada para el consumo de tocoferoles en adultos es de 9 mg/día (EFSA,2015).

Perfil fenólico individual de los extractos hidrometanólicos e infusiones de las muestras de flores. Un derivado de ácido fenólico (ácido 5-*O*-cafeolquínico), veinte flavonoides (diferentes glicósidos de eriodictiol, kaempferol, quercetina, apigenina, naringenina, hesperetina, buteína e isoliquiritigenina) y dos compuestos desconocidos se detectaron en las muestras de dalia, donde la flavanona naringenina-3-*O*-glucósido era el compuesto mayoritario ($2,92 \pm 0,03$ mg/g de peso seco). Las flores de rosa mostraron doce flavonoides, todos derivados de kaempferol y quercetina, siendo la quercetina-3-*O*-glucósido el presente en mayor cantidad ($2,87 \pm 0,07$ mg/g de peso seco), mientras que no revelaron ningún derivado de ácidos fenólicos. En muestras de caléndula se identificaron tres derivados de ácido cafeico y diez flavonoides (glicósidos de kaempferol, quercetina e isorhamnetina). En estas muestras la isorhamnetina-3-*O*-rutinósido era el compuesto mayoritario ($5,40 \pm 0,04$ mg/g de peso seco), también identificado por Miguel et al. (2016) en otras muestras de *C. officinalis*. Finalmente, las muestras de centaurea presentaron cinco derivados de ácidos fenólicos (derivados de los ácidos cafeico y *p*-cumárico), nueve flavonoides (glicósidos de quercetina, kaempferol, apigenina, luteolina y taxifolina) y un compuesto desconocido; la apigenina-glucurónido era el compuesto mayoritario ($12,22 \pm 0,09$ mg/g de peso seco).

Los extractos hidrometanólicos e infusiones de caléndula presentaron las mayores concentraciones de flavonoides (11,15 y 7,37 mg/g, respectivamente) y de compuestos fenólicos totales (11,31 y 7,47 mg/g, respectivamente) de todas las muestras estudiadas. También mostraron mayor concentración de estos compuestos en comparación con los determinados por Miguel et al. (2016) en muestras de *C. officinalis*. Esta diferencia podría estar relacionada con el tipo de tratamiento que se dio a la muestra (por ejemplo, diferente proceso de secado), así como por el distinto origen geográfico de las flores.

Los derivados de ácidos fenólicos representan la segunda clase principal en las muestras de flores, aunque no fueron detectados en rosa. La concentración más alta en ácidos fenólicos se encontró en la muestra de centaurea tanto en los extractos hidrometanólicos como en las infusiones. El ácido clorogénico (ácido 5-*O*-cafeolquínico) fue el ácido fenólico más abundante en todos los casos. Este compuesto ha sido relacionado con varios efectos biológicos, incluyendo actividades antioxidante, antiobesidad, antiapoptosis y antitumoral (Kamiyama, Moon, Jang y Shibamoto, 2015; Rakshit et al., 2010).

Bioactividad de los extractos hidrometanólicos e infusiones en las muestras de flores.

Los extractos hidrometanólicos y las infusiones de flores de rosa mostraron capacidad para inhibir la peroxidación lipídica y prevenir el daño oxidativo en todos los ensayos realizados: captación de los radicales DPPH (0,18 y 0,82 mg/mL, respectivamente), poder reductor (1,29 y 0,64 mg/mL, respectivamente) e inhibición de la decoloración de β -caroteno (0,38 y 1,12 mg/mL, respectivamente). Estos resultados están en de acuerdo con los obtenidos por Barros et al. (2011) para flores de *Rosa canina* L.. Los extractos hidrometanólicos de caléndula mostraron valores más bajos de EC₅₀ (mayor actividad antioxidante) en los ensayos de inhibición de la decoloración de β -caroteno y DPPH que los reportados por Miguel et al. (2016).

No todas las muestras estudiadas eran capaces de inhibir el crecimiento de las líneas celulares tumorales estudiadas. Los extractos hidrometanólicos e infusiones de dalia aportaron los valores más bajos de GI₅₀ frente a las líneas celulares HeLa (223,65 μ g/mL) y MCF-7 (361,99 μ g/mL, 303,27 μ g/mL respectivamente). Sólo se detectó la presencia de flavanonas en las muestras de dalia, lo que pueden haber contribuido a su mayor actividad antiproliferativa, asociada por algunos autores a este tipo de flavonoides (Manthey y Guthrie, 2002).

El extracto hidrometanólico de rosa también presentó capacidad para inhibir el crecimiento de las líneas celulares de carcinoma cervical y hepatocelular. Nadpal et al. (2016) describieron resultados similares frente a líneas celulares de carcinoma cervical en ensayos con muestras de rosa. Los extractos hidrometanólicos y las infusiones de centaurea y caléndula apenas mostraron actividad antiproliferativa, con valores de GI₅₀ superiores a 400 μ g/mL en todas las líneas celulares ensayadas. Ninguno de los extractos o infusiones presentó hepatotoxicidad en el cultivo primario de células de hígado (PLP2).

Caracterización del perfil de antocianos. Se caracterizaron los perfiles antociánicos en los extractos de flores mediante análisis de HPLC-DAD-ESI/MS y están identificados en

la **Tabla 14** de la versión completa de la tesis. Se detectaron nueve antocianos en dalia, dos en rosa y ocho en extractos de centaurea, derivados de tres antocianidinas: cianidina (Cy; picos 1, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 13, 15 y 17), pelargonidina (Pg; picos 8, 9, 12, 16 y 18), y delphinidina (Dp; picos 5 y 7). El pico 1, detectado en rosa y centaurea se identificó positivamente como Cy-3,5-di-*O*-glucósido por comparación con nuestra biblioteca de datos. Este compuesto ya fue descrito como el principal antociano en flores de *R. damascena* (Velioglu y Mazza, 1991) y *R. hybrida* (Lee, Lee y Choung, 2011), así como en flores de diferentes especies de centaurea utilizadas con fines comestibles (Mishio, Takeda y Iwashina, 2015). El pico 2, encontrado en las muestras de rosa, fue también identificado positivamente como Cy-3-*O*-glucósido por comparación con un patrón y había sido ya descrito en *R. canina* por Hvattum (2002). El pico 4 era el antociano mayoritario en las muestras de centaurea y se identificó como Cy-3-*O*-(6"-succinilglucósido)-5-*O*-glucósido, compuesto consistentemente reportado en flores de centaurea y conocido como centaurocianina (Mishio et al., 2015; Takeda y Tominaga, 1983). La combinación de este antociano con una flavona e iones metálicos da lugar a la protocianina, un pigmento complejo estable considerado el principal responsable del color azul de las flores de *Centaurea cyanus* (Takeda et al., 2005). Del mismo modo, las características espectrales de masas del pico 3 permitieron asignarlo como Cy-3-*O*-(6"-malonilglucósido)-5-*O*-glucósido, también descrito previamente en flores de diferentes especies de centaurea (Mishio et al., 2015), mientras el pico 6 fue identificado tentativamente como Cy-*O*-glucurónido.

Los picos 8 y 9 en las muestras de centaurea se asociaron con derivados de pelargonidina, basándose en la forma característica de sus espectros de absorción con λ_{\max} a 501 nm, así como en la detección del aglicón en los espectros de masas (m/z 271). El pico 8 con un comportamiento de fragmentación similar al pico 4, fue identificado como Pg-3-*O*-(6"-succinilglucósido)-5-*O*-glucósido, previamente descrito en flores de *Centaurea cyanus* por Takeda, Kumegawa, Harborne y Self (1988). El pico 9 fue asignado provisionalmente como Pg-*O*-malonilhexósido basado en la pérdida de 248 mu (malonilhexósido) para producir el ion con m/z 271. De manera similar, pico 7 se asoció con Dp-*O*-malonilhexósido. El mismo razonamiento se aplicó un para identificar los antocianos en las muestras de dalia como derivados de cianidina (picos 10, 11, 13, 15 y 17) y de pelargonidina (picos 12, 16 y 18), previamente descritos en flores de esta especie (Deguchi et al., 2013; Takeda, Harborne y Self, 1986). El Cy-acetilhexósido (pico 13) fue

el compuesto más abundante en dalia, siendo el principal responsable de la coloración en estas flores comestibles. Finalmente, el pico 14 presentó un ion molecular $[M]^+$ de m/z 431 y un único fragmento MS^2 de m/z 269, que coincide con la masa de metilapigeninidina, una 3-desoxiantocianina, por lo que se podría asociar tentativamente a metilapigeninidina hexósido, un pigmento reportado en sorgo rojo (Wu y Prior, 2005). No obstante, el espectro de absorción de este pico 14 no parece coherente con tal identidad, ya que el máximo de absorción en la región del visible de ese compuesto debería esperarse alrededor de 470 nm (Awika, 2008). Por lo tanto, la identidad de este pico permanece incierta, aunque en caso de confirmarse sería la primera descripción de este tipo de pigmentos en flores de dalia. En general, estas flores pueden ser consideradas excelentes fuentes de antocianos con potencial para ser utilizadas como colorantes naturales y desarrollar productos innovadores con nuevas características sensoriales y bioactivas.

Caracterización de los yogures fortificados. Generalmente se considera que los aditivos naturales no producen daños sobre la salud de los consumidores, a diferencia de algunos compuestos artificiales (Carocho, Barreiro, Morales y Ferreira, 2014). Sin embargo, la aceptabilidad de estos productos depende mucho de su apariencia y propiedades sensoriales y reológicas (Caleja et al., 2016; Santillán-Urquiza, Méndez-Rojas, y Vélez-Ruiz, 2017). En lo que concierne al yogur, de manera similar a otros productos alimenticios, el color es un factor determinante. Teniendo esto en cuenta, se seleccionaron diferentes especies de flores comestibles como posibles fuentes de colorantes, y yogures preparados con extractos de las mismas se compararon entre sí y con yogures a los que se incorporaba un antociano comercial (E163, autorizado por EFSA). Como “blanco” control, se utilizaron los mismos yogures libres de cualquier agente colorante. Además de tras su preparación, las formulaciones de yogur (YF) también se evaluaron después de 7 días de almacenamiento (SE). Dado que el efecto de cada factor (YF o SE) puede verse afectado por el segundo nivel de factor (es decir, efecto del almacenamiento según cada YF, o viceversa), también se evaluó la interacción $YF \times SE$. En todos los casos se encontró una interacción significativa ($p < 0.050$), por lo que no se pudieron realizar comparaciones, de manera que las conclusiones generales se obtuvieron a partir de representaciones gráficas (EMM).

En lo referido a parámetros nutricionales, se encontró una interacción significativa entre YF y SE ($YF \times SE$) en todos los casos, lo que indica que cada formulación reaccionó de

manera diferente al almacenamiento, considerando cada factor individualmente. Las diferencias relacionadas con YF fueron significativas en la mayoría de los casos, excepto para agua y energía, mientras que SE no tuvo efecto significativo en ningún caso.

En cualquier caso, el perfil nutricional es muy similar entre todas las muestras analizadas, con el agua como componente principal (≈ 85 g/100 g), seguido de carbohidratos (ligeramente más alto en yogures coloreados con rosa, RY, y con centaurea, CY, y menor en los que se había añadido dalia, DY) y proteínas (5,3-5,4 g/100 g), grasa (3,2-3,4 g/100 g) y cenizas ($<0,9$ g/100 g en todos los yogures). Los valores de energía estuvieron alrededor de 74 kcal/100 g en todos los casos. Debido a la baja cantidad de material colorante agregado, no era de esperar que se produjesen diferencias significativas entre las distintas formulaciones, particularmente en lo que concierne a la cantidad de grasa, ya que los extractos de flores habían sido obtenidos en agua.

En lo que respecta a los azúcares individuales, la lactosa fue el compuesto principal ($\approx 4,8$ g/100 g, con valores ligeramente más altos en las muestras coloreadas con colorante comercial E163, AY) y también se cuantificaron niveles menores de galactosa, variando los valores máximos detectados entre 0,76 g/100 g (yogur con centaurea) y 0,69 g/100 g (yogures control, BY).

Las diferencias más significativas se obtuvieron en el caso de los parámetros de color.

El yogur libre de aditivos (BY) mostró los valores L^* más altos, seguidos de CY, AY, RY y DY. Por el contrario, BY presentó los valores de a^* más bajos, mientras que AY, RY y DY alcanzaron los más altos (sin diferencias significativas entre ellos). La ausencia de diferencias significativas para los valores a^* entre AY, RY y DY sugiere que los extractos de rosa y dalia podrían ser colorantes potenciales alternativos al E163.

También se caracterizaron los perfiles de ácidos grasos, especialmente por su potencial utilidad como indicadores de condiciones de conservación adecuadas (Barreira, Pereira, Oliveira y Ferreira, 2010; Pereira et al., 2016). Para el tratamiento estadístico posterior se tuvieron en consideración los ácidos grasos cuantificados en porcentajes relativos superiores al 1%, aunque los perfiles analizados incluyeron también otros ácidos grasos (C11:0, C13:0, C14:1, C17:0, C17:1, C18:3n6, C20:0, C20:1, C20:4n6, C20:5n3, C22:0, C23:0, C24:0).

Dado que la leche era la principal fuente de ácidos grasos en el yogur, y teniendo en mente, una vez más, que los extractos agregados eran acuosos, la similitud de perfiles

entre las distintas formulaciones es coherente. A pesar de ello, C18:1n9 ($p = 0,133$), SFA ($p = 0,180$) y MUFA ($p = 0,125$) eran los únicos casos sin diferencias significativas entre formulaciones, posiblemente por la diferente eficacia que pueden tener los distintos extractos para prevenir la oxidación de ácidos grasos a lo largo del tiempo. De la interacción entre factores (YF \times SE) se obtuvieron las siguientes conclusiones: BY presentó mayores porcentajes de C4:0 (1,3%), C6:0 (1,7%), C8:0 (1,3%) y C10:0 (2,9%), mientras que C15:0 (1,5%), C16:1 (1,5%), C18:0 (11,5%), C18:2n6 (2,5%) y PUFA (5,3%) mostraron los valores más altos en CY. Los yogures preparados con extracto de rosa (RY), por otro lado, tenían los porcentajes más altos de C14:0 (12,2%) y C16:0 (36%), mientras que C12:0 se encontraba en niveles ligeramente mayores en AY (3,7%). En lo que respecta al efecto del almacenamiento, casi todos los ácidos grasos mostraron diferencias significativas, excepto C15:0 ($p = 0,737$), C16:1 ($p = 0,984$), C18:0 ($p = 0,213$), C18:2n6 ($p = 0,063$) y PUFA ($p = 0,532$). En las muestras almacenadas durante 7 días se cuantificaron porcentajes más altos de C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0 y SFA, mientras que C4:0, C18:1n9, C19:3n3 y MUFA tendían a presentar valores más altos en las muestras recién preparadas. En general, estos resultados corroboran la mayor resistencia de los ácidos grasos saturados durante el almacenamiento.

Análisis discriminante lineal. A pesar de las diferencias estadísticas entre las formulaciones de yogures, se decidió verificar si la magnitud de las diferencias detectadas era lo suficientemente alta para discriminar cada formulación. Para ello, se realizó un análisis discriminante lineal (LDA) con el objeto de encontrar las variables con mayor capacidad de discriminación entre YF. Las tres primeras funciones discriminantes permitieron explicar el 97,7% de la varianza observada (primera función: 61,4%; segunda función: 30,0%; tercera función: 6,3%).

De las 41 variables bajo análisis, el modelo seleccionó b^* , a^* , L^* , pH, C4:0, C8:0, C13:0, C16:1, C17:1, C18:3n3, C18:3n6, C20:1, C20:4n6, C20:5n3, C23:0, C24:0 y PUFA como aquellas con mayor capacidad discriminante, lo que indica claramente que los ácidos grasos y los parámetros de color eran las variables con menor similitud entre las preparaciones de yogures. En lo que respecta a las correlaciones entre funciones y variables, la función 1 estaba altamente correlacionada con b^* y L^* , colocando las formulaciones DY y BY en las posiciones más alejadas debido a sus diferencias en ambos parámetros (el valor b^* más alto se midió en DY, mientras que el L^* máximo se midió en BY). La función 2, a su vez, estaba mayormente correlacionada con a^* , separando las preparaciones AY y RY de BY. La función 3 también contribuyó a separar los marcadores

de cada YF, siendo especialmente eficaz en la separación de BY y CY. Teniendo en cuenta su proximidad según las tres discriminantes consideradas, las formulaciones RY y AY fueron las que tenían mayor similitud entre ellas.

4.2. Frutos

Los frutos se caracterizaron en cuanto a su composición nutricional y química, aunque en el caso de *V. myrtillus* también se determinó el perfil de antocianos, teniendo en cuenta que podría ser utilizado como colorante natural.

4.2.1. *Malus domestica* a Borkh. cv Bravo de Esmolfe

Composición nutricional y valor energético. Los carbohidratos fueron los macronutrientes más abundantes, seguidos de grasas, proteínas y cenizas. Feliciano et al. (2010), en estudios realizados sobre distintas variedades de manzana portuguesas, citan para “Bravo de Esmolfe” contenidos de proteínas más bajos que los determinados en el presente estudio (0,08 g/100 g de porción comestible, equivalentes a 1,23 g/100 g peso seco). Se identificaron 16 ácidos grasos con predominio de los ácidos grasos saturados, principalmente ácido palmítico, seguido de los ácidos esteárico y linoleico (28,94%, 16,4% y 15,8%, respectivamente). El α -tocoferol (0,52 mg/100 g de peso seco) fue la única isoforma de tocoferol encontrada, lo que está de acuerdo con lo citado por Feliciano et al. (2010) en “Bravo de Esmolfe” (107,27 μ g/100 g de porción comestible). Fructosa, glucosa y sacarosa fueron los azúcares detectados en la muestra analizada, siendo la fructosa la más abundante, lo que también está de acuerdo con lo recogido por Feliciano et al. (2010) en cuanto a distribución de azúcares. Respecto a los ácidos orgánicos, el ácido málico fue con diferencia la principal molécula presente, seguido de los ácidos quínico, oxálico y siquímico. El ácido málico era también el principal ácido orgánico presente en zumos de manzana (Chinnici, Spinabelli, Riponi y Amati, 2015), así como en distintas variedades de manzana analizadas por Feliciano et al. (2010) y Wu et al. (2007), quienes detectan, además, la presencia de otros ácidos orgánicos, como cítrico, succínico y fumárico.

Perfil fenólico. Los flavan-3-oles fueron la principal familia de compuestos detectados, como también se ha descrito para otras variedades de manzana (Malec et al., 2014; Scafuri et al., 2016; Verdu et al., 2013; Wojdyło et al., 2008). Los picos **1**, **7** y **11** fueron identificados como procianidinas B1, B2 y C1 por comparación con nuestra biblioteca de datos. Estos compuestos han sido reportados consistentemente como procianidinas mayoritarias en manzana (Mayr et al., 1995; Shoji et al., 2003, 2006; Verdu et al., 2013; Wojdyło et al., 2008). Es conocido que las procianidinas de manzana están principalmente

formadas por unidades de extensión de epicatequina (Mayr et al., 1995; Shoji et al., 2003, 2006), lo que también se asume para los oligómeros no identificados (picos 3, 4, 12, 13). El compuesto más abundante presente en la variedad ‘Bravo de Esmolfe’ fue el ácido 5-*O*-cafeoilquínico (pico 6; 51,5 mg/100 g de peso seco), seguido de procianidina B2 (pico 7; 34,5 mg/100 g de peso seco).

En la evaluación de la actividad antioxidante, los valores de EC₅₀ más bajos se observaron en los ensayos TBARS y DPPH (0,45 y 0,71 mg/ml, respectivamente). Hamauzu, Yasui, Inno, Kume y Omanyuda (2005) y Luo, Zhang, Li y Shah, (2016) encontraron valores más bajos de EC₅₀ en el ensayo de captación de radicales DPPH en manzanas de la variedad ‘Fuji’ (EC₅₀ = 8,4 mg/100 ml y 0,26 mg/ml, respectivamente). Las diferencias observadas podrían estar relacionadas con las variedades estudiadas, pero también con la distinta forma de preparación de los extractos.

En cuanto a actividad antibacteriana, los valores más bajos de CMI se encontraron frente a bacterias Gram positivas, en particular *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina (MSSA) (CMI = 2,5 mg/ml). Para *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y otras bacterias Gram positivas como *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis* se obtuvieron valores de CMI más altos (5 mg/ml). Entre las bacterias Gram negativas, fueron *Escherichia coli*, *Escherichia coli* ESBL y *Morganella morganii* las que presentaron los valores más bajos de CMI (5 mg/ml). Luo et al. (2016) también estudiaron la actividad antibacteriana de extractos polifenólicos de manzana de variedad ‘Fuji’, obteniendo valores CMI más bajos que los encontrados en el presente trabajo. Una posible explicación podría estar en que en ese estudio se utilizaron microorganismos estándar (ATCC), mientras que las bacterias aquí utilizadas se obtuvieron de aislados clínicos con perfiles multirresistentes (Dias et al., 2016). Además, en cada caso se han utilizado diferentes disolventes para la preparación de extractos, lo que también puede influir sobre los resultados.

4.2.2. Frutos y tallos de *Lycium barbarum* L.

Composición de nutrientes. Los carbohidratos fueron los macronutrientes más abundantes en frutas y tallos (87 y 78,1 g/100 g de peso seco, respectivamente). Los tallos presentaron mayores contenidos de cenizas, proteínas y grasas (9,9, 7,4 y 4,6 g/100 g de peso seco, respectivamente), mientras que las frutas presentaron proteínas como el segundo macronutriente principal (5,3 g/100 g de peso seco), seguido por grasa y ceniza

(4,1 y 3,21 g/100 g de peso seco, respectivamente). Yang et al., (2014) reportaron diferentes resultados para frutos de goji, con mayores contenidos de proteínas y grasas (12,1 y 6,89 g/100g de peso seco, respectivamente) y menores de cenizas (0,95 g/100 g de peso seco). Estas diferencias pueden explicarse por el tipo de cultivo y/o diferentes condiciones edafoclimáticas que pueden conducir a contenidos nutricionales variables. La fructosa, glucosa y sacarosa fueron los únicos monosacáridos detectados en frutos y tallos, siendo la glucosa el más abundante, seguido de fructosa y sacarosa. Como se esperaba, las frutas presentaron un contenido mucho mayor en azúcares solubles (27,9 g/100 g de peso seco) que los tallos (1,08 g/100 g de peso seco). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Mikulic-Petkovsek et al. (2012) en frutos de goji de Eslovenia, donde la glucosa y la fructosa también eran los azúcares predominantes, aunque esos autores encontraron un mayor contenido de azúcares totales. Con respecto a los ácidos orgánicos, frutos y tallos presentaron perfiles muy diferentes, sin embargo, no había diferencias estadísticamente significativas en el contenido total de ácidos orgánicos entre muestras. Los ácidos succínico, cítrico y oxálico (1,29, 0,77 y 0,010 g/100 g de peso seco, respectivamente) fueron detectados en el fruto, mientras que los ácidos málico, oxálico y quínico (0,899, 0,65 y 0,53 g/100 g de peso seco, respectivamente) fueron detectados en los tallos. El ácido oxálico fue el único ácido orgánico común en ambas muestras. Donno et al. (2015) describieron la presencia de varios ácidos orgánicos (málico, quínico y tartárico) en frutas goji de Italia. Estas diferencias pueden deberse al estado físico de las muestras y/o la metodología de extracción.

Se identificaron dieciséis ácidos grasos en los frutos, siendo los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) los predominantes del grupo, principalmente debido a la presencia de ácido linoleico (C18:2n6, 53,4%), seguido de ácido oleico (C18:1n9, 16,5%) y ácido palmítico (C16:0, 12,77%). Resultados similares fueron obtenidos por Yan et al. (2014) en frutas goji de China, quienes describieron el ácido linoleico (66,81%) y el ácido oleico (17,13%) como los principales ácidos grasos. En las muestras de tallos se identificaron dieciocho ácidos grasos, predominando los saturados (SFA), especialmente el ácido palmítico (C16:0, 15,94%) y el ácido lignocérico (C24:0, 15,3%), seguido del ácido linolénico (C18:3n3, 14,8%). Con respecto a los tocoferoles, el mayor contenido (3,59 mg/100 g de peso seco) se encontró en los tallos, principalmente debido a la presencia de α -tocoferol (3,37 mg/100 g de peso seco), con niveles menores de β -tocoferol (0,22 mg/100 g de peso seco). En el fruto se encontraron menores cantidades de

tocoferoles, que también contienen α -tocoferol como isoforma mayoritaria, pero con δ -tocoferol como segundo vitámero (0,23 y 0,09 mg/100 g de peso seco, respectivamente).

Perfil fenólico individual. Las frutas y los tallos presentaron diferente perfil fenólico, con presencia de derivados del ácido hidroxibenzoico (derivados galoilo) y de ácidos hidroxicinámicos (cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico), flavan-3-oles y flavonoles (derivados de quercetina y kaempferol). En las muestras de frutas se identificaron dieciséis compuestos que están descritos en la **Tabla 24** de la versión completa de la Tesis: ocho flavonoles (picos 6, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22), siete derivados de ácidos fenólicos (picos 1, 2, 3, 4, 7, 10 y 14), y un flavan-3-ol (pico 9), mientras que en los tallos se detectaron once compuestos, la mayoría de los cuales eran derivados de ácidos fenólicos (picos 2, 4, 5, 7, 8, 11, 12 y 13), junto con dos flavonoles (picos 16 y 20) y un flavan-3-ol (pico 15). Solo tres ácidos clorogénicos (picos 2, 4 y 7) fueron comunes a ambas muestras. Los picos 7, 9, 12, 14, 16, 19 y 20 (ácido 5-*O*-cafeoilquínico, catequina, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, quercetina-3-*O*-rutinósido, quercetina-3-*O*-glucósido, y kaempferol-3-*O*-rutinósido, respectivamente) fueron identificados por sus espectros UV y de masas y características de retención en comparación con estándares comerciales. Los compuestos 19 y 20 habían sido previamente reportado por otros autores en hojas (Mocan et al., 2017) y frutos de goji (Bondia-Pons et al., 2014; Inbaraj et al., 2010). Los flavonoles fueron los compuestos fenólicos más abundantes en los tallos de goji. aunque principalmente debido a la presencia de quercetina-3-*O*-rutinósido (rutina, pico 16), con niveles menores de kaempferol-3-*O*-rutinósido (pico 20). La presencia de rutina como principal flavonol presente en distintas partes de goji ha sido reportada por varios autores (Affes et al., 2017; Bondia-Pons et al., 2014; Mocan et al., 2017, 2015a, b, 2014; Protti et al., 2017; Qian et al., 2004; Zhang et al., 2016).

El contenido total de compuestos fenólicos no mostró ninguna diferencia significativa entre frutos y tallos de goji. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre las muestras cuando se consideraba cada familia de compuestos fenólicos, siendo los derivados de ácidos fenólicos la mayoría de los compuestos en el fruto (32,7 mg/g vs 17,2 mg/g en los tallos) y los flavonoles en los tallos (48,5 mg/g vs 27,6 mg/g en las frutas). La quercetina-3-*O*-rutinósido fue, el principal compuesto fenólico en tallos (48 mg/g) y frutos (16,6 mg/g), seguido en estos últimos por ácido *p*-cumárico (12,3 mg/g).

Bioactividad de los extractos hidrometanólicos de frutas y tallos. Los extractos hidrometanólicos de los tallos de *L. barbarum* mostraron la mayor actividad antioxidante

en todos los ensayos: actividad de captación de DPPH, poder reductor, inhibición de la decoloración de β -caroteno e inhibición de TBARS ($EC_{50} = 0,28, 0,23, 0,26$ y $0,07$ mg/mL, respectivamente). Resultados similares fueron reportados por Liu et al. (2017) en extractos etanólicos de *L. barbarum* de Taiwán, en ensayos de captación de radicales DPPH y poder reductor ($0,102$ y $0,167$ mg/mL, respectivamente). Por otro lado, Jabbar et al. (2014), en extractos metanólicos de frutas goji de China, describieron valores de EC_{50} más bajos que los determinados en este trabajo, en cuanto a captación de radicales DPPH y poder reductor ($0,042$ y $0,121$ mg/mL, respectivamente). La actividad antioxidante revelada por las muestras aquí estudiadas podría deberse a sus contenidos fenólicos.

Ni las frutas ni los tallos revelaron toxicidad en el cultivo primario de hígado de cerdo (PLP2). Con respecto a la actividad antibacteriana, ambas muestras mostraron mejores resultados contra bacterias Gram-positivas que contra Gram-negativas, con valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que oscilaban entre $2,5$ y 10 mg/mL. Los valores más bajos se determinaron para *E. faecalis* ($2,5$ mg/mL), *L. monocytogenes* (5 mg/mL), *S. aureus* ($2,5$ mg/mL), MRSA ($2,5$ mg/mL) y MSSA ($2,5$ mg/mL). En bacterias Gram-negativas, los tallos presentan mayor actividad contra *A. baumannii* (20 mg/mL), *K. pneumonia* (10 mg/mL) y *P. aeruginosa* (10 mg/mL). Mocan et al. (2017) y Mocan et al. (2015b) determinaron valores de CMI más bajos en hojas y flores de goji, contra bacterias Gram-negativas y positivas, respectivamente.

Se obtuvieron buenas correlaciones entre las diferentes familias de compuestos fenólicos analizados y la actividad antioxidante ($r^2 < 0,8$). En cuanto a actividad antibacteriana, se observaron aceptables coeficientes de correlación entre compuestos fenólicos y *Escherichia coli* ESBL 2, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*, sugiriendo que la presencia de compuestos fenólicos podría estar relacionada con el potencial antibacteriano de las muestras en estudio.

4.2.3. *Vaccinium myrtillus* L.

Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto de arándano.

Se detectaron once glicósidos de antocianos derivados de delfinidina (Dp; picos 1, 2 y 4), cianidina (Cy; picos 3 y 6), petunidina (Pt; picos 5 y 8), peonidina (Pn; picos 7 y 10), y malvidina (Mv; picos 9 y 11) que están descritos en la **Tabla 26** de la versión completa de la tesis. Los glicósidos de malvidina, especialmente Mv-3-O-galactósido y Mv-3-O-

arabinósido, fueron los principales pigmentos presentes, representando el 48% del contenido total de antocianos, mientras que los derivados de delfinidina (Dp-galactósido, Dp-glucósido y Dp-arabinósido) constituían el 22%, y los de petunidina el 20% (Pt-galactósido y Pt-arabinósido).

Perfil nutricional de los yogures fortificados con frutos de arándano y E163. Los yogures presentaron un contenido de humedad superior a 85 g/100 g y aproximadamente los mismos niveles de proteínas y carbohidratos (~5 g/100 g), con un contenido de grasa ligeramente inferior (~3,3 g/100 g), y valores de energía de alrededor de 70 Kcal/100 g, validando la información etiquetada y demostrando ser coherente con la composición nutricional típica del yogur natural (Van Nieuwenhove et al., 2019). El tiempo de almacenamiento (ST) y el tipo de incorporación (IT) no mostraron un efecto cooperativo sobre el contenido de grasa, que fue significativamente mayor en yogures que contenían E163 y en las muestras almacenadas durante 7 días. A su vez, la interacción entre los factores (ST × IT) fue significativa ($p < 0,050$) para todos los demás parámetros. Los valores de energía fueron ligeramente más altos en las muestras a los 7 días (73 ± 2 kcal/100 g de peso fresco), debido a la pérdida de humedad durante el almacenamiento. El contenido de cenizas era significativamente mayor en los yogures que contenían E163 ($1,0 \pm 0,2$ g/100 g de peso fresco) y extracto de arándano, lo que indica que se incorporaron minerales como parte de la composición de esos aditivos, aspecto lógico al tratarse de extractos de plantas. En todo caso, las variaciones de composición encontradas entre las distintas muestras son pequeñas y, consecuentemente, las diferencias nutricionales entre ellas muy leves.

Análisis de azúcares y de ácidos grasos en las formulaciones de yogur. Los ácidos grasos presentes en porcentajes más altos fueron ácido palmítico: C16:0 (~ 35%), ácido oleico: C18:1n9 (~ 21%), ácido mirístico: C14:0 (~ 12%), y ácido esteárico: C18:0 (~ 11%), que está de acuerdo con los resultados reportados en un estudio similar (Van Nieuwenhove et al., 2019). Como se esperaba, la lactosa fue el azúcar principal. En línea con los resultados obtenidos en el análisis nutricional, las diferencias obtenidas para cada uno de los compuestos individuales estudiados reflejaron interacción significativa entre ambos factores (ST e IT), excepto en el caso de la lactosa, que mostró contenidos estadísticamente más altos en yogures añadidos con arándano. En consecuencia, las pocas tendencias generales tuvieron que obtenerse de los gráficos de EMM, que indicaron porcentajes de C18:0 y contenido de galactosa más bajos en yogures naturales.

Color y pH. Todos los parámetros e índices cromáticos mostraron diferencias significativas entre las diferentes formulaciones de yogur, mientras que el tiempo de almacenamiento apenas tuvo efecto, excepto para los valores de L^* , que fueron ligeramente más bajos en las muestras en el día 0. No obstante, las gráficas de EMM permitieron establecer que L^* , b^* y c^* presentaban valores más altos en las muestras de yogur natural, que a su vez mostraron valores más bajos de h^* y, en particular, de a^* .

Está claro que ambos colorantes proporcionaban color al yogur, aunque con menor intensidad en el adicionado con E163, particularmente en el día 7, donde se encontró una disminución en el valor del componente a^* . En todo caso, se debe tener en cuenta que, además de las diferencias que pueden existir en el perfil antociánico y composición de cada colorante (E163 y arándanos), la concentración de extracto incorporada era distinta en cada caso.

Estas apreciaciones se corroboran al calcular la diferencia de color total (ΔE), que después de 7 días alcanzaba un valor de 3,86 para los yogures E163 en comparación con el día 0, mientras que para los yogures de color de arándano la diferencia era de 0,91, muy similar a la variación producida en la muestra de yogur natural (0,73). Esta observación pone de manifiesto la existencia de mayor estabilidad del extracto de arándano, apoyando su viabilidad como colorante alimentario para el yogur.

Los valores de pH fueron estadísticamente diferentes para cada formulación, presentando menor acidez los yogures que contenían E163. Por otro lado, el tiempo de almacenamiento no tuvo ningún efecto sobre los valores de pH, independientemente del tipo de formulación.

Análisis de componentes principales. Se realizó para establecer las variables con las diferencias más altas entre cada IT considerada, las dos primeras dimensiones definidas (primera: α de Cronbach = 0,920, valor propio = 8,232, varianza explicada = 47,4%; segunda: α de Cronbach = 0,871, valor propio = 5,940, varianza explicada = 37,0%), permitieron formar tres grupos principales: dos de ellos correspondientes a marcadores de yogur natural y un gran tercer grupo que contiene marcadores correspondientes a yogures añadidos con E163 o con el extracto de arándano. Tras analizar los resultados, los marcadores correspondientes a yogures naturales y aquellos que contenían colorantes estaban básicamente separados por la dimensión 1, siendo lógicamente los parámetros de color, los que tenían la mayor contribución para esta separación. Específicamente, los yogures naturales se caracterizaron principalmente por sus altos valores de L^* , b^* y c^* ,

mientras que los yogures coloreados presentaban valores elevados de a^* y h^* , como características más relevantes. Por su parte, la segunda dimensión separó dos grupos distintos de marcadores, ambos pertenecientes a yogures naturales, que correspondían exactamente a los dos períodos analizados: 0 y 7 días, lo que indica que este tipo de yogures no mantenían sus características a lo largo del tiempo. Esta separación, no se observa, sin embargo, en los yogures que contenían colorantes, donde no hubo segregación entre muestras a los 0 y 7 días, lo que se considera una evidencia sólida de la estabilidad proporcionada por ambos aditivos. A pesar de esta similitud entre yogures añadidos con E163 o con extracto de arándano, los marcadores correspondientes a este último tipo de incorporación generalmente se colocaron a la derecha de los agregados con E163, lo que en este caso sugiere una mayor eficacia como colorante de los extractos de arándano (ubicación más cercana a la variable a^*).

4.3. Mezclas a base de *Vaccinium myrtillus* L.

El objetivo principal fue caracterizar tres mezclas a base de frutas de arándano combinadas con flores de rosa (P1), flores de caléndula (P2), y manzana deshidratada y frutos de goji (P3), comparando todos los resultados con un control muestra compuesto solo de frutos de arándano (P0).

Valor nutricional y caracterización química. En general, a pesar de las diferencias estadísticas entre las cuatro muestras, los perfiles fueron muy similares, excepto por el contenido de tocoferoles. Los carbohidratos fueron el macronutriente más abundante en todas las muestras, con un rango de 94,32 a 94,80 g / 100 g de peso seco, seguidos de proteínas ($2,6 \pm 0,5$ a $3,7 \pm 0,6$ g/100 g de peso seco), cenizas ($1,3 \pm 0,4$ a $1,6 \pm 0,1$ g/100 g de peso seco) y grasa ($0,7 \pm 0,04$ a $1,1 \pm 0,1$ g/100 g de peso seco).

De los veinticuatro ácidos grasos identificados, los poliinsaturados (PUFA) fueron los que presentaron mayores proporciones en todas las muestras. El ácido linoleico (C18:2n6) fue el principal ácido graso encontrado, seguido por ácido linolénico (C18:3n3) y ácido oleico (C18:1n9). Estos resultados estaban de acuerdo con los obtenidos en la caracterización de flores de rosa y caléndula. Al comparar los resultados para los ácidos grasos entre las muestras individuales antes estudiadas y las mezclas ahora analizadas, se podría esperar que hubiera una mayor concentración de ácido linoleico en las mezclas que contenían rosa y goji, y de α -linolénico y ácido palmítico en mezclas con caléndula y manzana, respectivamente. Sin embargo, las cantidades de flores de rosa y caléndula,

goji o manzana incorporadas en las mezclas no eran suficientes para causar diferencias relevantes en la distribución de ácidos grasos en P1, P2 y P3 en comparación con P0.

Con respecto al contenido de azúcar, se detectaron fructosa, glucosa y sacarosa en todas las muestras, siendo la fructosa la más abundante ($29,2 \pm 0,4$ a $36,4 \pm 0,7$ g/100 g de peso seco). Mikulic-Petkovsek et al. (2015), reportaron valores similares. en frutos de *V. myrtillus*, donde la fructosa era el azúcar más abundante. La adición de los diferentes componentes no indujo diferencias significativas en los contenidos de azúcar en las mezclas P1 y P2 en comparación con P0, pero se encontraron contenidos menores en P3 (agregado con frutas de manzana y goji), lo que podría atribuirse a la menor proporción de arándano en esa muestra.

El perfil en ácidos orgánicos fue similar en todas las muestras, identificándose seis compuestos principales. El principal ácido orgánico encontrado fue el cítrico, seguido del ácido quínico. No se encontró ácido málico en la muestra P0, al contrario que en las otras tres muestras. Este era un resultado esperado, ya que el ácido málico se había encontrado previamente en pétalos de rosa y caléndula y en muestras de manzana.

Con respecto a los tocoferoles, se encontraron diferencias significativas entre las cuatro muestras. El α -tocoferol era la isoforma más abundante en todas las muestras (en un rango de $1,31 \pm 0,08$ a $4,74 \pm 0,05$ mg/100 g de peso seco). P1 fue la única muestra que presentó las cuatro isoformas en su composición debido a su presencia en las flores de rosa, como se había establecido previamente; de manera similar sucede en P2 con la presencia de β -tocoferol (ausente en la muestra de P0) y el aumento significativo en la cantidad de α -tocoferol, debido a la presencia de flores de caléndula. También fue en las muestras P2 donde se observó el mayor contenido total de tocoferoles ($6,301$ mg/100 g de peso seco), una vez más atribuido a la presencia de flores comestibles de caléndula. La presencia de frutos de manzana y goji en mezclas de P3 no tuvo influencia en el perfil de tocoferoles, aunque había una disminución en su contenido total ($2,02 \pm 0,08$ mg/100 g de peso seco) en comparación con P0 ($3,04 \pm 0,12$ mg/100 g de peso seco), que podría estar relacionada con la menor proporción de arándano en esa muestra.

Perfil fenólico de compuestos antociánicos y no antociánicos. Se encontraron veinticuatro compuestos fenólicos no antociánicos diferentes (**Tabla 31** de la versión completa de la tesis), de los cuales diez eran derivados de ácidos fenólicos (picos 1^{NA} a 10^{NA}) y catorce flavonoides (picos 11^{NA} a 24^{NA}).

Los flavonoles (derivados de la quercetina isorhamnetina, kaempferol y miricetina) fueron la clase principal de compuestos fenólicos en los frutos de arándano. Los picos 11^{NA} (miricetina-3-*O*-glucósido), 14^{NA} (quercetina-3-*O*-rutinósido), 15^{NA} (quercetina-3-*O*-glucósido), 18^{NA} (kaempferol-3-*O*-rutinósido), 19^{NA} (isorhamnetina-3-*O*-rutinósido) y 21^{NA} (isorhamnetina-3-*O*-glucósido) se identificaron por comparación con estándares comerciales. El pico 13^{NA} presentaba características similares al pico 14^{NA} y se asignó tentativamente como quercetina-*O*-desoxihexósido-hexósido. Los picos 16^{NA} y 20^{NA} se asignaron tentativamente como quercetina-3-*O*-galactósido y quercetina-3-*O*-ramnósido, respectivamente, teniendo en cuenta los compuestos previamente descritos en *V. myrtillus* (Mikulic-Petkovsek, Slatnar, Stampar y Veberic, 2012; Vhrosek, Masuero, Palmieri y Mattivi, 2012; Diaconeasa, Florica, Rugină, Lucian y Socaciu, 2014),

El pico 23^{NA} se identificó tentativamente como kaempferol-*O*-desoxihexósido. Los picos 12^{NA}, 22^{NA} y 24^{NA} presentaban un único fragmento MS² de m/z 315 (isorhamnetina aglicón), y se identificaron provisionalmente como isorhamnetina-*O*-desoxihexosilhexósido, isorhamnetina-*O*-desoxihexósido e isorhamnetina-*O*-glucurónido, respectivamente. La presencia de isorhamnetina-3-*O*-rutinósido e isorhamnetina-3-*O*-glucurónido, que podrían corresponder a los picos 12^{NA} y 24^{NA}, fue descrita por Mikulic-Petkovsek et al. (2012) en diferentes bayas.

Los ácidos fenólicos fueron el segundo grupo de compuestos encontrados en los extractos hidrometanólicos de arándano, la mayoría de ellos conjugados con restos de azúcar, en particular los picos 1^{NA} (hexósido de ácido siríngico), pico 2^{NA} / 5^{NA} (hexósido de ácido cafeico), 3^{NA} (hexósido de ácido *p*-cumárico), 4^{NA} / 7^{NA} (hexósidos de ácido ferúlico), y 9^{NA} (hexósido de ácido sináptico). El pico 10^{NA} se identificó positivamente como ácido cafeico mientras los picos 6^{NA} y 8^{NA} se identificaron tentativamente como ácidos *cis* y *trans* 5-*O*-cafeoilquínico, respectivamente, por comparación con nuestra biblioteca de datos. El pico 6^{NA} era el principal ácido fenólico encontrado en las cuatro muestras. Finalmente, se identificó tentativamente una flavanona, naringenina-*O*-glucurónido (pico 17^{NA}). Este era el segundo compuesto principal en la muestra P2 (12,78 mg/g de extracto) y también se encontraba en cantidades traza en la muestra P3. En nuestro conocimiento, ésta es la primera vez que se informan derivados de naringenina en fruto de arándano.

El perfil de las cuatro muestras fue muy similar, lo que lleva a la conclusión de que los compuestos fenólicos presentes en las frutas de arándano predominan sobre los de otros componentes presentes en las mezclas, con la excepción del pico 23^{NA} (kaempferol-*O*-

desoxihexósido), solo detectado en P1, previamente encontrado en muestras de flores de rosa. En la mezcla P2, siete de los compuestos identificados (hexósido del ácido cafeico, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, ácido cafeico, quercetina-*O*-desoxihexósido-hexósido, quercetina-3-*O*-rutinósido, isorhamnetina-3-*O*-rutinósido e isorhamnetina-3-*O*-glucósido) son muy comunes en los arándanos, pero también en flores de caléndula, como se había podido establecer. En el caso de la mezcla P3, ninguno de los compuestos identificados era común con los compuestos fenólicos de manzana, previamente identificados. En cuanto a los frutos de goji, seis compuestos (hexósido del ácido *p*-cumárico, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, hexósido del ácido sinápico, quercetina-3-*O*-rutinósido, quercetina-3-*O*-galactósido y quercetina-3-*O*-glucósido) eran comunes con los encontrados en frutos de arándano. Se encontró un aumento estadísticamente significativo en el caso de quercetina-3-*O*-rutinósido ($12,925 \pm 0,002$ mg/g en P3 frente a $4,4 \pm 0,1$ mg/g en P0), lo que puede explicarse por el hecho de que este compuesto es uno de los principales componentes fenólicos en frutos de goji. En general, la muestra P2 reveló el mayor contenido de compuestos fenólicos totales ($110,72 \pm 0,01$ mg/g de extracto) y, en consecuencia, los compuestos comunes entre los arándanos y las flores de caléndula están en cantidades más altas que en la muestra P0. Por lo tanto, se puede concluir que, a pesar de su baja concentración en la mezcla, las flores de caléndula proporcionan cantidades relevantes de compuestos fenólicos, lo que puede ser de gran interés para el consumidor.

Compuestos antociánicos. Se identificaron hasta veinte glucósidos de antocianos diferentes identificados en la **Tabla 32** de la versión completa de la tesis. El grupo principal fueron los derivados glicosilados de pelargonidina, de los que se detectaron seis compuestos, todos ellos en la muestra P3, cuyo perfil antociánico es completamente diferente a las otras tres mezclas, lo que denota que su composición de antocianinas no deriva del arándano sino de los frutos de goji. Once picos (3^A , 5^A - 7^A , 9^A , 12^A - 15^A , 17^A , 18^A) de los veinte compuestos identificados habían sido ya descritos en este trabajo. Los nueve antocianos restantes se encontraron en la mezcla P3. Así, los picos 11^A y 20^A correspondieron a derivados de pelargonidina, identificándose tentativamente como pelargonidina-*O*-hexósido y pelargonidina-*O*-malonilhexósido, respectivamente. El pico 2^A presentó un resto hexosilo adicional respecto al pico 11^A , y se identificó tentativamente como pelargonidina-*O*-dihexósido. Los picos 8^A / 10^A y 16^A se asignaron a pelargonidina-malonil-dihexósido y pelargonidina-dimalonil-dihexósido, respectivamente.

Los derivados de cianidina fueron el segundo grupo de antocianos encontrados en las mezclas. El pico 19^A se identificó tentativamente como cianidina-malonil-hexósido. La fragmentación del pico 1^A daba lugar a la liberación consecutiva de dos restos hexosilo, por lo que se identificó tentativamente como cianidina-3,5-*O*-diglucósido, un antociano antes detectado en flores de rosas y frutos de goji, componentes de las mezclas P1 y P3, donde se encontró el compuesto. El pico 4^A se identificó tentativamente como cianidina-malonil-dihexósido.

Como se indicó anteriormente, el perfil de antocianinas en las muestras de la mezcla P3 difería mucho de las otras tres muestras, de hecho, ninguna de los antocianos encontrados en P3 se detectó en ellas (salvo el pico 1^A en P1), lo que se indicaría que las frutas de goji son los principales contribuyentes a la composición antociánica de P3. También debe tenerse en cuenta que la proporción de arándanos en esta mezcla era menor que en las restantes.

Evaluación de la bioactividad. Las diferencias entre las muestras P0 y P1 (considerando que sus diferencias en la cantidad de frutos de arándano no eran significativas) pueden deberse a la presencia de muestras de rosas que, como se describió anteriormente, presentaban un buen potencial antioxidante. Por el contrario, la muestra P3 era la que presentaba los valores más altos de EC₅₀, lo que podría deberse a la menor cantidad de frutos de arándano y a la actividad relativamente baja conferida por las muestras de manzana y frutos de goji.

Con respecto a la actividad antibacteriana, los mejores resultados se encontraron frente a bacterias gram-positivas, mostrando los valores más bajos de CMI (entre 2,5 y 5 mg/mL) en las cuatro muestras estudiadas. P2 también mostró valores de CMI de 2,5 mg/mL contra bacterias gram-negativas *Escherichia coli* de espectro β-lactamasa extendido y *Morganella morganii*.

Ninguno de los extractos mostró hepatotoxicidad contra la línea celular PLP2 no tumoral estudiada.

5. Conclusiones

Como conclusión general, los pétalos de caléndula presentaron los mayores valores de grasa total, cenizas, aporte energético, ácidos grasos poliinsaturados (principalmente ácido linolénico) y tocoferoles totales (mayoritariamente α -tocoferol). Por su parte, los pétalos de rosa contenían los niveles más altos de proteínas, azúcares solubles y ácidos orgánicos. Centaurea presentaba el contenido más alto de carbohidratos y el porcentaje más bajo de ácidos grasos saturados. Las infusiones de dalia y rosa mostraron la concentración más elevada de azúcares, mientras que la infusión de centaurea poseía los mayores niveles de ácidos orgánicos, ausentes en la infusión de dalia. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los pétalos comestibles de las especies analizadas podrían consumirse como parte de una dieta habitual y contribuir al aporte de nutrientes. Las muestras de flores estudiadas mostraban perfiles fenólicos diferentes, siendo los flavonoides los compuestos predominantes en todas ellas. Las mayores concentraciones de compuestos fenólicos totales se encontraron en los pétalos de caléndula, con cantidades relevantes de derivados de isorhamnetina. Los extractos hidrometanólicos e infusiones de pétalos de rosa mostraron la actividad antioxidante más elevada, que quizás podría relacionarse con la presencia de niveles relevantes de derivados de quercetina y kaempferol. Los extractos hidrometanólicos de pétalos de rosa presentaron los mejores resultados en cuanto a actividad antibacteriana, y los extractos hidrometanólicos de dalia en lo referido a actividad antiproliferativa frente a casi todas las líneas celulares tumorales ensayadas, con la excepción de NCI-H460. Las actividades antiproliferativa y antimicrobiana parecen estar en relación con la composición fenólica de las muestras.

De manera general, los resultados obtenidos apoyan el potencial de las flores comestibles como fuentes de compuestos fenólicos con potencial bioactivo.

Las manzanas secas de la variedad "Bravo de Esmolfe" demostraron ser buenas fuentes de fructosa, ácido málico, ácido palmítico y α -tocoferol. Flavan-3-oles (epicatequina y procianidinas de tipo B), ácidos hidroxicinamoil-quínicos y derivados de floretina (una dihidrocalcona) fueron los tipos de compuestos fenólicos encontrados en su composición. Los extractos hidrometanólicos de las muestras de manzana mostraron actividad antioxidante y antimicrobiana contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las manzanas secas "Bravo de Esmolfe" son productos de valor nutricional equilibrado y podrían también ser útiles en la preparación de formulaciones nutraceuticas con potencial antioxidante y antimicrobiano.

Los tallos de *L. barbarum* mostraron valores más altos de energía, grasas, proteínas y cenizas, así como ácidos grasos monoinsaturados, tocoferoles, y flavonoles (quercetina-3-*O*-rutinosido) que los frutos. También presentaron mayor capacidad antioxidante y mayor actividad contra bacterias Gram-negativas. Por su parte, los frutos de *L. barbarum* poseían mayores contenidos de azúcares. (principalmente fructosa y glucosa), como se podía esperar, ácidos grasos poliinsaturados, derivados hidroxicinamoilo (derivados de ácido *p*-cumárico y ácido clorogénico) y flavan-3-oles (catequina); también mostraron mayor actividad contra bacterias Gram-positivas. Con todo, este estudio permitió verificar que no solo el fruto sino también los tallos de goji pueden ser fuentes de compuestos con interesantes propiedades nutricionales y bioactivas y, por lo tanto, podrían ser útiles para el desarrollo de formulaciones o su incorporación en alimentos con propiedades funcionales. Dado que los tallos son subproductos, además de sus posibles beneficios para los consumidores, también proporcionan sostenibilidad industrial y aportan mayor valor añadido.

Los yogures preparados con extractos de flores presentaron un valor nutricional y un perfil de azúcares libres similares a los preparados con E163 y al yogur sin colorante, en este caso con la excepción de los parámetros de color. Dos extractos destacaron como los más idóneos como alternativa a E163: el extracto de rosa, considerando su capacidad de coloración, y el extracto de dalia, particularmente para mantener la protección contra la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados.

Los principales compuestos antociánicos en el arándano fueron glicósidos de malvidina y delfinidina. En lo que respecta a los yogures preparados, todas las muestras mantuvieron el perfil nutricional, los ácidos grasos individuales y los azúcares solubles, independientemente del tiempo de almacenamiento. No obstante, los extractos de arándano mostraron menor capacidad de coloración que el E163, mientras que conferían mayor estabilidad al yogur durante el almacenamiento en comparación con E163. Otra ventaja de este extracto natural son las posibles propiedades bioactivas que puede aportar.

La combinación de arándanos con pétalos comestibles y manzana y frutos goji mejoró el aporte nutricional y fitoquímico, proporcionó un mayor contenido en ácidos fenólicos y antocianos y condujo a mayores actividades antioxidante y antibacteriana. Los resultados obtenidos aportan elementos para el desarrollo de nuevos aperitivos sostenibles y saludables por parte de la industria alimentaria.