

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA
Master Universitario Oficial de
Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo



**“DISEÑO Y ELABORACIÓN DE PANES
ENRIQUECIDOS CON SUBPRODUCTOS
FLORALES DE AZAFRÁN Y ESTUDIO
DE SUS PROPIEDADES
ANTIOXIDANTES”**

TRABAJO FIN DE MASTER

Junio – 2022

AUTOR: Rosalía Sanchiz Gracia

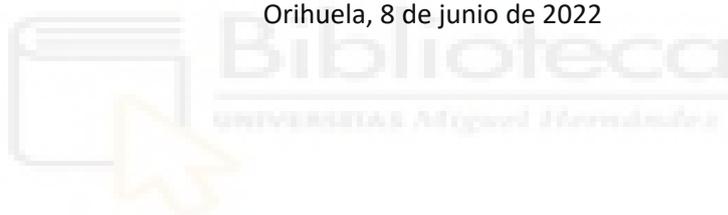
DIRECTOR/ES: M. José Frutos Fernández
Débora Cerdá Bernad



Máster Oficial en Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo

Se autoriza la alumna **D^a. Rosalía Sanchiz Gracia** a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “DISEÑO Y ELABORACIÓN DE PANES ENRIQUECIDOS CON SUBPRODUCTOS FLORALES DE AZAFRÁN Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES” realizado bajo la dirección de **D^a. María José Frutos Fernández y Débora Cerdá Bernad**, debiendo cumplir las directrices para la redacción del mismo que están a su disposición en la asignatura.

Orihuela, 8 de junio de 2022



Fdo.: Esther Sendra Nadal

Directora del Master Universitario en Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo





MASTER UNIVERSITARIO OFICIAL DE AGROECOLOGÍA, DESARROLLOR RURAL Y AGROTURISMO

VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2021/2022

Director/es del trabajo
María José Frutos Fernández Débora Cerdá Bernad

Dan su visto bueno al Trabajo Fin de Máster

Título del Trabajo
“DISEÑO Y ELABORACIÓN DE PANES ENRIQUECIDOS CON SUBPRODUCTOS FLORALES DE AZAFRÁN Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES”
Alumno
Rosalía Sanchiz Gracia

Orihuela, a 5 de julio de 2022

Firma/s directores/es trabajo



MASTER UNIVERSITARIO OFICIAL DE AGROECOLOGÍA, DESARROLLO RURAL Y AGROTURISMO

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Título: “Diseño y elaboración de panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán y estudio de sus propiedades antioxidantes”

Modalidad (proyecto/experimental/bibliográfico/caso práctico): Experimental

Autor: Rosalía Sanchiz Gracia

Director/es: M. José Frutos Fernández y Débora Cerdá Bernad

Convocatoria: junio-2022

Número de referencias bibliográficas: 27

Número de tablas: 5

Número de figuras: 7

Palabras clave (5 palabras): azafrán, subproducto floral, polifenoles, capacidad antioxidante, bioactivos.

RESUMEN:

El azafrán (*C. sativus*) es una planta mediterránea tradicional de cuyos estigmas se obtiene una especia ampliamente utilizada en la industria agroalimentaria por sus propiedades colorantes y aromatizantes. Para producir 1 kg de azafrán se necesitan alrededor de 230.000 flores (unos 350 kg de tépalos) lo que supone una gran acumulación de desechos. Así, la valorización de los subproductos florales de azafrán como ingredientes de alto valor añadido, debido a su composición rica en compuestos bioactivos (polifenoles), contribuiría a reducir el impacto ambiental.

Este trabajo tiene como objetivo diseñar y elaborar panes con harina de trigo y espelta enriquecidos con los subproductos florales del azafrán, y evaluar su bioactividad y capacidad antioxidante, así como la estabilidad de los compuestos bioactivos y del poder antioxidante tras la digestión gastrointestinal *in vitro*. Los resultados muestran que incorporando un 5 o 10% de subproductos florales a la masa, los panes presentan un alto poder antioxidante que podría estar relacionado con su alto contenido en polifenoles totales. Además, tanto la capacidad antioxidante como la concentración de los compuestos bioactivos del pan se mantiene estable a lo largo del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* por lo que el pan enriquecido en bioactivos del subproducto floral del azafrán, podría ejercer efectos beneficiosos en la salud tras su ingesta. Por tanto, los subproductos florales del azafrán son ingredientes adecuados y sostenibles para desarrollar nuevos alimentos funcionales.





INFORME DE EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE DE 2. TFM (Trabajo Fin de Máster)

Elche, a 03 de mayo del 2022

Nombre del tutor/a	MARÍA JOSÉ FRUTOS FERNÁNDEZ
Nombre del alumno/a	ROSALÍA SANCHIZ GRACIA
Tipo de actividad	Adherido a proyecto
Título del 2. TFM (Trabajo Fin de Máster)	“DISEÑO Y ELABORACIÓN DE PANES ENRIQUECIDOS CON SUBPRODUCTOS FLORALES DE AZAFRÁN Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES”
Código/s GIS estancias	
Evaluación Riesgos Laborales	No procede
Evaluación Ética	No procede
Registro provisional	220502191850
Código de Investigación Responsable	TFM.MAD.MJFF.RSG.220502
Caducidad	2 años

Se considera que el presente proyecto carece de riesgos laborales significativos para las personas que participan en el mismo, ya sean de la UMH o de otras organizaciones.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: “**DISEÑO Y ELABORACIÓN DE PANES ENRIQUECIDOS CON SUBPRODUCTOS FLORALES DE AZAFRÁN Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES**” ha sido realizada de manera automática en base a la información aportada en el formulario online: “TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)”, habiéndose determinado que no requiere someterse a dicha evaluación. Dicha información se adjunta en el presente informe. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, **se autoriza** la realización de la presente actividad.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos
Secretario del CEII
Vicerrectorado de Investigación

Domingo L. Orozco Beltrán
Presidente del CEII
Vicerrectorado de Investigación

Información adicional:

- En caso de que la presente actividad se desarrolle total o parcialmente en otras instituciones es responsabilidad del investigador principal solicitar cuantas autorizaciones sean pertinentes, de manera que se garantice, al menos, que los responsables de las mismas están informados.
- Le recordamos que durante la realización de este trabajo debe cumplir con las exigencias en materia de prevención de riesgos laborales. En concreto: las recogidas en el plan de prevención de la UMH y en las planificaciones preventivas de las unidades en las que se integra la investigación. Igualmente, debe promover la realización de reconocimientos médicos periódicos entre su personal; cumplir con los procedimientos sobre coordinación de actividades empresariales en el caso de que trabaje en el centro de trabajo de otra empresa o que personal de otra empresa se desplace a las instalaciones de la UMH; y atender a las obligaciones formativas del personal en materia de



prevención de riesgos laborales. Le indicamos que tiene a su disposición al Servicio de Prevención de la UMH para asesorarle en esta materia.

La información descriptiva básica del presente trabajo será incorporada al repositorio público de Trabajos fin de Grado y Trabajos Fin de Máster autorizados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández en el curso académico 2020/2021. También se puede acceder a través de <https://oir.umh.es/tfg-tfm/>



ÍNDICE DE MATERIAS

1.- INTRODUCCIÓN	11
2.- OBJETIVOS	15
2.1.- Objetivo principal	16
2.2.- Objetivos específicos	16
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1.- Materias primas	18
3.2.- Elaboración de los panes	18
3.3.- Parámetros físico – químicos	20
3.3.1.- Determinación de la humedad	20
3.3.2.- Determinación de cenizas	20
3.4.- Digestión “ <i>in vitro</i> ”	20
3.5.- Extracción de compuestos bioactivos	20
3.6.- Polifenoles totales	21
3.7.- Propiedades antioxidantes	21
3.7.1.- Capacidad antioxidante: Método DPPH	21
3.7.2.- Capacidad antioxidante: Método ABTS	22
3.7.3.- Capacidad antioxidante: Método FRAP	22
3.8.- Análisis estadístico.....	22
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1.- Humedad y cenizas en los panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán	24
4.2.- Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales	25
4.3.- Capacidad antioxidante en panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán en cada fase de la digestión <i>in vitro</i>	27
4.4.- Determinación de los polifenoles totales en panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán en todas las fases de digestión <i>in vitro</i>	30

5.- CONCLUSIONES	32
5.- BIBLIOGRAFÍA	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- (A) Esquema de las partes de la flor <i>C. sativus</i> L. (B) Flor del azafrán y (C) especia del azafrán.....	11
Figura 2.- Clasificación de los polifenoles	12
Figura 3.- Efectos beneficiosos de los flavonoides	13
Figura 4.- Proceso de elaboración de los panes	19
Figura 5.- Panes obtenidos en el estudio	19
Figura 6.- Contenido de cenizas en panes frescos enriquecidos con subproductos florales de azafrán	25
Figura 7.- Contenido en Polifenoles Totales (TPC) en panes realizados con harina de trigo (A) y espelta (B) enriquecidos con subproductos florales de azafrán durante cada fase de la digestión <i>in vitro</i>	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Humedad en panes frescos enriquecidos con subproductos florales de azafrán	24
Tabla 2.- Capacidad antioxidante y contenido en Polifenoles Totales (TPC) en panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán	27
Tabla 3.- Capacidad antioxidante a través del método DPPH en panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán durante cada fase de la digestión <i>in vitro</i>	28
Tabla 4.- Capacidad antioxidante a través del método ABTS en panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán durante cada fase de la digestión <i>in vitro</i>	29
Tabla 5.- Capacidad antioxidante a través del método FRAP en panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán durante cada fase de la digestión <i>in vitro</i>	30



1.-INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

Crocus sativus L., comúnmente conocido como azafrán, es una planta mediterránea tradicional que pertenece a la familia Iridaceae., y se cultiva ampliamente en diferentes áreas como Irán, India, Marruecos, Azerbaiyán, España, Grecia, Italia, Turquía y China, entre otros (Karabagias, Koutsoumpou, Liakou, Kontakos, & Kontominas, 2017). *C. sativus* L. es una planta estéril de poca altura cuyo cultivo se realiza a través de bulbos. La flor se compone de seis tépalos de color púrpura, tres estambres de color amarillo y un pistilo rojo, que culmina con tres filamentos, los estigmas, que tras un proceso de secado dan lugar a la especia del azafrán (Lotfi, Kalbasi-Ashtari, Hamedi, & Ghorbani, 2015; Mathew, 1977)(Figura 1).



Figura 1. (A) Esquema de las partes de la flor *C. sativus* L. (B) Flor del azafrán y (C) especia del azafrán.

Por tanto, solamente una parte de la flor, los estigmas, se utilizan en alimentación, mientras que el resto de la flor se deshecha como residuo. Esto la convierte en la especia más cara del mundo por sus costes de producción, ya que para producir 1 kg de azafrán se necesitan alrededor de 230.000 flores (unos 350 kg de tépalos) (Kafi, Koocheki, & Rashed, 2006).

El azafrán se usa principalmente en la industria agroalimentaria por sus características organolépticas relacionadas con sus propiedades colorantes y aromatizantes y además se ha utilizado durante siglos como parte de una dieta mediterránea saludable, así como planta medicinal para tratar diversas enfermedades. Los principales componentes químicos responsables de estas propiedades son la crocina, crocetina y safranal, considerados compuestos bioactivos (Melnik, Wang, & Marcone, 2010).

Respecto a la composición química del azafrán, posee metabolitos primarios, en su mayoría carbohidratos (almidón, gomas, pentosanos, azúcares reductores, pectina y dextrinas) (63%), aminoácidos y proteínas (12%), humedad (10%), y menores contenidos de grasa (5%), minerales (5%), fibra (5%) y vitaminas, especialmente vitamina B1 (tiamina) y vitamina B2 (riboflavina). Además, los estigmas de azafrán también presentan una gran cantidad de metabolitos secundarios como los carotenoides, monoterpénos, antocianinas y flavonoides (Ríos, Recio, Giner, & Máñez, 1996).

Sin embargo, algunos estudios demuestran la presencia de compuestos bioactivos en los subproductos florales del azafrán, como los flavonoles (hasta un 3%), una clase de polifenoles con efectos biológicos beneficiosos como su actividad antioxidante (Goupy, Vian, Chemat, & Caris-Veyrat, 2013; Termentzi & Kokkalou, 2008).

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos (Figura 2). Estos compuestos se denominan polifenoles y se originan principalmente en las plantas, siendo los compuestos antioxidantes más abundantes en frutas, verduras y bebidas derivadas de algunas plantas.

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. En los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares. Los efectos de los polifenoles son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes. Además, presentan claros efectos antiinflamatorios y son a su vez capaces de modular los procesos de apoptosis en el endotelio vascular (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012).

La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas y para interferir en distintos procesos celulares se debe, en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción y actuar como potenciales antioxidantes (Quiñones et al., 2012). Así, más allá de sus propiedades para captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno también pueden actuar en numerosas vías de señalización intracelulares como mediadores, lo que los convierte en moléculas muy interesantes para el desarrollo de nuevos productos para prevenir el desarrollo de diversas enfermedades.

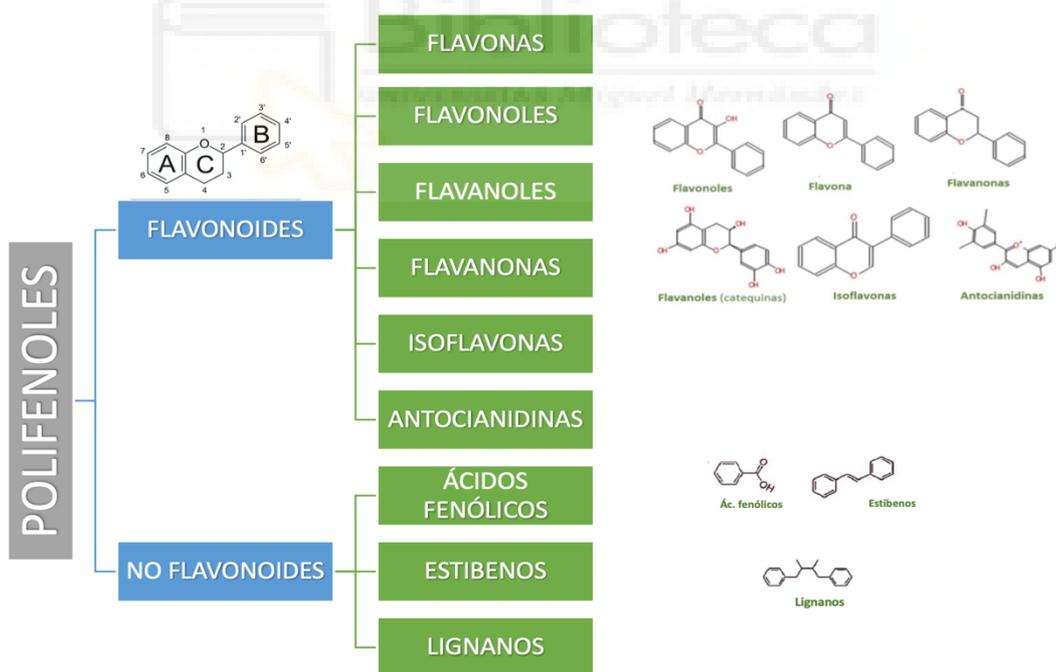


Figura 2. Clasificación de los polifenoles.

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la generación y la eliminación de especies reactivas. Este desequilibrio ocasiona que la célula sea ocupada por radicales con gran capacidad oxidante que pueden ser resultado del metabolismo celular como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) tales como el anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico. Los ROS y NOS causan daño celular grave lo que conlleva al desarrollo de diversas enfermedades como el síndrome metabólico, cáncer, Alzheimer y problemas cardiovasculares, entre otras (Cerdá-Bernad, Valero-Cases, Pastor, & Frutos, 2022).

Por tanto, el alto contenido de polifenoles, particularmente de flavonoides, se ha correlacionado positivamente con la capacidad de eliminar radicales libres e inhibir enzimas prooxidantes. Es por ello que estudios recientes han sugerido que la ingesta de fitoquímicos y, en particular, de polifenoles está asociada con la prevención de diversas enfermedades incluyendo las cardiovasculares, el cáncer y las neurodegenerativas debido a que estos compuestos actúan en la reducción de la peroxidación lipídica y el aumento de los niveles de glutatión, tioles y enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa [SOD], catalasa [CAT] y glutatión peroxidasa [GPx]) (Cerdá-Bernad et al., 2022).

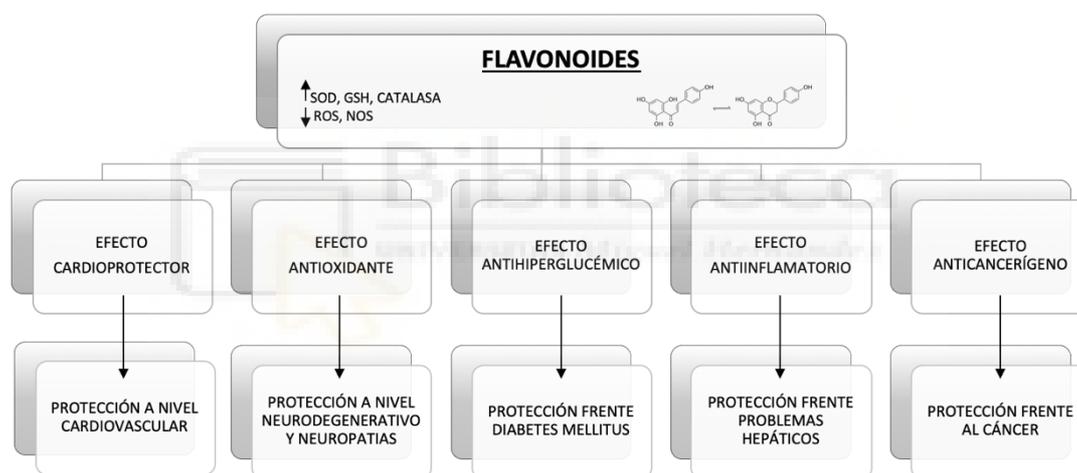


Figura 3. Efectos beneficiosos de los flavonoides.

Así, dado que los subproductos florales del azafrán presentan un alto contenido de polifenoles, el objetivo principal de este trabajo es su valorización mediante su uso como ingrediente de alto valor añadido para desarrollar nuevos alimentos funcionales. Su aplicación podría conllevar al aumento de la eficiencia de los recursos y la competitividad de este sector tradicional, así como reducir el impacto medioambiental, utilizando una biomasa que se encuentra actualmente sin explotar.

El término de alimento funcional se ha utilizado de forma muy amplia en los últimos años, por lo que un alimento puede ser considerado funcional si posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas del organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales (Bellido, Bellido, de Luis, & García-Almeida, 2012). Los componentes alimentarios que confieren funcionalidad a los alimentos funcionales pueden dividirse en cinco categorías: prebióticos, probióticos, simbióticos, nutrientes y no nutrientes (compuestos bioactivos).

En este trabajo, se van a desarrollar panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán, mejorando la receta de pan tradicional. Los compuestos bioactivos no son nutrientes esenciales para la vida, en el sentido de que no son necesarios para el crecimiento y desarrollo, pero tienen efectos positivos sobre la salud. Además de conferir color y sabor a los alimentos, ejercen acciones beneficiosas, gracias fundamentalmente a su efecto antioxidante (Bellido et al., 2012).

La disponibilidad del pan, junto con su volumen de consumo y facilidad de producción, hace que sea un producto apto para el enriquecimiento con ingredientes que aporten un alto potencial para promover la salud y así aumentar el aporte de ingredientes bioactivos en la dieta (Pycia & Ivanišová, 2020). El pan es, esencialmente, una mezcla de harina, agua, levadura y sal, en las proporciones adecuadas, correctamente amasada, fermentada y cocida en un horno, que ha sido considerado desde los tiempos más remotos y por muchas civilizaciones, el alimento por excelencia (Gil-Hernández, 2009).

Además, el pan es un alimento natural y equilibrado que contiene una gran cantidad de nutrientes esenciales: hidratos de carbono, proteínas, vitaminas A, B1, B2, niacina, ácido fólico y minerales como, calcio, magnesio, fósforo, yodo, hierro y zinc (Gil-Hernández, 2009). A la hora de la fabricación del pan, uno de los factores más importantes que debemos tener en cuenta es la elección de la harina. En este trabajo usamos harina de trigo de fuerza y harina de trigo blanca de espelta ecológica.

Por harina de trigo blanca entendemos una harina que se ha obtenido de la molturación del grano del cereal (proceso de molienda del trigo), pero que procede fundamentalmente del endospermo, es decir, de la parte interior del grano, y en la cual, durante el proceso de elaboración, a través de sucesivos cernidos, se han retirado las capas externas del grano. Por otro lado, la espelta es un tipo de trigo diferente, que está considerada como el origen de todas las variedades de trigo actuales, pero ha sido en esta última década cuando su popularidad ha crecido vertiginosamente, gracias al descubrimiento de sus múltiples cualidades nutricionales y su uso gastronómico. Destaca sobre todo por su alto contenido en proteínas de elevado valor biológico con aminoácidos como la lisina, escasa en otros cereales, siendo también una buena fuente de minerales y vitaminas sobre todo del grupo B (Gil-Hernández, 2009).



2.- OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo principal

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster es elaborar pan de alta calidad formulado con la incorporación ingredientes ricos en compuestos bioactivos a partir de los subproductos florales del azafrán.

2.2.- Objetivos específicos

- Desarrollar diversas formulaciones de pan, con diferentes harinas ecológicas (trigo y espelta) incorporando distintas proporciones de harina de subproductos florales de azafrán (0%, 2,5%, 5% 10%)., previamente deshidratados en estufa a vacío.
- Determinar el porcentaje de humedad y cenizas existente en las muestras de subproductos florales en fresco y deshidratados para estudiar la posible influencia de la adición de la harina de subproductos florales en estos parámetros.
- Evaluar la bioactividad en los distintos panes elaborados mediante la determinación de contenido en polifenoles totales utilizando el método de Folin-Ciocalteu por espectrofotometría UV-Vis.
- Analizar la capacidad antioxidante *in vitro* de los panes obtenidos mediante los métodos DPPH, ABTS y FRAP.
- Investigar la estabilidad a la digestión gastrointestinal *in vitro* de los compuestos bioactivos y del poder antioxidante de los panes desarrollados.
- Determinar las propiedades antioxidantes (DPPH, ABTS, FRAP) y el contenido en polifenoles totales de los panes desarrollados, en cada una de las etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro* (oral, gástrica e intestinal).



3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Materias primas

Los subproductos florales del azafrán se obtuvieron durante la cosecha de 2020 en la región de Castilla La-Mancha (España), cultivados siguiendo los requisitos establecidos por la Denominación de Origen Protegida “Azafrán de La Mancha” según DOCM (1999). Se utilizaron todas las partes de la flor (tépalos, estambres y estilos), excepto los estigmas, que se habían separado previamente de forma manual, siguiendo los procedimientos tradicionales establecidos. Las flores frescas se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su deshidratación por estufa a vacío (VACIOTEM, JP SELECTA®, Barcelona, España) a $50 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 28 mbar, durante 36 h.

Una vez deshidratadas las flores, se trituraron ligeramente con un molinillo de café (Taurus Aromatic, Grupo Taurus, España) durante unos segundos, y se tamizaron mediante un tamiz con una abertura de $500\text{ }\mu\text{m}$ (Cisa, Barcelona, España). La harina resultante se utilizó para la elaboración de los panes. Además, se utilizaron dos tipos de harina: harina de trigo de fuerza (PT) (Fuerza $W=360$, Tenacidad $P=100$, Elasticidad $L=100$, y % proteína= $14,2\text{ g}$; El amasadero, Málaga, España); y harina de trigo blanca de espelta ecológica (PE) (Fuerza $W=95$, Tenacidad $P=36$, Elasticidad $L=105$ y % proteína= $13,9\text{ g}$; El amasadero, Málaga, España); levadura seca de panadero (Mauripan, Barcelona, España), sal y agua potable del grifo.

3.2.- Elaboración de los panes

Para la elaboración del pan, se utilizó harina de trigo (PT) o de espelta (PE) (100%), agua (65-70%), levadura seca de panadero (1%), sal (2%), y harina de los subproductos florales de azafrán en diversas proporciones: 0%, 2,5%, 5% y 10% en relación al peso de la harina.

Todos los ingredientes se mezclaron y amasaron durante 5 min. Tras un breve reposo se llevó a cabo la primera fermentación durante 30 min a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Transcurrido ese tiempo se boleó la masa de cada panecillo durante 2 min y se procedió a efectuar una segunda fermentación 30 min a 30°C . Al finalizar esta fase, los 8 panes se hornearon a 210°C durante 20 minutos (Figura 4).

Como resultado del proceso de elaboración, obtuvimos 8 formulaciones de panes (4 con harina de trigo: PT0, PT2.5, PT5 y PT10 y 4 con harina de espelta: PE0, PE2.5, PE5 y PE10) (Figura 5). Una vez enfriados, una parte de los panes se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriormente realizar los análisis de humedad y cenizas y los ensayos de digestión *in vitro*.

La otra parte se liofilizó (Christ Alpha 2-4 (B. Braun Biotech International, Melsungen; Alemania) durante 24 h, con una temperatura inicial $-25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y presión 0,220 mbar. Luego, se trituraron ligeramente con un molinillo de café durante unos segundos, se tamizaron a través de una malla de $500\text{ }\mu\text{m}$, y se almacenaron en bolsas de polietileno a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis (estudios de contenido en compuestos bioactivos y capacidad antioxidante).

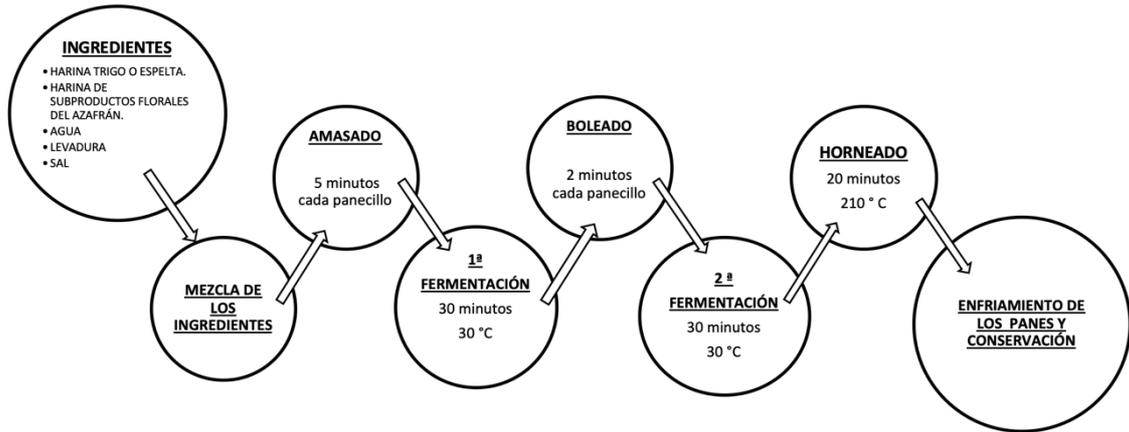


Figura 4. Proceso de elaboración de los panes.



Figura 5. Panes obtenidos en el estudio. La barra de escala equivale a 5 cm.

3.3.- Parámetros físico – químicos

3.3.1.- Determinación de la humedad

El contenido de humedad de los diferentes tipos de panes tanto en fresco como liofilizados se determinó introduciendo los panes en estufa a $105 \pm 5^\circ\text{C}$ hasta alcanzar peso constante, según AOAC (1995). El resultado se expresa en porcentaje de humedad.

3.3.2.- Determinación de cenizas

La determinación del contenido de cenizas se realizó según el método de la AOAC (1995), mediante la incineración de las muestras obtenidas tras la humedad, en mufla (Habersal PR 1300 PAD, Barcelona, España) a 550°C , hasta conseguir cenizas de color blanco, y obteniendo los resultados por una diferencia de peso. Los resultados se expresaron como porcentaje de cenizas.

3.4.- Digestión *in vitro*

La fase oral de la digestión *in vitro*, se realizó de acuerdo con Gawlik-Dziki, Dziki, Baraniak and Lin (2009) con algunas modificaciones. Las muestras de pan fresco (2g) se homogeneizaron con la presencia de 30 mL de PBS (buffer fosfato salino) en un Stomacher durante 30 segundos para simular la masticación. La solución se ajustó previamente a pH 6,75 y se añadió alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1.) para obtener 100 U por mL de actividad enzimática.

La digestión gastrointestinal se llevó a cabo mediante la metodología descrita por Cerdá-Bernad, Valero-Cases, Pastor, Frutos and Perez-Llamas (2021) con algunas modificaciones. Las muestras se sometieron a la digestión gastrointestinal simulada durante 180 minutos a 37°C en agitación.

Tras la fase oral, las muestras se ajustaron a un pH = 3 con HCl 1 M (Panreac; Barcelona, España) y se agregó la enzima pepsina (3 g/L) (Sigma; Madrid, España) para llevar a cabo la digestión gástrica durante 60 min a 37°C en agitación. Transcurrido ese periodo de tiempo, se tomaron muestras para sus análisis posteriores inactivando la enzima en un baño con hielo.

Para la simulación de digestión intestinal, se aumentó el pH a 7 con NaHCO_3 1 M (Panreac; Barcelona, España), se agregaron 4,5 g/L de sales biliares y 1 g/L de pancreatina (Sigma, Madrid, España) y se incubaron durante 120 min a 37°C en agitación. Se tomaron muestras a los 60 min y a los 120 min y se detuvieron las reacciones enzimáticas mediante un baño con hielo.

En las muestras obtenidas en cada una de las fases de la digestión *in vitro* se determinó el contenido en polifenoles totales y la capacidad antioxidante por los métodos: DPPH, ABTS y FRAP. Todas las muestras se filtraron ($0,45\ \mu\text{m}$; Millipore, España) y se almacenaron en a -20°C hasta sus análisis posteriores.

3.5.- Extracción de compuestos bioactivos

Se llevó a cabo la extracción de compuestos bioactivos para la determinación de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en las diferentes formulaciones de pan para su caracterización. Las extracciones se prepararon utilizándose como agente

extractante una solución de metanol al 80% (Metanol HPLC Gradient Grade J.T. Baker; Madrid, España), y las muestras de pan liofilizado, empleándose una relación muestra/metanol 1:20 (p/v). A continuación, las mezclas se agitaron durante 5 min en un agitador magnético (Ovan, mod. MultiMix Heat D-MMH30E) a 300 rpm y se sometieron a un baño de sonicación durante 15 min. Todas las muestras se centrifugaron a 10000 x g durante 15 min a 4°C (Centrifuge C30P, B. Braun Biotech International). Finalmente, los sobrenadantes se filtraron (0,45 µm; Millipore, España) y se almacenaron en a -20 °C hasta los análisis posteriores.

3.6.- Polifenoles totales.

Para la determinación del contenido de polifenoles totales, se empleó la metodología de Folin-Ciocalteu, siguiendo el método descrito por Singleton, Orthofer and Lamuela-Raventós (1999). El reactivo de Folin se preparó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, Alemania) y agua ultrapura, 1:10 (v/v). Se empleó ácido gálico 1 mM (Sigma; Madrid, España) como patrón de referencia en distintas concentraciones (0 - 4,725 mg/L). La ecuación de la recta de calibrado que se obtuvo fue $y = 96,1 x - 0,0721$ ($R^2 = 0,991$).

Para los ensayos, se mezclaron 100 µL de los diferentes extractos con 400 µL de tampón fosfato 50 mM a pH 7,8. Se añadieron 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y tras agitar y reposar durante 2 min, se añadieron 2 mL de Na₂CO₃ (75 g/L). Se introdujeron en un baño termostático a 50 °C durante 10 min.

Se midió la absorbancia a 760 nm y el blanco se preparó con 500 µL de tampón fosfato 50 mM, 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 mL de Na₂CO₃. Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mg ácido gálico por 100 g de muestra seca.

Para los análisis de las muestras de pan tras la digestión *in vitro* se siguió el mismo procedimiento explicado anteriormente, expresando los resultados como mg ácido gálico por 100 g de muestra fresca.

3.7.-Propiedades antioxidantes

3.7.1. Capacidad antioxidante: Método DPPH

Para determinar la actividad de captación de radicales libres utilizamos el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) siguiendo la metodología desarrollada por Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995), con algunas modificaciones. El radical DPPH (Sigma; Madrid, España) se preparó disolviendo 0,0035 g con 10 mL de metanol. La solución se conservó en oscuridad durante 30 min, transcurrido ese tiempo se ajustó la absorbancia a $1 \pm 0,02$ en un espectrofotómetro (UV/Vis Spectrophotometer T80; PG Instruments Limited, UK) a 515 nm. La ecuación de la recta de calibrado que se obtuvo fue $y = 163 x + 108$ ($R^2 = 0,99$), empleando Trolox 10 mM como patrón de referencia a diferentes concentraciones 0,5 - 4,00 mmol/L.

Para los ensayos, se utilizaron 100 µL de los distintos extractos a los que se añadieron 900 µL de la solución DPPH. Se dejó reaccionar durante 10 min en oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia a 515 nm. Los resultados se expresaron como mmol de Trolox por 100 g de muestra seca.

Para los análisis de las muestras de pan tras la digestión *in vitro* se siguió el mismo procedimiento explicado anteriormente, expresando los resultados como mg ácido gálico por 100 g de muestra fresca.

3.7.2. Capacidad antioxidante: Método ABTS

La actividad de captación de radicales libres se determinó utilizando el método ABTS [2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina- 6-sulfónico)] siguiendo la metodología desarrollada por Re et al. (1999). El radical ABTS se preparó mezclando ABTS 7 mM (Sigma; Madrid, España) con persulfato de potasio $K_2S_2O_8$ 2,45 mM (Sigma; Madrid, España) y se dejó reaccionar durante 16 h en oscuridad a temperatura ambiente. La solución obtenida se diluyó con agua ultrapura hasta ajustar su absorbancia a $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. La ecuación de la recta de calibrado que se obtuvo fue $y = 200 x + 0,0444$ ($R^2 = 0,999$), empleando Trolox 10 mM como patrón de referencia en distintas concentraciones (0,20 - 3,00 mmol/L).

Para realizar los ensayos se mezclaron 100 μ L de los diferentes extractos con 900 μ L de la solución ABTS, se dejó reaccionar durante 6 minutos en oscuridad y finalmente se midió la absorbancia a 734 nm. Los resultados se expresaron como mmol de Trolox por 100 g de muestra seca.

Para los análisis de las muestras de pan tras la digestión *in vitro* se siguió el mismo procedimiento explicado anteriormente, expresaron los resultados como mg ácido gálico por 100 g de muestra fresca.

3.7.3. Capacidad antioxidante: Método FRAP

Para medir la capacidad antioxidante mediante la capacidad de reducción del hierro, se empleó el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), adoptado de Benzie and Strain (1996). El reactivo FRAP se preparó mezclando 300 mmol/L de tampón de acetato (pH 3,6), 10 mmol/L de solución de TPTZ en 40 mmol/L de HCl y 20 mmol/L de solución de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ en una proporción de volumen de 10:1:1, respectivamente.

Para los ensayos, se mezclaron 100 μ L de cada extracto con 900 μ L de la disolución FRAP y se mantuvieron en oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 593 nm. La ecuación de la recta de calibrado que se obtuvo fue $y = 408 x + 0,159$ ($R^2 = 0,999$), empleando Trolox 10 mM como patrón de referencia en distintas concentraciones (0,01 a 5,00 mmol/L).

Los resultados se expresaron como mmol de Trolox por 100 g de muestra seca. Para los análisis de las muestras de pan tras la digestión *in vitro* se siguió el mismo procedimiento explicado anteriormente, expresaron los resultados como mg ácido gálico por 100 g de muestra fresca.

3.8.- Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico se usó el software SPSS v 21.0 (SPSS Inc., Chicago- Illinois- USA). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados fueron expresados como la media \pm la desviación estándar. La comparación de medias se realizó con un análisis de varianza (ANOVA) y mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey. La diferencia significativa fue establecida como ($p < 0.05$).



4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Humedad y cenizas en los panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán

Los valores de humedad y cenizas de las distintas formulaciones de panes se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 6, respectivamente. Respecto a la humedad, un indicador importante de la vida útil de los alimentos podemos observar que en los panes de espelta no se muestran diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes formulaciones, mostrando valores en torno al 30%. En los panes de trigo, los valores de humedad fueron entre 25-32% dependiendo de la formulación, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el PT2,5% ($25,47 \pm 2,49$) y PT10% ($32,44 \pm 2,44$).

Estos valores de humedad son similares a los reportados en otros estudios, como el de Andrzej-Kurek, Wyrwisz, Piwińska and Wierzbicka (2015) donde analizaron la humedad en panes elaborados con diferentes tipos de harina (harina de repostería, harina común, harina de fuerza media, harina de fuerza), mostrando valores alrededor del 40%.

Así, todos los panes objeto de estudio tienen un valor similar en cuanto a humedad, en cuyo contenido influye la cantidad de agua aportada en el amasado, el tiempo de cocción, así como la temperatura de horneado. Por lo tanto, estos valores de humedad nos proporcionan información relacionada con la vida útil del producto para evitar su deterioro microbiológico o químico.

Tabla 1.- Humedad en panes frescos enriquecidos con subproductos florales de azafrán¹.

		Humedad (%)
PT ²	0%	$31,12 \pm 2,43$ ab
	2,5%	$25,47 \pm 2,49$ b
	5%	$31,12 \pm 2,40$ ab
	10%	$32,44 \pm 2,44$ a
PE ³	0%	$32,71 \pm 2,61$
	2,5%	$29,51 \pm 2,46$
	5%	$31,89 \pm 2,36$
	10%	$31,50 \pm 2,33$

¹Media \pm desviación estándar en la misma columna seguida de diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) para cada tipo de pan con diferentes formulaciones (n = 3). ² PT: panes con harina de trigo; ³ PE: panes con harina de espelta.

Con respecto al contenido de cenizas, que proporciona una medida de la cantidad total de minerales dentro de un alimento, podemos observar que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los diversos panes de trigo ni entre los de espelta (Figura 6), observando un contenido medio de $3,23 \pm 0,74$ % para el pan de harina de trigo y un contenido medio de $3,44 \pm 0,68$ % para el pan de harina de espelta. Estos valores fueron superiores a los obtenidos en otros estudios. La investigación de Pycia and Ivanišová (2020) en la que desarrollaron pan de harina de trigo enriquecido con avellanas y nueces, y la de García-Segovia, Igual and Martínez-Monzó (2020) en la que estudiaron panes con harina de trigo con proteínas de guisante o de insectos, los valores de cenizas en todas las muestras fueron del 1-2%.

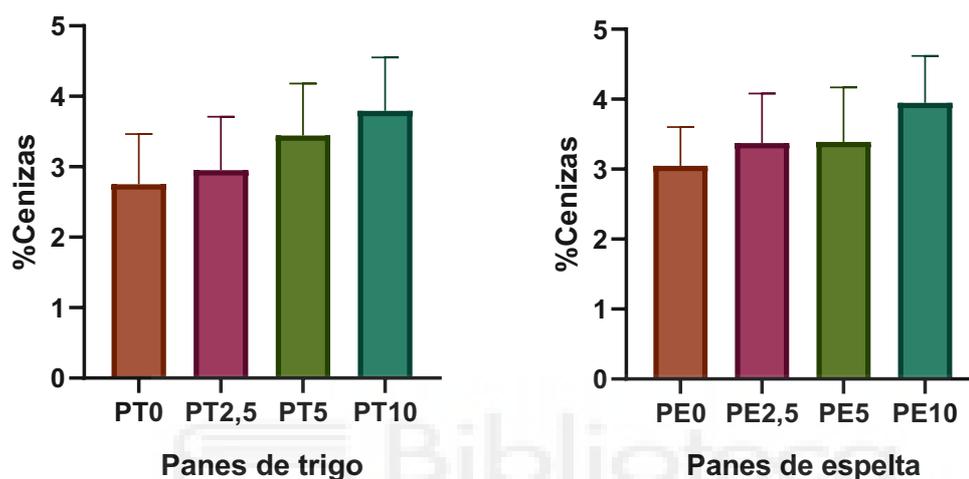


Figura 6.- Contenido de cenizas en panes frescos enriquecidos con subproductos florales de azafrán. Las barras de error indican la desviación estándar.

4.2.- Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales

Los resultados de la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales en las diferentes formulaciones de pan se muestran en la Tabla 2.

Los resultados de los ensayos DPPH, ABTS y FRAP revelan las actividades antioxidantes de los diferentes panes. El método ABTS cuantifica la decoloración del radical $ABTS^+$, debido a su reducción a ABTS; el DPPH cuantifica la eliminación de radicales 1,1-difenil-2-picrilidracilo; y el método FRAP, la reducción del hierro férrico (Fe^{+3}) presente en el reactivo de FRAP hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}) por presencia de antioxidantes. Así, las pruebas DPPH y ABTS evalúan la actividad antirradical *in vitro* y FRAP evalúa el potencial reductor de las muestras.

Si observamos los datos recogidos en la Tabla 2 podemos ver que para el método DPPH, se empieza a observar capacidad antioxidante a partir de la formulación del pan en el que añadimos 5% de harina de subproducto floral del azafrán tanto en los panes elaborados con harina de trigo como los de harina de espelta. Para ambas harinas vemos un incremento importante de la capacidad antioxidante cuando añadimos un 10% de subproductos a la mezcla ($8,67 \pm 1,72$ mmoles de Trolox/ 100g muestra elaborada con harina de trigo y $12,43 \pm 1,06$ mmoles de Trolox/ 100g muestra elaborada con harina de espelta), encontrando diferencias estadísticamente significativas con las muestras en las que se ha añadido un 5% de subproducto floral ($2,00 \pm 0,68$ mmoles de Trolox/ 100g

muestra elaborada con harina de trigo y $1,69 \pm 0,67b$ mmoles de Trolox/ 100g muestra elaborada con harina de espelta).

Para los métodos ABTS y FRAP, vemos como al aumentar el porcentaje de subproducto floral, aumenta la capacidad antioxidante en ambos tipos de pan, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los panes de trigo al 5% y 10% y diferencias estadísticamente significativas entre todos los panes de espelta. Así, en la formulación que contenía un 10% de harina de subproductos florales, la actividad antioxidante se triplica en ambos métodos alcanzando valores de $98,52 \pm 3,58$ mmoles de Trolox/ 100g muestra para harina de trigo y $110,787 \pm 5,371$ mmoles de Trolox/ 100g muestra para harina de espelta con el método ABTS. Con el método FRAP los valores son de $85,00 \pm 5,685$ mmoles de Trolox/ 100g muestra para harina de trigo al 10% de subproducto floral y $98,954 \pm 7,337$ mmoles de Trolox/ 100g muestra para harina de espelta al 10% de subproducto floral.

Por tanto, a medida que se aumenta la concentración de subproducto floral de azafrán, los panes presentan una mayor capacidad antioxidante que podría estar relacionada con el contenido en compuestos bioactivos que contienen las flores de azafrán, como los polifenoles. Estudios previos han demostrado la elevada capacidad antioxidante de las flores de azafrán, sobre todo los tépalos que podría estar relacionada con su alto contenido en polifenoles (Sun et al., 2020). Además, respecto a los resultados obtenidos mediante ABTS, estos panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán presentan una mayor capacidad antioxidante en comparación a los reportados por otros estudios en los que desarrollaron pan de harina de trigo enriquecido con avellanas y nueces, presentando valores de poder antioxidante entre 37-89 $\mu\text{mol Trolox}/100 \text{ g}$ (Pycia & Ivanišová, 2020).

Con respecto al contenido de polifenoles totales observamos la misma tendencia que en la actividad antioxidante, al aumentar el porcentaje de subproducto floral, aumenta el contenido en compuestos bioactivos tanto en las elaboraciones de harina de trigo como en las de espelta (observamos un valor de $51,90 \pm 2,96$ mg GAE por 100 g peso seco de muestra para la elaboración de PT2,5%, valor que aumenta hasta $211,48 \pm 26,84$ mg GAE por 100 g peso seco en la muestra PT10%). Por tanto, la capacidad antioxidante de las muestras está relacionada con el contenido en polifenoles de los subproductos florales.

Los valores de polifenoles totales obtenidos son superiores a los alcanzados en el estudio realizado por Pycia and Ivanišová (2020) en panes enriquecidos con avellanas y nueces (26-39 mg GAE/100g), lo cual se debe al gran contenido en polifenoles que presentan los subproductos florales del azafrán, donde estudios previos reportan valores de 30 mg/g para TPC en extractos de metanol de tépalo de azafrán de China (Sun et al., 2020).

Tabla 2.- Capacidad antioxidante y contenido en Polifenoles Totales (TPC) en panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán¹.

		DPPH ²	ABTS ²	FRAP ²	TPC ³
PT⁴	0%	n.d	27,83 ± 1,05c	23,27 ± 1,35d	n.d
	2,5%	n.d.	49,43 ± 4,09b	42,16 ± 3,05c	51,90± 2,96b
	5%	2,00 ± 0,68b	52,46 ± 3,59b	53,01 ± 1,33b	77,94 ± 7,50b
	10%	8,67 ± 1,72a	98,52 ± 3,58a	85,00 ± 5,69a	211,48 ± 26,84a
PE⁵	0%	n.d	31,96 ± 2,31d	21,13 ± 1,42d	n.d
	2,5%	n.d	42,09 ± 2,31c	36,54 ± 3,11c	36,51± 5,98c
	5%	1,68 ± 0,68b	79,05 ± 0,91b	65,88 ± 1,99b	74,82 ± 15,71b
	10%	12,43 ± 1,06a	110,79 ± 5,37a	98,95 ± 7,34a	214,26 ± 4,77a

¹Media ± desviación estándar en la misma columna seguida de diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) para cada tipo de pan con diferentes formulaciones ($n = 3$). ²La capacidad antioxidante se expresa en mmol Trolox por 100 g peso seco de muestra.

³Los polifenoles totales (TPC) se expresan en mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g peso seco de muestra; ⁴ PT: panes con harina de trigo; ⁵PE: panes con harina de espelta. n.d.: no detectado.

4.3.- Capacidad antioxidante en panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán en cada fase de la digestión *in vitro*

Los resultados de la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP) y el contenido de polifenoles totales en las diferentes muestras de pan en cada fase de digestión *in vitro* se muestran en las Tablas 3, 4 y 5 y en la Figura 7, respectivamente.

Se observó en el ensayo DPPH que la actividad antioxidante en la fase oral sólo es detectable a partir de las elaboraciones en las que hemos añadido el 5% de harina de subproductos florales ($4,20 \pm 1,98$ mmol Trolox /100 g peso seco de muestra), tanto para la harina de trigo como para la de espelta ($5,21 \pm 3,51$ mmol Trolox /100 g peso seco de muestra).

En ambas elaboraciones no se detecta actividad para ninguna de las concentraciones en la fase gástrica y en ambas fases intestinales para los dos tipos de harinas, sólo aparece cuando llegamos al 10% añadido, siendo los valores inferiores a los encontrados en el pan sin ser sometido al proceso de digestión (Tabla 2).

Tabla 3.- Capacidad antioxidante a través del método DPPH en panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán durante cada fase de la digestión *in vitro*¹.

Digestión <i>in vitro</i>						
	Muestra	Fase oral	Fase gástrica	Fase intestinal 1h	Fase intestinal 2h	
DPPH ²	P.T ³	0 %	n.d	n.d	n.d	n.d
		2,5%	n.d	n.d	n.d	n.d
		5%	4,20 ± 1,98b	n.d	n.d	n.d
		10%	13,86 ± 2,78a	n.d	2,76 ± 1,82	2,54 ± 2,73
	P.E ⁴	0 %	n.d	n.d	n.d	n.d
		2,5%	n.d	n.d	n.d	n.d
		5%	5,21 ± 3,51b	n.d	n.d	n.d
		10%	15,77 ± 1,89a	n.d	5,31 ± 3,99	1,49 ± 0,06

¹Media ± desviación estándar en la misma columna seguida de diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) para cada tipo de pan con diferentes formulaciones (n = 3).

²La capacidad antioxidante se expresa en mmol Trolox por 100 g peso seco de muestra.

³ PT: panes con harina de trigo; ⁴PE: panes con harina de espelta; n.d.: no detectado.

Para los ensayos ABTS (Tabla 4), durante el periodo de digestión oral, la capacidad antioxidante disminuye con respecto a la observada en los panes sin digestión *in vitro* y en la fase gástrica alcanzan valores similares a los reflejados en la tabla 2, sin embargo, se produce un aumento en la capacidad antioxidante en condiciones de digestión intestinal con cambios significativos durante las 2 horas, alcanzando los máximos valores para ambos tipos de harina cuando añadimos un 10% de subproductos florales de azafrán ($1576,44 \pm 34,03$ mmol Trolox por 100 g peso seco de muestra y $1582,69 \pm 82,75$ mmol Trolox por 100 g peso seco de muestra, para pan de trigo y espelta respectivamente).

Para la elaboración con harina de trigo encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la muestra PT10% y el resto de formulaciones, sin embargo, en la formulación con harina de espelta observamos que las diferencias estadísticamente significativas se observan a partir de la adición de 2,5% de harina de subproductos florales (Tabla 4).

Este aumento podría deberse a las condiciones intestinales (pH neutro, presencia de enzimas pancreáticas y sales biliares), que facilitarían una mejora en la liberación de compuestos bioactivos que anteriormente podrían estar ligados o insolubilizados por su interacción con la matriz.

En el método FRAP encontramos diferencias estadísticamente significativas en ambos panes al 10% en todas las fases de la digestión observando en esta ocasión una disminución de los valores de capacidad antioxidante a lo largo del proceso, pasando de $38,77 \pm 5,90$ mmol Trolox por 100 g peso seco de muestra y $61,86 \pm 10,75$ mmol Trolox por 100 g peso seco de muestra en la fase oral para trigo y espelta, respectivamente, a valores de $27,89 \pm 6,99$ mmol Trolox por 100 g peso seco de muestra y $36,62 \pm 3,130$ mmol Trolox por 100 g peso seco de muestra en la fase intestinal 2h para trigo y espelta, respectivamente. Se muestran resultados similares otros estudios, como el de Gawlik-Dziki et al. (2009) donde determinan la actividad antioxidante tras la digestión simulada

de pan enriquecido con un extracto de la planta de trigo sarraceno y se observó el máximo poder reductor en la muestra control después de la digestión, hecho que se puede atribuir a la interacción de las distintas enzimas presentes en el proceso digestivo con los compuestos fenólicos, que permitirían su liberación de la matriz y por ello aumentaría el poder antioxidante.

Tabla 4.- Capacidad antioxidante a través del método ABTS en panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán durante cada fase de la digestión *in vitro*¹.

Digestión <i>in vitro</i>					
	Muestra	Fase oral	Fase gástrica	Fase intestinal 1h	Fase intestinal 2h
P.T ³	0 %	3,47 ± 1,75	22,37 ± 1,99c	421,40 ± 11,71a	457,89 ± 6,02b
	2,5%	3,94 ± 1,28	34,32 ± 8,47b	436,65 ± 4,52a	451,89 ± 10,35b
	5%	3,61 ± 2,61	48,74 ± 2,14a	434,90 ± 8,45a	460,64 ± 5,20b
	10%	4,94 ± 1,50	49,99 ± 0,98a	398,90 ± 6,66b	1576,44 ± 34,03a
ABTS ²	0 %	2,20 ± 0,16b	30,74 ± 3,31b	428,65 ± 10,67	437,40 ± 26,93b
	2,5%	5,49 ± 0,67a	43,34 ± 1,99a	430,40 ± 12,28	1372,69 ± 59,52a
	5%	4,91 ± 0,81a	45,44 ± 6,40a	425,90 ± 18,79	1457,69 ± 176,54a
	10%	5,69 ± 0,20a	50,54 ± 0,39a	437,40 ± 26,93	1582,69 ± 82,75a

¹Media ± desviación estándar en la misma columna seguida de diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) para cada tipo de pan con diferentes formulaciones (n = 3).

²La capacidad antioxidante se expresa en mmol Trolox por 100 g peso seco de muestra.

³ PT: panes con harina de trigo; ⁴PE: panes con harina de espelta.

Tabla 5.- Capacidad antioxidante a través del método FRAP en panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán durante cada fase de la digestión *in vitro*¹.

Digestión <i>in vitro</i>					
	Muestra	Fase oral	Fase gástrica	Fase intestinal 1h	Fase intestinal 2h
P.T ³	0 %	0,89 ± 0,50c	8,07 ± 2,03c	n.d.	n.d.
	2,5%	14,09 ± 4,08b	17,12 ± 0,56bc	1,40 ± 0,83b	2,43 ± 0,73b
	5%	28,05 ± 4,85a	25,64 ± 6,04b	9,83 ± 5,35ab	15,00 ± 6,58ab
	10%	38,77 ± 5,90a	37,67 ± 4,67a	20,71 ± 7,96a	27,89 ± 6,99a
FRAP ²	0 %	6,99 ± 0,73c	11,21 ± 1,01b	n.d.	n.d.
	2,5%	18,08 ±	21,56 ± 1,19b	3,97 ± 2,81b	7,60 ± 0,34c
		4,03bc			
	5%	26,69	±12,58ab	14,26 ± 8,84b	18,16 ± 4,89b
		32,01 ± 9,90b			
10%	61,86 ±	43,97 ± 6,96a	31,79 ± 1,22a	36,62 ± 3,130a	
	10,75a				

¹Media ± desviación estándar en la misma columna seguida de diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) para cada tipo de pan con diferentes formulaciones (n = 3).

²La capacidad antioxidante se expresa en mmol Trolox por 100 g peso seco de muestra.

³ PT: panes con harina de trigo; ⁴PE: panes con harina de espelta; n.d.: no detectado.

4.4.- Determinación de los polifenoles totales en panes enriquecidos con subproductos florales de azafrán en todas las fases de digestión *in vitro*

La concentración de polifenoles totales en panes enriquecidos con distintos porcentajes de harina obtenida de los subproductos florales de azafrán que son sometidas a digestión *in vitro* se muestra en la Figura 7.

En los dos tipos de elaboraciones (harina de trigo y espelta) la concentración de polifenoles totales se mantiene estable en todas las fases de la digestión alcanzando los valores más altos para la concentración del 10% de harina de flores de azafrán. En los panes de espelta se observó un ligero aumento en la fase gástrica que podría estar relacionado con una mayor solubilidad de ciertos polifenoles, antes probablemente quelados, o en forma reducida, bajo las condiciones de pH gástrico (Gião et al., 2012).

Los valores de los polifenoles se mantienen altos en las fases intestinales 1h y 2h, por lo que tras la digestión, estos compuestos bioactivos podrán alcanzar el colon y contribuir al mantenimiento de la salud intestinal (Laparra & Sanz, 2010). Sin embargo, es necesaria una mayor investigación para conocer cuáles son estos compuestos fenólicos y poder comprender el mecanismo de acción a nivel fisiológico en la salud humana, ya que la biodisponibilidad de los polifenoles a través de la dieta depende de muchos factores, entre ellos: factores ambientales externos, factores relacionados con el procesamiento de alimentos (temperatura, homogeneización, liofilización, cocción/procesamiento, almacenamiento), factores relacionados a la estructura química de los polifenoles, factores relacionados con la fase de digestión intestinal (actividad enzimática, tránsito

intestinal, microflora del colon), factores sistémicos (edad y sexo, enfermedades y/o patologías, factores genéticos), factores relacionados con la alimentación (tipo de producto, presencia de componentes que afectan la absorción de forma positiva o negativa, como grasa y fibra) e interacciones con otros compuestos (Czubaszek, Czaja, Sokół-Łętowska, Kolniak-Ostek, & Kucharska, 2021).

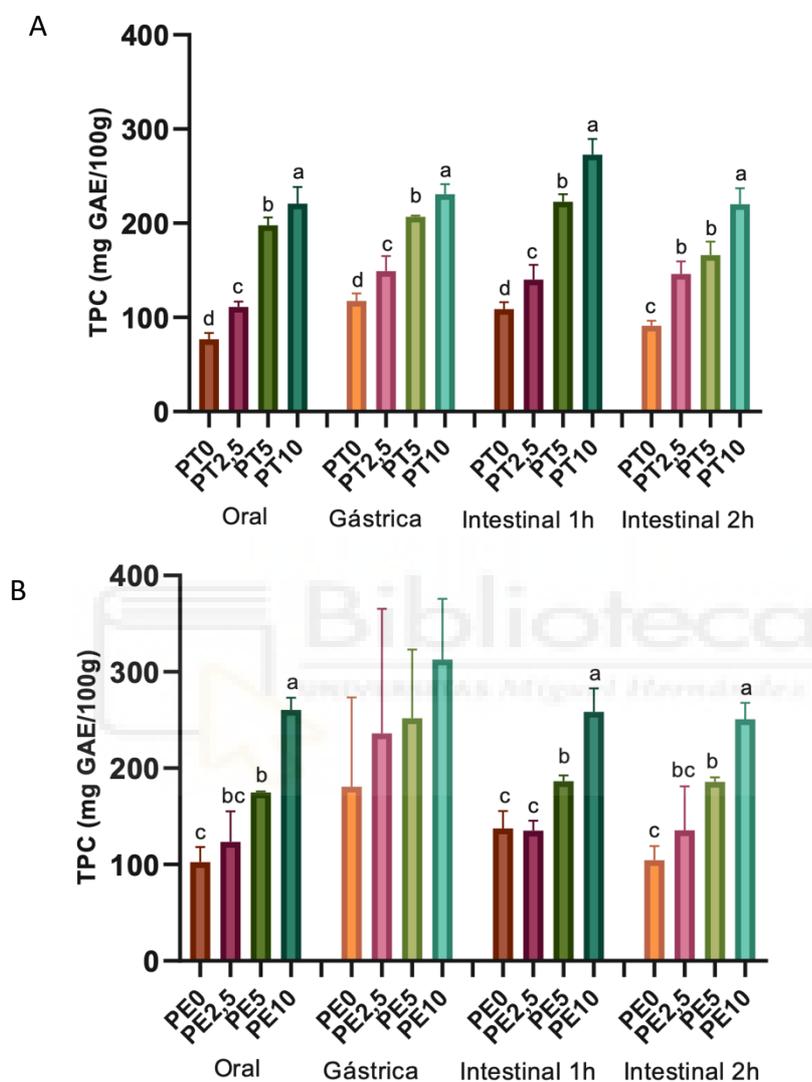


Figura 7.- Contenido en Polifenoles Totales (TPC) en panes realizados con harina de trigo (A) y espelta (B) enriquecidos con subproductos florales de azafrán durante cada fase de la digestión *in vitro*. Las barras de error representan la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) para cada tipo de pan con diferentes formulaciones (n = 3).



5.- CONCLUSIONES

- Los subproductos florales del azafrán son ingredientes adecuados y sostenibles para desarrollar nuevos alimentos funcionales.
- La valorización de los subproductos florales del azafrán mediante su aplicación como ingrediente en la elaboración del pan permite obtener nuevos alimentos con efectos beneficiosos, además de reducir el impacto medioambiental, aprovechando una biomasa que se encuentra sin explotar.
- Los subproductos florales del azafrán poseen un alto contenido de compuestos bioactivos (polifenoles) aptos para ser incluidos en distintas matrices alimentarias como el pan y mejorar su composición.
- La capacidad antioxidante de las diferentes elaboraciones de pan, se mantiene estable a lo largo de todas las etapas de la digestión *in vitro*, presentando las muestras con un 5 y 10% de subproducto floral un alto poder antioxidante
- Los polifenoles se mantienen disponibles tras la fase de digestión intestinal 2h, mostrando una mayor concentración las muestras con un 5 y 10% de subproducto floral, por lo que podrían ser absorbidos para ejercer sus efectos beneficiosos.
- El estudio realizado en el presente trabajo supone una alternativa sostenible para el desarrollo de un alimento funcional, usando las partes de la flor de *C. sativus* que se desechan. Sin embargo, son necesarios estudios posteriores para conocer el perfil fenólico de estos alimentos y estudiar cuáles son los efectos a nivel fisiológico tras su consumo.



AGRADECIMIENTOS

Gracias a la empresa Verdú Cantó Saffron Spain, S.L. por su colaboración.

FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación está financiado por “The Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area (PRIMA) program, project 174-SAFFROMFOOD. The PRIMA program is supported by the European Union”. La investigación ha sido también financiada por la Diputación de Alicante (Subvención N° 2021/3791).





6.- BIBLIOGRAFÍA

Referencias

- Andrzej-Kurek, M., Wyrwisz, J., Piwińska, M., & Wierzbicka, A. (2015). Influence of the wheat flour extraction degree in the quality of bread made with high proportions of β -glucan. *Food Science and Technology*, 35(2). <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6537>
- AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis* (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Bellido, V., Bellido, D., de Luis, D. A., & García-Almeida, J. M. (2012). Alimentos funcionales: dianas terapéuticas actuales. *Nutrición Clínica en Medicina*, 3, 140-151.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cerdá-Bernad, D., Valero-Cases, E., Pastor, J.-J., & Frutos, M. J. (2022). Saffron bioactives crocin, crocetin and safranal: effect on oxidative stress and mechanisms of action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(12), 3232-3249. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1864279>
- Cerdá-Bernad, D., Valero-Cases, E., Pastor, J. J., Frutos, M. J., & Perez-Llamas, F. (2021). Probiotic red quinoa drinks for celiacs and lactose intolerant people: study of functional, physicochemical and probiotic properties during fermentation and gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1-11. <https://doi.org/10.1080/09637486.2021.1921707>
- Czubaszek, A., Czaja, A., Sokół-Łętowska, A., Kolniak-Ostek, J., & Kucharska, A. Z. (2021). Changes in Antioxidant Properties and Amounts of Bioactive Compounds during Simulated *In Vitro* Digestion of Wheat Bread Enriched with Plant Extracts. *Molecules*, 26(20), 6292. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/20/6292>
- DOCM. (1999). Especificaciones para los azafranes protegidos por esta Denominación de Origen, que comprende aquellos azafranes producidos en una zona geográfica delimitada de la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha. *Diario oficial Castilla La Mancha*, 19(10), 1098-1112.
- García-Segovia, P., Igual, M., & Martínez-Monzó, J. (2020). Physicochemical Properties and Consumer Acceptance of Bread Enriched with Alternative Proteins. *Foods*, 9(7), 933. <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/7/933>
- Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B., & Lin, R. (2009). The effect of simulated digestion *in vitro* on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 137-143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.06.009>
- Gião, M. S., Gomes, S., Madureira, A. R., Faria, A., Pestana, D., Calhau, C., Pintado, M. E., Azevedo, I., & Malcata, F. X. (2012). Effect of *in vitro* digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of Agrimonia eupatoria, Rubus idaeus, Salvia sp. and Satureja montana. *Food Chemistry*, 131(3), 761-767. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.030>
- Gil-Hernández, A. (2009). *Libro blanco del pan* (1 ed.). Editorial Medica Panamericana.
- Goupy, P., Vian, M. A., Chemat, F., & Caris-Veyrat, C. (2013). Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and

- ion trap mass spectrometry detections. *Industrial Crops and Products*, 44, 496-510. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.004>
- Kafi, M., Koocheki, A., & Rashed, M. H. (2006). *Saffron (Crocus sativus) production and processing*. Science Publishers.
- Karabagias, I. K., Koutsoumpou, M., Liakou, V., Kontakos, S., & Kontominas, M. G. (2017). Characterization and geographical discrimination of saffron from Greece, Spain, Iran, and Morocco based on volatile and bioactivity markers, using chemometrics. *European Food Research and Technology*, 243(9), 1577-1591. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2866-6>
- Laparra, J. M., & Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 61(3), 219-225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.11.001>
- Lotfi, L., Kalbasi-Ashtari, A., Hamed, M., & Ghorbani, F. (2015). Effects of enzymatic extraction on anthocyanins yield of saffron tepals (*Crocus sativus*) along with its color properties and structural stability. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(2), 210-218. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.10.011>
- Mathew, B. (1977). *Crocus sativus* and its allies (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 128(1), 89-103. <https://doi.org/10.1007/BF00985174>
- Melnyk, J. P., Wang, S., & Marcone, M. F. (2010). Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Research International*, 43(8), 1981-1989. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.033>
- Pycia, K., & Ivanišová, E. (2020). Physicochemical and Antioxidant Properties of Wheat Bread Enriched with Hazelnuts and Walnuts. *Foods*, 9(8), 1081. <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/8/1081>
- Quiñones, M. T., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutricion Hospitalaria*, 27, 76-89.
- 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(9), 1231-1237. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ríos, J. L., Recio, M. C., Giner, R. M., & Máñez, S. (1996). An Update Review of Saffron and its Active Constituents. *Phytotherapy Research*, 10(3), 189-193. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199605\)10:3<189::AID-PTR754>3.0.CO;2-C](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199605)10:3<189::AID-PTR754>3.0.CO;2-C)
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sun, C., Nile, S. H., Zhang, Y., Qin, L., El-Seedi, H. R., Daglia, M., & Kai, G. (2020). Novel Insight into Utilization of Flavonoid Glycosides and Biological Properties of Saffron (*Crocus sativus* L.) Flower Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(39), 10685-10696. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04076>
- Termentzi, A., & Kokkalou, E. (2008). LC-DAD-MS (ESI+) Analysis and Antioxidant Capacity of *Crocus sativus* Petal Extracts. *Planta Med*, 74(05), 573-581.