

MEMORIA LIBRE: MELLORA DO CULTIVO DA ESPECIE AUTÓCTONA DE SABUGUEIRO PARA A OBTENCIÓN DE EXTRACTOS RICOS EN COMPOSTOS BIOACTIVOS (SAMBUCUS GO)

CONVOCATORIA MR331B

Exp: FEADER 2022/30B

FECHA COMIENZO PROYECTO: 15/03/2022

FECHA FINAL PROYECTO: 30/10/2024



ENTIDAD REPRESENTANTE:
VEIGAS DE SABUGUEIRO, S.L.
REPRESENTANTE DEL PROYECTO:
NELSON ALONSO ALONSO

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1 INTRODUCCIÓN. RESUMEN TÉCNICO.....	3
2 OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	5
3 DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS.....	7
4 CONCLUSIONES DEL PROYECTO.....	84
5 ACTIVIDADES DE DIVULGACIÓN Y PROMOCIÓN DEL PROYECTO.....	85

1 INTRODUCCIÓN. RESUMEN TÉCNICO

Se ha culminado con éxito técnico del Proyecto titulado “MELLORA DO CULTIVO DA ESPECIE AUTÓCTONA DE SABUGUEIRO PARA A OBTENCIÓN DE EXTRACTOS RICOS EN COMPOSTOS BIOACTIVOS (SAMBUCUS GO)” en el que han sido finalizadas las Tareas previstas en las diferentes actividades enmarcadas en cada uno de los objetivos planificados: i) Optimizar el cultivo ecológico de la especie autóctona *S. Nigra* aplicando estrategias de manejo agronómico que permitan alcanzar niveles superiores de compuestos bioactivos en flores y frutos, ii) Demostrar el incremento de productividad asociado al cultivo de Sabugueiro derivado de las mejoras en la multiplicación del material vegetal, el injertado y el diseño de las plantaciones. Identificación de variedades autóctonas en Galicia y norte de Portugal, iii) Optimizar la calidad del fruto y mejora de la composición de compuestos bioactivos en hojas y frutos mediante la aplicación de estrategias de manejo agronómico relacionadas con la poda, la respuesta al riego y la fertirrigación. Estandarización del control de calidad de frutos por NIR, iv) Desarrollar la primera guía de cultivo de Sabugueiro en Galicia, v) Establecer los criterios básicos para el diseño de una plantación de Sabugueiro autóctono y, vi) Divulgar y transferir al sector los resultados que permitan poner en valor el cultivo ecológico fomentando las prácticas agrícolas sostenibles a pequeña escala.

Dentro de las **actividades del Proyecto**, durante el hito 1, VEIGAS DE SABUGUEIRO en colaboración con la USC (Universidad de Santiago de Compostela), iniciaron algunas de las tareas correspondientes a la Actividad 1, que incluyen el estudio de multiplicación del material vegetal (Tarea 1.1), los estudios del injerto del material autóctono (Tarea 1.2) y se inició el estudio de diseño de plantaciones de alta y baja densidad (Tarea 1.3). También durante el hito 1, en colaboración con ANFACO-CECOPESCA, se iniciaron algunas de las tareas correspondientes a la Actividad 2, que incluyen los trabajos para la comparación de los patrones principales de compuestos presentes en bayas y flores de saúco (Tarea 2.1) y se comenzó con la puesta a punto de su determinación (Tarea 2.3).

Durante el hito 2 continuaron las tareas correspondientes a la Actividad 1, se llevaron a cabo las acciones de multiplicación de material vegetal (Tarea 1.1), los estudios de injerto de cultivo autóctono (Tarea 1.2), llevándose a cabo técnicas de injerto en verde en distintas épocas del año, consiguiéndose la preparación adecuada del brote a injertar. Además, se continuó con los trabajos referentes a la revisión bibliográfica y realización de contactos y visitas a zonas donde existen plantaciones regulares de Sabugueiro para los estudios de diseño de cultivo relacionados con las plantaciones piloto de alta y baja densidad (Tarera 1.3). En cuanto a la Actividad 2, se han llevado a cabo trabajos relacionados con los estudios a la poda (Tarea 2.1) sobre un total de unas 150 plantas de la plantación que posee Veigas de Sabugueiro en Vilar de Santos. También se han diseñado dos tipos de microaspersión para llevar a cabo los estudios de respuesta al riego (Tarea 2.2). Además, se ha puesto a punto la determinación de flavonoides en bayas de saúco mediante HPLC y se utilizaron dos métodos espectrofotométricos para la determinación de la capacidad antioxidante. Se ha analizado la calidad de las flores de los diferentes ejemplares determinándose su contenido promedio de compuestos fenólicos y se ha estudiado el efecto inmunomodulador mediante Epiintestinal (Tarea 2.3). En base a los resultados del hito 1, se han recogido datos espectrales y se ha realizado el análisis de variabilidad existente para los diferentes parámetros (Tarea 2.4). En lo que se refiere a la promoción de la idea del Proyecto, durante el Hito 2, se han llevado a cabo, las tareas de promoción en ferias y redes sociales, además de los grupos de trabajo

creados en la USC, el grupo operativo ha participado en el webinar “Alimentos funcionales del laboratorio a la empresa” y en el grupo de trabajo del Proyecto de Bioeconomía Forestal para el desarrollo del Proyecto “Desarrollo de nuevas estrategias de valorización del bosque mixto atlántico en espacios naturales protegidos de Galicia y Asturias (MIXTURANDO)”.

Durante la tercera anualidad, se han finalizado los trabajos de la Actividad 1 y de la Actividad 2. Finalizaron las tareas para la multiplicación de la materia vegetal, de técnicas de injerto en verde, los estudios de diseño de cultivo tanto de plantaciones piloto de alta densidad como de baja densidad. Además, finalizaron los estudios de respuesta a la poda, de respuesta al riego y la fertirrigación. En cuanto a la monitorización de compuestos bioactivos en función de las condiciones de cultivos, se determinó que la CIANIDINA-3-SAMBUBIÓSIDO es la antiociocianina más abundante en las bayas del Sabugueiro y se estudió su capacidad antioxidante, observándose tendencias en los valores obtenidos en base a los tratamientos de cultivo aplicados a las muestras (tipo de poda, tipo de ramificación, tipo de riego o de fertilización). Además, con el objetivo de poner en valor el carácter saludable del zumo de baya de sauco se ha estudiado el contenido en determinados minerales y vitamina C, realizándose un estudio de alegaciones nutricionales (Alto contenido en, fuente de...) y parámetros de etiquetado saludable y las menciones a posibles alegaciones de salud en base a la legislación vigente (Reglamento CE 432 del 2012 y sus posteriores modificaciones; Reglamentos CE 1169 del 2011 y 2283 del 2015). Finalizaron los ensayos de determinación de la capacidad antiinflamatoria del zumo de baya de sauco. Durante esta última anualidad, además, finalizaron los estudios de aplicación de tecnología de espectrometría roja cercana (NIR) para analizar compuestos bioactivos en bayas de saúco. Finalmente, en lo que se refiere a la promoción del Proyecto, durante el Hito 3, han continuado las tareas de promoción en ferias y redes sociales, además de en los grupos de trabajo creados en la USC. El grupo operativo, ha participado en el Obradoiro “Posibilidades de cultivo de Sabugueiro en Galicia” y ha realizado unas jornadas de verano tituladas “O Sabugueiro, cultivo, propiedades y procesado”.

Se ha dado una leve desviación en el cronograma previsto, ampliándose en un mes el desarrollo del Proyecto, ya que debido a las fuertes precipitaciones registradas en primavera del 2024 en Galicia y concretamente en la zona donde se desarrolla el Proyecto y debido a la propia temporalidad del Sabugueiro, la maduración de la baya se ha visto retrasada u no ha podido ser recogida para su análisis hasta finales del mes de agosto de dicha anualidad. En este sentido, los estudios relacionados con el análisis de contenido en compuestos bioactivos de las bayas de Sabugueiro (Tarea 2.3.), se han visto aplazados, por lo que se solicitó una ampliación del plazo de finalización del Proyecto de 30 días. El traslado de dicha fecha no ha afectado al desarrollo del Proyecto.

2 OBJETIVOS DEL PROYECTO

La potencialidad del aprovechamiento del sabugueiro se fundamenta en la disponibilidad garantizada de un producto de calidad que cumpla los parámetros tecnológicos y sanitarios adecuados. La escasa tradición de cultivo en Galicia, a pesar de la calidad indiciaria del material autóctono, obliga a la elaboración de un plan de selección, propagación y conocimiento del cultivo que garanticen su adecuación al producto de destino. La consecución de estos objetivos en una especie leñosa implica la puesta en marcha de un plan ambicioso y multiacción, que requiere un ensamblaje técnico de los resultados parciales de las distintas acciones. VEIGAS pretende estudiar el desarrollo fisiológico y el proceso de maduración de los frutos de Sabugueiro autóctono en Ourense, con el fin de determinar las mejores condiciones agronómicas para la multiplicación, el injerto y el diseño de nuevas plantaciones de cultivo ecológico. Considerando que la composición en compuestos bioactivos puede verse afectada por múltiples factores, se profundizará sobre determinados aspectos del manejo agronómico (poda, riego y fertirrigación) y su influencia sobre la presencia de compuestos fenólicos y antocianinas en las diferentes partes de la planta, que serán analizados empleando técnicas no destructivas de análisis (NIRS). Los resultados del proyecto serán ampliamente difundidos a través del CRAEGA con el objetivo de fomentar el cultivo de Sabugueiro que garantice la conservación y explotación sostenible en Galicia, proporcionando para ello una Guía práctica de cultivo, así como desde la USC, con la puesta en marcha de un curso de verano para la formación del alumnado.

El objetivo general del proyecto SAMBUCUSGO es, optimizar el cultivo ecológico de la especie autóctona de *S. nigra* aplicando estrategias de manejo agronómico que permitan alcanzar niveles superiores de compuestos bioactivos en flores y frutos.

Los objetivos técnicos intermedios y específicos del Proyecto son los siguientes:

- OBJETIVO 1. Demostración del incremento de productividad asociado al cultivo de sabugueiro derivado de las mejoras en la multiplicación del material vegetal, el injertado y el diseño de las plantaciones.
- OBJETIVO 2. Optimización de la calidad del fruto y mejora de la composición de compuestos bioactivos en hojas y frutos mediante la aplicación de estrategias de manejo agronómico relacionadas con la poda, la respuesta al riego y a la fertirrigación.
- OBJETIVO 3. Desarrollar la primera Guía de cultivo de sabugueiro en Galicia.
- OBJETIVO 4. Establecer los criterios básicos para el diseño de una plantación de sabugueiro autóctono.
- OBJETIVO 5. Divulgación y transferencia al sector de los resultados que permitan poner en valor el cultivo ecológico fomentando las prácticas agrícolas sostenibles a pequeña escala.

Durante los meses que comprenden el Proyecto SAMBUCUSGO, se han abordado de forma integral los cinco objetivos propuestos, finalizando las Actividades 1 y 2, ampliándose en un mes el desarrollo del Proyecto (octubre 2024), en base al diagrama de Gantt previsto en la Memoria de solicitud de los Grupos Operativos de la Asociación Europea de la Innovación (AEI) y el Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (Feader) en el marco del Programa de desarrollo rural (PDR) de Galicia 2014-2020 (MR331B) del plan de innovación (Figura 2.1).

Figura 2.1. Diagrama de Gantt previsto vs real.

	2022										2023										2024											
	Ma	Ab	Ma	Xu	Xu	Ag	Sp	Oc	No	De	En	Fe	Ma	Ab	Ma	Xu	Xu	Ag	Sp	Oc	No	De	En	Fe	Ma	Ab	Ma	Xu	Xu	Ag	Sp	Oc
Actividad 1. MULTIPLICACIÓN DE MATERIAL VEGETAL Y ESTUDIOS DE DISEÑO DE PLANTACIÓN																																
T1.1. Multiplicación del material vegetal																																
ST1.1. Recogida del material vegetal	●	●		●			●					●				●			●													
ST1.2. Propagación por estaca leñosa en campo											●	●	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	●	●		
ST1.3. Propagación por material verde en mesa de propagación				●	●	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	●	●		
ST1.4. Propagación por estaca semileñosa en mesa de propagación							●	●	.	.	.	.	.	.	.	.	.	●	●	.	.	.	.	.	.	.	.	●	●			
ST1.5. Propagación por estaca semileñosa en campo							●	●	.	.	.	.	.	.	.	.	.	●	●	.	.	.	.	.	.	.	.	●	●			
T1.2. Estudios de injerto del cultivo autóctono																																
ST1.2.1 Técnicas de injerto en verde				●	●	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	●	●	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	●	●			
ST1.2.2. Técnicas de injerto en invierno												●	●	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	●	.	.	.	●	●			
T1.3. Estudios de diseño de cultivo								●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		
ST3.1. Diseños de plantaciones piloto de alta densidad								●	●	●	●	●	●	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	●					
ST3.2. Diseños de plantaciones piloto a baja densidad											●	●	●	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	●	●	●	●			
Actividade 2. ESTUDIOS DE MANEJO AGRONÓMICO PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS																																
T2.1. Estudios de respuesta a la poda			●	●	●	●	●	.	.	.	.	.	.	●	●	●	●	●	.	.	.	.	.	.	.	●	●	●	●			
T2.2. Estudios de respuesta al riego y a la fertirrigación			●	●	●	●	●	.	.	.	.	.	.	●	●	●	●	●	.	.	.	.	.	.	.	●	●	●	●			
T2.3. Monitorización de compuestos bioactivos en función de las condiciones de cultivo.						●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
T2.4. Aplicación de tecnología de espectrometría roja cercana (NIR) para análisis de compuestos bioactivos en las bayas.								●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●					
T1. Promoción de la idea de proyecto	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●						
T2. Divulgación de los resultados del proyecto																								●	●	●	●	●	●	●	●	●
HITOS	HITO 1										HITO 2										HITO 3											

3 DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS

Actividad 1. Multiplicación de material vegetal y estudios de diseño de plantación

Estado: Finalizada (100%)

Tarea 1.1. Multiplicación del material vegetal

Subtarea 1.1.1 Recogida del material vegetal:

Durante las tres anualidades de duración del SMABUCUSGO, se han realizado tareas relativas a la recogida del material vegetal. A continuación se describen dichas tareas por anualidades:

- Anualidad 2022: Se realiza recogida de material a principios de marzo de clones de sabugueiro y sabugueira propiedad de Veigas de Sabugueiro que se encontraban enraizados en Viveiros Braña desde hace un año. Así mismo se recogen estacas y estaquillas leñosas de diversas procedencias: clones de interés comercial facilitados por el promotor: Aldo (AL), Elías (EL), Prado (PR), Canastro (CA), Tumbados (TU) y Jose (JO). Se recoge también algún otro material localizado por el equipo de investigación que se ha considerado de posible interés: Marisa (MA). A mediados de mayo y mediados de julio se recoge material de los mismos clones anteriores, esta vez estaquillas semileñosas y estaquillas herbáceas respectivamente.
- Anualidad 2023: Se realiza recogida de diverso material vegetal (estacas, estaquillas leñosas y estaquillas en verde) en distintas épocas del año de los clones de sabugueiro (SO) y sabugueira (SA) propiedad de Veigas de Sabugueiro que se encontraban enraizados en Viveiros Braña desde hace dos años. Así mismo se recogen otros clones de interés comercial facilitados por el promotor: Aldo (AL), Elías (EL), Prado (PR), Canastro (CA), Tumbados (TU) y Jose (JO).
- Anualidad 2024: Se realiza la recogida del material vegetal a partir de los ejemplares implantados en la finca de prácticas de la EPSE de San Fiz. Se recogen estacas, estaquillas y esquejes de sabugueiro (SO) y sabugueira (SA), Aldo (AL), Elías (EL), Prado (PR), Canastro (CA), Tumbados (TU) y Jose (JO).

Subtarea 1.1.2 Propagación por estaca leñosa en campo:

A continuación, se describen los trabajos de propagación por estaca leñosa en campo llevados a cabo durante el desarrollo del Proyecto:

- Anualidad 2022: Se ensaya esta técnica como método de plantación directa en campo con el fin de conseguir plantaciones más económicas y con menor trabajo. Se basa en el potencial de multiplicación de esta especie. Los objetivos de estos ensayos preliminares buscan la instalación de planta madre que permitan suministrar material vegetal suficiente para futuros ensayos, disponer de ejemplares próximos con el fin de estudiar la fenología, comparar la capacidad de multiplicación de estacas de diferentes procedencias y comparar la capacidad de multiplicación en función del tipo de estaca. El 4 de marzo de 2022 se planta material enraizado de dos clones (sabugueiro y sabugueira) con el fin de tener material vegetal para los futuros ensayos. Se ensaya la capacidad de arraigo de estacas en función del origen, comparando un total de 7 clones diferentes. La plantación se realizó el 4 de marzo de 2022 en la finca de prácticas de San Fiz de la EPSE de Lugo, sobre eras de 1 m de ancho protegidas por un acolchado de plástico negro y con instalación de riego por goteo y tubo plástico protector. Los

clones utilizados fueron seleccionados a partir de varias visitas de campo y se corresponden con las siguientes denominaciones: Prado Flor, Tumbados, Canastro, Casa José Flor, Casa Elías Flor, Aldo y Marisa. Esta última fue plantada el 17 de marzo. El 25 de marzo se colocaron protectores a todas las plantas. El 11 de marzo se instala un nuevo ensayo con el fin de estudiar las diferencias entre diferente material vegetal del mismo clon. En concreto se plantan estacas pequeñas, medianas y grandes del clon Julián. El marco de plantación fue de 30x30 excepto en Sabugueiro y Sabugueira que fue de 40x40. Además, se especifica el nº de ejemplares de cada clon. Se ha obtenido una supervivencia razonable.

- Anualidad 2023: Se continúa con el ensayo de estacado en campo del año anterior. El 2 de febrero de 2023 se plantan de estaca leñosa en bancal de tres clones (SA, SO y AL) en la finca de prácticas de San Fiz de la EPSE de Lugo, sobre eras de 1 m de ancho protegidas por un acolchado de plástico negro y con instalación de riego por goteo, con 14 plantas/clon. El marco de plantación fue de 30x30 excepto en Sabugueiro y Sabugueira que fue de 40x40. La plantación fue exitosa y sirvió para suministrar material clonal para el resto de ensayos de multiplicación
- Anualidad 2024: Con dos repeticiones en años consecutivos se considera finalizado el ensayo de propagación por estacado directo en campo.

Subtarea 1.1.3 Propagación por material verde en mesa de propagación:

A continuación, se describen los trabajos de propagación por material verde en mesa de propagación llevados a cabo a lo largo del desarrollo del Proyecto:

- Anualidad 2022: Esta metodología se ensaya por su elevado potencial en multiplicación y la expectativa de buena capacidad enraizamiento. El material de estaquillas herbáceas se toma en dos épocas (19 mayo y 19 de julio) realizando una clasificación en dos calibres (de 1 a 3 mm y mayor de 3 mm) longitud aproximada 20 centímetros con cada 1 de los clones objeto de estudio. En el ensayo ha incluido fundamentalmente los clones de interés comercial facilitados por el promotor, así como algún otro material localizado por el equipo de investigación que se ha considerado de interés. La segunda de las épocas de estaquillado presenta un ligero mejor aspecto. Tras su corte el material se prepara en campo y se traslada debidamente refrigerado e hidratado hasta las mesas de enraizamiento colocándose de inmediato en las mismas. Se procedió al levantamiento de esta repetición en invierno, tras la caída de hoja. Se registró supervivencia, número de raíces, longitud de la raíz, calibre y longitud de la estaquilla.
- Anualidad 2023: El material de estaquillas herbáceas se toma en primavera (4 de mayo) realizando una clasificación en dos calibres (de 1 a 3 mm y mayor de 3 mm) longitud aproximada 20 centímetros con cada 1 de los clones objeto de estudio (SA+SO+AL+PR+CA+TU+JO). Se realiza un ensayo doble, uno con hormona de enraizamiento y otro sin ella, con 20 plantas por clon. Tras su corte el material se prepara en campo y se traslada debidamente refrigerado e hidratado hasta las mesas de enraizamiento colocándose de inmediato en las mismas. Vista la experiencia del año anterior, a los dos meses se procede a su levantado y toma de datos: supervivencia, número de raíces, longitud de la raíz, calibre y longitud de la estaquilla. Posteriormente se traspa a tiestos algunas de estas estaquillas para realizar seguimiento de su evolución.
- Anualidad 2024: Se replican los ensayos de multiplicación del año anterior. Tras la exitosa implantación de la planta madre, se obtiene el material directamente de los ejemplares plantados en la finca de prácticas de la EPSE de San Fiz. Se plantan 15 esquejes de cada uno de

los clones seleccionados: sabugueiro (SO) y sabugueira (SA), Aldo (AL), Prado (PR), Canastro (CA), Tumbados (TU) y Jose (JO).

Subtarea 1.1.4 Propagación por estaca semileñosa en mesa de propagación:

A continuación, se describen los trabajos de propagación por estaca semileñosa en mesa de propagación llevados a cabo durante el desarrollo del Proyecto:

- Anualidad 2022: Esta metodología se ensaya como alternativa a la propagación de estaca leñosa para estudiar una posibilidad de multiplicación rápida y poco sofisticada de material de base. El material consiste en estaquillas semileñosas de 10 a 25 mm con una longitud aproximada de 25 cm en un número 20 unidades en cada 1 de los clones objeto de estudio. En el ensayo se han incluido los clones de interés comercial facilitados por el promotor, así como algún otro material localizado por el equipo de investigación que se ha considerado de posible interés. La obtención del material se realiza en dos épocas, 19 mayo y 20 de julio, para discriminar posibles diferencias en su aptitud a la multiplicación. Tras su corte el material se prepara en campo y se traslada debidamente refrigerado e hidratado hasta las mesas de enraizamiento colocándose de inmediato en las mismas. La supervivencia y comportamiento fue superior que el de las estaquillas herbáceas. Algunos de los materiales también presentan un problema de deterioro caulinar de la zona enterrada similar a un chancro y también se ha observado una respuesta aparentemente buena de emisión de raíces de las que es preciso determinar su calidad y regularidad en el levantamiento. Se procedió al levantamiento de esta repetición en invierno tras la caída de la hoja.
- Anualidad 2023: El material estaquillas semileñosas de 10 a 25 mm con una longitud aproximada de 25 cm en un número 20 unidades en cada 1 de los clones objeto de estudio. En el ensayo se han incluido los clones de interés comercial facilitados por el promotor (SA+SO+AL+PR+CA+TU+JO). Se realiza un ensayo doble, uno con hormona de enraizamiento y otro sin ella, con 15 plantas por clon. La obtención del material se realizó en tres épocas: invierno (2 de febrero), primavera (4 de mayo) y verano (7 de julio). Tras su corte el material se prepara en campo y se traslada debidamente refrigerado e hidratado hasta las mesas de enraizamiento colocándose de inmediato en las mismas. Vista la experiencia del año anterior a los dos meses se procede a su levantado y toma de datos: supervivencia, numero de raíces, longitud de la raíz, calibre y longitud de la estaquilla. Posteriormente se traspasa a tiestos algunas de estas estaquillas para realizar seguimiento de su evolución.
- Anualidad 2024: El material consiste en estaquillas semileñosas de 10 a 25 mm con una longitud aproximada de 25 cm en un número 20 unidades en cada 1 de los clones objeto de estudio. En el ensayo se han incluido los clones de interés obtenido del campo de plantas madre establecido los años anteriores (SA+SO+AL+PR+CA+TU+JO). Se realizan ensayo doble, uno con hormona de enraizamiento y otro sin ella, con 15 plantas por clon. La obtención del material se realizó en dos épocas: invierno (5 de febrero) y primavera (6 de mayo). Tras su corte el material se prepara en campo y se traslada debidamente refrigerado e hidratado hasta las mesas de enraizamiento colocándose de inmediato en las mismas. Toma de datos a los dos meses: supervivencia, numero de raíces, longitud de la raíz, calibre y longitud de la estaquilla.

Subtarea 1.1.5 Propagación por estaca semileñosa en campo:

En relación a la propagación por estaca semileñosa en campo, se han realizado las siguientes tareas:

- Anualidad 2022: Se ensaya esta técnica como método de plantación directa en campo, similar al ensayo descrito anteriormente de estacas. La plantación en campo de estacas semileñosas, si bien tiene un mayor riesgo debido a las características propias de este material vegetal, permite un mayor rendimiento de las plantas madre y permitiría seleccionar el método de poda más adecuado de las mismas en función del material vegetal deseado. El 19 marzo y 20 de julio se plantan estaquillas semileñosas, en sendas réplicas, procedente de Celanova y Vilar de Santos. Se plantan en el segundo bancal con características similares al anterior (ver epígrafe 1.1.2). El marco de plantación es de 20x20. Las variedades plantadas son: Aldo (4 líneas), Tumbados (4 líneas), Canastro (6 líneas), Prado Flor (6 líneas), José Flor (4 líneas), Elías Flor (5 líneas). Hubo una deficiente supervivencia de las plantas del ensayo.
- Anualidad 2023: Se replica el ensayo del año anterior. La obtención del material se realiza en dos épocas: invierno (2 de febrero) primavera (4 de mayo) y verano (pendiente de realizar en septiembre) para discriminar posibles diferencias en su aptitud a la multiplicación. El material consiste en estaquillas semileñosas de 10 a 25 mm con una longitud aproximada de 25 cm en un número 20 unidades en cada 1 de los clones objeto de estudio. En el ensayo se incluyen los clones de interés comercial facilitados por el promotor (SA +SO+AL+PR+CA+TU+JO).
- Anualidad 2024: En vista de los resultados de los ensayos anteriores no se repite un tercer año el ensayo.

Subtarea 1.1.6 Propagación por estaca semileñosa en bandeja sobre distintos sustratos:

A mayores, se realizaron los siguientes trabajos que no estaban contemplados en el diagrama de Gantt presentado en la solicitud:

- Anualidad 2023: Se ha realizazo este ensayo a mayores, consistente en propagación de estaca semileñosa de tres clones (SA, SO y AL) en bandejas con dos sustratos diferentes (uno de 100% arena y otro de 50% arena + 50% turba). Para ambos se realiza un tratamiento con hormonas de crecimiento y otro sin ellas, con 5 repeticiones por tratamiento. A los dos meses se procede a su levantamiento y toma de datos: supervivencia, numero de raíces, longitud de la raíz, calibre y longitud de la estaquilla. Posteriormente se traspasa a tiestos algunas de estas estaquillas para realizar seguimiento de su evolución.
- Anualidad 2024: Se replica el ensayo del año anterior. Se propaga estquilla semileñosa de tres clones (SA, SO y AL) en bandejas con dos sustratos diferentes (uno de 100% arena y otro de 50% arena + 50% turba). Para ambos se realiza un tratamiento con hormonas de crecimiento y otro sin ellas, con 5 repeticiones por tratamiento. A los dos meses se procede a su levantado y toma de datos: supervivencia, numero de raíces, longitud de la raíz, calibre y longitud de la estaquilla.

Tarea 1.2. Estudios de injerto del cultivo autóctono:

Subtarea 1.2.1 Técnicas de injerto en verde:

Reproducción por semilla:

- Anualidad 2022: Al objeto de ver la viabilidad de reproducción por semilla y su posible traslado a campo como material porta injertos, se adquieren dos lotes de semillas que con fecha 09/03/2022 se disponen a estratificar en nevera. Con fecha 26/05/2022 se realiza la siembra de las semillas estratificadas. El resultado obtenido ha sido que no ha germinado ninguna, algo que ya se había recogido en la revisión bibliográfica.
- Anualidad 2023: Se recogen semillas congeladas de Veigas de Sabugueiro que tras su limpieza, con fecha 31/03/2023. Se realiza la siembra en bandeja una con las semillas directamente y otras separándolas previamente por flotación. El resultado obtenido ha sido similar al del año anterior, no ha germinado ninguna en los tratamientos estándar, algo que ya se había recogido en la revisión bibliográfica, sin embargo en semillas mantenidas en refrigerador en cámara húmeda por un año y medio se ha producido una germinación de aproximadamente un 80 % de brotaciones muy débiles.

Trasplante a tiesto:

- Anualidad 2022: Con objeto de poder realizar ensayos de injerto, tanto verde como en seco, el 09/03/2022 se trasplantan a macetas plantas de los clones sabugueiro y de sabugueira suministradas por Veigas de Sabugueiro, las cuales se encontraban enraizadas en "Vivero Braña" (Esgos-Orense). El origen de estas plantas son estacas obtenidas en plantaciones del norte de Portugal (con estas denominaciones son localmente conocidas), las cuales un año antes se dispusieron para su enraizamiento en vivero.

Pruebas de injerto en verde:

- Anualidad 2022: Debido al fracaso de la germinación de las semillas y a que los propios vigos de las plantas trasplantadas a tiesto desaconsejaban realizar en ellas los ensayos de injerto previstos, se decide realizar pruebas de auto injerto en ejemplares autóctonos. Con fecha 11/05/2022 se realizan autoinjertos en distintos ejemplares. Se realizan un total de 24 injertos tipo "inglés", realizados por dos personas distintas (12+12). El resultado obtenido es que ninguno de ellos ha sido viable.
- Anualidad 2023: Para la ejecución del injerto se han seleccionado púas /estaquillas de consistencia herbácea y médula no esponjosa en aspecto vítreo con un nudo, del que se han eliminado los folíolos de la hoja, persistiendo los pecíolos. Se han insertado en el brote del portainjertos mediante injerto de cuña simple y el atado con un plástico especial resistente a la humedad y capaz de dilatar sin problema. Se realizan distintas pruebas en distintas épocas, en concreto en las siguientes fechas: 26 de abril, el 1 de junio, con 5 pruebas sobre los clones AL y JO . También el 8 de junio se realizan injertos en chip sobre los clones AL y JO. Los resultados en estos casos han sido sin éxito. En otras pruebas de rebrotes de planta silvestre en auto-injerto, día 6 de junio, se realizan 10+8 en dos cepas rebajadas con brotes de distinta consistencia y edad y en esta el éxito ha sido del 80%. La clave del éxito ha sido:

- Preparación adecuada del brote a injertar, con posición de crecimiento vigoroso y, cómodo para la ejecución del injerto, bien hidratado y nutrido y sin heridas.
- La elección muy precisa del momento de injertada con material que ha de estar en estado de médula vítrea comprobándose que cuando ésta ha pasado a un estado más esponjoso generalmente el fracaso está asegurado
- Atención a la eliminación de rebrotes de yemas competidoras con el injerto en el tiempo posterior a la ejecución de éste en función del vigor y situación climática de la planta, pero al menos una vez por semana. Ha de procederse al desmote de competidoras al menos durante el primer mes y medio y de esta forma se garantiza una respuesta satisfactoria del injerto en verde.

▮ Anualidad 2024: En vista de los resultados obtenidos el año anterior, se centra el ensayo de injerto en material con médula en estado vítreo. Para ello el 22 de marzo se recepan ejemplares en la finca de San Fiz con el fin de proveer de rebrotes adecuados para ser utilizados como hipo y epibiontes. El éxito es del 82%. A las claves del éxito del año anterior cabe añadir dos precauciones:

- Evitar el uso de material con médula algodonosa.
- Evitar la fase de corteza sensible donde se produce un fácil desprendimiento de la misma.

Las puesta en práctica de esta técnica en condiciones adecuadas y con la vigilancia continuada en cuanto al control de la brotación de yema inferiores consigue un éxito considerable (entre un 80 y 90%) si se realiza en las condiciones adecuadas. Por tanto es un método de elección cuando durante la ventana propicia, en torno a 2 semanas, se dispone de plantas bien preparadas y se pueden realizar los injertos en condiciones de planta sin estrés por agua, y dónde es importante también que no se den circunstancias de alta insolación y viento por lo que puede ser conveniente la instalación de tubos protectores.

Subtarea 1.2.2 Técnicas de injerto en invierno:

▮ Anualidad 2023: En invierno, se recoge material para el injertado en diversas localizaciones, en concreto de Lugo, Cervantes y Antas de Ulla, las cuales se conservan en nevera. Se realizan distintos tipos de injertos en distintas localizaciones y en diversas fechas y combinando el material de distintas procedencias:

Se concluye que la fase más adecuada para el injerto del saúco es el estado herbáceo / vítreo, sobre el que se incidirá en la injertada del 2024. El prendimiento ha sido muy escaso. Las claves del escaso éxito, tras realizar injertos con otro tipo de material y en otra época son los siguientes: Debido al gran vigor del saúco es necesario la eliminación frecuente de rebrotes que compiten con el injerto. La médula algodonosa existente en la madera leñosa y semileñosa es un inconveniente importante para un buen tallado de los biontes.

Tarea 1.3. Estudios de diseño de cultivo:

Subtarea 1.3.1 Diseño de plantaciones piloto de alta densidad:

Se ha realizado en este apartado los trabajos referentes a la revisión bibliográfica sobre esta cuestión que se recoge en la guía del cultivo de Sabugueiro. También se han realizado contactos y visitas a zonas donde existen plantaciones regulares y comerciales del cultivo para analizar *in situ* las principales variables a tener en cuenta, así como la observación de los resultados alcanzados en dichas experiencias. Las plantaciones observadas, además de las propias de Veigas de Sabugueiro, están ubicadas en la región norte de Portugal, y a tal objeto se han desarrollado una serie de visitas *ex profeso* o relacionadas con estancias financiadas con otras fuentes en las cuales se ha aprovechado para visitar explotaciones y establecer contactos con técnicos que han tenido en algún momento un papel activo en la explotación de las diversas formas de aprovechamiento del sabugueiro en Portugal.

En este punto aparece una situación anecdótica desconcertante en torno al cultivo del Sabugueiro en Portugal: por un lado existe una demanda de material vegetal para nuevas plantaciones en la zona costera próxima a Porto e incluso más al sur, hacia la zona del interior de Aveiro; y por otro, al mismo tiempo, se aprecia que en el Valle de Barossa se atienden aquellas plantaciones tradicionales en buenas zonas de cultivo, plantaciones con algunos años, pero las nuevas plantaciones, normalmente en terrenos no muy adecuados, tienen dificultades por falta de atención. Se han desarrollado diversos sistemas de plantación, alguno aumentando algo la densidad de plantación. En cualquier caso, estas plantaciones de mayor intensidad son nuevas y aún no han podido demostrar su adecuación y comportamiento productivo. Esta opción de cultivo tiene que llevarse a cabo en adecuadas condiciones desde el punto de vista ecológico y dónde también se disponga de una infraestructura de cultivo suficiente a nivel de prestación de servicios propios de arboricultura ya que estamos hablando de una intensificación que hace más crítica la situación de atención de vida a este cultivo.

Subtarea 1.3.2 Diseño de plantaciones piloto de baja densidad:

Se han realizado en este apartado los trabajos referentes a la revisión bibliográfica sobre el tema en cuestión. También se han realizado contactos y visitas a zonas donde existen plantaciones regulares y comerciales del cultivo, fundamentalmente en Portugal en diversas zonas tanto de Trás-os-Montes así como en la zona de Lamego y Villarreal y zonas limítrofes donde se ha apreciado una situación muy diversa y poco definida, ya que, a pesar de los precios de la fruta de saúco, y debido quizá a la situación de costes del actual sistema productivo impuesto, con un nivel complejo de compatibilidad con el sistema tradicional de manejo por secado, hace que muchas de las plantaciones jóvenes menos productivas, por estar en zonas más desfavorecidas y disponibilidad de infraestructura, de apoyo como riego y con un nivel de entrada en producción que la hace no competitivas, se encuentren en una situación de semi abandono lo que las puede poner en compromiso de viabilidad.

Estas visitas han permitido analizar *in situ* las principales variables a tener en cuenta, así como la observación de los resultados alcanzados en dichas experiencias. Las plantaciones observadas, además de las propias de Veigas de Sabugueiro, están ubicadas en la región norte de Portugal. Entendemos que otro enfoque, el de plantaciones del centro o centro-norte de Europa puede facilitar una comprensión de aspectos productivos claves.

Respecto este punto, es sorprendente la pujanza del cultivo en muchos países de centro de Europa, zona balcánicas y países eslavos, así como en Austria, Suiza, Dinamarca e incluso Suecia en donde tenemos contactos, pero dónde debido a la distancia, extensión y la falta de previsión para desplazamiento, no hemos podido trasladarnos. Entendemos que el aprendizaje directo de las

técnicas utilizadas en el resto de Europa puede ser muy interesante de cara a un futuro ya que es muy posible que el sistema de cultivo pueda tener en ocasiones más que ver, o adaptarse mejor, con las técnicas y prácticas que se llevan a cabo en estos países centroeuropeos. Las variedades actualmente más desarrolladas en cuanto a cultivo en Galicia son las portuguesas, ya que, no se ha indagado a nivel práctico, sobre las posibilidades del material autóctono, por lo que se desconoce el comportamiento de las variedades gallegas en plantación regular intensiva. Estos aspectos precisan de una programación a más largo plazo, para poder apreciar los resultados y comportamientos de especies arbóreas leñosas, que no pueden estudiarse desde el comienzo en proyectos tan cortos como el actual, donde más bien el objetivo es una puesta a punto de las técnicas en plantaciones ya establecidas, o estudios de técnicas de propagación concretas, es decir, fases de cultivo pero no exactamente un proceso de experimentación, que tiene otro recorrido temporal, pero que es fundamental, si se quiere animar a realizar plantaciones en caso de que se consideren económicamente de interés.

En la actualidad, el estudio de alternativas de diseños de plantaciones, se recoge en una guía básica del cultivo del sabugueiro y un alumno de la EPSE ha colaborado con trabajos sobre zonas posibles y costes derivados en función de la ubicación en plantaciones de Sabugueiro.

Actividad 2. Estudios de manejo agronómico para la obtención de compuestos bioactivos

Estado: Finalizada (100%)

Tarea 2.1. Estudios de respuesta a la poda:

La poda constituye una técnica muy importante para el manejo de las especies leñosas productivas de una forma económicamente rentable, regular en la producción, sin grandes alternancias y con posibilidades de gestión que facilite la ergonomía y el manejo rentable de la explotación de este cultivo, así como la sostenibilidad de las plantaciones, tanto en cuanto a la productividad de las mismas, como a la longevidad y sanidad de los árboles.

Se partía de una situación de desconocimiento en el manejo de esta especie, y las podas que se habían practicado desde la instalación de la plantación habían conllevado a una situación muy desafortunada en cuanto al esqueleto de las plantas. No obstante, se inició ya en la primera anualidad una poda que, al margen de intentar hacer un esqueleto básico y lo mejor posible, permitiese el estudio de la respuesta de esta especie, el efecto de la poda y la adecuación de las variedades portuguesas a las condiciones de Vilar de Santos. Partíamos de un campo supuestamente constituido por dos variedades aunque con posterioridad, al investigar sobre las variedades portuguesas, tal como comentamos anteriormente, nos dimos cuenta de que no era exactamente así. A tal efecto se plantearon los tratamientos que se describen a continuación

Se actuó sobre un total de unas 150 plantas de la plantación de Vilar de Santos, definiendo tres tratamientos:

- ┃ T testigo: No podar. Se marca con banderola naranja
- ┃ S suave: Se dejan el 50 % de las ramas totales que tenga (sumando las del año y las florecidas). Se marca con banderola rosa.
- ┃ D Duro: Se dejan el 30 % de las ramas totales que tenga (sumando las del año y las florecidas). Se marca con banderola azul.

Dicho planteamiento, se ha mantenido a lo largo de las 3 anualidades por coherencia pero siempre intentando ajustar a la mejora del esqueleto.

Por otro lado los viajes a Portugal han permitido conocer como se realizaba la poda de estas variedades en las condiciones de allí y se ha visto que esta especie precisa de una poda en vaso en un sistema tradicional de formación de árboles no arbustivos con una forma más o menos libre o diferida y podas que garanticen los retornos para la continuidad al año siguiente, siendo esta clave en la garantía de la producción del año siguiente. A tal fin, es muy importante el equilibrio en poda y se ha podido constatar que la respuesta de la misma en la calidad de los rebrotes es diferente según el tipo de poda utilizado.

Como conclusión básica se puede decir que el método de poda "testigo" de la parcela de Carabuñas en Vilar de Santos, más próximo al desarrollo natural de la planta, conlleva una pérdida de producción y calidad reduciéndose la cosecha en promedio y de forma independiente de la variedad por debajo de un la mitad llegando a representar en condiciones similares solo un tercio de las más productiva.

Los resultados de los otros dos tipos de poda (S y D) no fueron muy reveladores debido a la heterogeneidad del material e historial del mismo y las incidencias climatológicas, sobre todo en la primavera del año 2023 donde se sucedieron hasta 8 condiciones de helada afectando a las diversas sucesiones de botones y flores de las plantas, lo que hizo que prácticamente la productividad se viese diezmada, una y otra vez, hasta la última helada acontecida cerca de junio del año 2023.

En el año 2024 las circunstancias han sido completamente diferentes. En primer lugar, hubo una falta de frío, que hacía que la planta no tirase la hoja y, como se puede ver en el conteo de horas frío, la acumulación precisa se retrasa muchísimo, no aconteciendo las 900 horas supuestamente hasta aproximadamente mediados de abril. Esto hizo que la brotación/ floración se halla extendido enormemente y cuando ha subido las temperaturas, como se puede ver en el gráfico lo que ha acontecido, ha sido un agrupamiento de la floración, de los distintos materiales vegetales presentes en la finca, lo cual ha sido muy positivo desde el punto de vista de posibilidades de cuajado.

Se puede decir que, a pesar, de la heterogeneidad que hace que los estudios estadísticos no permitan dar valores con alta significación, se ha apreciado un efecto independientemente de la variedad, en el que la poda ha tenido, unas consecuencias positivas de cara a la emisión de flores, el tamaño de las inflorescencias o panículas y, de forma claramente diferenciada, con el tratamiento de no poda.

Las diferencias entre los dos tratamientos de "poda severa" y "suave" no han sido muy significativas fundamentalmente debido a la variabilidad, por causa del terreno, la afectación en el cuajado por la competencia con la vegetación espontánea y la variabilidad del material de plantación en sí mismo, en cuanto la fruta. El efecto más destacable se debe fundamentalmente a las condiciones que han concurrido en cuanto a la gestión de la finca de ensayos.

La diferencia en número de flores y tamaño de las mismas sí que ha sido observable al ser previo al de fuerte competencia que se inicia en la fase de cuajado de frutos, pero no se ha podido

contabilizarla adecuadamente, ya que esto precisa de un seguimiento y descripción detallado de las plantas de estudio, que además deberían de ser unidades homogéneas, para poder compararlas.

En cuanto al efecto sobre la producción, aún siendo importante y mostrando resultados de fructificación, fundamentalmente en peso de los racimos de las inflorescencias, la diferencia favorable a la poda severa, no es suficientemente diferente para permitir dar valores significativos, y debido al mayor número de inflorescencias, en términos de cosecha el tratamiento de poda suave arroja unos valores medios ligeramente superiores, donde si hay diferencia es en el agrupamiento de resultados, ya que en la opción de poda suave , (eliminación del 40 % de los brotes nuevos hay más estabilidad independientemente de la situación varietal y las cajas de datos son más concentradas, en el caso dela poda dura la respuesta al ser menor número de ramas es mucho más dependiente del hábito vegetativo y productivo del material vegetal.

En cualquier caso, el sistema de poda adecuado a aplicar, existiendo un efecto del tipo de poda en cuanto a dureza, con las implicaciones que tiene en la iluminación de la copa, inducción floral, y eficiencia fotosintética **debe adecuarse siempre a la variedad en concreto**

Con la medidas de radiación e índices de vegetación por radiación a través de satélites y de vuelos de drones, se ha podido constatar que el manejo en el punto del cuajado ha sido crítico para que haya existido un elevado corrimiento de flor o caída precoz de frutos ya que las plantas debido al crecimiento intenso de la vegetación natural han sufrido un estrés nutricional e hídrico intenso que ha generado la pérdida de la cosecha. Hasta los meses de junio-julio la previsión de cosecha era muy interesante, pero se vio afectada por la imposibilidad de conseguir desbroces continuados en la medida necesaria, dado que la empresa colaboradora no tiene medios propios para realizarla.

La poda una vez que la estructura se racionaliza puede realizarse con un buen rendimiento y con unas consecuencias satisfactorias pero es importante equilibrar la adecuadamente para garantizar los renuevos del año siguiente y esta operación tiene que estar debidamente coordinada con el resto de técnicas, como son manejo del suelo o de la vegetación espontánea y manejo de la disponibilidad hídrica.

A nivel de Balance fotosintético no se han apreciado diferencias ostensibles , de nuevo debido a la variabilidad de la parcela y el corto espacio de tiempo, para su adecuada selección, pero se ve que la afectación por la disponibilidad hídrica es el factor limitante.

Asimismo el potencial hídrico en hoja, y de tallo no mostró efectos significativos en cuanto al efecto de la poda , ya que se alcanzaba fácilmente el estado de marchitamiento produciéndose con probabilidad el fenómeno de cavitación vascular como ocurre con algunas variedades de otras especies, ante fuerte competencia por los recursos hidrológico, como ha sido en caso ante la falta de control dela vegetación espontanea los datos de presión medidos , indicaban un límite entorno a los 0'8 ´,9 Mpa recuperando se los árboles a saturación en la medidas de potencial de base (preamanecida o predown) en todos los casos, independientemente del clon y tratamiento , pero con un potencial de tallo(o de medio día) entorno los 4 kilopascales y enorme variabilidad intra varietal e intratratamiento que se reflejaba de igual modo en los valores de fijación de CO₂ o de eficiencia fotosintética.

A nivel de datos de cosecha los datos del año 2023 , son validos solamente a nivel de caracterización de la fruta pero no a nivel productivo . en el año 2024 , a pesar de las interferencias de gestión de la parcela . Ha puesto de manifiesto que el tratamiento testigo rindió en torno a 375 g por planta (con una enorme variabilidad) y los de poda ligera (suave) E intensa (dura) 950 y 970 g respectivamente de nuevo con una enorme variabilidad intertratamiento. En general y salvo algún caso aislado son valores muy modestos y lejanos a los valores de las plantaciones de Centro Europa , pero que en este caso son perfectamente explicables de acuerdo con las incidencias comentadas anteriormente. Respecto a la producción de madera, lo que es interesante a nivel del equilibrio vegetativo se aprecia curiosamente que la poda más intensa genera una producción interanual más baja de madera que la poda más suave probablemente porque es probable exista un mayor equilibrio vegetal productivo en estas circunstancias derivado de la mejor aireación iluminación y respuesta en las brotaciones que permiten más acumulo de reservas y desarrollo de los brotes pero equilibrado con una mayor tasa de fecundidad.

Tarea 2.2. Estudios de respuesta al riego y a la fertirrigación:

Estudios de respuesta al riego:

El Sabugueiro es una especie con un sistema radicular superficial y relativamente poco competitivo, y que además, presenta, a priori , una elevada tendencia al embolismo xilemático por lo que entendemos que el Estado deprimido de la plantación, se debe, básicamente, al estrés hídrico que presenta, por lo que el planteamiento de un dispositivo de riego pensamos que era de la mayor importancia.

El estándar de aplicación, normalmente debido a los volúmenes y disponibilidades de agua y por otro lado, por la limitación energética, más utilizado es el goteo, sin embargo, dadas las características radicales del sistema del sabugueiro, se entendió que podría ser interesante estudiar un riego de apoyo mediante micro aspersión, que favorece más las zonas superficiales.

Para esto, se diseñó de una forma un poco innovadora dos tipos de microaspersión que prácticamente, dan lugar a una banda continua en la zona de proyección de la copa, con dos caudales diferentes que van a suponer por lo tanto también dos dosis, puesto que se pretende regar de forma subóptima, y controlando el avance del perfil de humedad y las consecuencias del mismo en el cultivo, para ello se han dispuesto por lo tanto en los tratamientos ensayados dos tipos de microaspeadores uno de 27 L/hora y otro aproximadamente de la mitad unos 17 L /hora y por el otro lado una doble banda de goteo, al objeto de testar si es capaz de paliar mediante su eficiencia el déficit hídrico relativo y también una banda simple que es el estándar comercial, pero que en teoría basándonos en las características radicales de esta planta no sería el óptimo puntual .

Esto daría lugar a bulbos muy distintos y de eso deriva la necesidad de controlar el avance del flujo del frente húmedo .

Dada la característica, de falta de disponibilidad de electricidad, la automatización de todo el proceso, es compleja por lo tanto se ha optado por la utilización de un motor térmico y que se ha arrendado a la empresa de servicios que lo va a operar, aportándolo directamente y que es capaz de esta forma en aplicaciones discretas al ser capaz de aplicar la dosis precisa.

Cuando el dispositivo estaba prácticamente listo para funcionamiento, dado que en la anualidad 2023 hubo tormentas tardías, se produjo una falta de suministro de agua o de disponibilidad de la misma y el riego no ha podido funcionar hasta la anualidad 2024, por lo que, no se dispuso de datos concretos válidos relativos a la situación, y al efecto de la planta hasta bien entrado el mes

de agosto, en que se ha dispuesto de una fuente alternativa hidráulica para aplicar el riego; por lo tanto el dispositivo montado debería haber obtenido perfiles de potenciales hídricos ligados al estudio del avance del frente húmedo como se había diseñado y correlacionarlo con los niveles de potencial hídrico, eficiencia fotosintética, y esto con los valores de parámetros en remoto NDVI y MSAVI, una caracterización y una visualización de cómo afecta a los crecimientos y desarrollo de la fruta, pero evidentemente no van a ser como si hubieran sido aplicados en momento de inicio de estrés, y especialmente de cara a la fructificación, ya que en los momentos más críticos ha sido justo cuando no se ha dispuesto de agua.

En la anualidad 2024, el problema ha sido diferente dado que aunque el dispositivo estaba listo y se ha aplicado riego, se observaba en primer lugar que los dispositivos para detección del avance del frente no estaban funcionando adecuadamente y que los niveles de estrés presente en la planta en torno a los 8 megapascuales. En las plantas que reflejaban esta situación, presentaban un crecimiento desmesurado de la vegetación espontánea.

El sistema de riego por goteo era en estas circunstancias de falta de manejo de la vegetación, ventajoso respecto a los sistemas de microaspersión, el motivo fundamental consiste en que la concentración del goteo hace que exista un cierto flujo de agua que traspasa la barrera radicular de la vegetación espontánea, y que el sistema radicular del árbol es capaz de aprovechar mientras que en un sistema con una capacidad extractiva radicular elevada por parte de la vegetación espontánea, los potenciales hídricos estaban prácticamente al igual que en secano para la raíz del sabugueiro, aprovechándose del riego exclusivamente la cobertura vegetal incontrolada esto se refleja perfectamente en las imágenes MSAVI (Figuras 3.1 y 3.2) que figuran a continuación en: críticos en junio y a principios de agosto después de un desbroce el riego empieza a tener consecuencias que se manifiestan en las imágenes, pero por un espacio breve de tiempo ya que la vegetación siguió creciendo de forma desmesurada.

Por lo tanto, a pesar de todas las incidencias, parece claro que la deficiencia de recursos hídricos es el principal aspecto limitante, más allá de las heladas primaverales, de la situación de estas plantaciones experimentales e iniciales por lo que es quizá la intervención aplicada más relevante. Se puede concluir que, dadas las circunstancias acontecidas, hubiera sido interesante poder prolongar este proyecto en el tiempo, dado que el plazo del mismo y, no va a ser el óptimo, para obtener apreciaciones de los efectos del riego y de las diferencias entre las distintas tipologías de riego aplicadas.

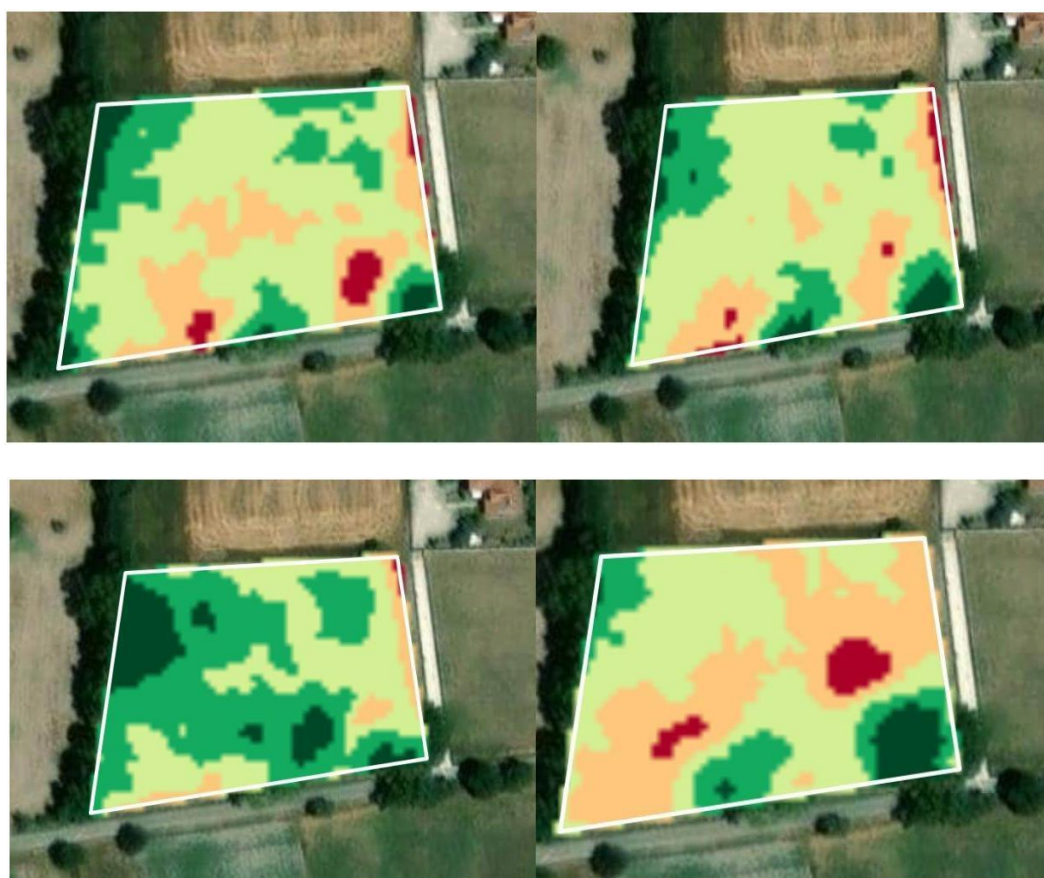


Figura 3.1 MSAVI 02/06/2024, 06/06/2024, 18/08/2024 y 21/08/2024

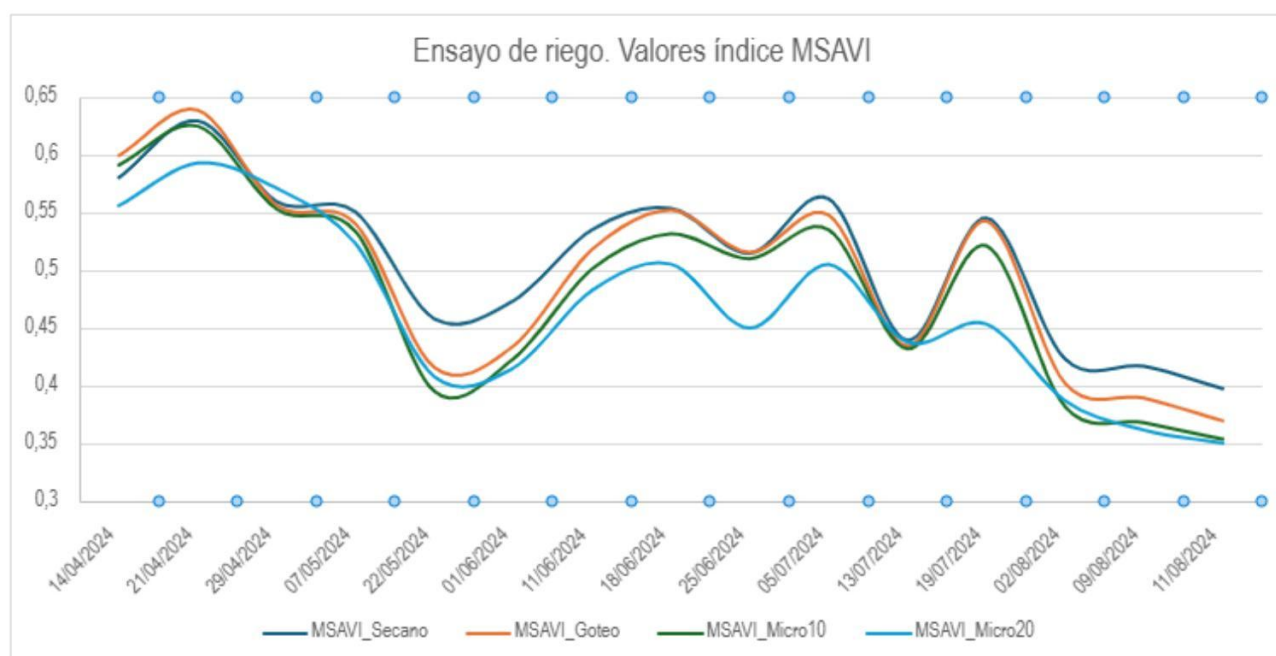


Figura 3.2. Valores Índice MSAVI obtenidos en el ensayo de riego

Estudios de respuesta la fertirigación:

En la visita realizada con técnicos portugueses, aprovechando la jornada en torno al cultivo de Sabugueiro en el que se intercambio información con los técnicos de la zona más importante de cultivos de Europa, que es el norte de Portugal , en la anualidad 2023, se pudo apreciar que el material que existe en la explotación que es básicamente portugués , y de origen de la zona Val Varosa.

En la visita se comprobó que aparecían síntomas compatibles con una situación nutricional de las plantas deficiente. A partir de este punto, se organizaron unos análisis foliares diagnósticos, llegando a la conclusión de que la plantación tiene carencias en boro, manganeso, potasio, y sobre todo nitrógeno y Molibdeno, a pesar de que se ha procedido a una fertilización orgánica, dado que la finca está en producción de tipo ecológico. Se ha aplicado en dos formas, compuestos orgánicos minerales aceptados en la producción ecológica y se ha optado por fórmulas ricas en nitrógeno fósforo potasio. Los resultados analíticos tanto de suelo como foliares, demuestran que en suelo hay un nivel de alto de potasio calcio y fósforo y sin embargo, en cambio existe una carencia en magnesio, manganeso, molibdeno, boro y especialmente en nitrógeno.

Estos resultados son compatibles con lo expresado anteriormente con respecto a la disponibilidad de agua y obedece fundamentalmente a la competencia que ejerce la pradera natural descontrolada en su crecimiento y que evita que el árbol absorba las cantidades necesarias, especialmente de nitrógeno, generando carencias en el Sabugueiro y manifestándose a la hora del cuajado de frutos. Todo esto se puede observar en la Figura 3.3, que revela el índice de vigor o reflectancia de los niveles de HP vigor y actividad fotosintética

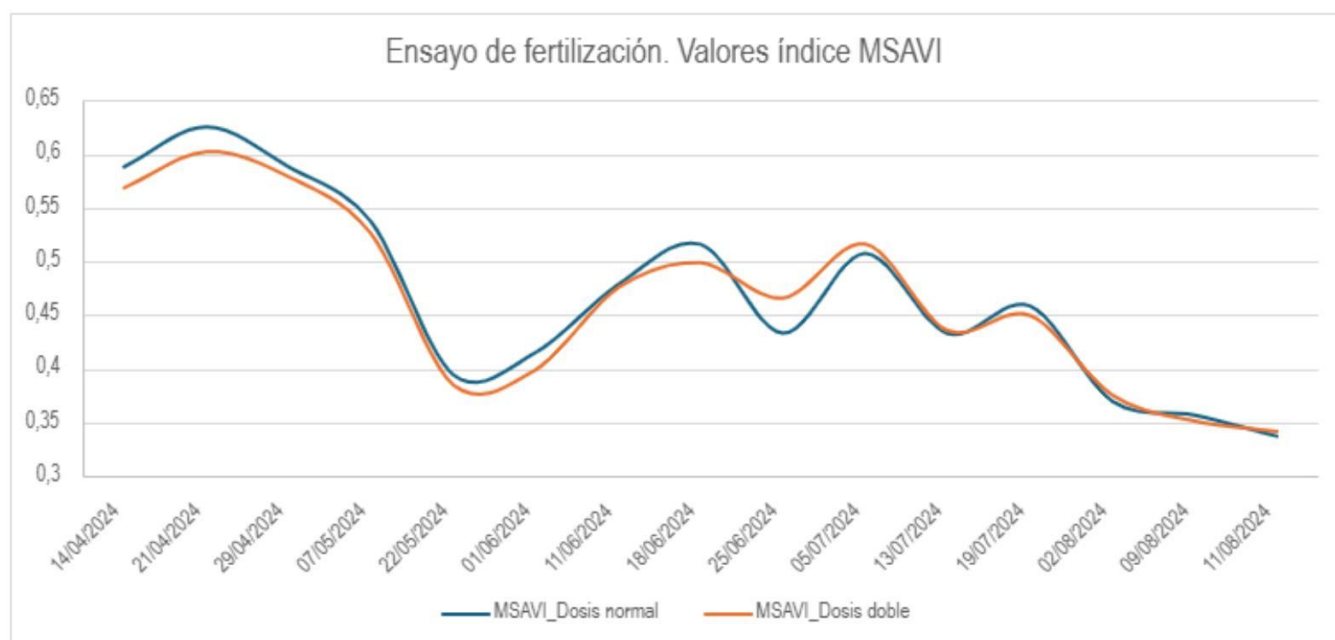


Figura 3.3. Valores Índice MSAVI obtenidos en el ensayo de fertilización

Tarea 2.3. Monitorización de compuestos bioactivos en función de las condiciones de cultivo:

Actualmente, las bayas de saúco están siendo objeto de una intensa investigación de mejora de su cultivo para incrementar el contenido de antocianinas. La bioquímica de la maduración del fruto del saúco es un programa genético que implica la degradación de la clorofila, la biosíntesis de antocianinas y su acumulación en vacuolas, con lo cual las bayas de saúco verdes abundan en flavonoides y sodio, mientras las bayas de saúco maduras registran las mayores concentraciones de antocianinas. Es por eso, que a lo largo del desarrollo del SAMBUCUSGGO, se ha realizado una monitorización de los compuestos bioactivos del fruto del Sabugueiro en función de las condiciones de cultivo. A continuación, se describen los trabajos realizados a este respecto en las diferentes anualidades del Proyecto:

Estaba previsto la determinación de **CFT, flavonoides, antocianinas y carotenoides** por métodos espectrofotométricos de diferentes lotes de bayas en función de las condiciones de cultivo y poda propuestas por USC y llevadas a cabo por VEIGAS en la parcela experimental. Sin embargo, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) determina con mayor exactitud como se modifican los valores de los diferentes compuestos a lo largo de la etapa de maduración. En esta primera anualidad se han comprado los patrones de los principales compuestos presentes en las bayas y flores de saúco y se ha comenzado a poner a punto su determinación.

En la anualidad 2022, en un primer análisis se han comparado 2 lotes de zumo de baya recogidos en su punto óptimo de maduración. Los perfiles en el contenido de compuestos fenólicos son similares, exceptuando la epicatequina que es mucho más elevada en uno de los lotes. En la siguiente anualidad se profundizará en aquellos compuestos específicos del cultivar analizado.

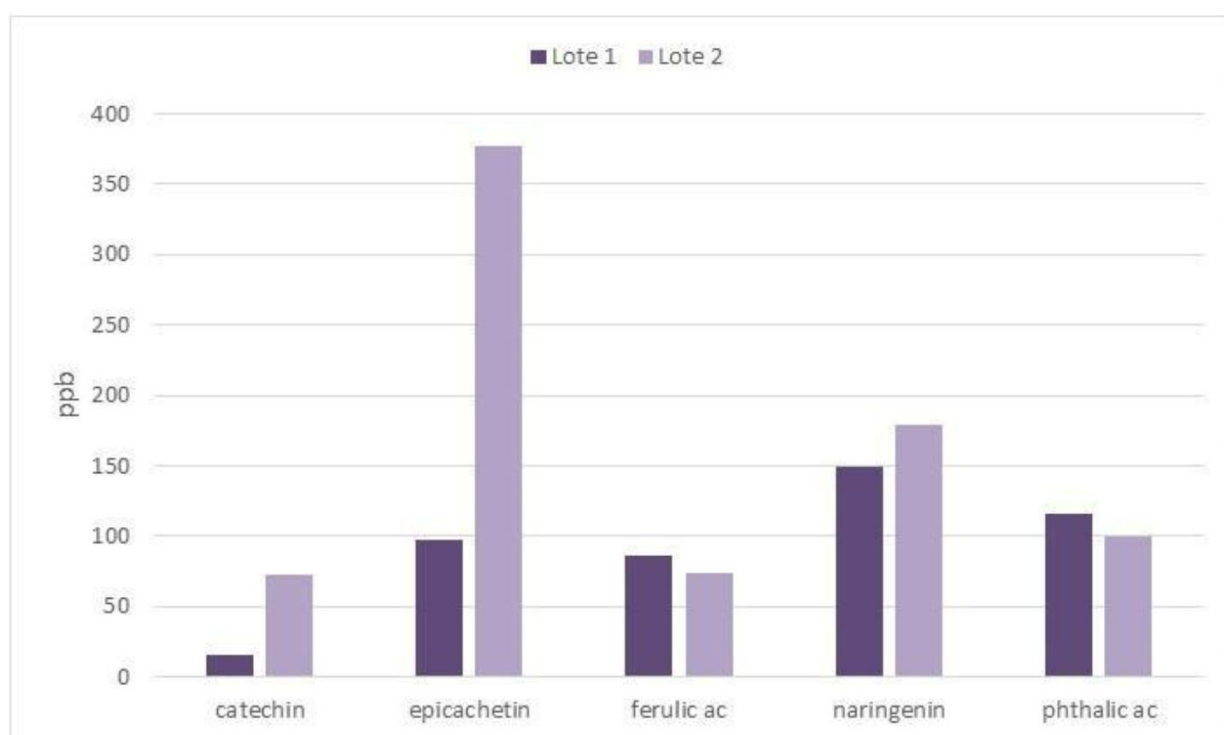


Figura 3.4. Comparación de compuestos fenólicos (ppb) en 2 lotes de zumo de baya

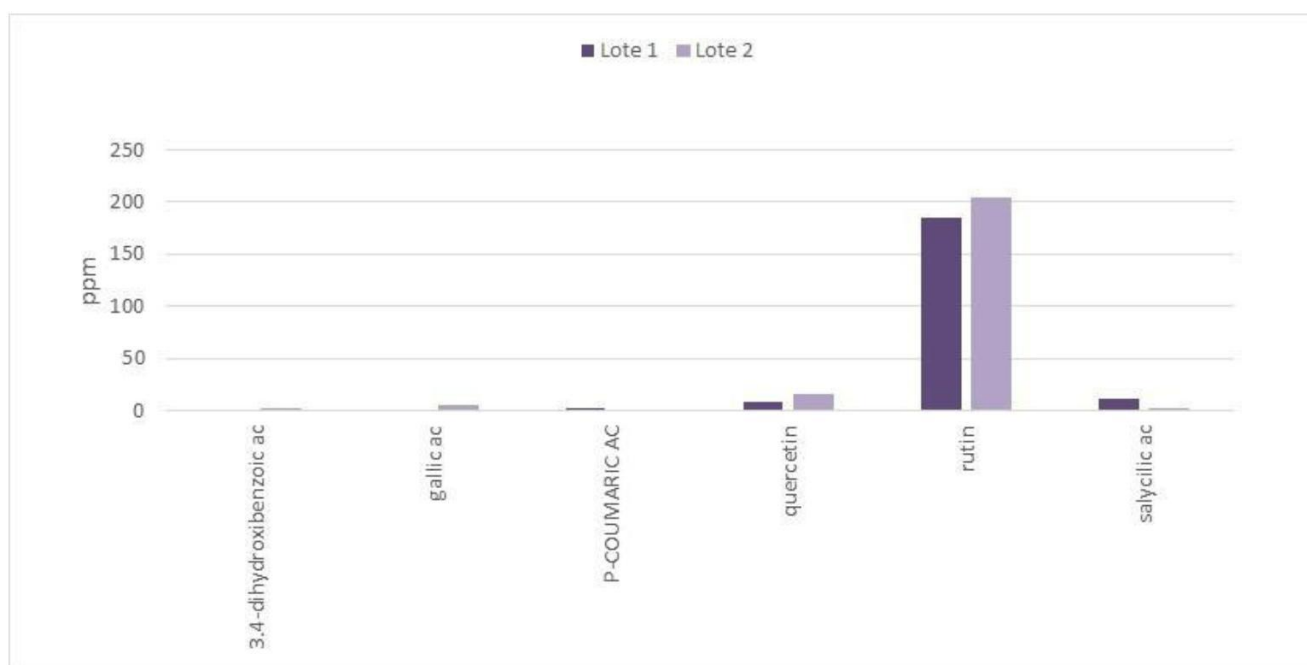


Figura 3.5. Comparación de compuestos fenólicos (ppm) en 2 lotes de zumo de baya

Además, se ha puesto a punto la determinación de triterpenos totales, utilizando como patrón el ácido ursólico, debido a su alto contenido en las bayas.

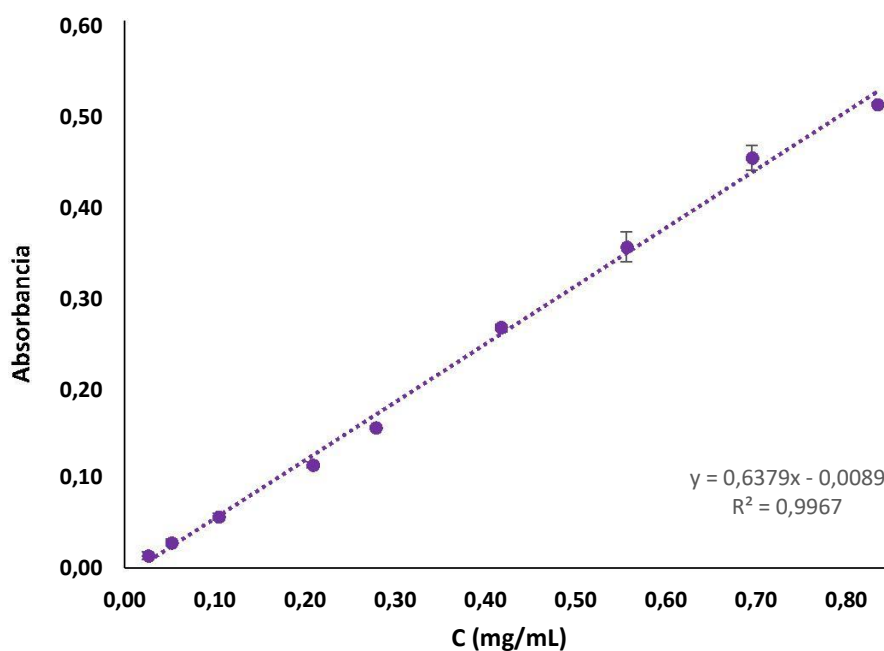


Figura 3.6. Recta ácido ursólico.

En la segunda anualidad del SAMBUCUSGO, se ha puesto a punto la determinación de los flavonoides en bayas de saúco mediante HPLC en varios lotes de zumos de bayas, proporcionados por Veigas de Sabugueiro. Para dicho análisis se han adquirido los patrones de las principales antocianinas y quercetinas presentes en las bayas de saúco. La determinación de las principales antocianinas y quercetinas en las bayas de saúco se llevó a cabo mediante HPLC (Agilent 1260 Infinity, Palo Alto, CA, USA) acoplado a un detector AB SCIEX Triple Quad 3500 (AB Sciex, Foster City, CA) equipado con una fuente de ionización electrospray (Turbo V™ en ionización positiva y negativa). Como gas nebulizador y gas de colisión se empleó el nitrógeno y la adquisición fue en modo MRM. Se utilizó una columna C18, volumen de inyección de 5 5 µL, flujo de 300 µL /min, fase móvil A. agua 0,1% ácido fórmico; fase móvil B. acetonitrilo 0,1% ácido fórmico. Los resultados se muestran en la Figura 3.7. Como se puede observar, la **cianidina 3-sambubiósido** es la antocianina más abundante.

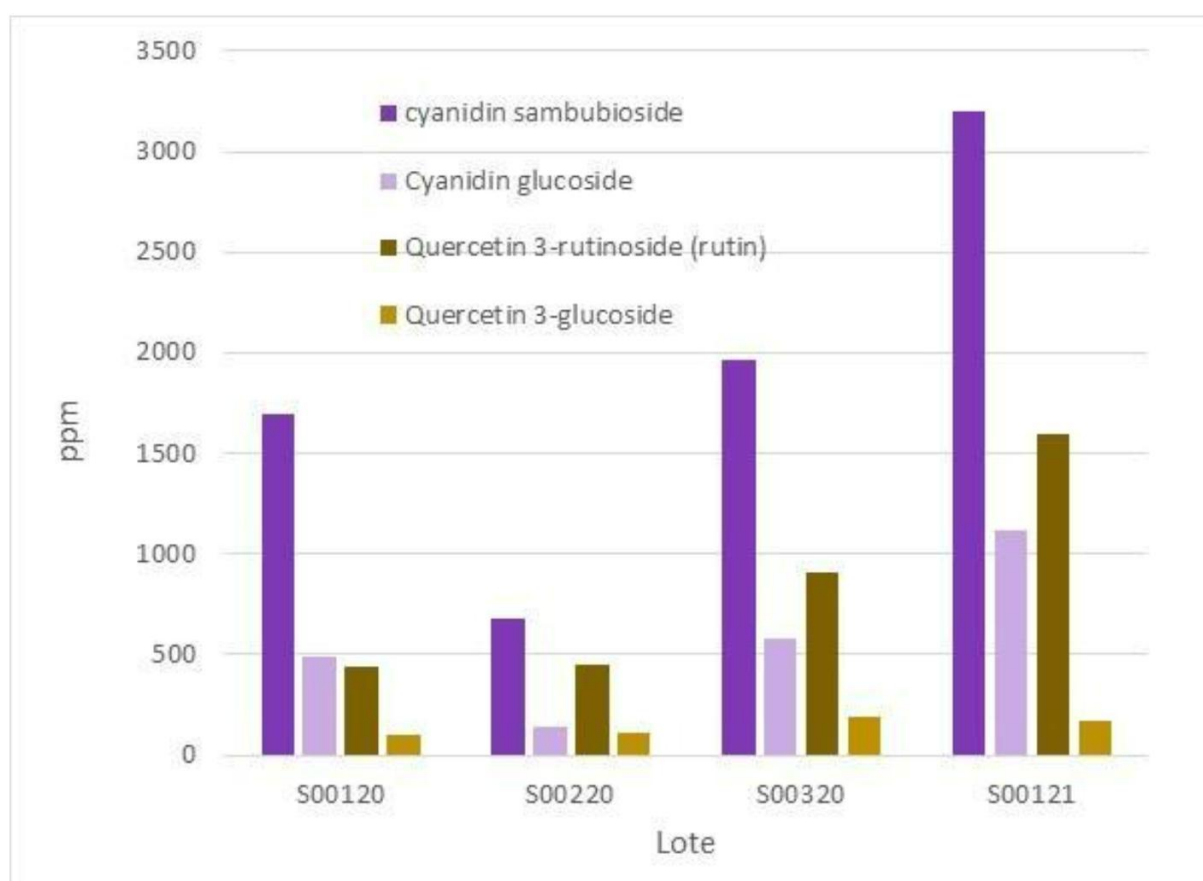


Figura 3.7. Principales antocianinas y quercetinas en zumo de baya de saúco

La determinación del contenido en antocianinas de las bayas recolectadas en esta segunda anualidad se llevó a cabo en muestras de bayas frescas y siguiendo el método del pH diferencial. Se trata de una técnica espectrofotométrica que se basa en la capacidad del cromóforo de estos compuestos para experimentar transformaciones estructurales reversibles a diferentes pH, con las consiguientes modificaciones en la absorbancia. Este método ha demostrado ser una de las formas más rápidas y simples de determinar el contenido total de antocianinas monoméricas de una

muestra. Para ello, se utilizó un buffer de cloruro de potasio a pH = 1,0 y un buffer de acetato de sodio a pH=4,5, y se midió la absorbancia a 500 y 700 nm. El total de antocianinas (mg/100g) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

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

Donde A es la absorbancia calculada como $A = (A_{500} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{500} - A_{700})_{pH4.5}$; MW y ϵ son el peso molecular y el coeficiente molar de extinción de la antocianina más abundante en la muestra y C es el factor de dilución de las muestras en el buffer. Las antocianinas se pueden cuantificar con un estándar externo, que habitualmente es la antocianina más abundante en el mundo vegetal, el cianidin-3-glucósido, cuyo peso molecular es $MW = 449,2$ y su coeficiente de extinción molar es $\epsilon = 26900$; o cualquier antocianina purificada. Las bayas una vez descongeladas se separaron de las ramas y se homogeneizaron mediante ultraturrax durante 1 minuto. El material homogeneizado se dividió en 3 lotes, para determinación de azúcares totales por HPLC, para recogida de los espectros NIR y para determinación de compuestos y propiedades funcionales (antocianinas, antioxidante y antiinflamatoria).



Figura 3.8. Procesado de las bayas

En el análisis previo de los zumos se concluyó que la antocianina mayoritaria era la cianidin-3-sambubiósido. Por este motivo, se realizó una recta con el patrón de esta antocianina y se calculó

su coeficiente de extinción molar para determinar el contenido en equivalentes de glucósido 3-sambubiósido de las bayas.

Los resultados en el contenido de antocianinas se muestran en la Figura 3.9. El contenido en antocianinas expresado en equivalentes de cianidin-3-sambubiósido es 1,6 veces mayor que el expresado como cianidin-3-glucósido. La concentración de antocianinas varió entre las muestras desde los 2487 ppm hasta 12536 ppm (mg eq. Sambubiósido/Kg baya fresca) de las muestras SS-6 y J-16, respectivamente.

En la tercera anualidad (2024), el contenido en antocianinas de las bayas recolectadas se determinó, de nuevo, siguiendo el mismo método. En este caso, la antocianina más abundante en las bayas de saúco, determinada en la anualidad anterior y confirmada en esta anualidad mediante UHPLC, fue la cianidina 3-sambubiósido. Para este estudio, se adaptó el método colorimétrico al recuento en placa de 96 pocillos. Para ello, se realizó una recta patrón con los patrones de antocianinas comerciales disueltos en el tampón utilizado para la determinación a pH 1,5 y se calcularon los coeficientes de extinción molar experimentales de cada una de las antocianinas, la cianidina 3-glucósido y la cianidina 3-sambubiósido.

Las bayas, una vez descongeladas, se homogeneizaron mediante ultraturrax durante 1 minuto. El material homogeneizado se dividió en 2 lotes, uno para determinación de antocianinas y azúcares totales por HPLC y propiedades antioxidantes, y otro para la recogida de los espectros NIR.

Los resultados del contenido en antocianinas determinado mediante el método del pH diferencial de la anualidad 2024, se muestran en la Figura 3.10.

En esta tercera anualidad, complementariamente al método de pH diferencial, se ha determinado el contenido en 3 antocianinas mayoritarias mediante cromatografía líquida de alta resolución (UHPLC): cianidina-3,5-diglucósido, cianidina-3-sambubiósido, cianidina-3-glucósido y quercetinas: rutina, quercetina-3-glucósido y quercetina. La determinación de antocianinas mediante cromatografía líquida se llevó a cabo utilizando un sistema HPLC Waters Alliance 2695 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) acoplado a un detector dual de absorbancia Waters 2487 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) En este caso, se utilizaron como patrones el cloruro de cianidina 3-glucósido, el cloruro de cianidina-3-sambubiósido, la rutina, la quercetina 3-glucósido y la quercetina. Los resultados se muestran en la Figura 3.11 expresados en μg de antocianina por g de muestra. La abundancia de las distintas antocianinas fue concordante en todas las muestras analizadas, de forma que, en todos los casos, la antocianina mayoritaria en las fue la cianidina-3-sambubiósido, de acuerdo con los resultados obtenidos en la pasada anualidad. La siguiente antocianina más abundante fue la cianidina-3-glucósido, antocianina mayoritaria en la naturaleza, excepto en la muestra L7, donde la cianidina-3,5-diglucósido fue ligeramente más abundante.

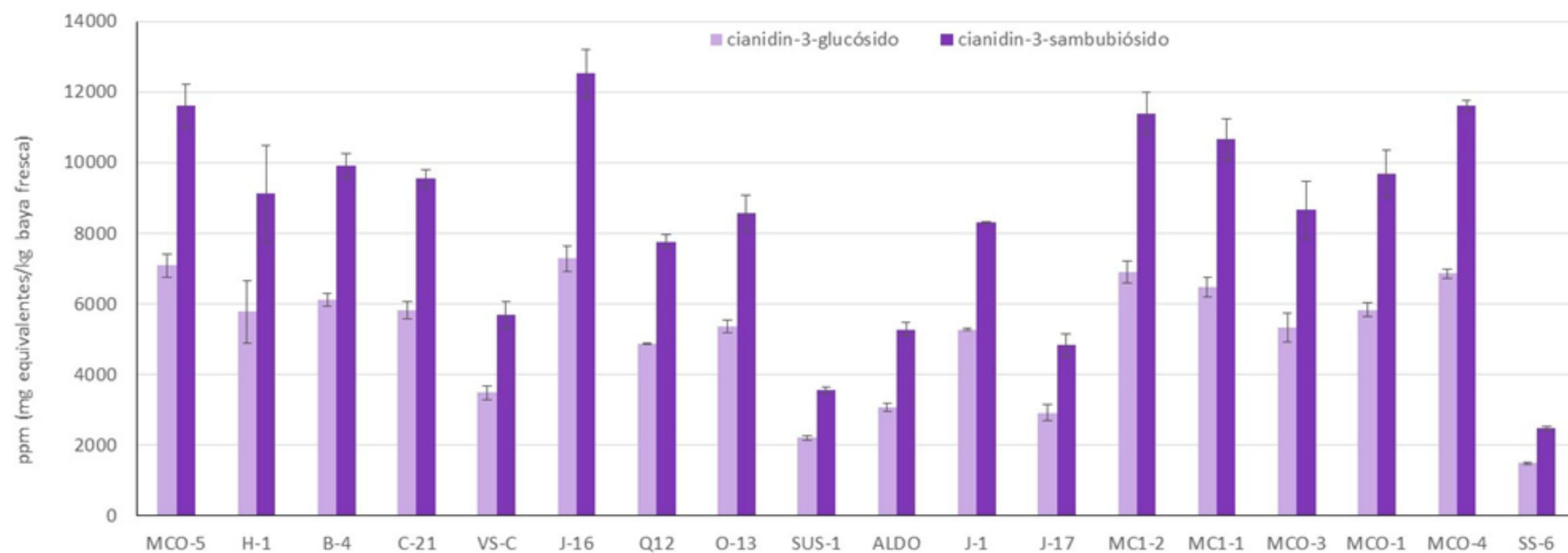


Figura 3.9. Comparación del contenido en antocianinas de las bayas, como equivalentes de cianidin-3-glucósido o cianidin-3-sambubiósido

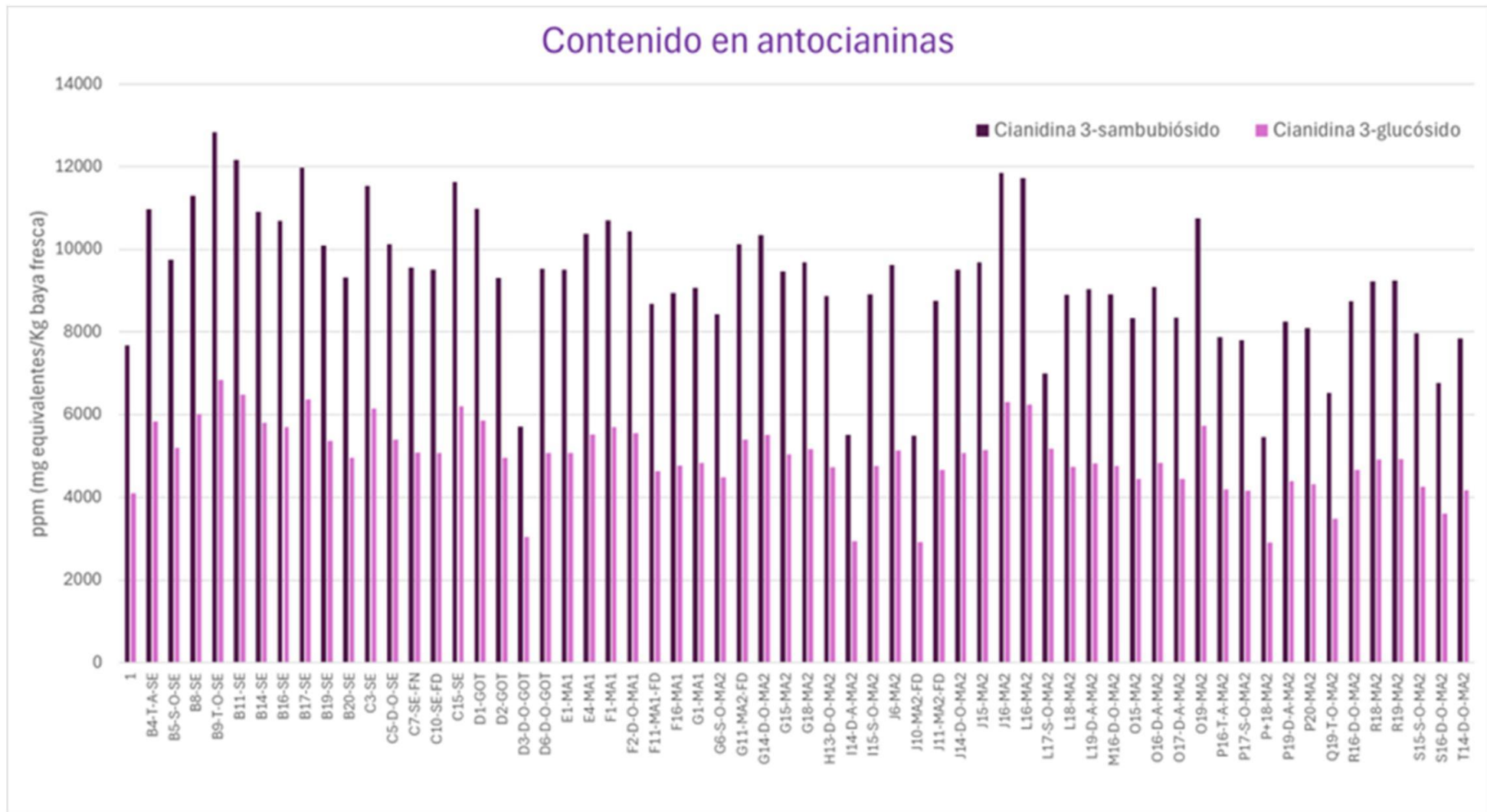


Figura 3.10. Comparación del contenido en antocianinas de las bayas, como equivalentes de cianidin-3-glucósido o cianidin-3-sambubiósido

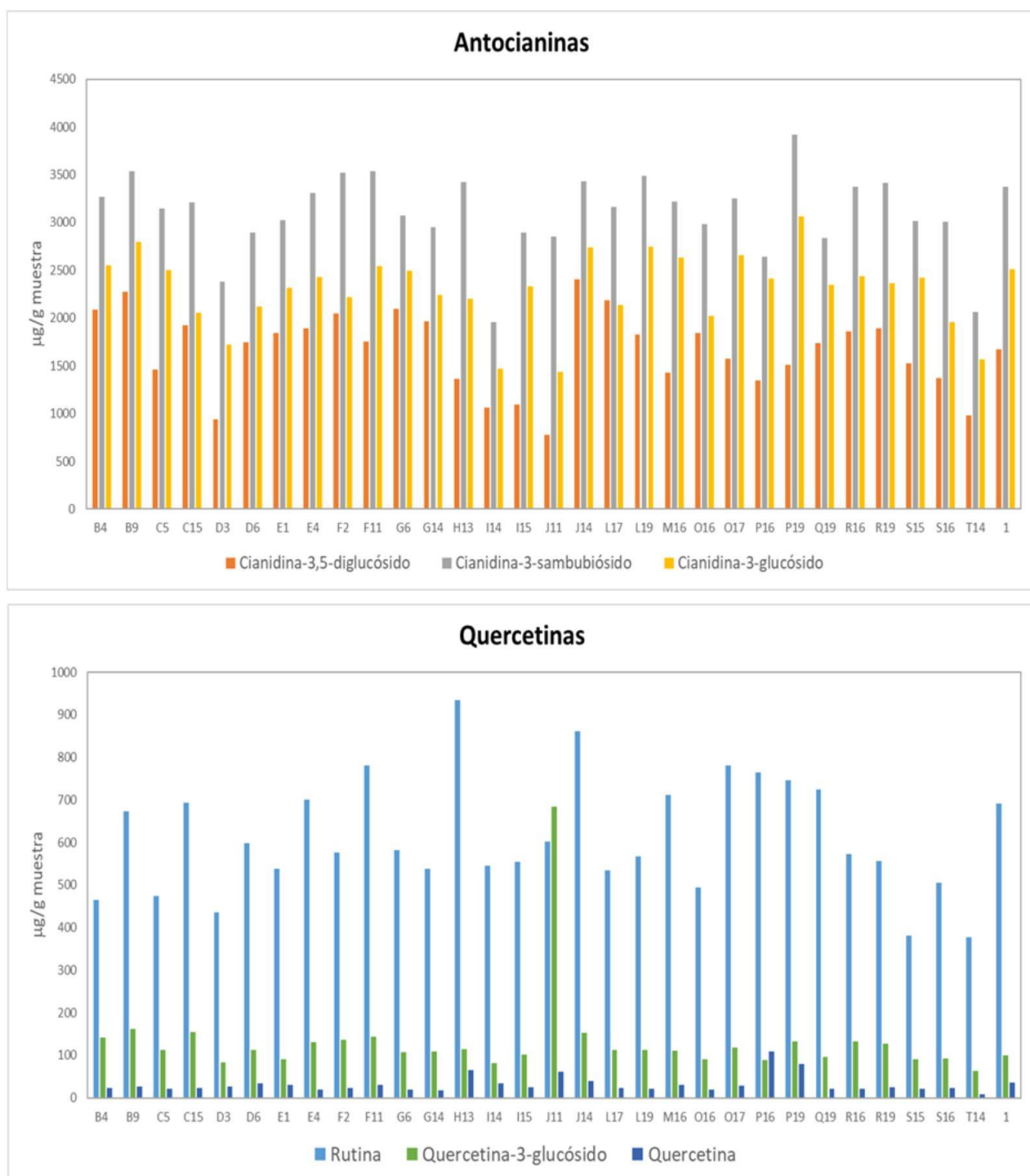


Figura 3.11. Contenido en antocianinas y quercetinas de las muestras de bayas calculado mediante UHPLC y expresado en $\mu\text{g/g}$ muestra.

Por otro lado, la quercetina más abundante fue la rutina, con un valor promedio de 612 ± 136 ppm. Hay que destacar que esta quercetina no fue la más abundante en la muestra J11, donde la concentración de quercetina-3-glucósido fue ligeramente superior a la de rutina. El tratamiento correspondiente a la parcela donde se recogió esta muestra incluyó fertilización doble, así como riego mediante microaspersión con doble caudal. Es posible que este tratamiento influyera en la concentración de quercetina-3-glucósido final en las bayas. Serían necesarios análisis adicionales de los resultados para determinar si existe una relación significativa entre el tratamiento y el contenido en quercetina-3-glucósido en las muestras de bayas.

En la Figura 3.12, se compara el resultado de antocianinas en las bayas sometidas a diferentes tratamientos agronómicos. En general no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Solo en el caso del riego se detectó un mayor contenido en antocianinas (*t student* $p < 0,05$) en las bayas de las plantas de secano. Sin embargo, cabe destacar que el número de ejemplares analizados en cada tratamiento fue muy diferente por lo que sería necesario confirmar esta tendencia observada en años sucesivos.

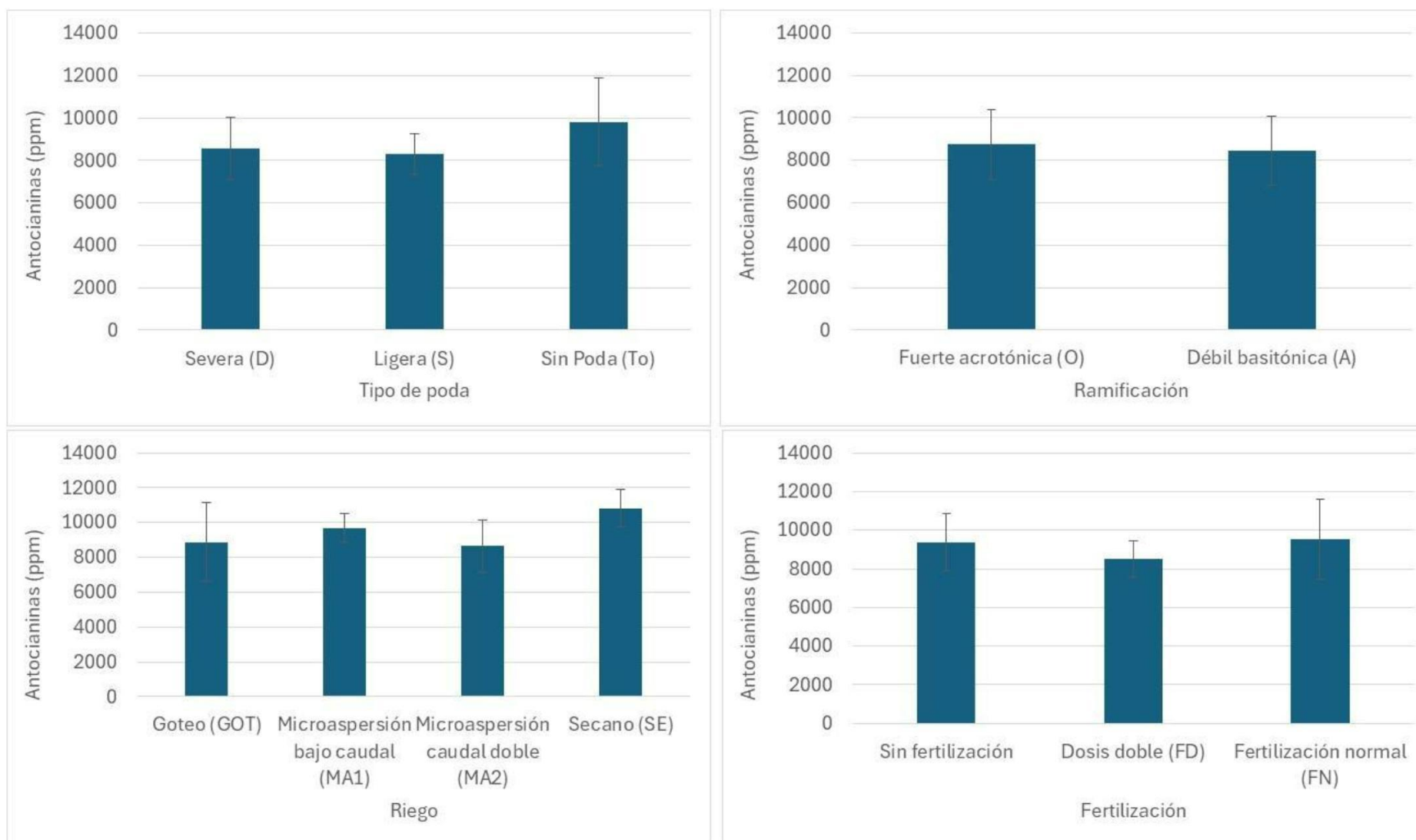


Figura 3.12. Resultados de antocianinas (expresados como valor promedio de equivalentes de cianidin-3-sambubioside y su desviación estándar) en función del tratamiento aplicado a la planta

Tabla 3.1. Contenido en antocianina de las bayas en función del tratamiento aplicado a la planta.

	Antocianinas (mg equivalentes de cianidin-3-sambubioside/Kg baya fresca)	
	Nº muestras	
Poda		
Severa (D)	16	8565 ± 1484
Ligera (S)	6	8314 ± 950
Sin Poda (To)	8	9812 ± 2065
Ramificación		
Fuerte acrotónica (O)	19	8740 ± 1664
Débil basitónica (A)	7	8441 ± 1639
Riego		
Goteo (GOT)	4	8881 ± 2241
Microaspersión bajo caudal (MA1)	7	9678 ± 821
Microaspersión caudal doble (MA2)	35	8635 ± 1521
Secano (SE)	15	10823 ± 1083
Fertilización		
Sin fertilización	55	9376 ± 1666
Dosis doble (FD)	5	8514 ± 1788
Fertilización normal (FN)	1	9554

La **determinación cuantitativa de azúcares** se realiza mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección de índice de refracción (RID). Se utiliza una columna de análisis de carbohidratos (tipo amino NH₂) 3.9x300mm, precolumnas Tipo NH₂ de 10µm 3.9x20mm y patrones de los azúcares (D(-) Fructosa, D(+) Glucosa anhidra, D(+) Sacarosa, D(+) Maltosa monohidratada, D(+) Lactosa monohidratada) en concentraciones de entre 0,5 y 20 g/100 g. Para la separación cromatográfica se utiliza un método isocrático con solvente de acetonitrilo y agua (75:25), 20 µL de volumen de inyección, flujo de 2 mL/min y temperatura de 32°C.

En la Tabla 3.2, se recopila el contenido en azúcares y antocianinas de las bayas. No se observa relación entre el contenido en azúcares y el contenido en antocianinas. Los valores para la lactosa, maltosa y sacarosa presentan concentraciones por debajo de 0,5 g/100g por lo que no se consideran en el análisis. Estos compuestos serán aquellos que se intentarán predecir mediante el uso de la tecnología NIR y el cálculo matemático.

Tabla 3.2. Contenido en azúcares y antocianinas de las bayas.

Muestra	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Azúcares Totales (g/100g)	Antocianinas (ppm equivalentes de cyanidin-3-O-glucoside)	Antocianinas (ppm equivalentes de Cyanidin 3-sambubioside)
MCO-5	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2	3,3 ± 0,3	7099 ± 332	11631 ± 615
H-1	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,2	3,1 ± 0,3	5786 ± 882	9125 ± 1380
B-4	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,2 ± 0,2	6116 ± 178	9907 ± 361
C-21	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	3,3 ± 0,3	5834 ± 252	9555 ± 263
VS-C	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	2,0 ± 0,2	3487 ± 190	5695 ± 392
J-16	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,2	2,8 ± 0,3	7292 ± 359	12536 ± 693
Q12	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,9 ± 0,2	4867 ± 21	7772 ± 186
O-13	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,2	3,1 ± 0,3	5359 ± 182	8593 ± 505
SUS-1	4,2 ± 0,4	4,9 ± 0,5	9,1 ± 0,9	2219 ± 68	3554 ± 109
ALDO	2,9 ± 0,3	3,9 ± 0,4	6,8 ± 0,7	3067 ± 113	5278 ± 198
J-1	3,0 ± 0,3	5,2 ± 0,5	8,2 ± 0,8	5283 ± 23	8307 ± 20
J-17	1,4 ± 0,2	2,7 ± 0,3	4,1 ± 0,5	2920 ± 229	4847 ± 324
MC1-2	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,3	4,9 ± 0,5	6912 ± 323	11398 ± 597
MC1-1	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	3,3 ± 0,4	6495 ± 275	10670 ± 588
MCO-3	2,1 ± 0,2	3,9 ± 0,4	6,0 ± 0,6	5344 ± 403	8671 ± 820
MCO-1	1,8 ± 0,2	3,6 ± 0,4	5,4 ± 0,6	5842 ± 211	9693 ± 676
MCO-4	5,2 ± 0,5	5,5 ± 0,6	10,7 ± 1,1	6874 ± 131	11622 ± 137
SS-6	3,9 ± 0,4	5,3 ± 0,6	9,2 ± 1,0	1491 ± 26	2487 ± 58

Para la determinación de la capacidad antioxidante (CAO) se utilizó en la anualidad 2023 y en la anualidad 2024, métodos espectrofotométricos *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) y *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC), en la anualidad 2023 de las 18 muestras de baya recibidas y en la anualidad 2024 de 31 muestras de baya recibidas.

El **método TEAC** mide la capacidad de los antioxidantes de neutralizar el radical catiónico ABTS^{°+}, que es un cromógeno soluble que se genera a partir de su precursor ABTS (2,2-azinobis- (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)) en presencia de persulfato de potasio, el oxidante más utilizado para esta reacción, tras un reposo de 12-16 horas en ausencia de luz. La cantidad de dicho radical disminuye en presencia de compuestos antioxidantes donadores de electrones o de átomos de hidrógeno, equilibrio determinado por la estructura del antioxidante y el pH del medio, y se mide la disminución de la absorbancia a 734 nm mediante cinética o punto final.

El **método ORAC-FI**, determina la CAO mediante un método fluorimétrico. Se basa en la oxidación de la fluoresceína (FI) por un radical peroxil-ROO generado por la descomposición térmica en presencia de oxígeno del agente oxidante AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro. Mide la capacidad donante de átomos de hidrógeno de los antioxidantes y, por lo tanto, es un método basado en transferencia de átomos de hidrógeno.

Los antioxidantes presentes en la muestra retrasan la oxidación de la fluoresceína inducida por el radical peroxilo, que conforme se va oxidando pierde la fluorescencia. Los radicales peroxilo son los radicales libres predominantes que se encuentran en la oxidación de lípidos en alimentos y sistemas biológicos en condiciones fisiológicas.

En la Figura 3.13, se muestran los resultados obtenidos en la anualidad 2023 de la capacidad antioxidante medida con el método TEAC, mostrando en valor numérico la suma de las actividades

de las fracciones hidrofílica y lipofílica. Las muestras C-21, MC1-2 y MCO-4 exhibieron mayor capacidad antioxidante total (165,8, 159,2 y 145,3 μ moles Trolox/g muestra, respectivamente), a diferencia de las muestras ALDO y J-17, las cuales mostraron menor actividad antioxidante total (53,3 y 50,7 μ moles Trolox/g muestra, respectivamente). Por lo que tanto las bayas como las ramas presentan propiedades antioxidantes. Además, como se puede observar, el carácter antioxidante se debe principalmente a la presencia de compuestos hidrofílicos, en el que destaca la muestra C-21 por presentar mayor carácter antioxidante en comparación con las demás muestras (150,70 μ moles Trolox/g muestra). En cuanto a las fracciones lipofílicas de las bayas, cabe resaltar que la muestra MC1-2 presentó mayor capacidad antioxidante (28,8 μ moles Trolox/g muestra) en comparación con las demás muestras, que se mantuvieron por debajo de 19,0 μ moles Trolox/g muestra.

En la Figura 3.14 se muestran los resultados obtenidos en la anualidad 2024 de la capacidad antioxidante determinada por el método TEAC, como equivalentes de Trolox (μ moles) por g de muestra (homogeneizado de baya).

Los resultados muestran valores más elevados y, por tanto, mayor capacidad antioxidante para las muestras B9, C15, E4, O16, B4, F2, E1 y 1, que superan los 260 μ moles equivalentes de Trolox por g de muestra. Y las muestras con menor capacidad antioxidante resultaron ser la D3, la Q19 y la I14, que no superaron los 180 μ moles equivalentes de Trolox por g de muestra. No se observan tendencias en los valores obtenidos en base a los tratamientos de cultivo aplicados a las muestras (tipo de poda, tipo de ramificación, tipo de riego o de fertilización).

En la Figura 3.15, se muestran los resultados obtenidos de capacidad antioxidante determinada mediante el método ORAC. Los resultados se muestran como equivalentes de Trolox (μ moles) por g de muestra.

Los resultados obtenidos para ORAC son, en general, más altos que los obtenidos mediante TEAC. Mediante este método las muestras con mayor capacidad antioxidante resultaron ser C15, E4, B9 y B4, coincidiendo con TEAC. Y la que muestra menor capacidad ORAC es la muestra D3, al igual que en TEAC, cuyo valor no alcanza los 250 μ moles equivalentes de Trolox por g de muestra. Si se ordenan los valores obtenidos en base al sistema de riego empleado, puede observarse una tendencia a incrementar la capacidad antioxidante en sistemas de riego de secano y de microaspersión de bajo caudal. Sería necesario profundizar en el estudio de estas variables de riego incrementando el número de muestras analizadas para poder evaluar un efecto significativo del tipo de riego sobre la capacidad antioxidante ORAC de las bayas.

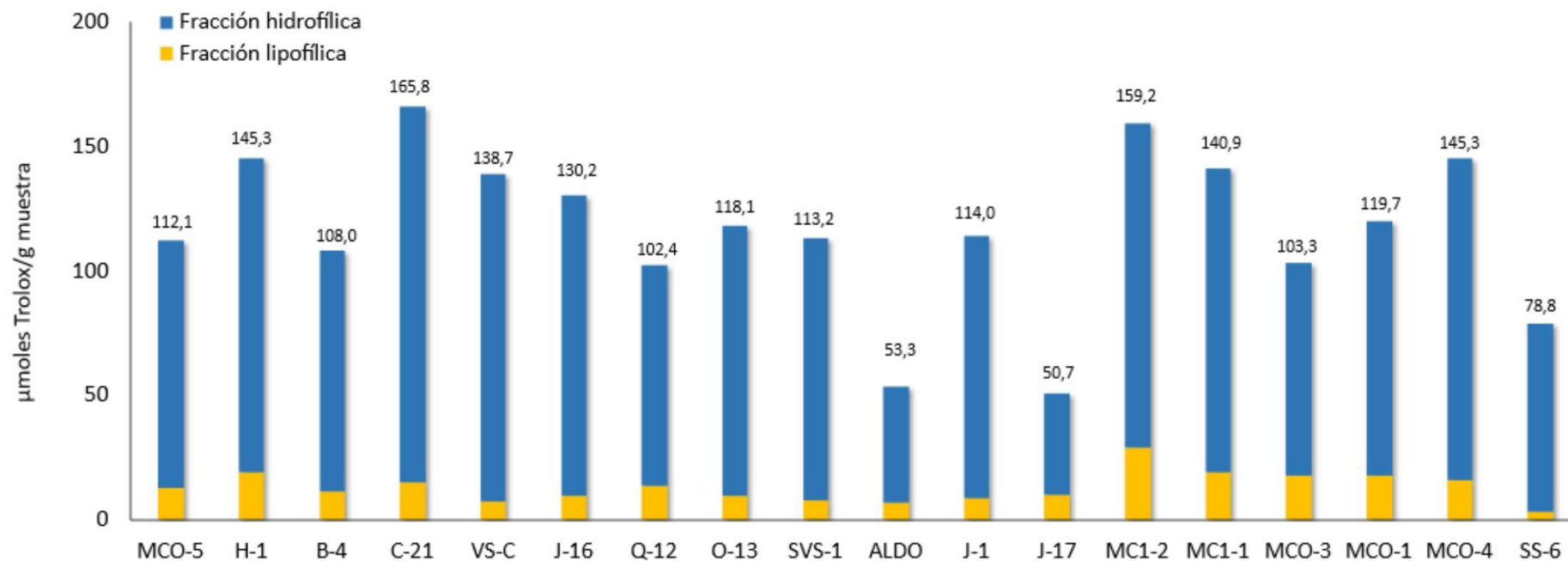


Figura 3.13. Actividad antioxidante TEAC de compuestos hidrofílicos (azul) y lipofílicos (amarillo) de las bayas. Los valores numéricos indican la actividad antioxidante total (fracción hidrofílica y lipofílica). Resultados expresados en $\mu\text{moles Trolox/g muestra}$.

Equivalentes Trolox ($\mu\text{moles/g}$ muestra)

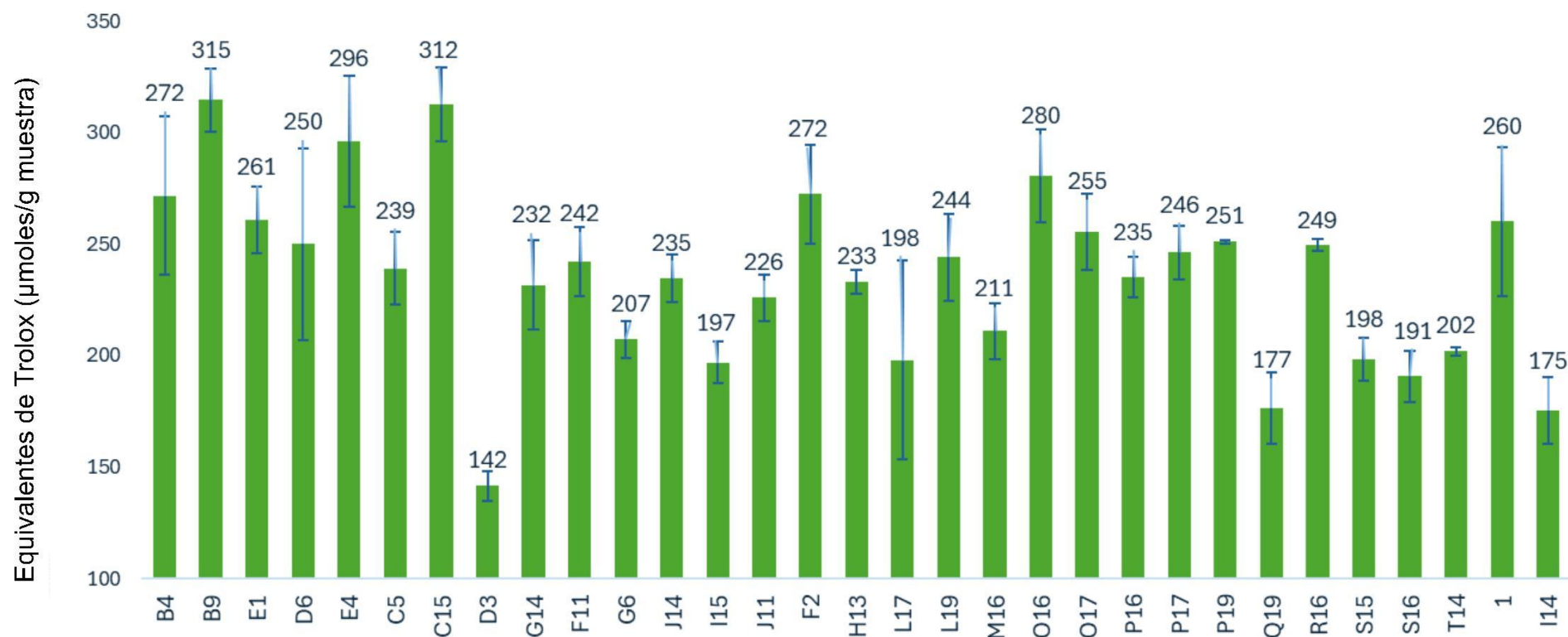


Figura 3.14. Actividad antioxidante TEAC de compuestos hidrofílicos de las bayas

Equivalentes de Trolox ($\mu\text{moles/g}$ muestra)

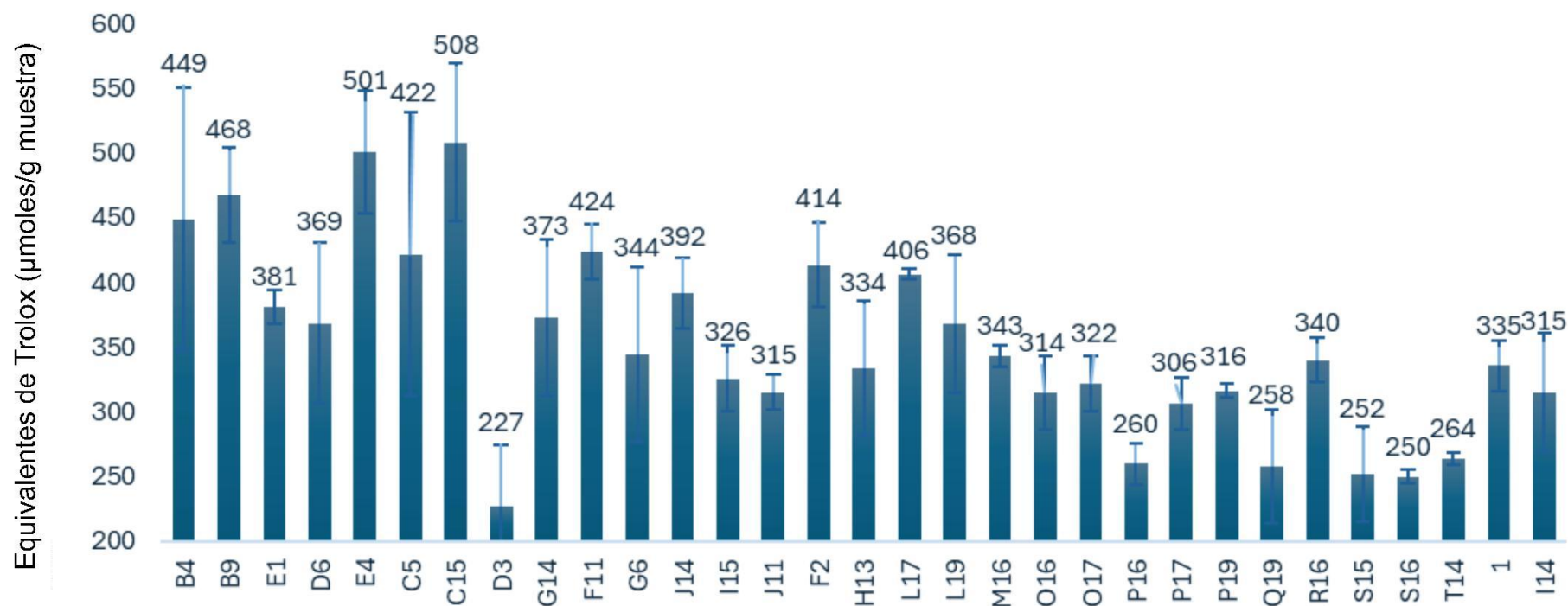


Figura 3.15. Actividad antioxidante ORAC de compuestos hidrofílicos de las bayas

ORAC en base al sistema de riego

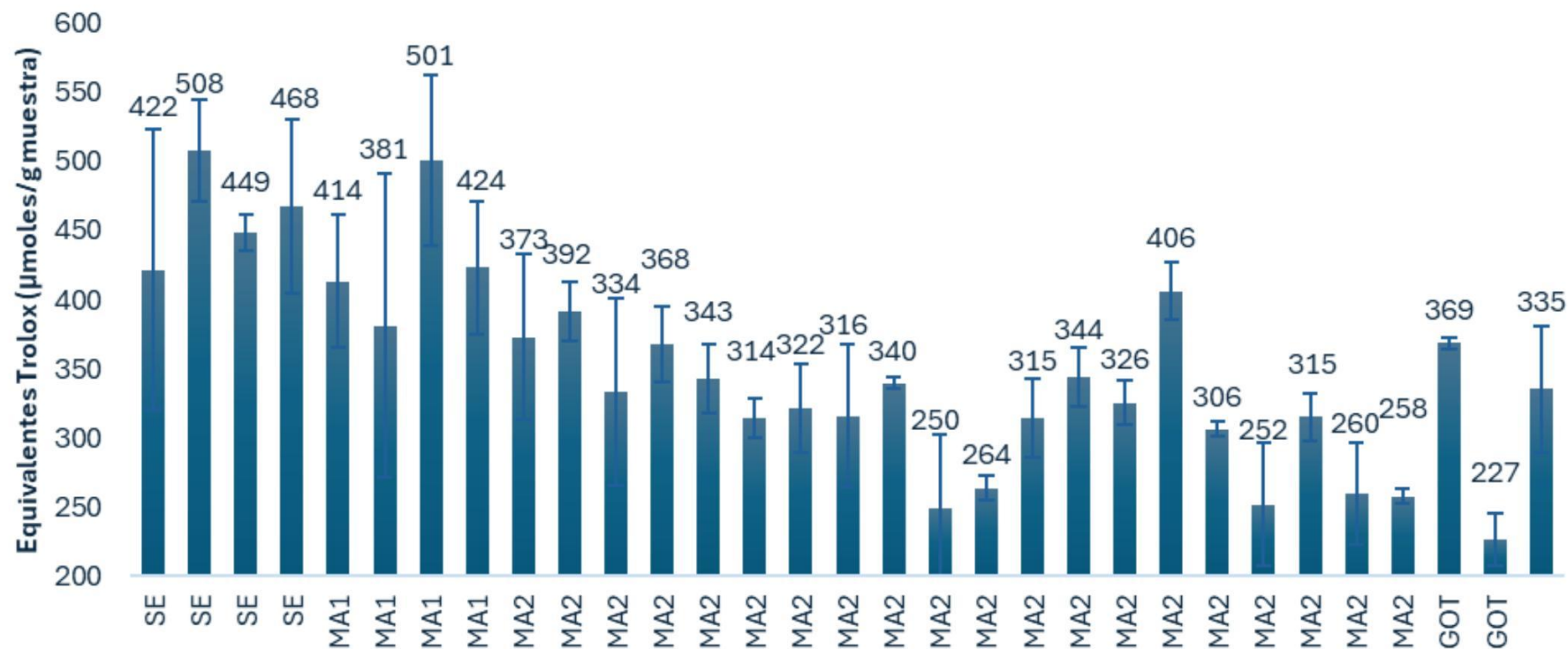


Figura 3.16. Actividad antioxidante ORAC de compuestos hidrofílicos de las bayas en base al sistema de riego

Además, Veigas de Sabugueiro, ha recolectado flores de ejemplares silvestres y las ha enviado a ANFACO para analizar **la calidad de las flores de los diferentes ejemplares**. En la anualidad 2023, se analizaron 32 muestras de flores de saúco para determinar su contenido en compuestos fenólicos totales (CFT) y en la anualidad 2024 se analizaron 15 muestras. Algunas de las muestras de flores sufrieron cierto nivel de oxidación antes de llegar a ANFACO (Figura 3.17), por lo que las muestras se clasificaron en tres grupos en función del color que presentaban cuando fueron recibidas: amarillo claro, amarillo oscuro y pardo.



Figura 3.17. Flores liofilizadas en diferente estado de oxidación.

A continuación, en la Tabla 3.1. se detallan las muestras correspondientes a cada grupo.

Tabla 3.1. Muestras de flores recibidas y codificación

COLOR	CODIGO DE		CODIGO DE		CODIGO DE
	MUESTRA	COLOR	MUESTRA	COLOR	MUESTRA
Amarillo claro	SVS-3	Amarillo oscuro	SVS-1	Pardo	SS-5
Amarillo claro	SS-2	Amarillo oscuro	SVS-2	Pardo	SX-3
Amarillo claro	SS-3	Amarillo oscuro	SS-1	Pardo	SVS-4
Amarillo claro	SS-4	Amarillo oscuro	SVS-5	Pardo	SVS-6
Amarillo claro	MCO-4	Amarillo oscuro	SA-1	Pardo	SVS-7
Amarillo claro	SVS-9	Amarillo oscuro	SVS-8	Pardo	MCO-1
Amarillo claro	SX-2	Amarillo oscuro	MCO-3	Pardo	MCO-2

	Amarillo oscuro	MCO-5	Pardo	SR-1
	Amarillo oscuro	SCC-2	Pardo	SR-2
			Pardo	SX-1
			Pardo	SCC-4
			Pardo	SCC-1
			Pardo	SCC-3

Las muestras de flores se liofilizaron y se trituraron con mortero. La determinación de CFT se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu en microplaca. El método se basa en una reacción redox entre el reactivo de Folin-Ciocalteu, formado por ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), y los compuestos fenólicos, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente.

En la Figura 3.18, se muestra el contenido en CFT de las muestras de flores liofilizadas en la abualidad 2023. El contenido en compuestos fenólicos totales disminuye significativamente en las muestras más oxidadas (Figura 3.19), por lo tanto, en la anualidad 2024 se intentó mejorar el muestreo de las flores para evitar su deterioro.

La enzima polifenol oxidasa (PPO) oxida los compuestos fenólicos y es crucial en la transición del color de las flores hacia el marrón. En este caso, las flores más pardas resultaron tener el menor contenido promedio de compuestos fenólicos, con lo que la enzima PPO podría tener mayor actividad en estas flores, quizás generada por un mayor tiempo expuestas a temperaturas altas hasta su congelación.

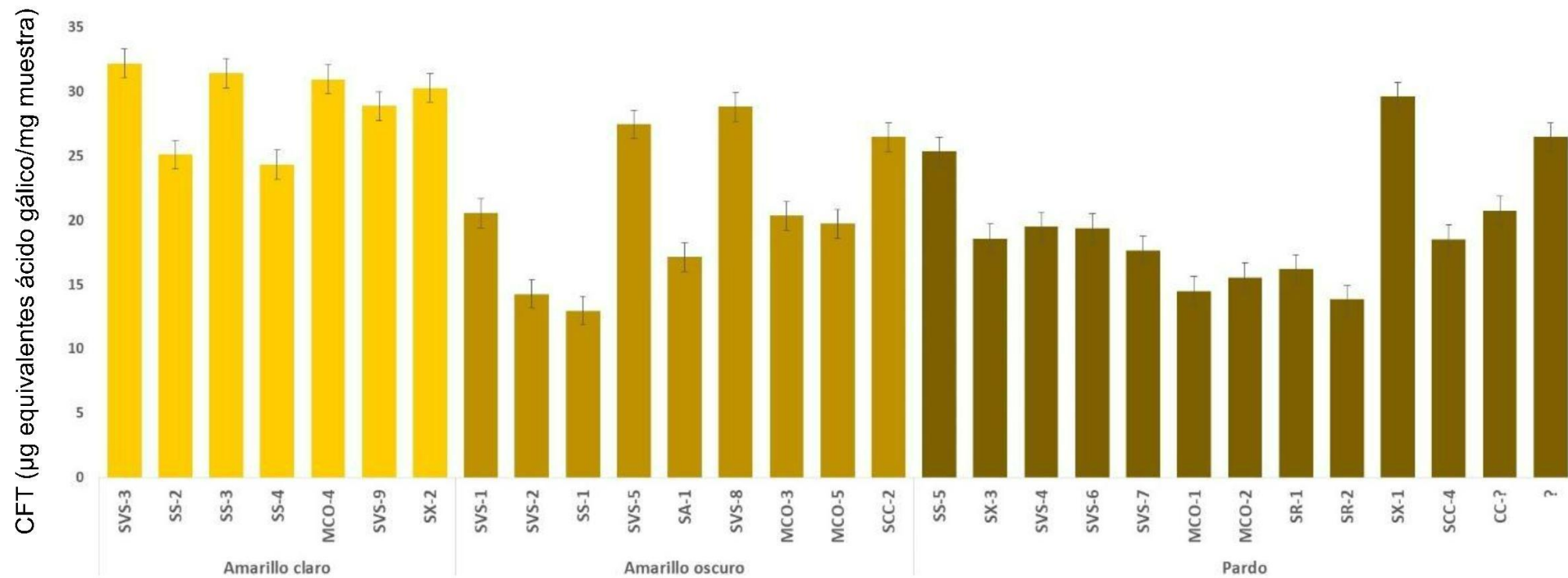


Figura 3.18. Compuestos fenólicos totales en las diferentes muestras de flores

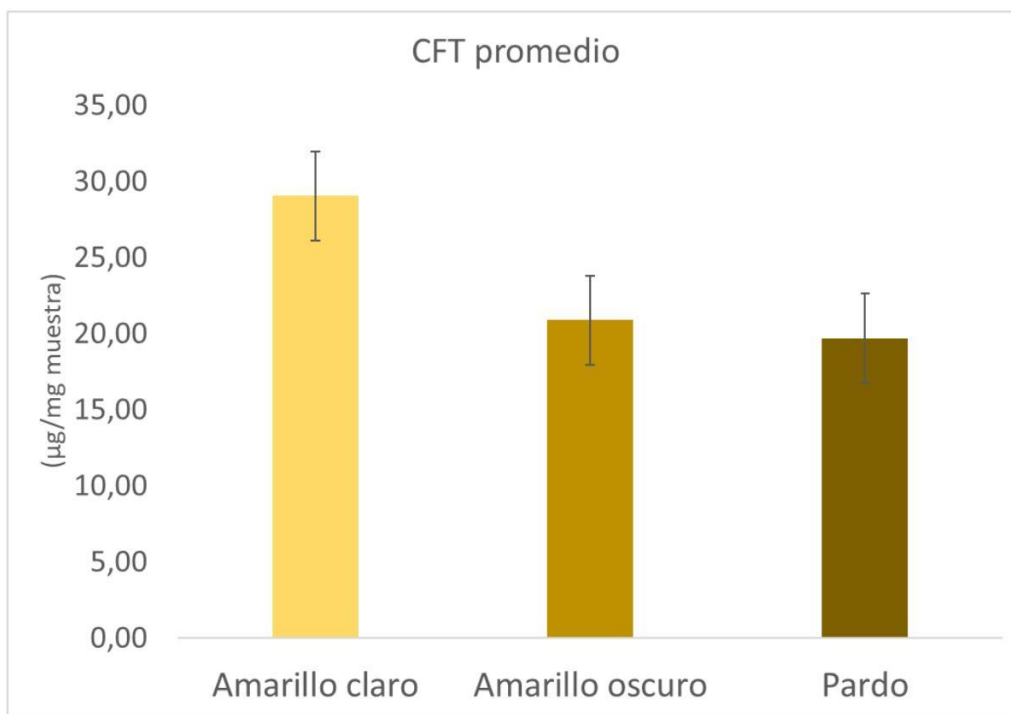


Figura 3.19. Compuestos fenólicos totales según nivel de oxidación de las flores.

En base a los resultados obtenidos en la anualidad 2023, en la anualidad 2024, Se analizaron 15 muestras de flores de saúco para determinar su contenido en compuestos fenólicos totales (CFT). Las muestras se recibieron congeladas. La mayoría de las flores sufrieron cierto grado de oxidación antes de llegar a ANFACO-CECOPESCA. Debido a esto, de entre todas las muestras, se eligieron 15, tratando de seleccionar aquellas cuya procedencia coincidiera con la de las muestras de bayas analizadas previamente; y aquellas que no hubieran sufrido oxidación, o, de haberla sufrido, en la menor medida posible. Las muestras analizadas se muestran en la 3.20. La diferencia en la coloración indica el grado de oxidación de las muestras, variando entre el amarillo de aquellas flores que no sufrieron oxidación, al marrón más oscuro de las que mayor grado de oxidación mostraron.



Figura 3.20. Flores congeladas en diferentes estados de oxidación

En la Figura 3.21 **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra el contenido en CFT de las muestras de flores analizadas en la anualidad 2024. La concentración de compuestos fenólicos oscila entre $1,90 \pm 0,45$ y $3,69 \pm 0,38$ μg equiv. ácido gálico/mg muestra. El contenido en CFT más alto es de la muestra M14, única muestra de las analizadas que no presentaba oxidación. La enzima polifenol oxidasa (PPO) oxida los compuestos fenólicos y es crucial en la transición del color de las flores hacia el marrón. Los daños causados a las células vegetales por diferentes tipos de estrés, como las altas temperaturas, liberan los compuestos fenólicos, principalmente localizados en las vacuolas, y los pone en contacto con la PPO provocando su oxidación y dando lugar al característico color marrón de las flores mustias. Así, el efecto del tratamiento en la composición de compuestos fenólicos no ha podido analizarse, a no haber suficiente número de muestras de flores que no hubieran sufrido oxidación.

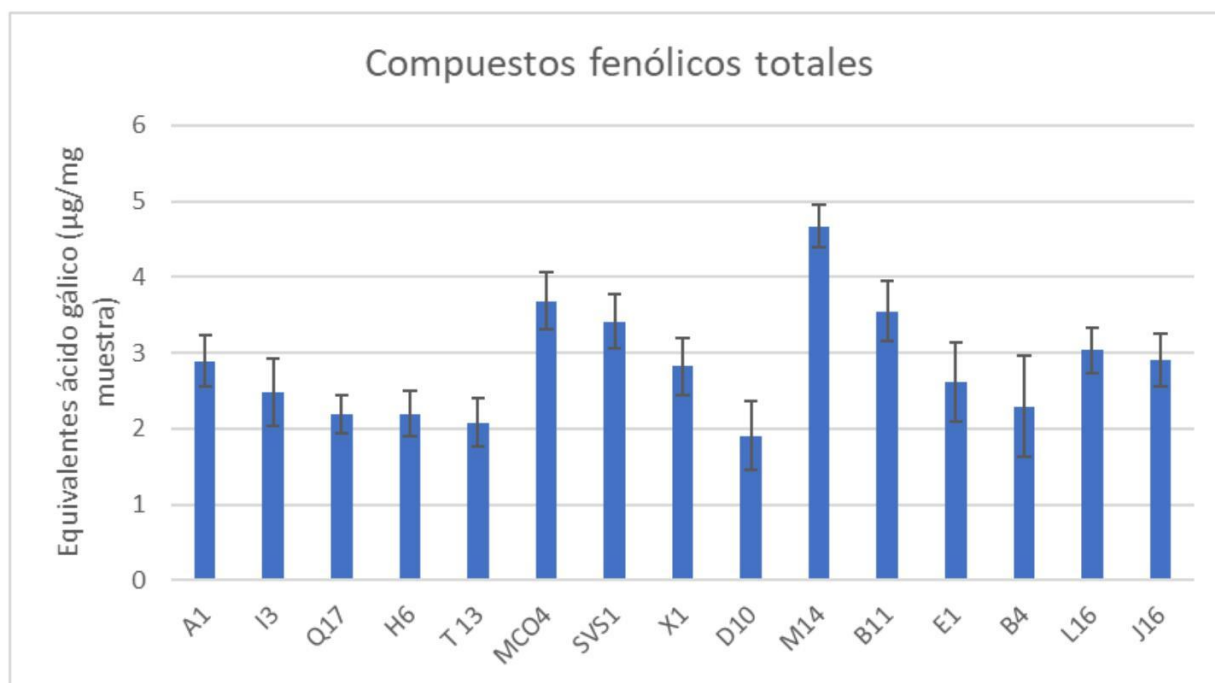


Figura 3.21. Contenido en compuestos fenólicos totales expresado en equivalentes de ácido gálico

Para explorar otras posibles vías de explotación de las bayas en las anualidades 2023 y 2024, se ha ensayado la **actividad antiinflamatoria de muestras de baya**. En la anualidad 2023, se han analizado 4 muestras de baya (MC0-5, B4, J16, MC1-2 y MCO-4) que presentaron un alto contenido en antocianinas. Para ello, se prepararon extractos acuosos a partir de la baya triturada a una concentración final de 100 mg/ml.

El efecto antiinflamatorio *in vitro* se determinó por métodos inmunológicos en la línea celular RAW264.7 (macrófagos de ratón). La capacidad antiinflamatoria se ensaya utilizando el modelo de macrófagos y la inducción de inflamación por LPS. El ensayo consiste en provocar la inflamación en los macrófagos mediante el suministro de LPS y la evaluación del efecto de la sustancia a ensayar sobre esta inflamación, en base a la medición de factores de inflamación como son nitritos, TNF- α e IL-6. Como fármaco de control con reconocida capacidad antiinflamatoria se utiliza la hidrocortisona, que servirá como control positivo del efecto antiinflamatorio en los macrófagos.

La determinación de nitritos se llevó a cabo por el método del Reactivo de Griess, que permite cuantificar la producción de óxido nítrico (NO). El reactivo de Griess nos permite cuantificar la cantidad de nitritos (NO $_2^-$), que se originan por la oxidación espontánea del NO bajo condiciones fisiológicas, lo que nos proporciona una medida indirecta del NO.

En el caso de las interleuquinas se ha utilizado un ensayo múltiple de inmunología tipo ELISA (panel de microesferas magnéticas de citocinas/quimiocinas de ratón MILLIPLEX®, MCYTOMAG-70K-07) que, mediante la tecnología Luminex, permite la determinación simultánea de 7 factores de inflamación: IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 y TNF- α .

Como primer paso para estudiar la actividad antiinflamatoria se realizó un ensayo de viabilidad celular (MTT) (Figura 3.22) para determinar la mínima concentración del extracto de baya que se puede ensayar sin que afecte a la viabilidad de la línea celular.

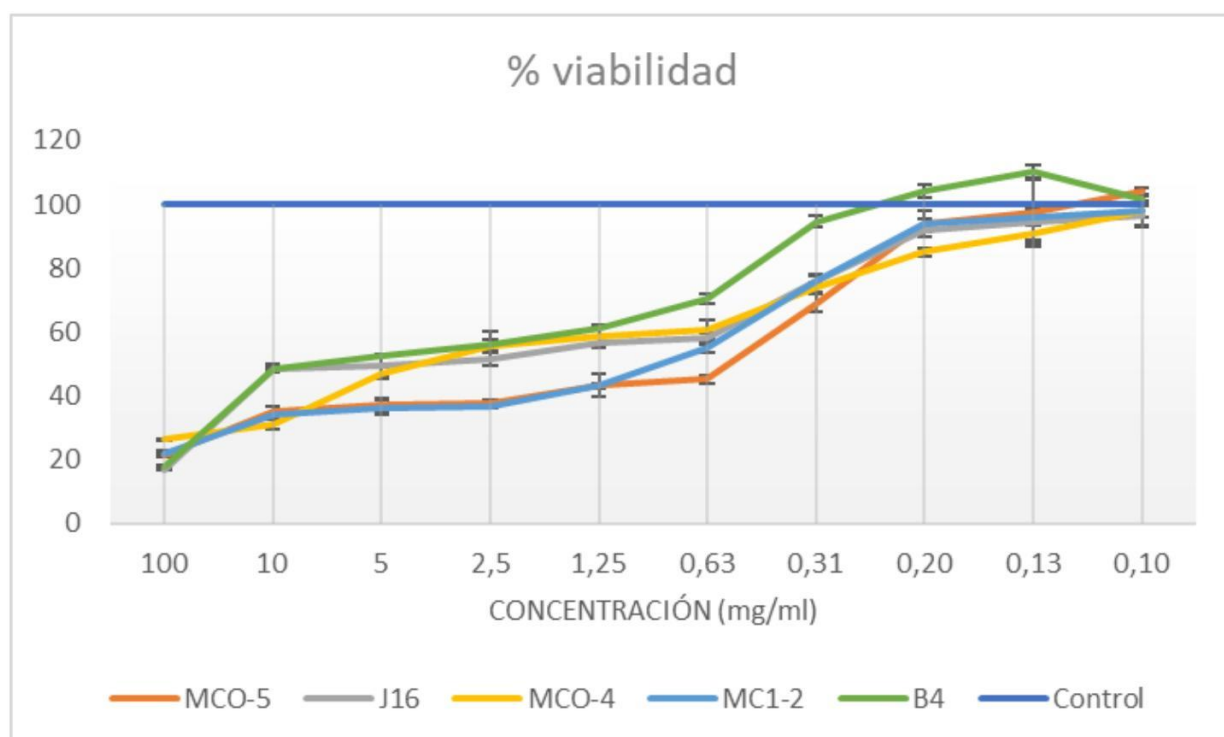


Figura 3.22 Efecto de la concentración de extracto de bayas de Sambucus sobre la Viabilidad celular de RAW 264.7

El ensayo muestra que la concentración más alta de extracto que no afecta a la viabilidad celular de manera significativa es 0,20 mg/ml para todos los extractos. Por tanto, ésta ha sido la concentración que se ha utilizado para el ensayo de capacidad antiinflamatoria llevado a cabo en la anualidad 2024 cuyos resultados se muestran en la Figura 3.23

Todas las muestras ensayadas mostraron capacidad antiinflamatoria en términos de la liberación de IL-6 y TNF- α . Destaca la capacidad de la muestra MCO4, a una concentración de 50 μ g/mL, de inhibir la liberación de IL-6, la cual es incluso superior a la de la hidrocortisona. Esta muestra también fue la que mostró la mayor capacidad antiinflamatoria en términos de liberación de TNF- α .

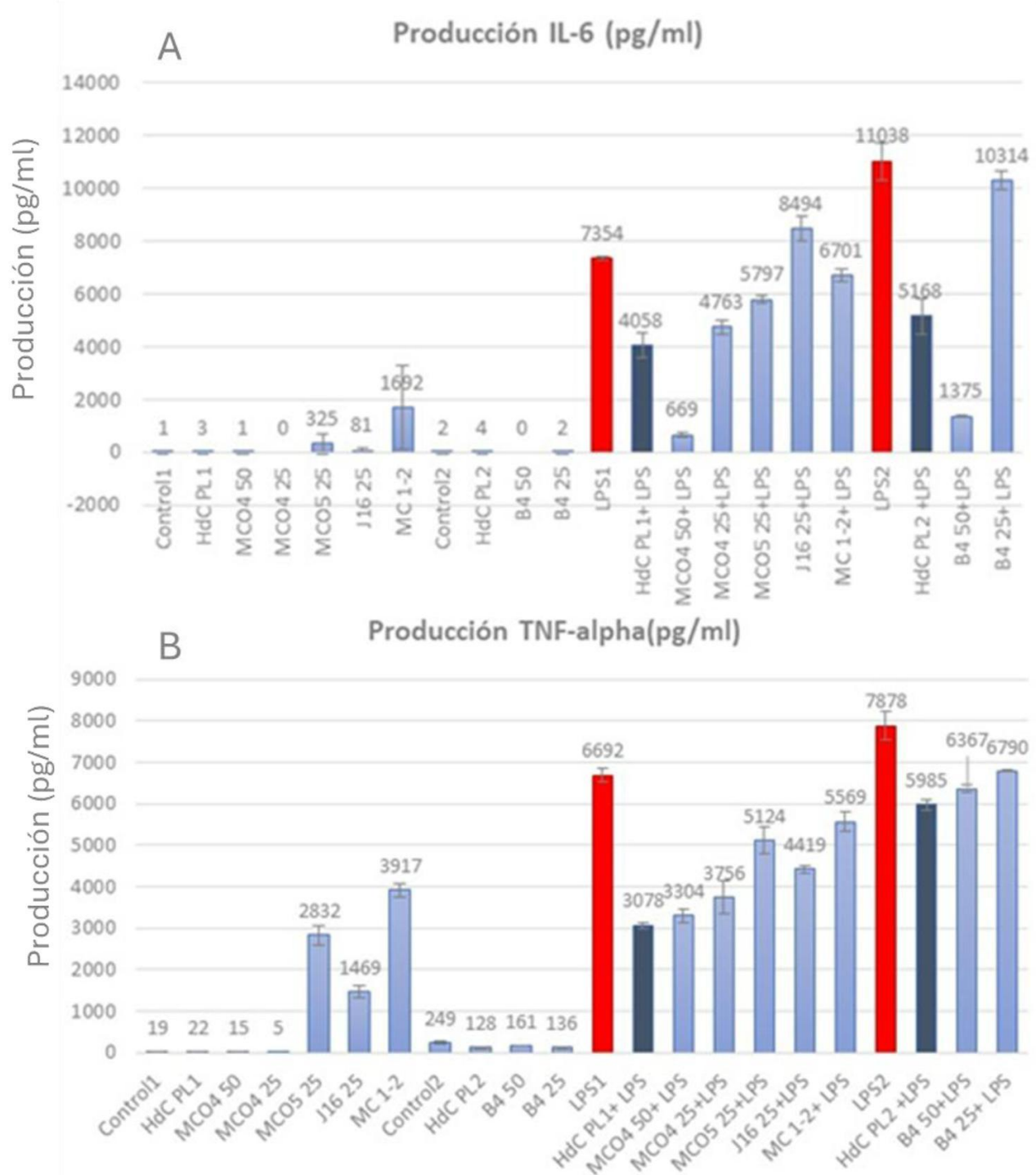


Figura 3.23. Capacidad antiinflamatoria de las muestras de bayas en términos de producción de IL-6 (A) y de TNF- α (B).

Además, se ha realizado una **caracterización nutricional de un lote de zumo obtenido con las bayas** recolectadas en 2024 y se han determinado los parámetros necesarios para etiquetado de producto: Kcal/KJ, hidratos de carbono de los cuales azúcares, grasas de las cuales, saturadas, fibra, proteína total.

Además, con el objetivo de poner en valor el carácter saludable del zumo de baya de sauco se ha estudiado el contenido en determinados minerales y vitamina C. En la Tabla 3.4 se muestran los valores nutricionales obtenidos.

Tabla 3.4. Valores nutricionales de lote L0124.

Humedad	88 ± 6 %
Proteínas (Kjeldahl)	1,1, * <5,0 g/100g
Grasa (Soxhlet)	0,12* <1,00 g/100g
Cenizas (Gravimetría)	0,96* <1,00 g/100g
Hidratos de carbono	8,3 ± 0,6 g/100g
Azúcares	8,3 ± 1,3 g/100g
Valor energético (kcal/100g)	41,8 ± 1,4
Fibra alimentaria (g/100g)	1,5 ± 0,3
Sal (g/100g)	<0,0100
	Minerales y vitaminas
Potasio mg/100 g	345 ± 44
Cobre mg/Kg	0,59 ± 0,14
Manganeso mg/Kg	2,41
Zinc mg/kg	<1,5
Magnesio mg/Kg	244
Selenio mg/Kg	<0,08
Hierro mg/100g	1,0 ± 0,3
Vitamina C mg/100 g	8,55 ± 0,86 mg/100g
	Composición ácidos grasos (CG-FID) (α/100 α)
Saturados	<0,10
Monoinsaturados	0,02
Poliinsaturados	0,07
EPA + DHA	<0,01
Omega - 3	0,03
Omega - 6	0,04
Trans	<0,01
*El valor experimental obtenido no está incluido en el rango cubierto por el Alcance de Acreditación	

En base a la composición nutricional, se ha realizado un estudio de **alegaciones nutricionales** (Alto contenido en, fuente de...) y **parámetros de etiquetado saludable y las menciones a posibles alegaciones de salud** en base a la legislación vigente (Reglamento CE 432 del 2012 y sus posteriores modificaciones; Reglamentos CE 1169 del 2011 y 2283 del 2015). Las bayas recogidas y estudiadas durante esta anualidad contenían una cantidad de fibra suficiente para cumplir con las alegaciones "Fuente de fibra" al contener más de 1,5 g de fibra por 100 Kcal de producto. Además, las bayas también cumplieron con los estándares requeridos para ser consideradas tanto alimento "Fuente de proteínas" como alimento con "Alto contenido en proteína", al aportar la proteína más del 20% requerido del valor energético del alimento. Por último, las bayas de saúco analizadas en esta anualidad también pueden considerarse alimento "Fuente de potasio" y alimento con "Alto contenido en potasio", ya que alimento es una "fuente de vitaminas y/o minerales", así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto aporta como mínimo el 15% de la cantidad diaria recomendada (CDR) para ese micronutriente. Además, cuando un alimento reúne de forma natural la condición o las condiciones establecidas en para el uso de una declaración nutricional, como en este caso, podrá utilizarse el término «naturalmente/ natural» antepuesto a la declaración. Por último, las bayas analizadas contenían una cantidad inferior a 0,04g de sodio por 100g, con lo que pueden etiquetarse como alimento con "Muy bajo contenido el sodio" (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Alegaciones nutricionales según contenido en minerales y vitaminas

Micronutriente	CDR	Lote 0124
Potasio	2000 mg	16,4%
Manganeso	2 mg	8,5%
Zinc	10 mg	< 1,5%
Magnesio	375 mg	9,0%
Cobre	1 mg	8,4%
Hierro	14 mg	4,5%
Vitamina C	80 mg	8,8%
Vitamina B6	1,4 mg	5,2%
*Sombreado en verde claro permite alegación <i>fuelle de</i> , en blanco no llega al 15% de la cantidad mínima recomendada y no permite alegación. El porcentaje es respecto a la Cantidad Diaria recomendada (CDR).		

Tabla 3.6. Alegaciones de salud que permiten las alegaciones nutricionales de los minerales

ALEGACIÓN NUTRICIONAL	DECLARACIÓN SALUDABLE
-----------------------	-----------------------

Fuente de potasio

El potasio contribuye al funcionamiento normal del sistema nervioso, de los músculos, al mantenimiento de la tensión arterial normal.

En la anualidad 2023, se estudió el **efecto inmunomodulador** de los extractos con mayor contenido en antiocianinas. Para este ensayo se utilizó EpilIntestinal™, un modelo de tejido en 3D del intestino delgado humano (MATTEK). Este modelo ofrece numerosas ventajas frente a los modelos de ensayo preclínico disponibles en la actualidad, como la línea celular Caco-2. El modelo 3D basado en células humanas incorpora enterocitos, células paneth, células M, células en penacho y células madre intestinales en un epitelio altamente diferenciado y polarizado. El tejido se cultiva en la interfase aire-líquido (ALI) para permitir condiciones de exposición fisiológicas (luminales). EpilIntestinal reproduce algunos aspectos de la función intestinal, como barrera intestinal, respuesta metabólica e inflamatoria metabólicas, inflamatorias y de toxicidad, de forma similar al tejido intestinal humano. Entre las características importantes de EpilIntestinal figura la presencia de uniones estrechas funcionales y bordes en cepillo en la superficie tisular apical. Las uniones estrechas y los bordes en cepillo epilIntestinales imitan fielmente la estructura y la fisiología humanas.

Para llevar a cabo el ensayo se han seleccionado los tres extractos acuosos con mayor contenido en antocianinas (MCO-5, J16 y MCO-4). El ensayo se realizó según las recomendaciones del fabricante, se ha realizado una exposición a corto plazo (2 horas) aplicando cada extracto por separado directamente sobre la superficie tisular apical, a una concentración de 0,2 mg/ml en medio de cultivo específico del tejido de ensayo. Además, se ha incluido un control negativo de medio de cultivo, que permita la comparativa del estado basal del cultivo frente al tratamiento ensayado.

Una vez aplicado el tratamiento, se incubó el tejido en condiciones óptimas de crecimiento (37°C, 5% de CO₂ y 95 % de humedad) durante 2 horas.

Transcurrido ese tiempo se evaluó el efecto del tratamiento sobre la función de barrera, utilizando mediciones de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) para sondear el estado de las uniones estrechas dentro del tejido. La medida del TEER se llevó a cabo en KCl 0.1M con el sistema TEER Millicell ERS-2. Los valores de TEER (expresados en Ohm*cm², Ω * cm²) se calcularon multiplicando las mediciones de resistencia brutas por la superficie del tejido (0,6 cm²).

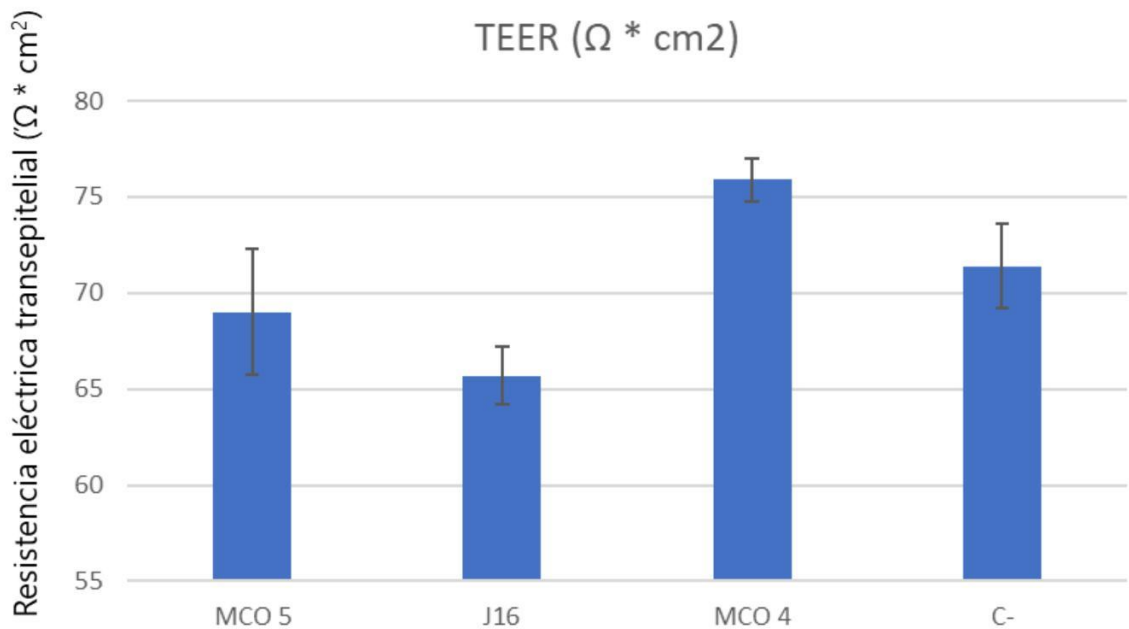


Figura 3.24. Resultados de TEER obtenidos para los tejidos sometidos a tratamiento con extracto de bayas

La TEER del tejido epitelial del intestino delgado extirpado ha sido determinado que oscila entre 12-120 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. La Figura 3.24, muestra los resultados de TEER de los tejidos tratados, lo que refleja que se hayan en el rango fisiológico de 60-180 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ imitando el microambiente SMI in vivo. Y no existen diferencias significativas entre el TEER de los tejidos sometidos a tratamiento y el tejido control.

Por otro lado, para garantizar la viabilidad del tejido se llevó a cabo una determinación de viabilidad mediante MTT, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Protocol MK-24-007-0083).

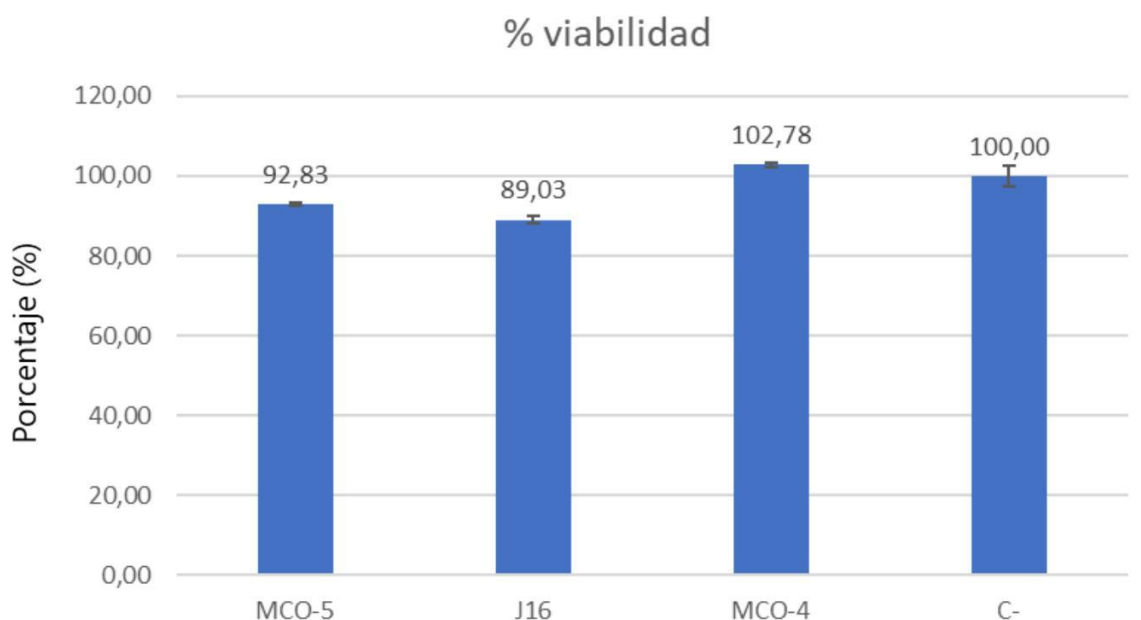


Figura 3.25. Efecto del tratamiento sobre la viabilidad de los tejidos sometidos a tratamiento

Los resultados se muestran en la Figura 3.25, donde se observa que los extractos MCO-5 y J16 afectan ligeramente al tejido, reduciendo su viabilidad, aunque esta reducción no se considera significativa.

Para la evaluación del efecto inmunomodulador se determinó si el tratamiento influye en la liberación de factores de inflamación como nitritos e interleukinas (IL-6 y TNF-alpha). Las determinaciones de las citoquinas TNF-alpha e IL6 se llevaron a cabo mediante el empleo de kits de ELISA comerciales (Mouse Tumor Necrosis Factor Alpha -BMS607-3 y IL-6 Mouse ELISA -KMC0061, respectivamente) y en todo momento se siguieron las instrucciones establecidas por el fabricante. Y la determinación de nitritos, se llevó a cabo por el método del Reactivo de Griess. Ninguna de las muestras indujo la liberación de nitritos ni de factores de inflamación estudiados, por lo que no se ha detectado efecto inmunomodulador en las condiciones del ensayo.

Tarea 2.4. Aplicación de tecnología de espectrometría roja cercana (NIR) para análisis de compuestos bioactivos en las bayas:

A continuación, se describen los trabajos de aplicación de tecnología de espectrometría roja cercana (NIR) para el análisis de compuestos bioactivos en las bayas, en las diferentes anualidades del Proyecto:

En un primer acercamiento se ha estudiado la presentación de las muestras al equipo VIS-NIR FOSS XDS (350-2500 nm).

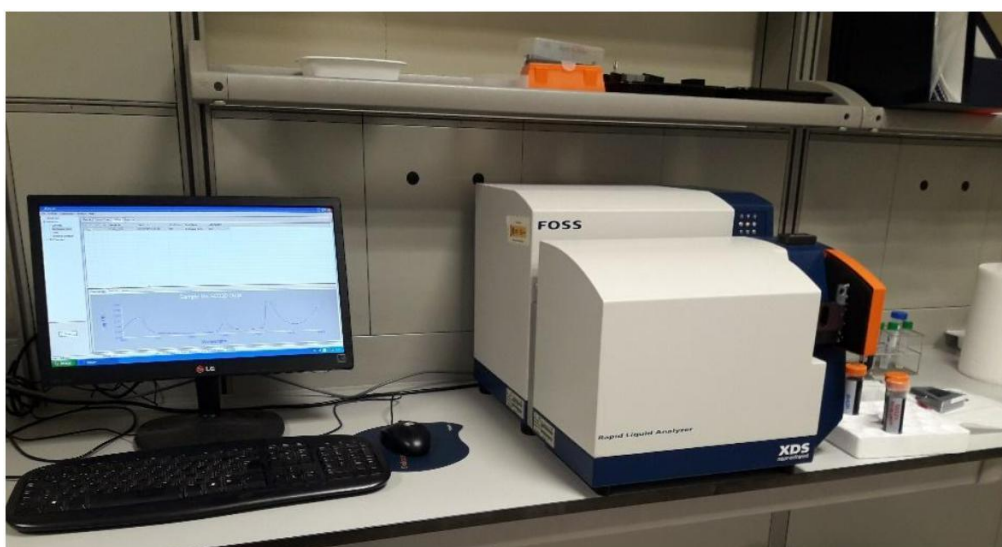


Figura 3.26. Equipo VIS-NIR FOSS XDS.

Por una parte, se dispone de un **zumo de saúco** con un alto contenido en agua. Dadas las características de este material se ha optado por la utilización de viales de 4 mm y 1mm de paso óptico a través del módulo termostatzado para líquidos (RLA) en condiciones de transmitancia.



Figura 3.27. Cubeta de cuarzo con 1mm de paso óptico.

Se han dosificado las diferentes muestras en ambos viales y capturado los espectros como se puede observar en la figura a continuación (Figura 3.27). La utilización de pasos ópticos de 4 mm conduce a una importante saturación de la señal en las zonas de absorción O-H, y por encima de los 1870 nm lo que inutilizaría estas franjas espectrales dentro de los estudios. Por el contrario, los espectros con paso óptico de 1 mm únicamente encuentran una alteración de la señal en el pico de los 1940 nm del agua y por encima de los 2400 nm. Aunque se encuentran lógicamente muy dominados por la importante absorción espectral del agua presente, lo que limita las posibilidades analíticas al

enmascarar información de otros componentes de interés, este paso óptico es el más adecuado para el estudio del líquido.

Las muestras utilizadas provenían de zumos sin tratamiento térmico alguno, a excepción de una que se encontraba pasteurizada. Se puede observar que los espectros recogidos (1mm) muestran unas diferencias importantes entre la muestra tratada (S220Past) y las no sometidas a calentamiento, especialmente en la región visible (Figura 3.28).

Por otra parte, se ha estudiado abordar los experimentos a partir de la pasta obtenida tras el homogenizado de las bayas de saúco en ultraturrax. Para este estudio se ha utilizado el módulo de sólidos (RCA) en una configuración en reflectancia en placas de vidrio de 4 cm de diámetro.

El espectro resulta más limpio observándose una presencia destacada de agua, pero sin tanta predominancia en el espectro. El espectro capturado de bayas pretratado de manera simple (1ª deriv. +SNV) muestra algo más de ruido que para el caso de los jugos, pero aflorando una mayor variabilidad en la señal espectral que para el caso de los jugos (Figura 3.30).

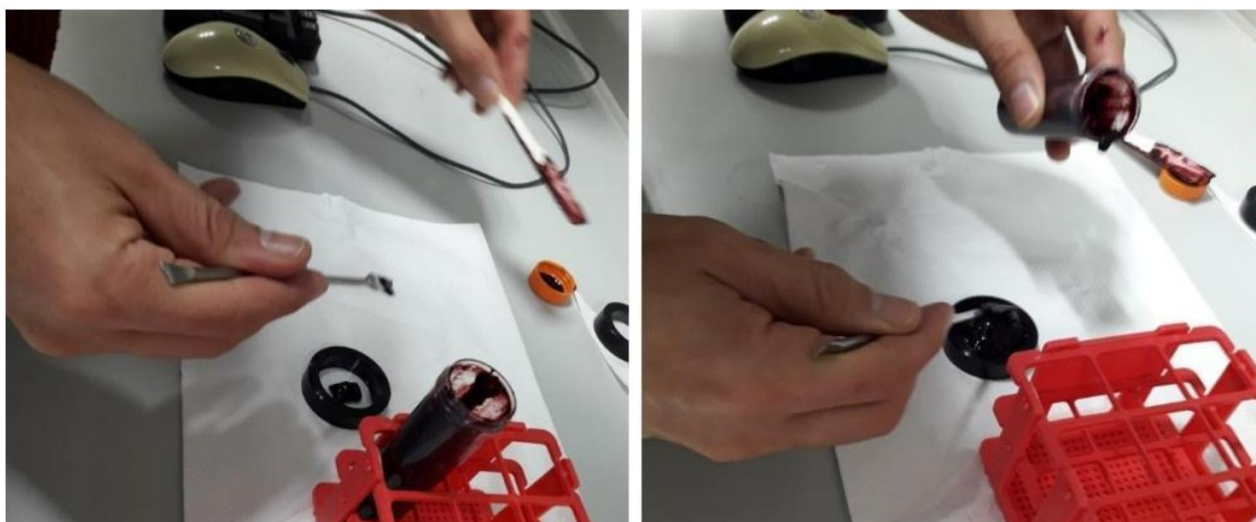


Figura 3.30. Pasta de baya en placa de vidrio de 4 cm.

Para el estudio se seleccionarán, por lo tanto, los jugos de saúco presentados en reflectancia en viales de cuarzo de 1 mm, y/o las pastas de bayas de saúco en modo reflectancia en placas de vidrio. En base a los resultados observados en la primera anualidad (2022), en la segunda anualidad (2023), las muestras se procesan en el equipo FOSS XDS (350-2500 nm, rango correspondiente al espectro electromagnético visible e infrarrojo cercano NIR) en forma de pasta de bayas de saúco.

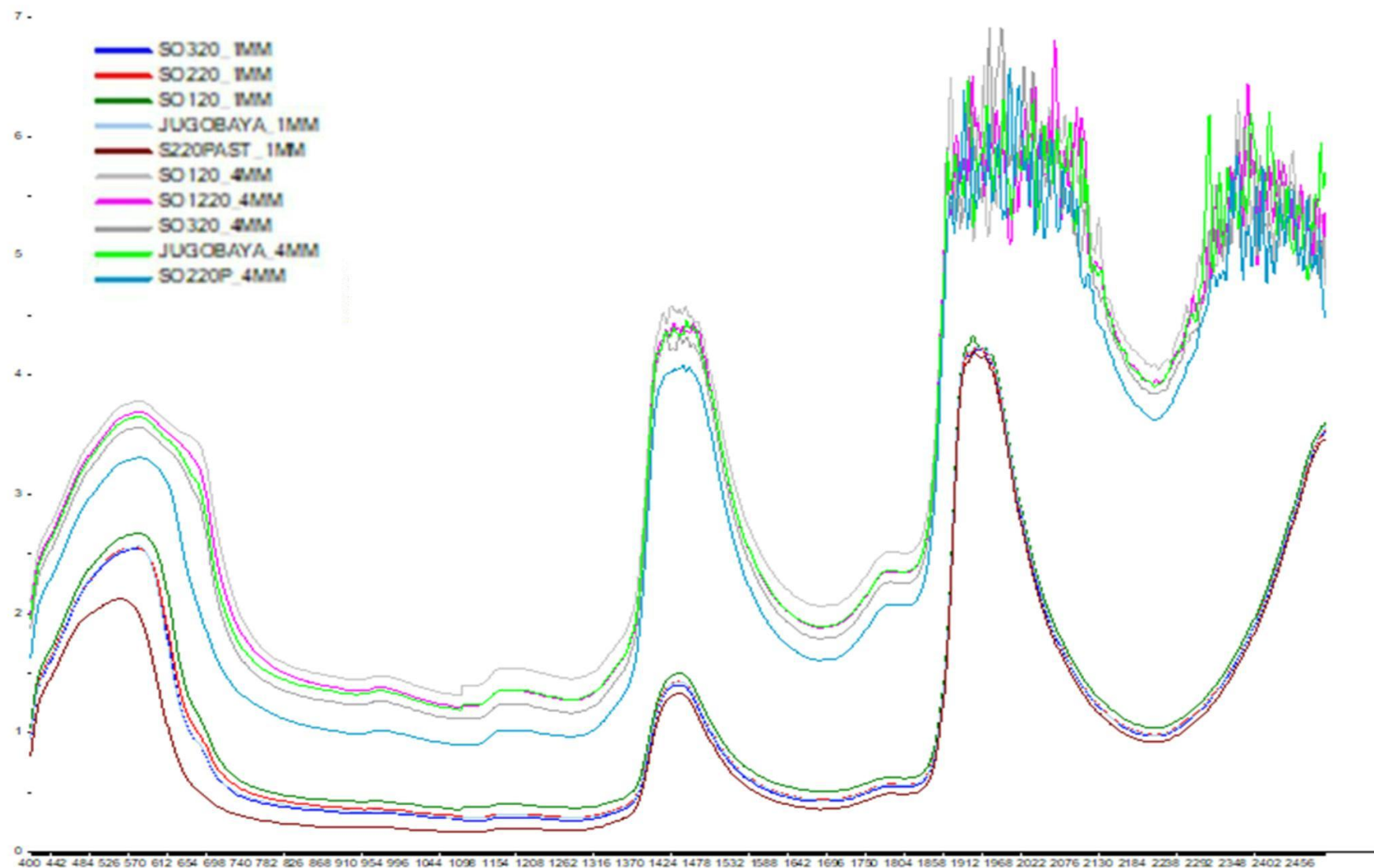


Figura 3.28. Espectros (abs.) de los jugos de saúco recogidos en viales de 4 mm y 1 mm de paso óptico

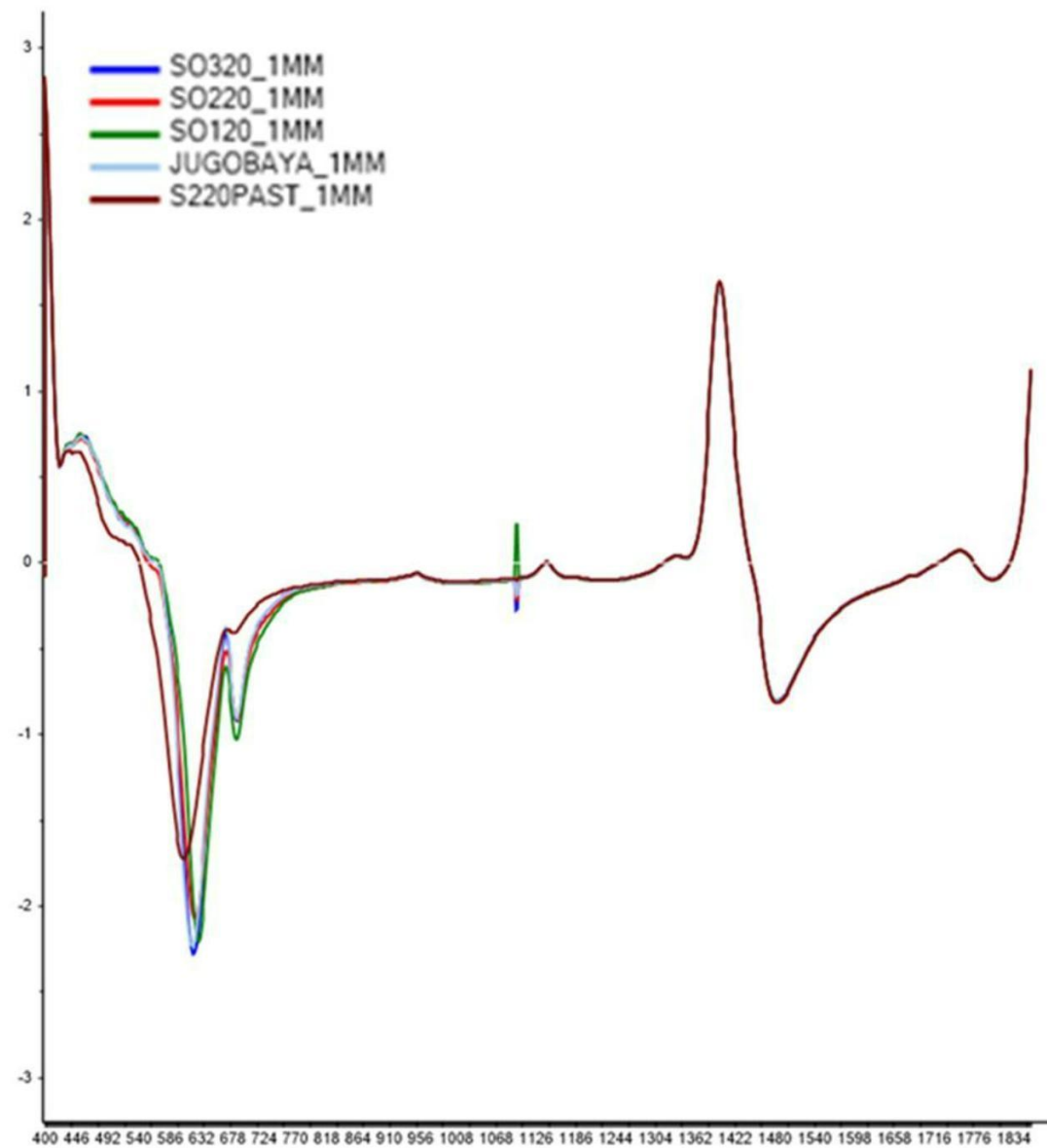


Figura 3.29. Espectros (1ª Deriv. + SNV) de las muestras de zumo de saúco

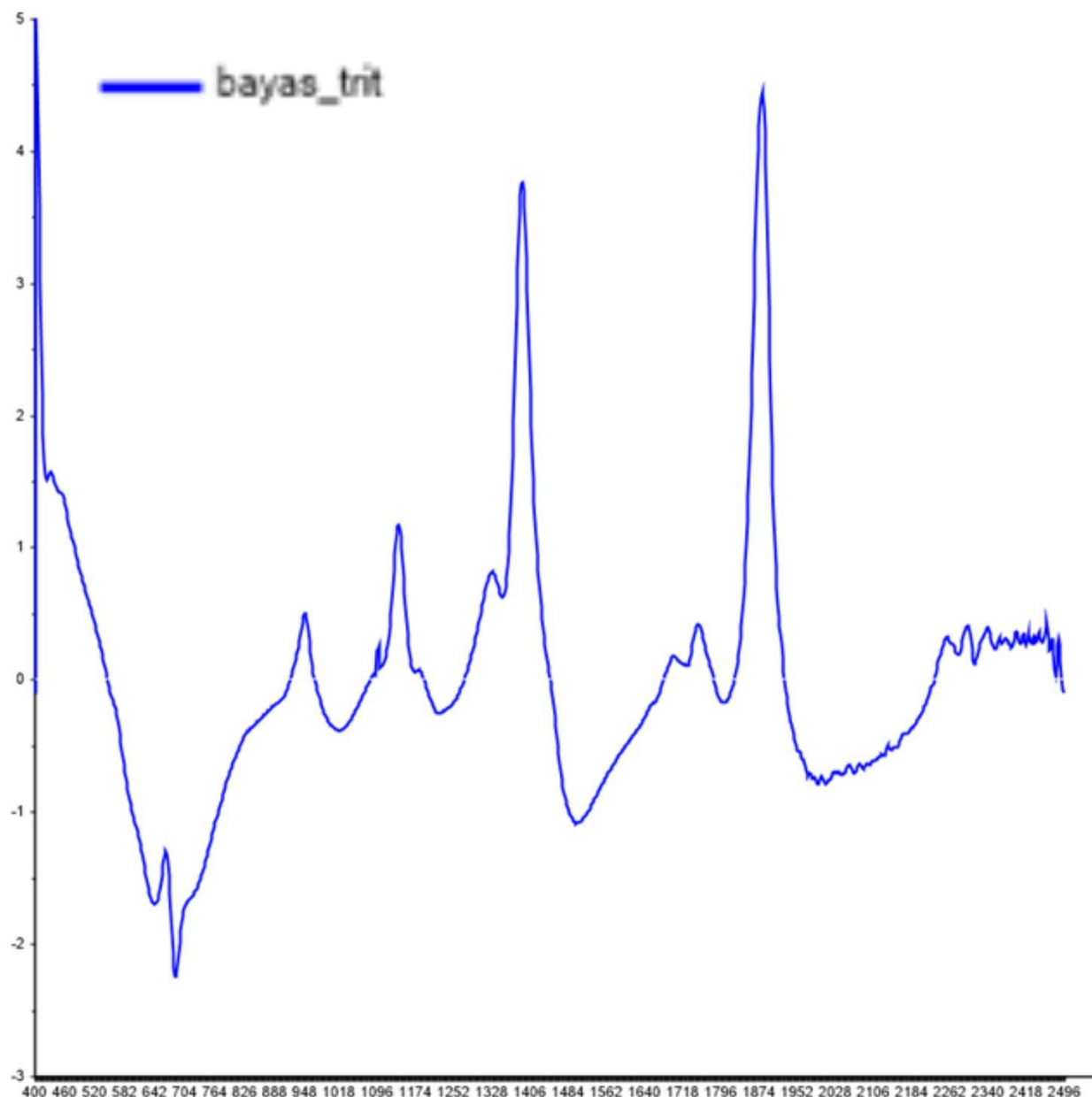


Figura 3.31 Espectro (Abs) de la pasta de bayas de saúco.

Usando Unscrambler X, un software de análisis estadístico, se han analizado los datos recogidos. En primer lugar, se han obtenido los histogramas de los distintos compuestos medidos (Figuras 3.32, 3.33, 3.34, 3.35 y 3.36).

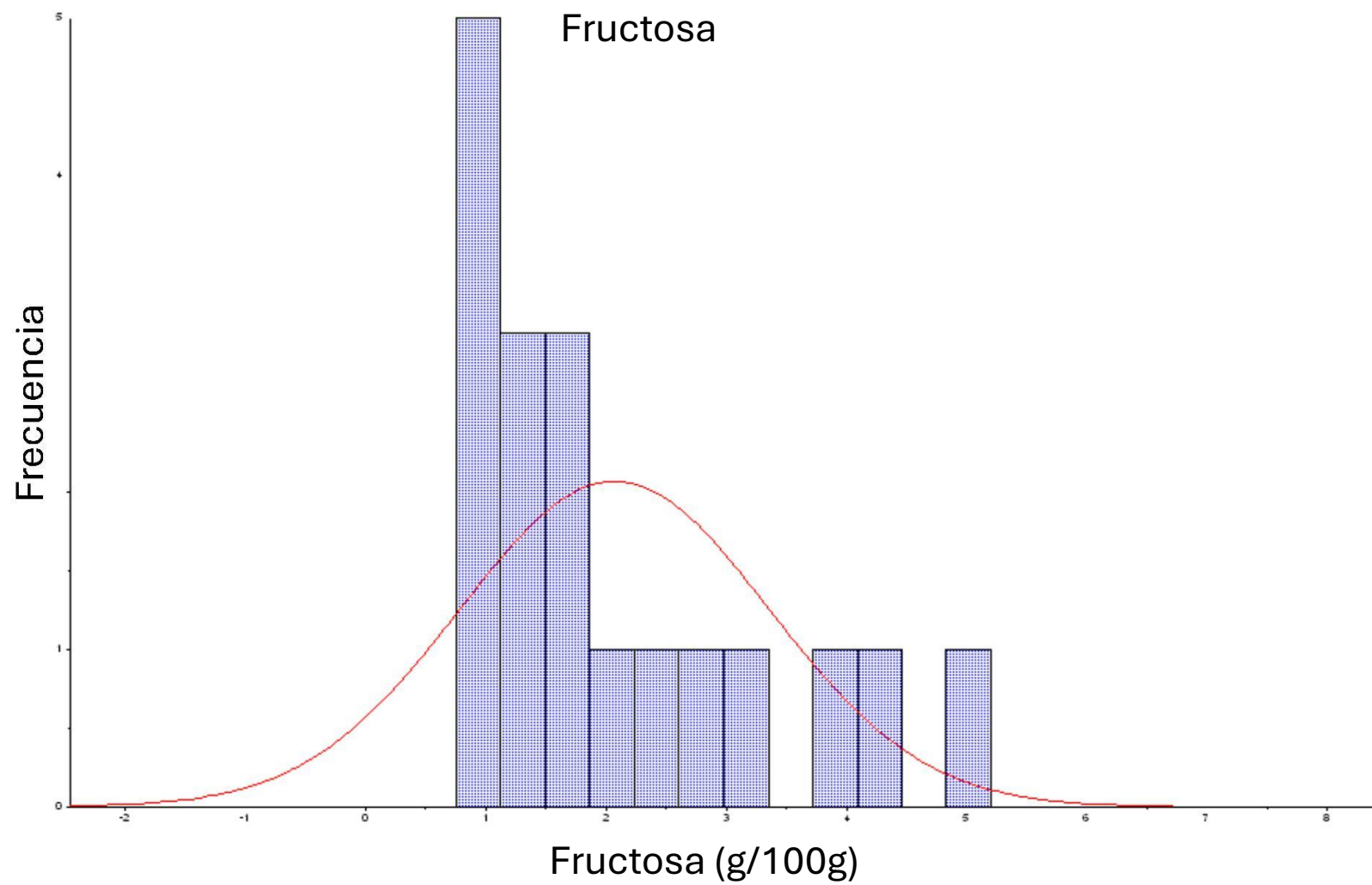


Figura 3.32. Histogramas de Fructosa

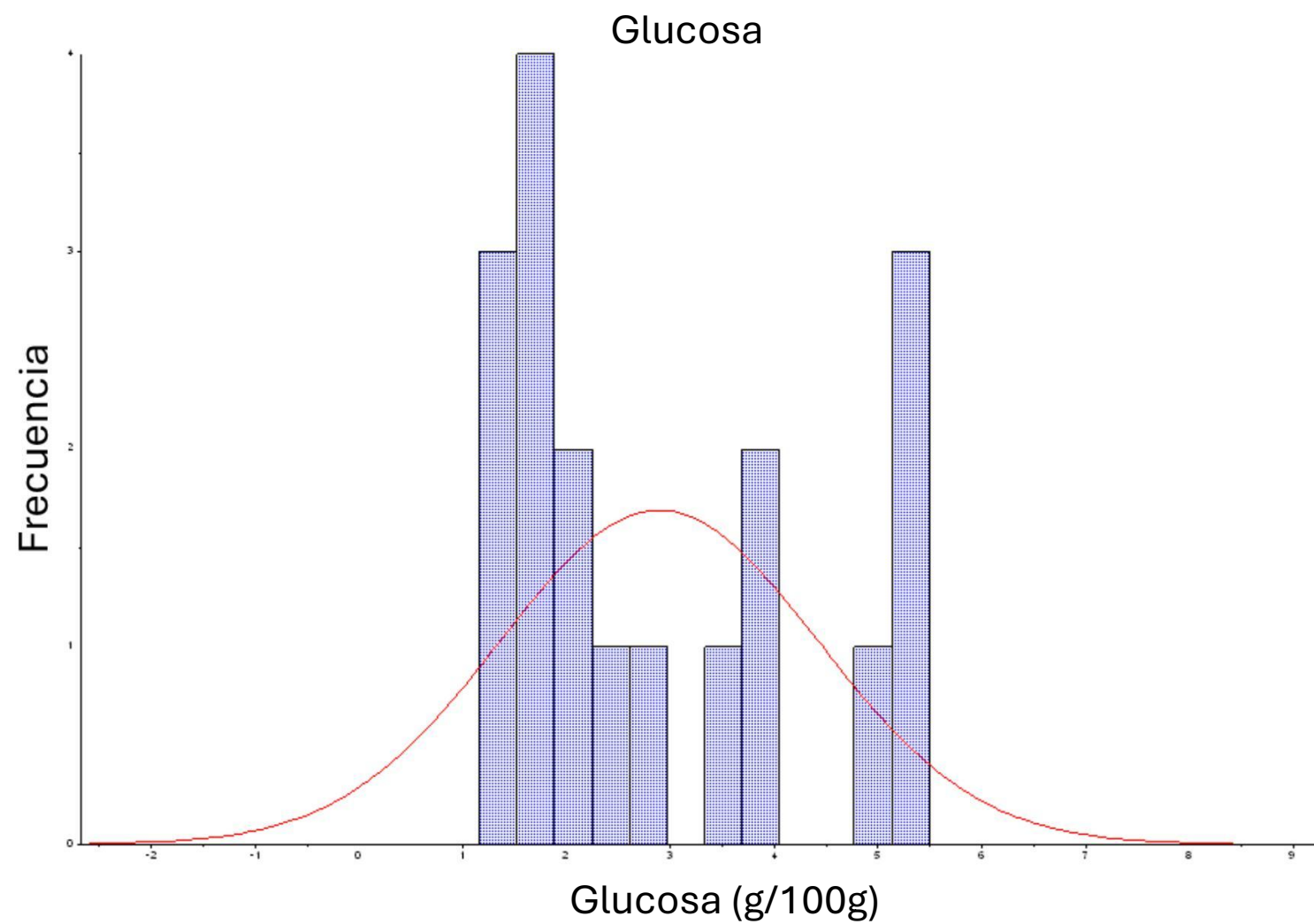


Figura 3.33. Histogramas de Glucosa

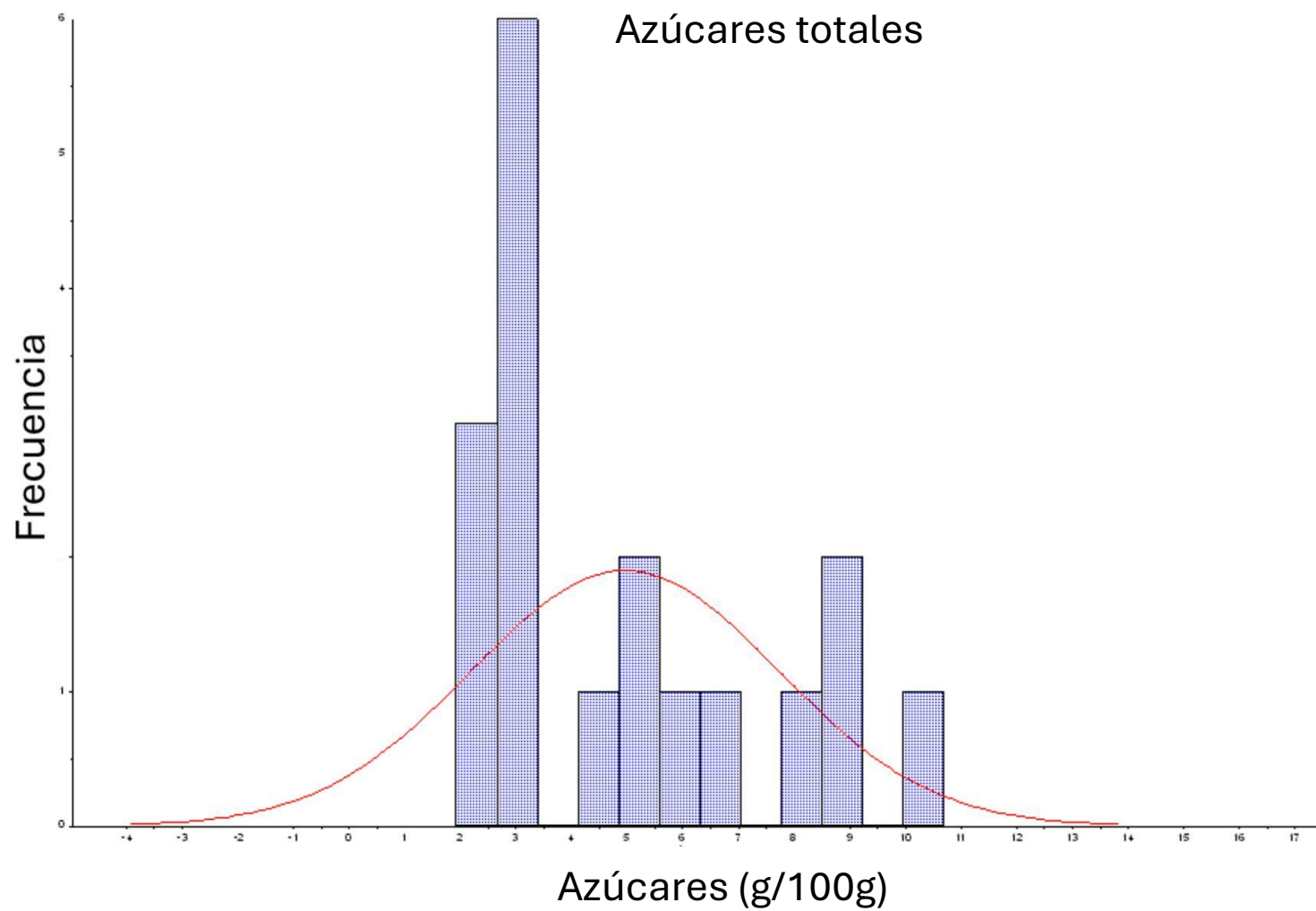
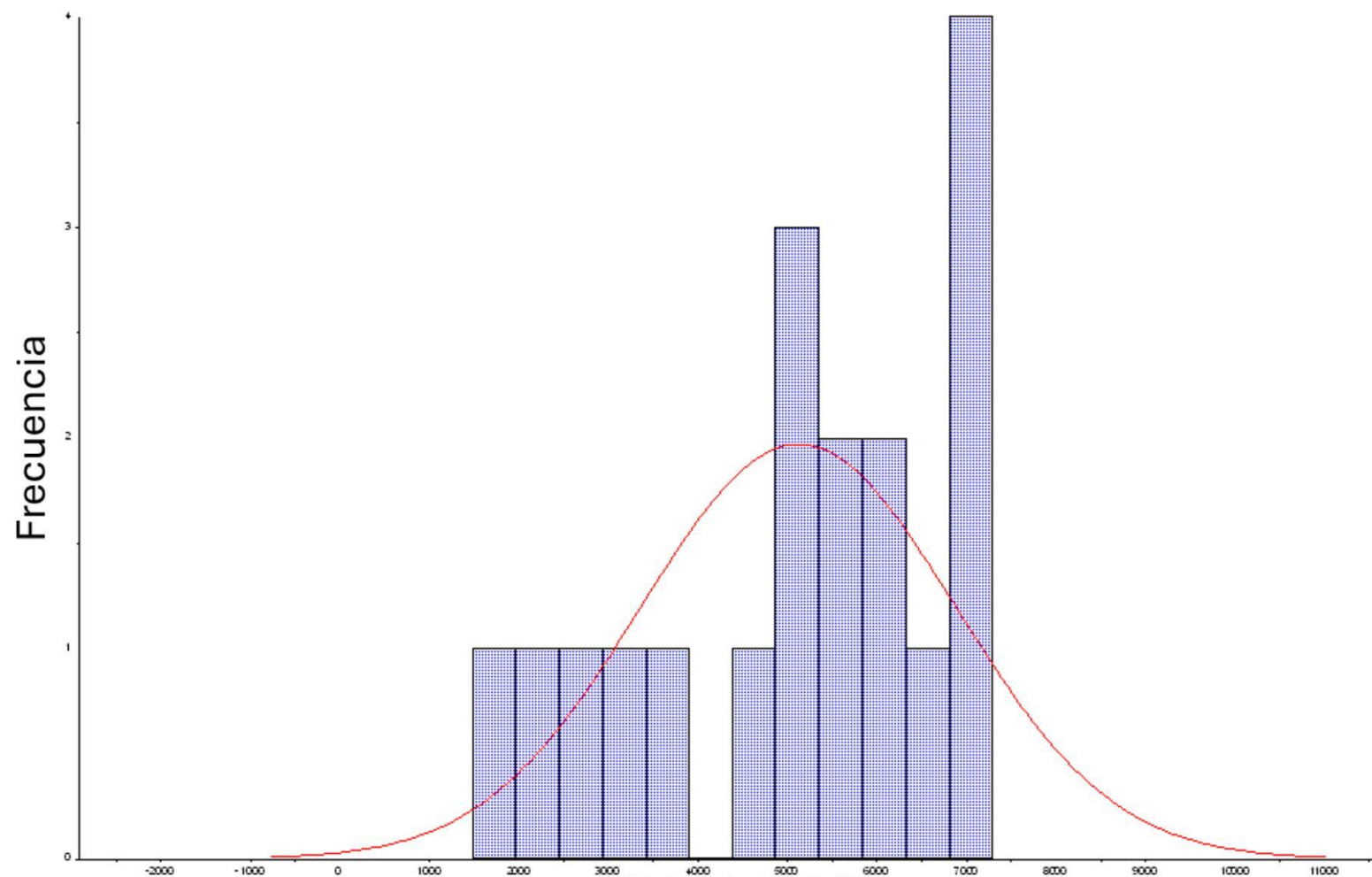


Figura 3.34. Histogramas de Azúcares totales

Antocianinas cianidin- 3- glucósido



Antocianinas como ppm de cianidin-3-O-glucoside

Figura 3.35. Histogramas de Antocianinas cianidin-3-glucósido

Antocianinas cyanidin-3-sambubiósido

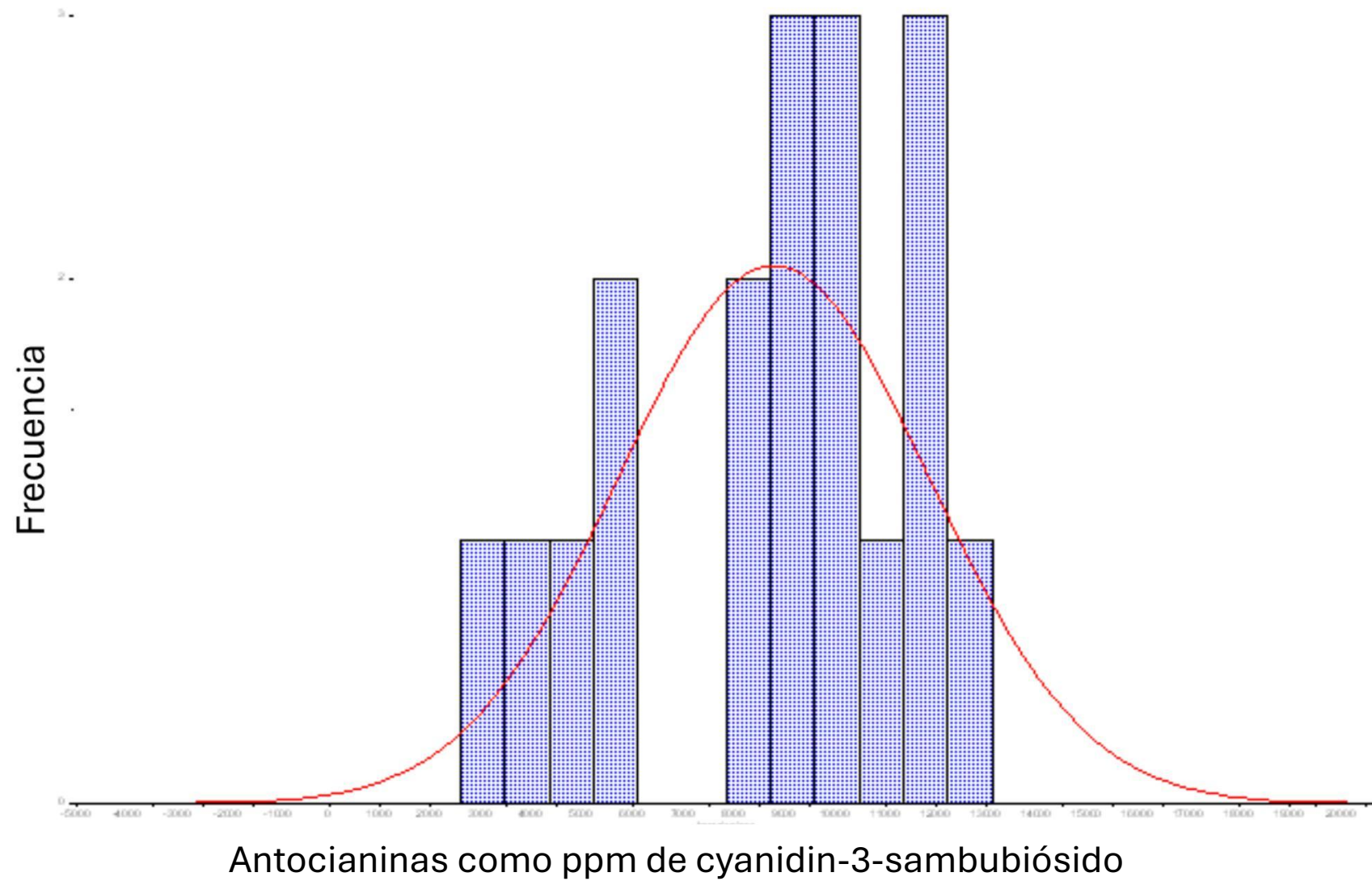


Figura 3.36. Histogramas de Antocianinas cyanidin-3-sambubiósido

Se observa que la distribución de los valores no presenta una distribución homogénea, lo que vendría a señalar que existe variabilidad entre las muestras. Esto es un factor importante a la hora de implementar un modelo predictivo (para variables cuantitativas) o un modelo de clasificación (para variables cualitativas/categorías), ya que si no hubiese variabilidad en los datos a predecir no tendría sentido plantearlo.

Posteriormente, se implementa un PCA (Principal Component Analysis) a los datos espectrales obtenidos para cada muestra. El PCA es técnica estadística que se emplea generalmente para la reducción de la dimensionalidad de un conjunto de datos, pero intentando mantener la máxima varianza explicada. Además, se emplea para comprobar si al reducir la dimensionalidad se agrupan los datos, lo que indicaría semejanzas entre distintas muestras.

Como se puede observar en la Figura 3.37, destaca un grupo que queda agrupado y un punto totalmente alejado del resto de dato (indicado por la flecha), lo que indicaría que podría tratarse de un outlier. Así, comprobamos si esta distribución podría explicarse por las muestras o por alguno de los parámetros medidos en laboratorio.

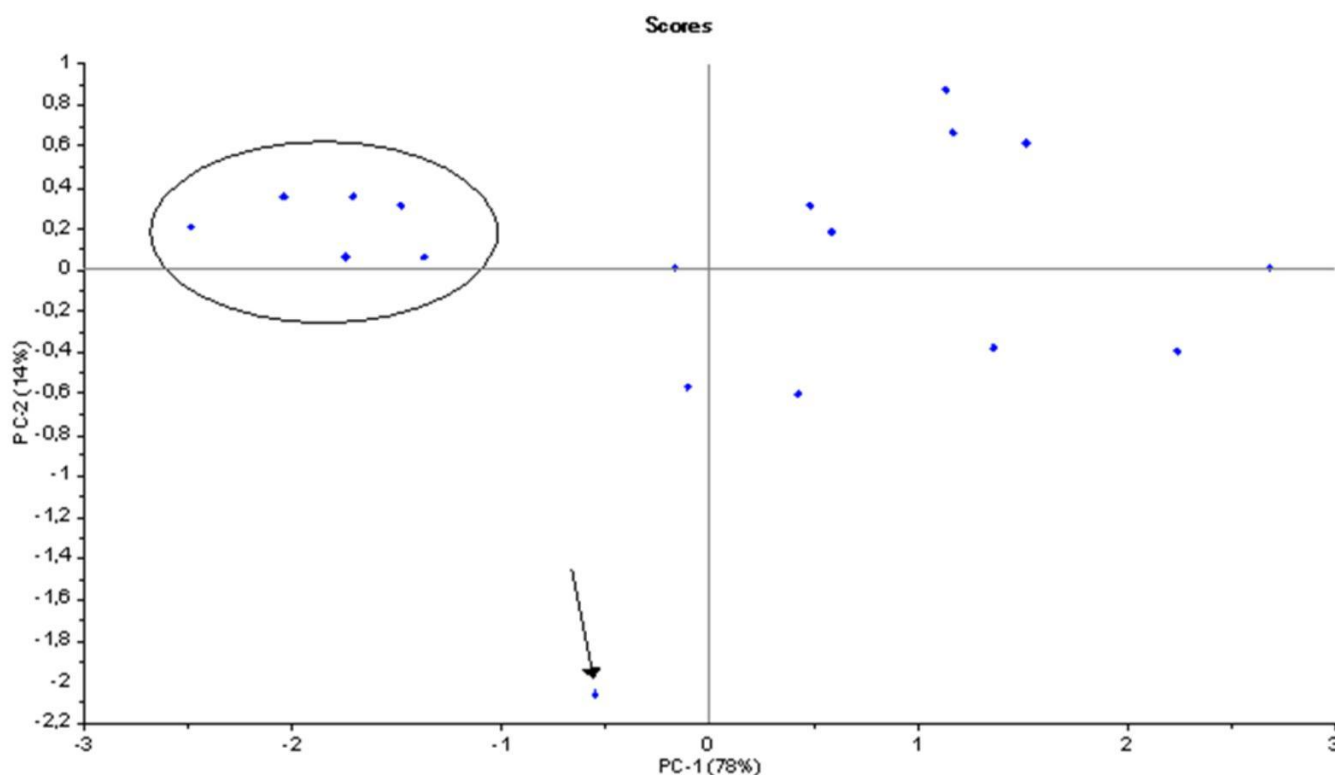
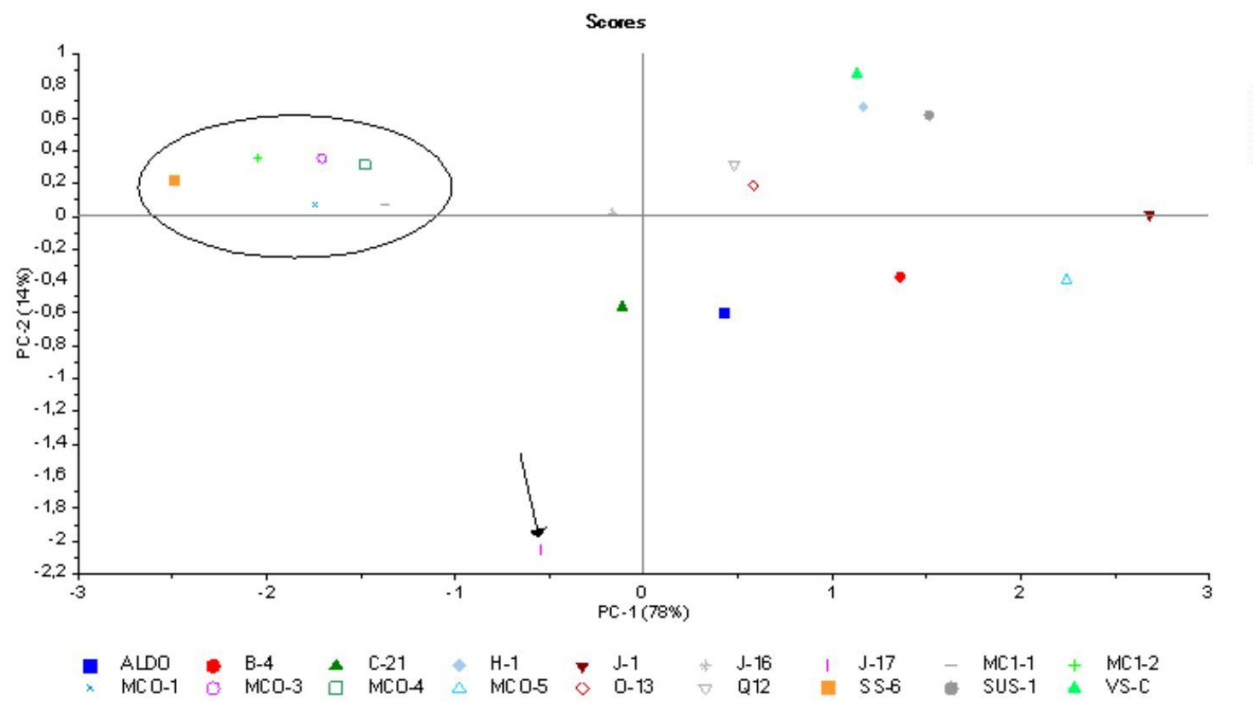
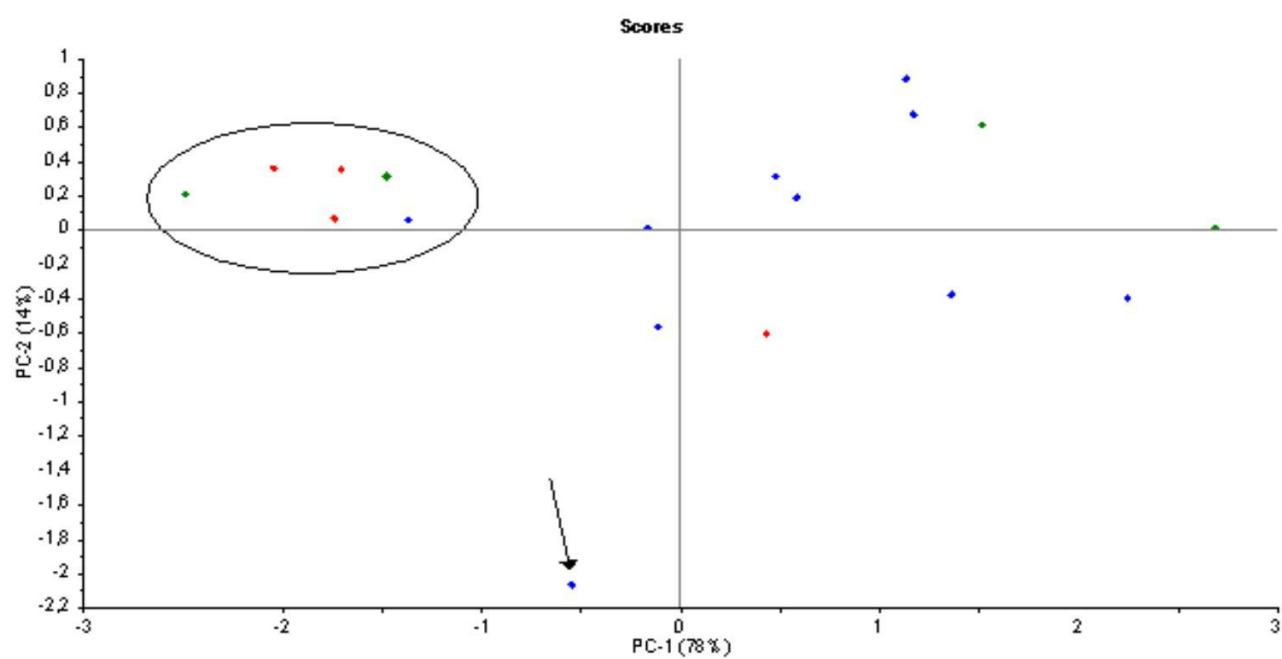
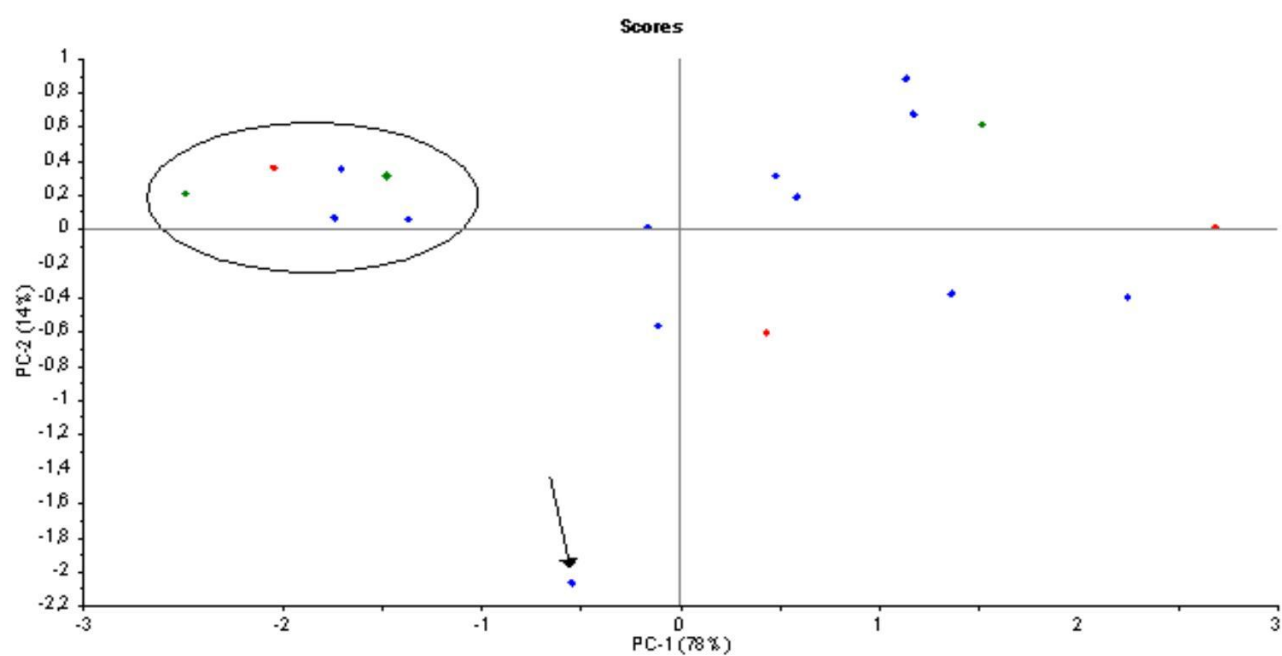


Figura 3.37. Resultados de aplicar PCA a los espectros recogidos

Atendiendo a la denominación de las muestras, se comprueba que en el grupo están todas las muestras que empiezan por MC, excepto la MCO-5; y el posible outlier corresponde a la muestra J-17 (Figura 3.38).





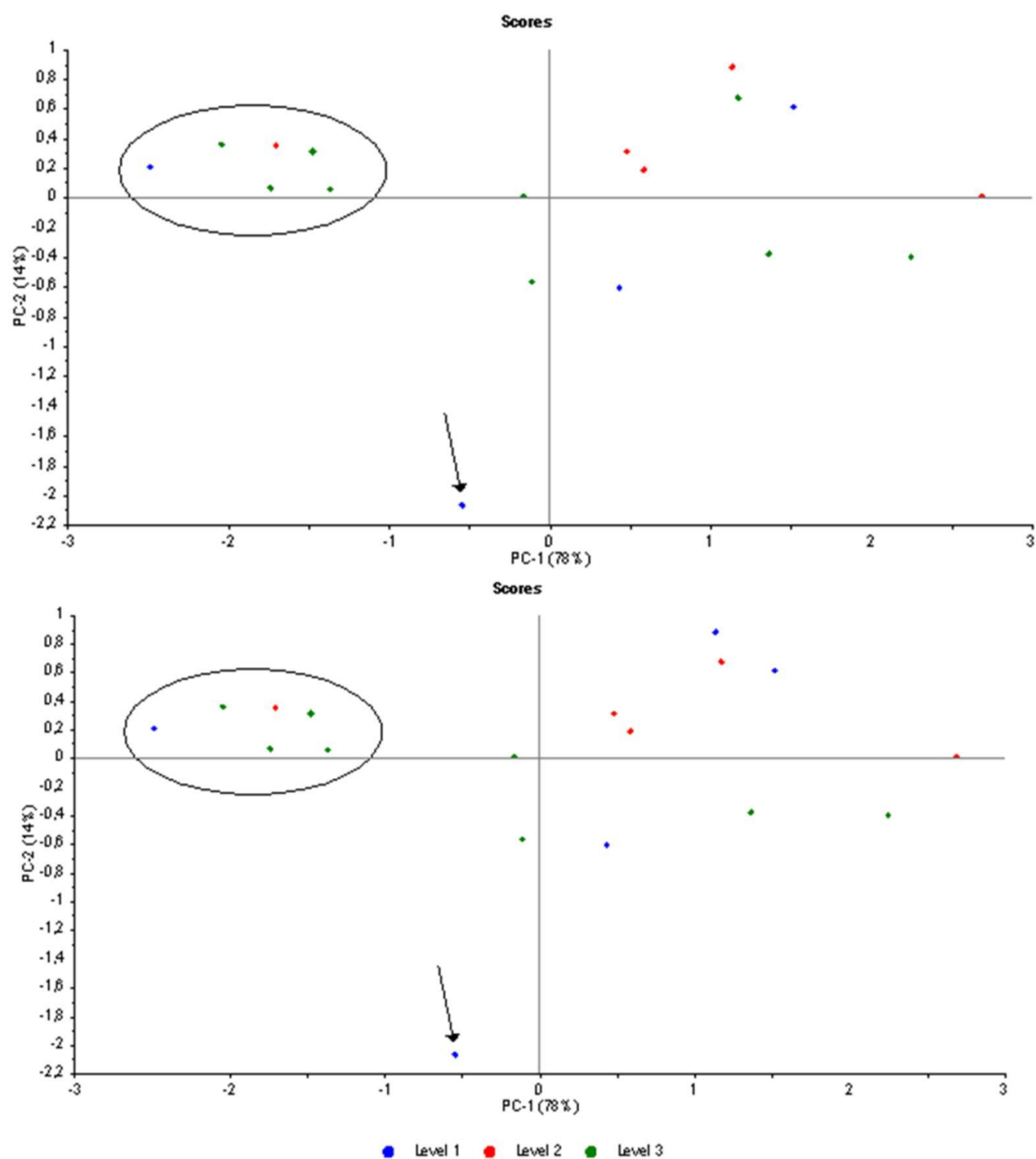
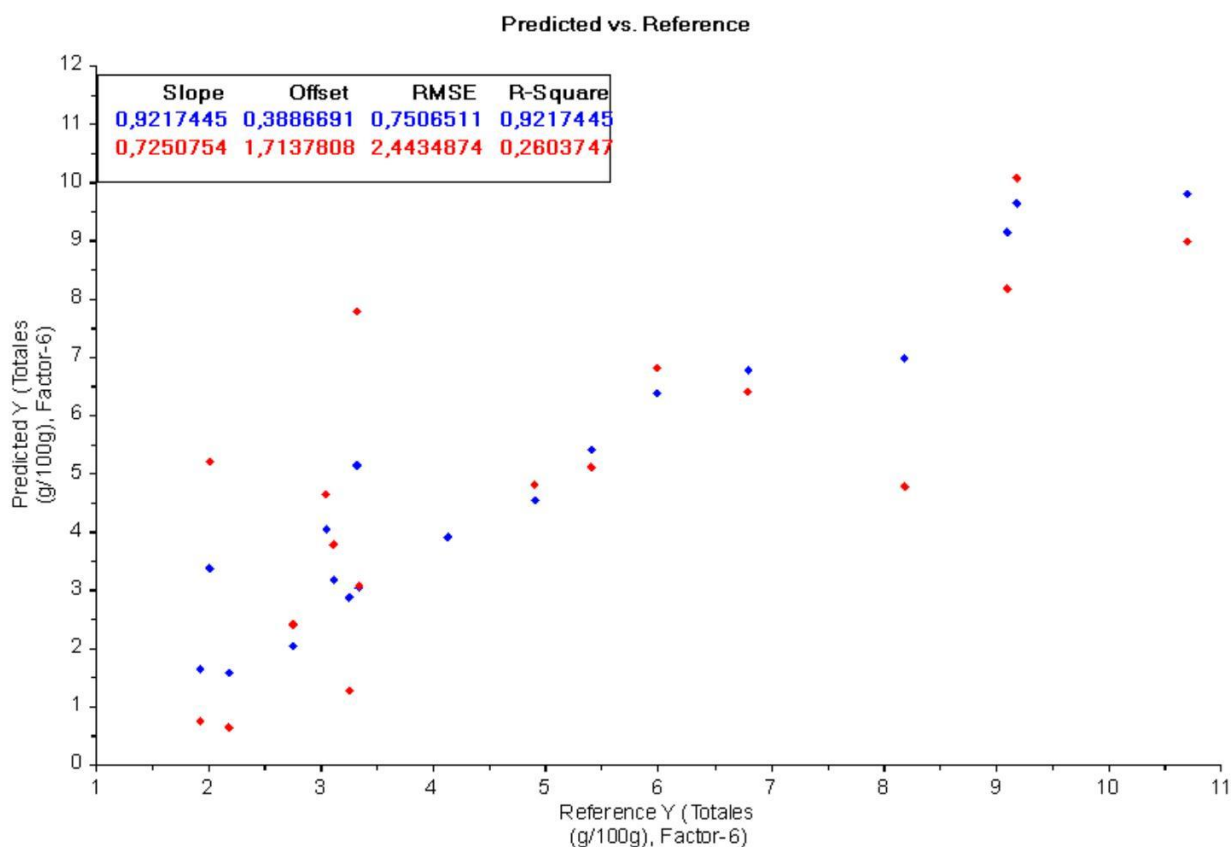


Figura 3.39. De arriba abajo, PCA clasificado según los niveles medidos de fructosa, glucosa, azúcares totales, antocianinas cyanidin-3-O-glucoside y antocianinas cyanidin-3-sambubioside

Como se puede comprobar para todos los compuestos analizados, no se observa un patrón por el que se pueda explicar por qué ciertos puntos se agrupan o no.

El siguiente paso es evaluar si dichos compuestos pudiesen ser predichos, bien con modelos cuantitativos, bien con modelos categóricos. Para ello, previo a la creación de los modelos, se preprocesan los espectros NIR registrados de cara a corregir ciertos efectos y destacar las zonas del espectro con una mayor información. En este caso, se han evaluado las siguientes combinaciones de transformaciones: derivada gap3 + SNV, Savitzky-Golay + SNV, derivada gap3 + MSC y Savitzky-Golay + MSC. Los resultados han sido semejantes entre sí, por lo que se muestran los resultados para el primer caso: derivada gap3 + SNV.

Primero, se presentan los resultados para los modelos cuantitativos. Se ha empleado el modelo PLSR (Partial Least Square Regression) y se ha aplicado para 3 variables: azúcares totales, antocianinas cyanidin-3-O-glucoside y antocianinas cyanidin-3-sambubioside (Figura 3.40).



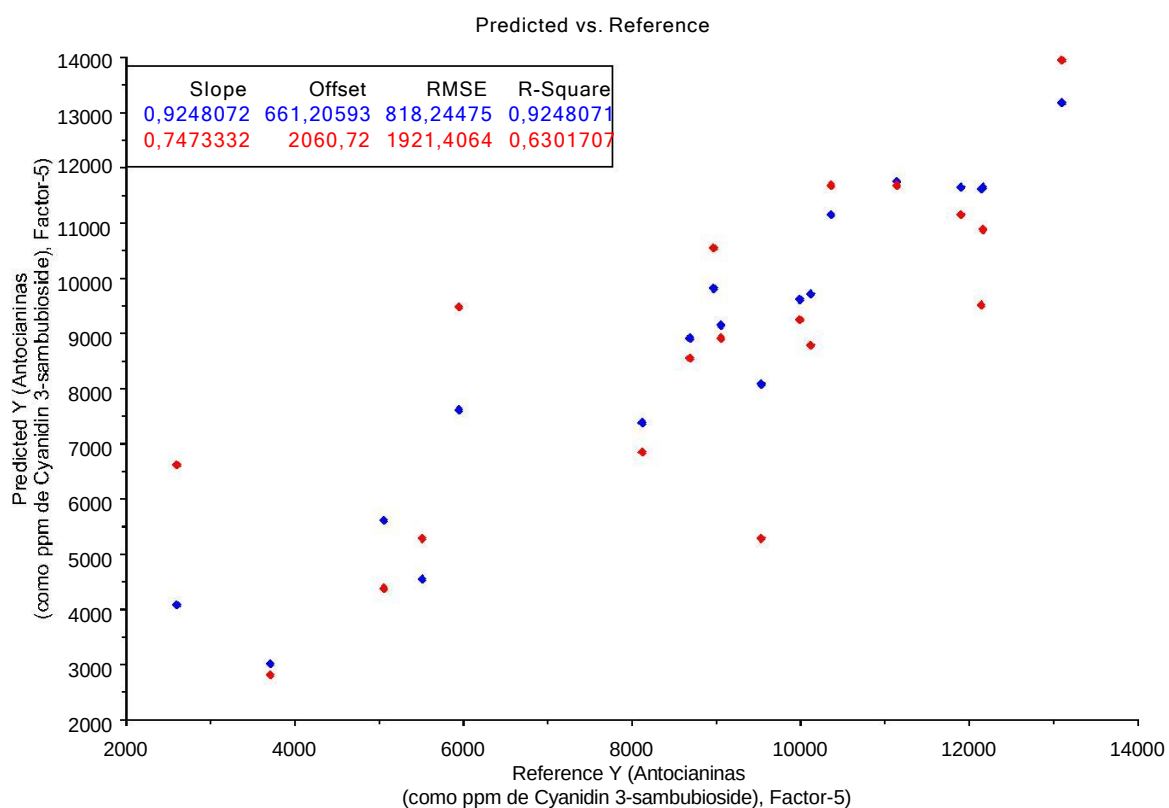
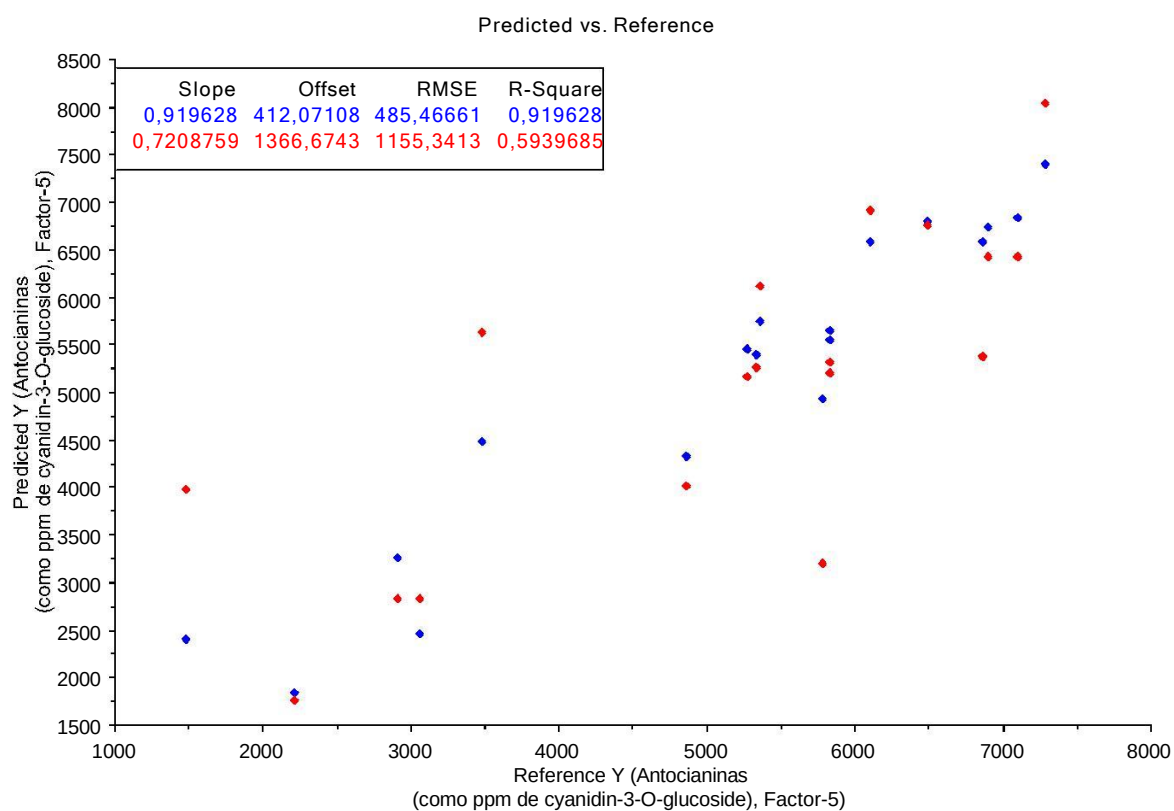


Figura 3.40. De arriba abajo, resultados de modelos predictivos cuantitativos basados en PL para azúcares totales, antocianinas cyanidin-3-O-glucoside y antocianinas cyanidin-3-sambubioside

Para los tres casos, se ve overfitting; esto es que el modelo responde mucho mejor para el subconjunto de entrenamiento que para el subconjunto de test. Cogiendo como métrica de rendimiento del modelo el coeficiente de determinación (R^2), en el que 1 indica una correspondencia total entre los datos reales y los datos predichos, parece que los modelos predictivos podrían ser válidos para predecir estos compuestos.

Se requiere disponer de un mayor número de muestras para hacer modelos más complejos y comprobar que se pueda minimizar el overfitting. Con los datos actuales parece más probable obtener un modelo válido para las antocianinas que para los azúcares.

También se ha evaluado si tratando los valores de laboratorio como variables cualitativas se podría implementar una clasificación que devolviese valores significativos. En este caso, las variables se han organizado en diferentes niveles siguiendo el criterio explicado anteriormente (3 niveles de igual tamaño), pero podría acordarse con Carabuñas diferentes umbrales según el interés que tenga cada compuesto. Al igual que para el modelado cuantitativo, los resultados parecen más favorables para las antocianinas que para los azúcares. No se observa una mejora significativa en los resultados del modelo cualitativo que justifique su uso por encima del modelo cuantitativo.

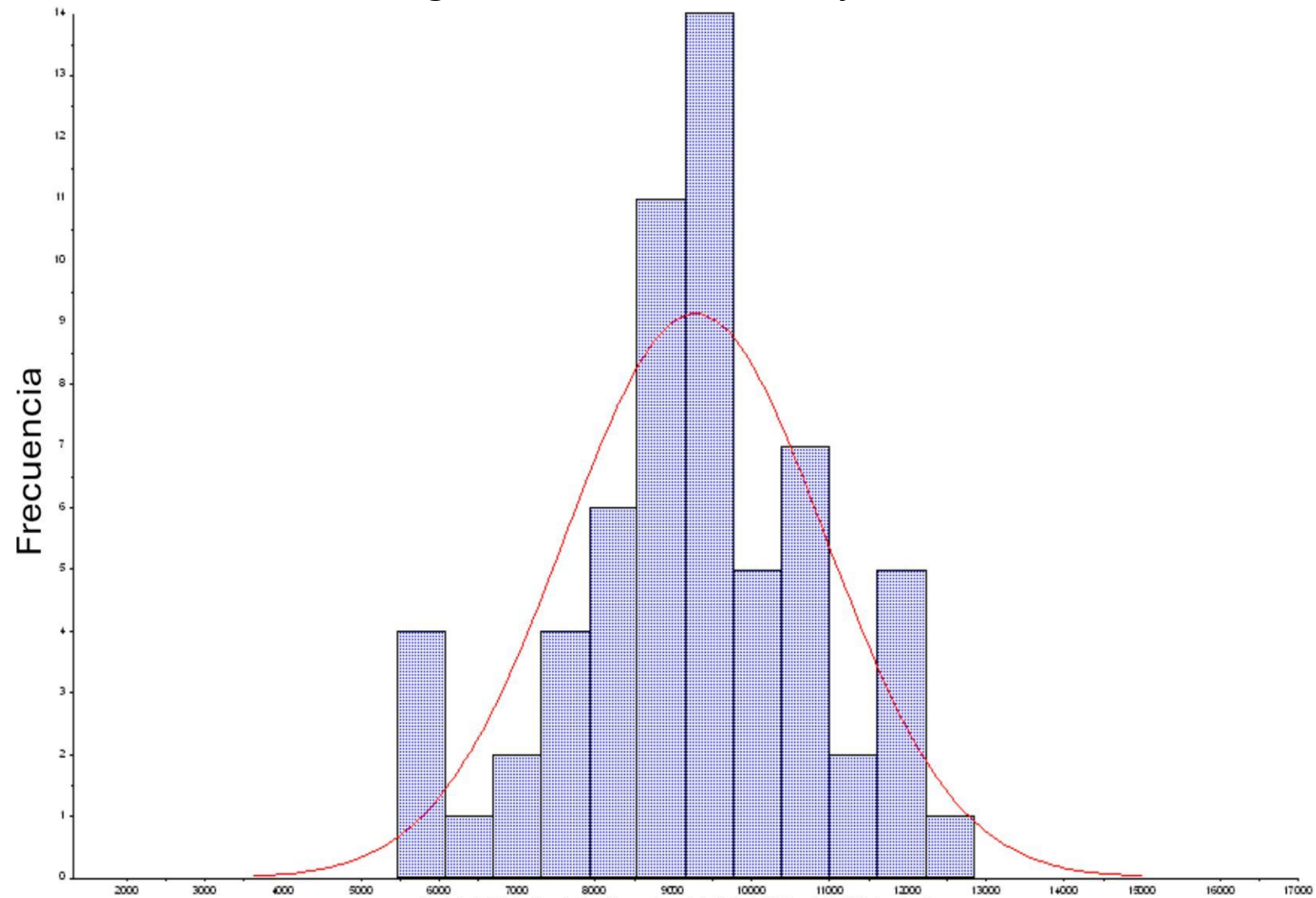
En la anualidad 2024, para completar el muestreo de la anterior anualidad (18 muestras) se completa con el muestreo de esta anualidad, con 62 muestras de bayas de sabugueiro con sus correspondientes datos analíticos de laboratorio. Estas 62 muestras se acondicionan y se presentan en reflectancia en viales de cuarzo de 1mm, y se procesan también con el equipo FOSS XDS (350-2500 nm, rango correspondiente al espectro electromagnético visible e infrarrojo cercano NIR)

Siguiendo el mismo protocolo de la anualidad anterior las muestras ya homogeneizadas se dosifican en los viales y se pasan por el equipo FOSS para sólidos. Mediante el software del equipo ISI SCAN y WIN ISI se extraen en formato CSV los espectros de cada una de las muestras.

Los resultados analíticos de las muestras de los 4 parámetros de antocianinas (cyanidin 3 sambusoide, glucósido, 3-5 diglucosido y totales) muestran una clara distribución Gaussiana, excepto las antocianinas totales donde sí que existe la distribución Gaussiana pero con una distribución más deformada y con falta de resultados en algunos rangos. Esto a priori puede afectar a la creación de modelos en estos rangos.

Los espectros en absorbancia recogidos en 2024 se solapan espectralmente con los recogidos en 2023. Como se puede observar el color rojo de los espectros de 2024, tapan prácticamente a los recogidos en 2023 en azul (Figura 3.45)

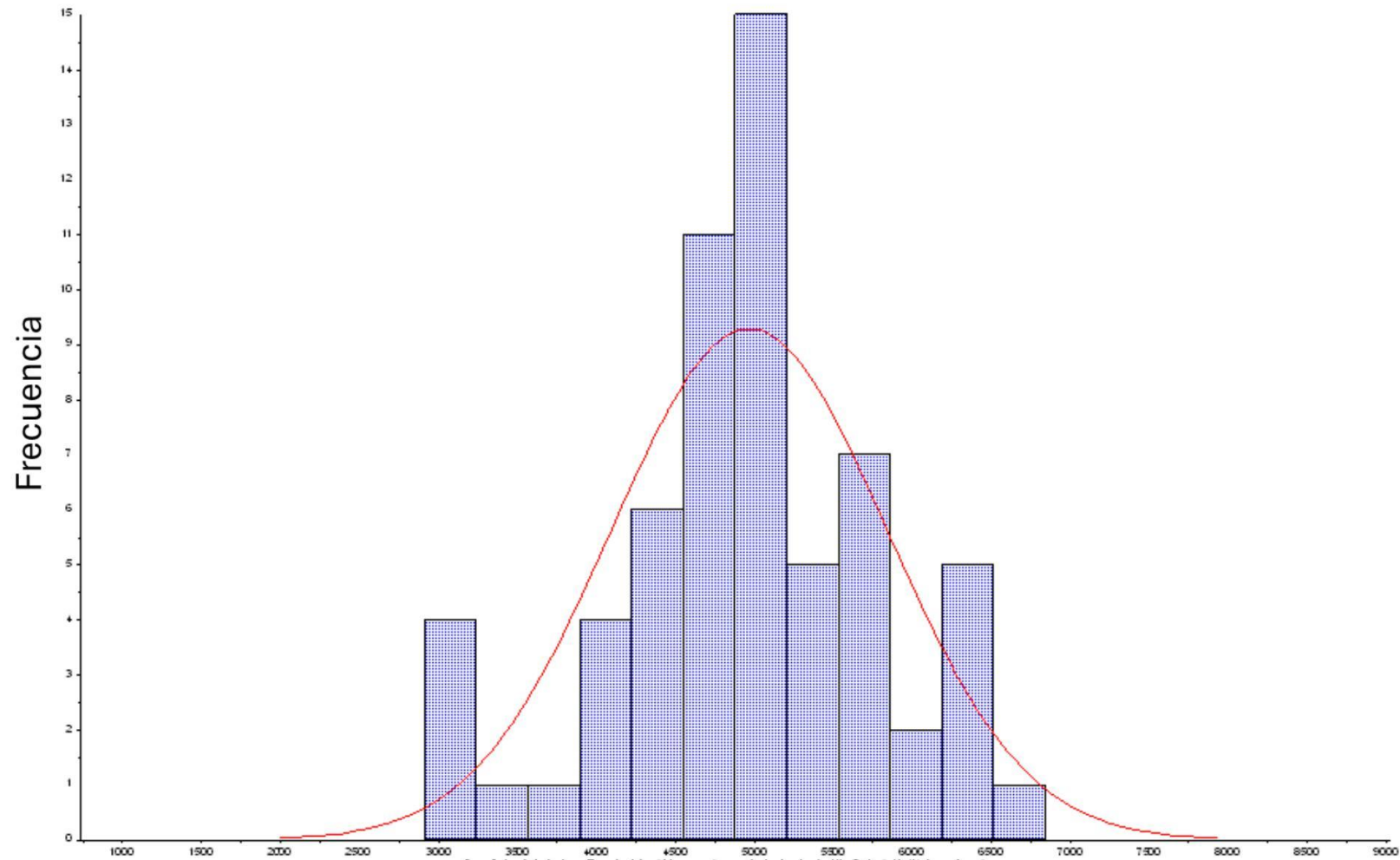
Histograma Antocianinas cyanidin-3-



Resultados Antocianinas Espectrométrico ppm mg equivalentes de cyanidin-3-sambubioside/Kg baya fresca

Figura 3.41. Histograma Antocianinas cyanidin-3 sambusoide

Histograma Antocianinas cyanidin-3- glucóxico



Resultados Antiocianinas Espectométrico ppm mg equivalentes de cyanidin-3-glucóxico/Kg baya fresca

Figura 3.42. Histograma Antocianinas glucóxico

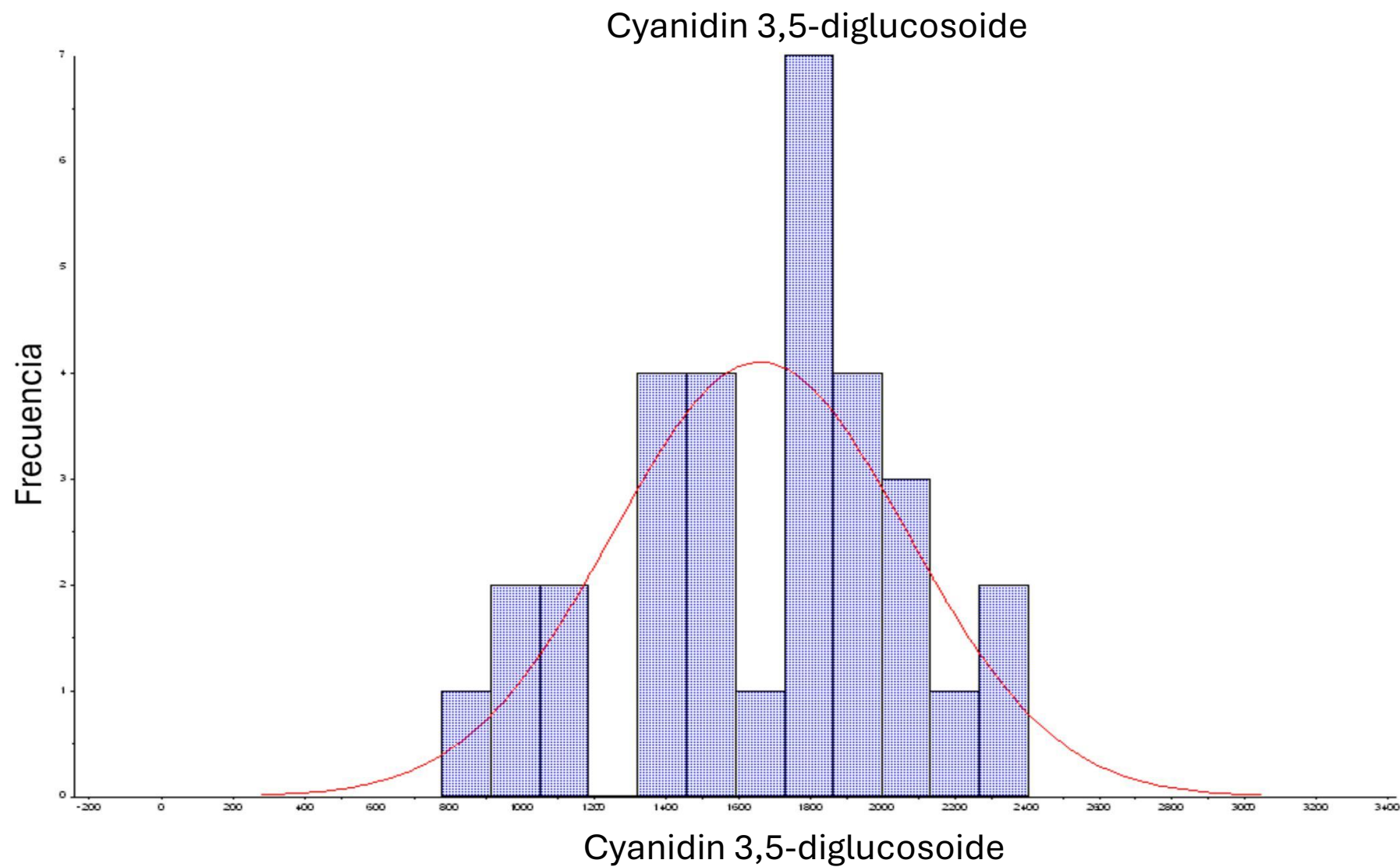


Figura 3.43. Histograma Antocianinas cyanidin-3-5 diglusoide

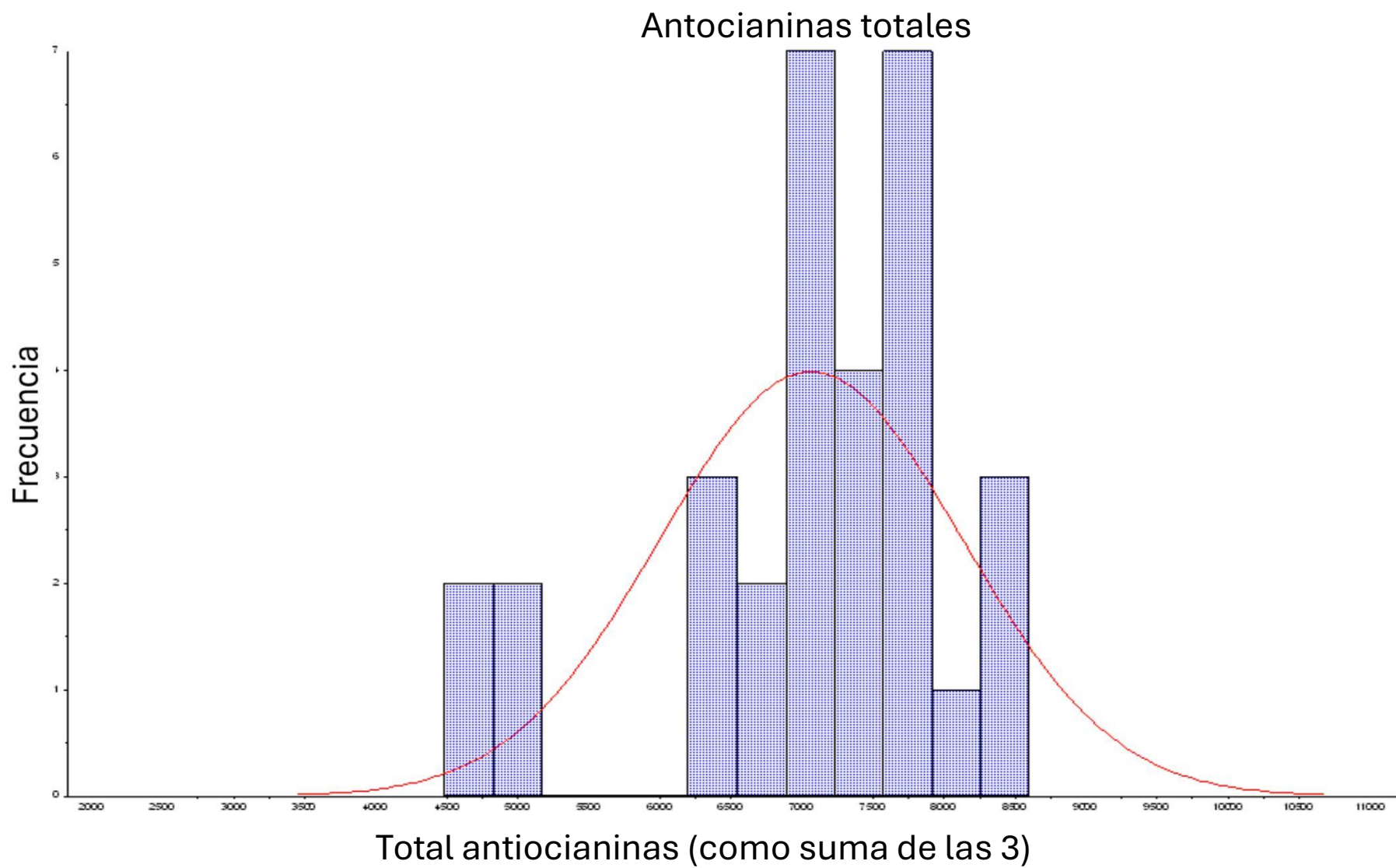


Figura 3.44. Histograma antocianicas totales

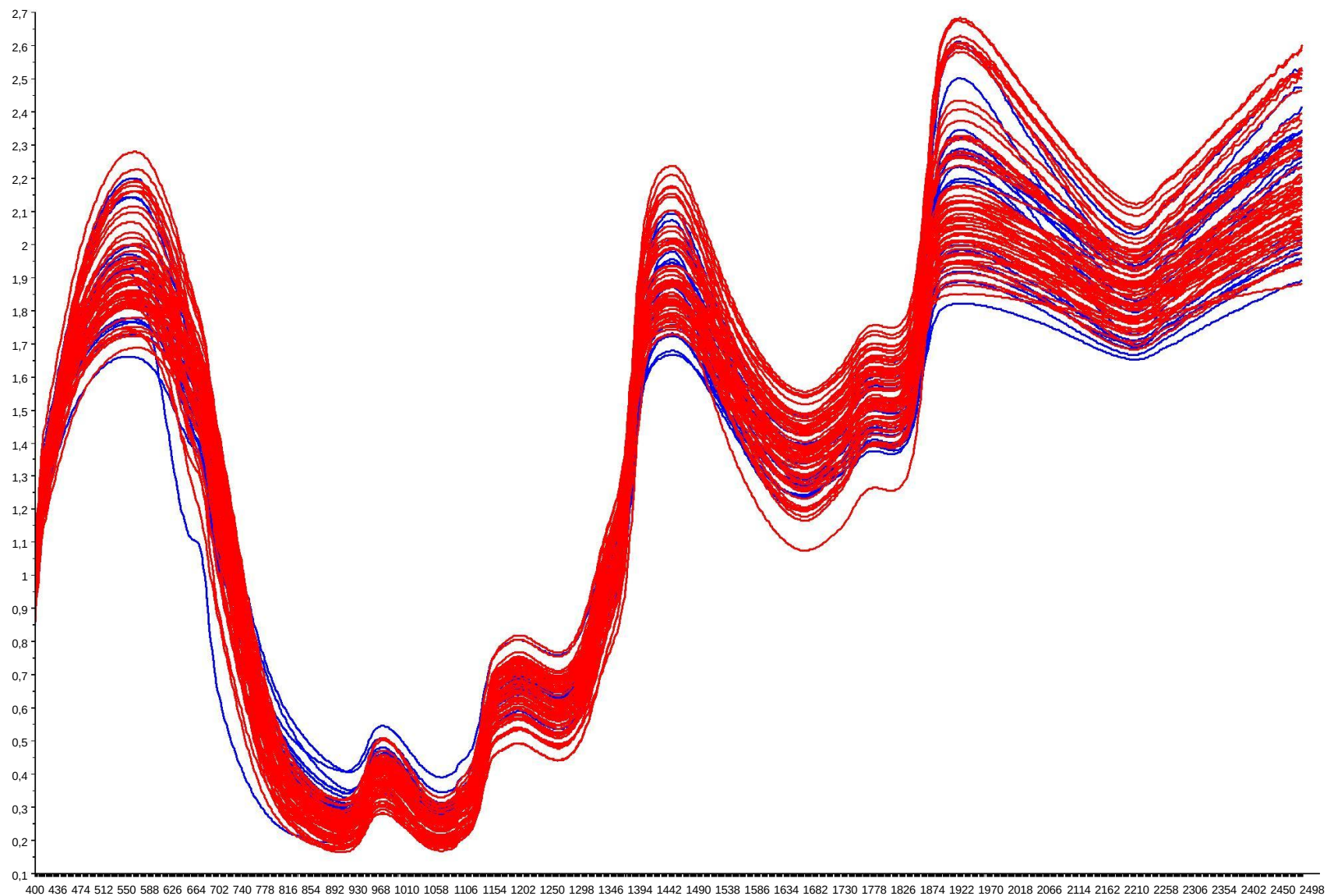


Figura 3.45. Espectros en absorbancia recogidos en 2023 y 2024.

A continuación, se muestra el análisis de los espectros recogidos en la anualidad 2024. Realizando un procesado para eliminar los efectos de dispersión, basado en normalización (SNV) y derivada primera con suavización.

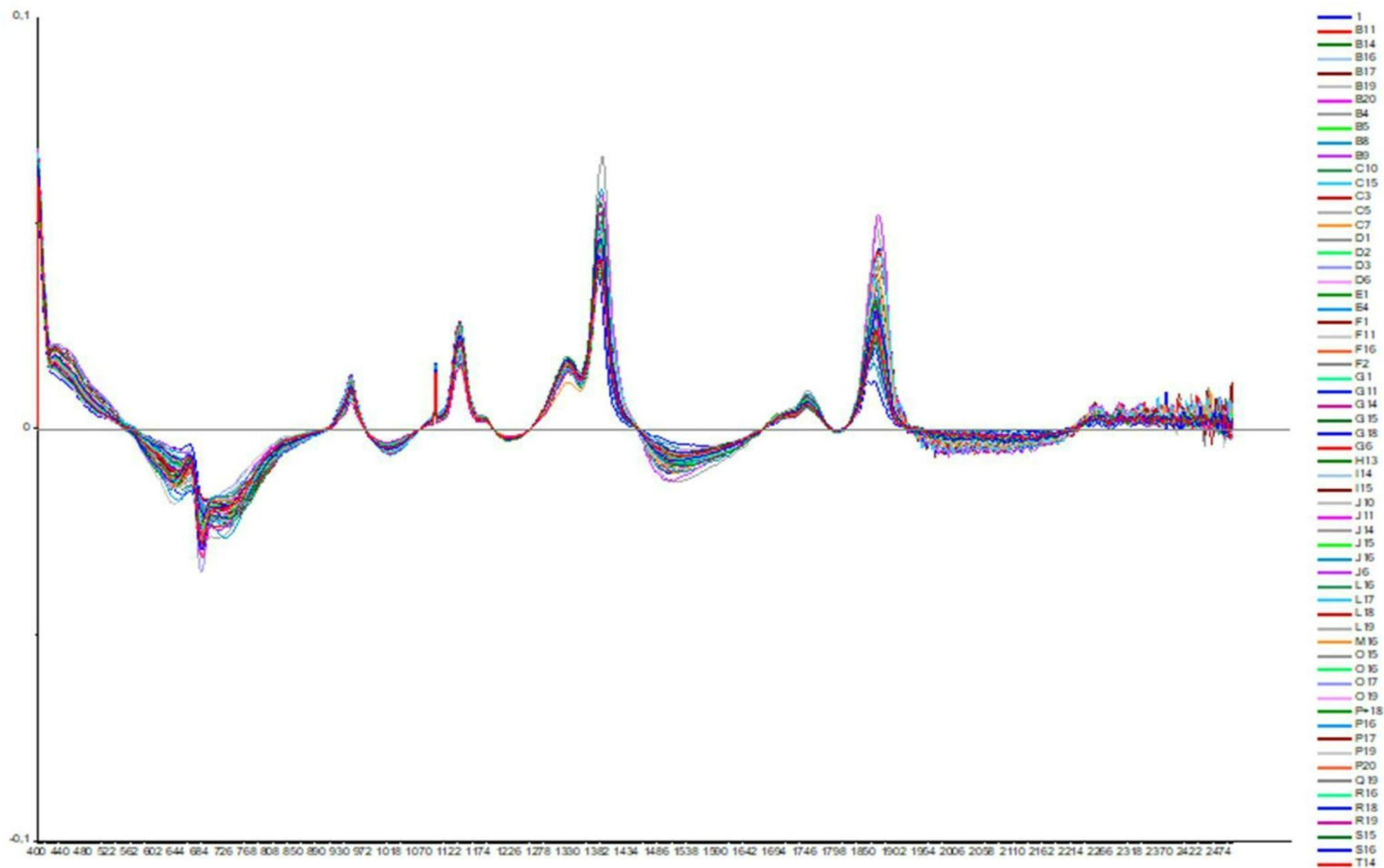


Figura 3.46. Espectros de muestras de 2024 en absorbancia normalizados y en primera derivada con suavizado.

Como se puede observar en la figura anterior aparecen diferentes picos y valles en las gráficas que se dividen en tres rangos espectrales, VIS, SWIR y MIR:

1. Rango VIS, con longitudes de onda entre 400nm a 1000nm. En su mayor parte radiación visible, con una pequeña parte de rango infrarrojo

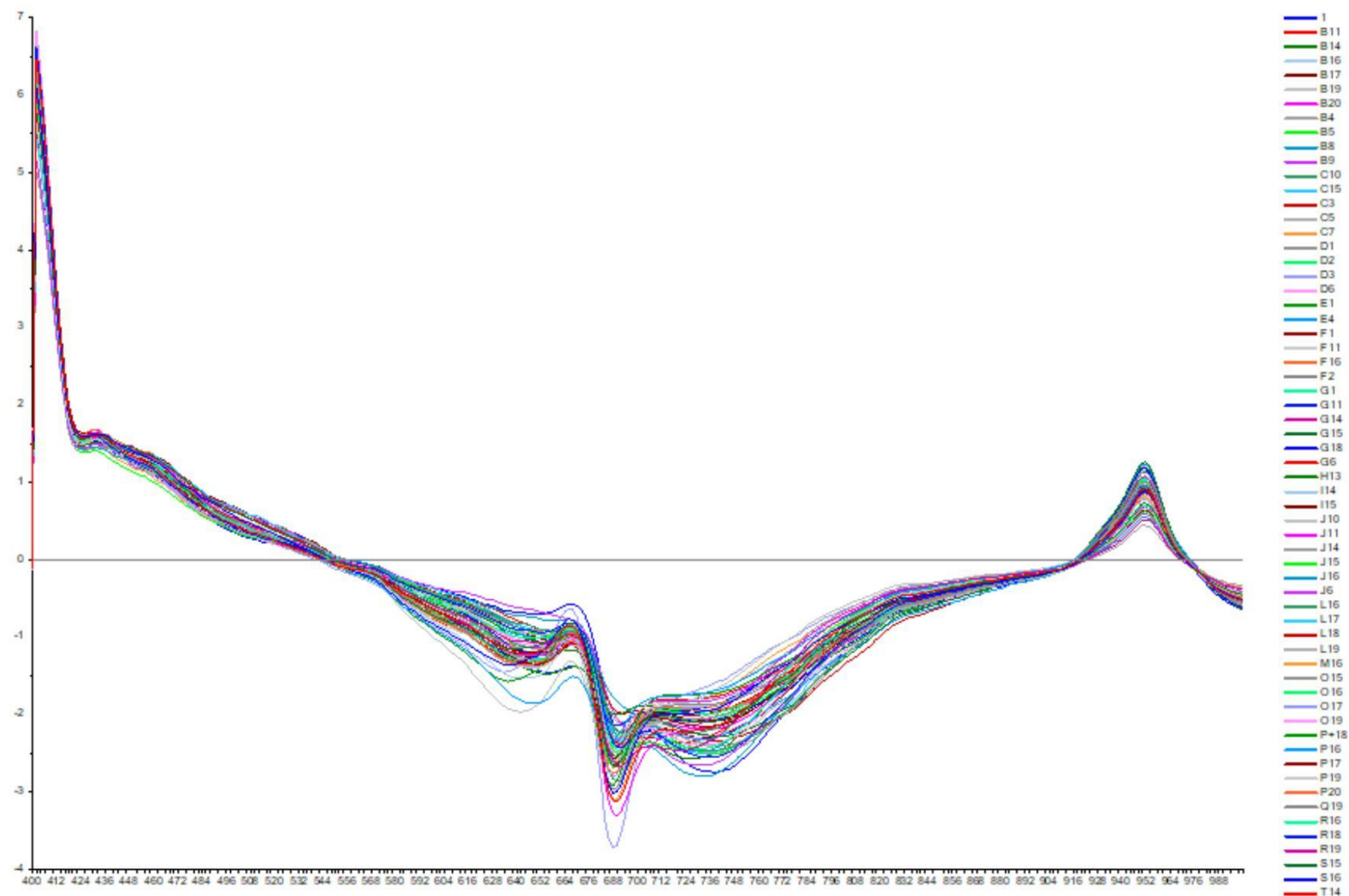


Figura 3.47. Espectros de muestras de 2024 en absorbancia normalizados y en primera derivada con suavizado en el rango 400 a 1000nm.

Se observan unos espectros bastante solapados, y con máximos y mínimos destacables en 650nm, 690nm (colores rojos, próximos al comienzo del infrarrojo) y 940nm. Esta última longitud de onda posiblemente relacionada con el grado de humedad.

2. Rango SWIR con longitudes de onda entre 1000 y 1700nm, radiación infrarroja en su totalidad.

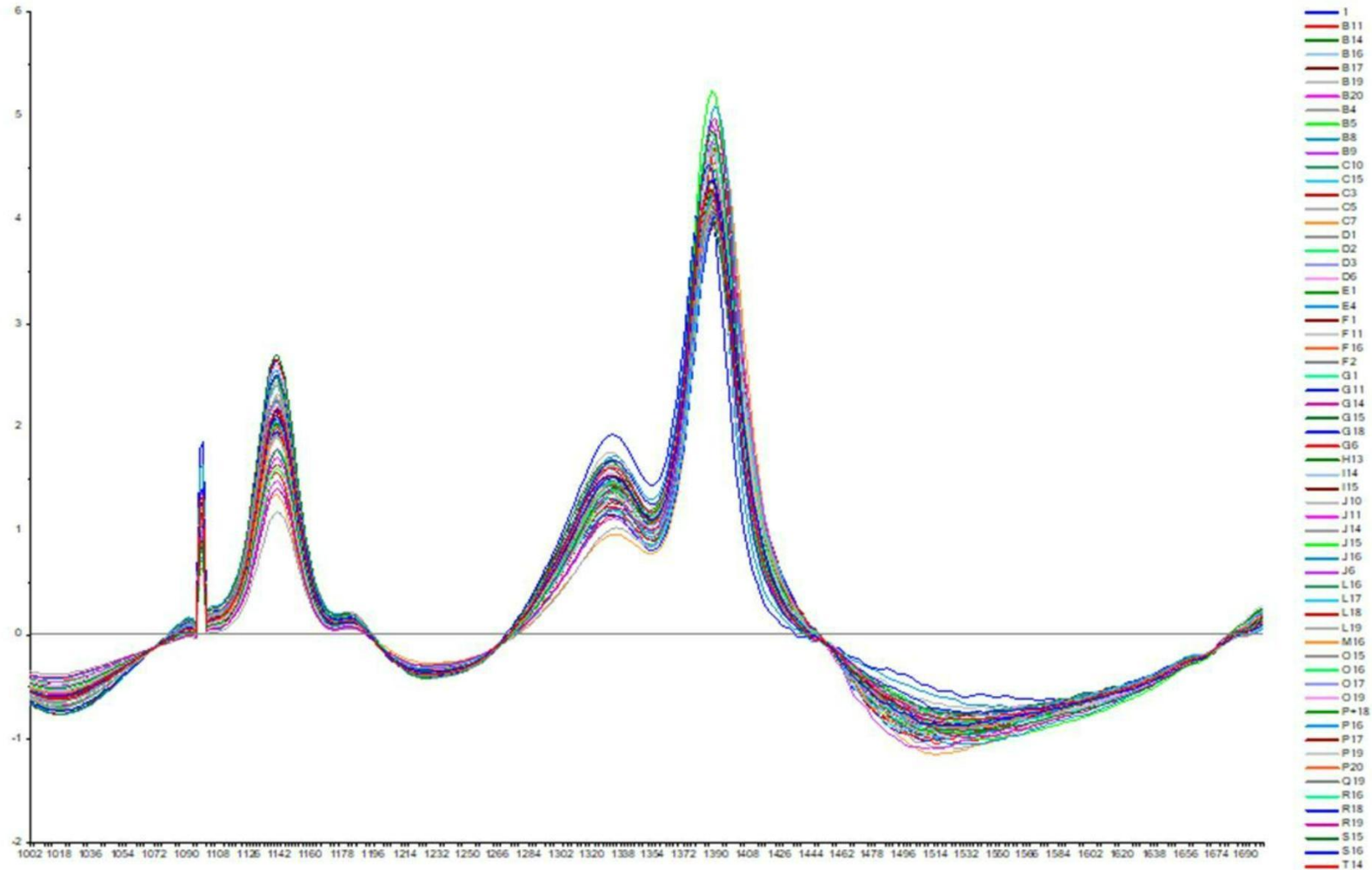


Figura 3.48. Espectros de muestras de 2024 en absorbancia normalizados y en primera derivada con suavizado en el rango 1000 a 1700nm

Analizando la respuesta espectral, se identifican 4 máximos en 1100,1140,1320 y 1376. El primero de ellos (1110nm) corresponde a ruido originado del cambio de tecnología de sensor. Por lo que, para el modelado, empezaremos por encima de esta longitud de onda.

3. Rango MIR, correspondiente a las longitudes de onda que están por encima de los 1700nm a los 2500nm. En principio como se puede ver en la siguiente ilustración, los espectros tienen un alto nivel de ruido a partir de los 1900nm en adelante.

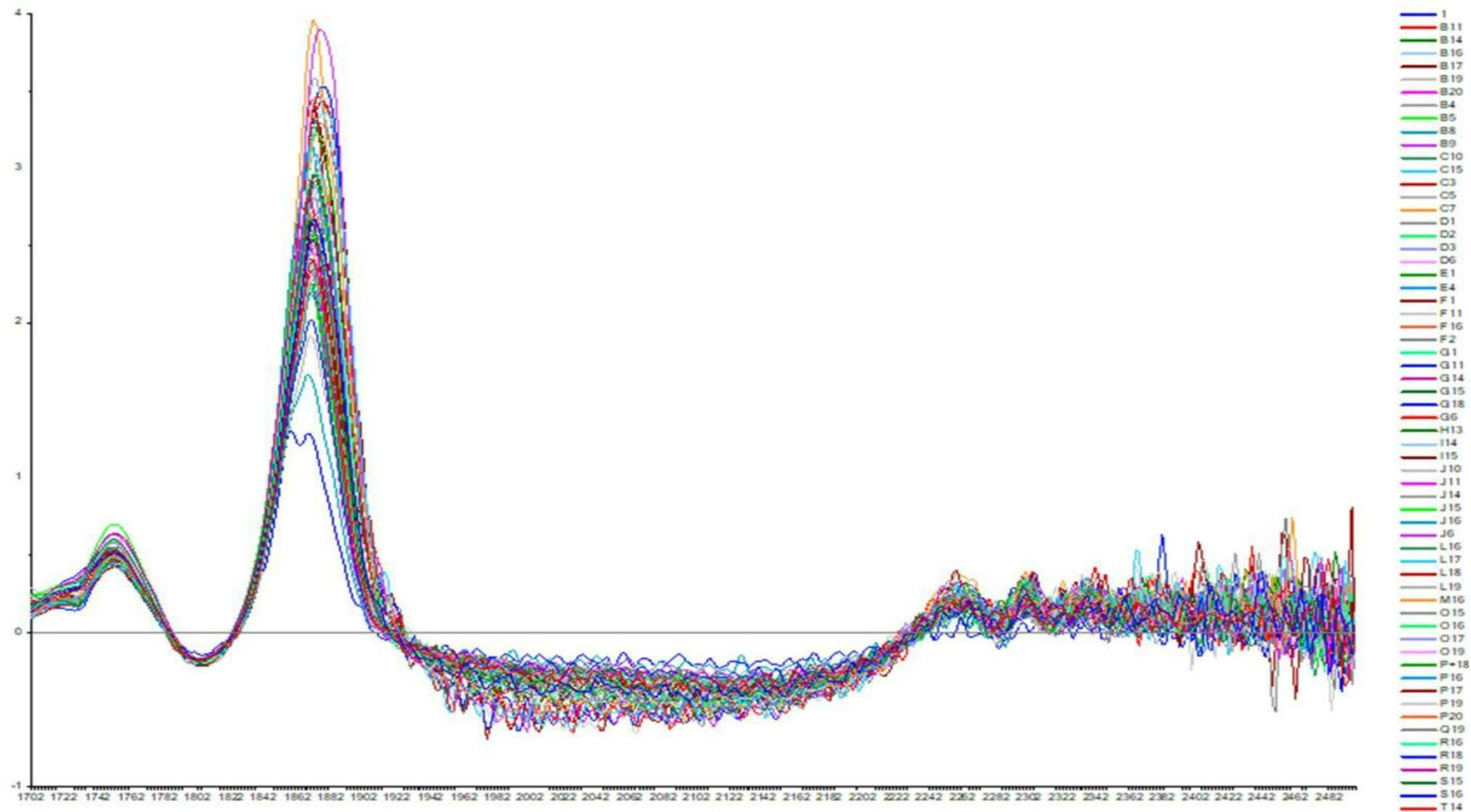


Figura 3.49. Espectros de muestras de 2024 en absorbancia normalizados y en primera derivada con suavizado en el rango 1700 a 2400nm

Realizando un procesamiento matemático para eliminar los efectos de scattering realizamos un análisis de componentes principales para ver la variabilidad de los espectros recogidos en ambas anualidades.

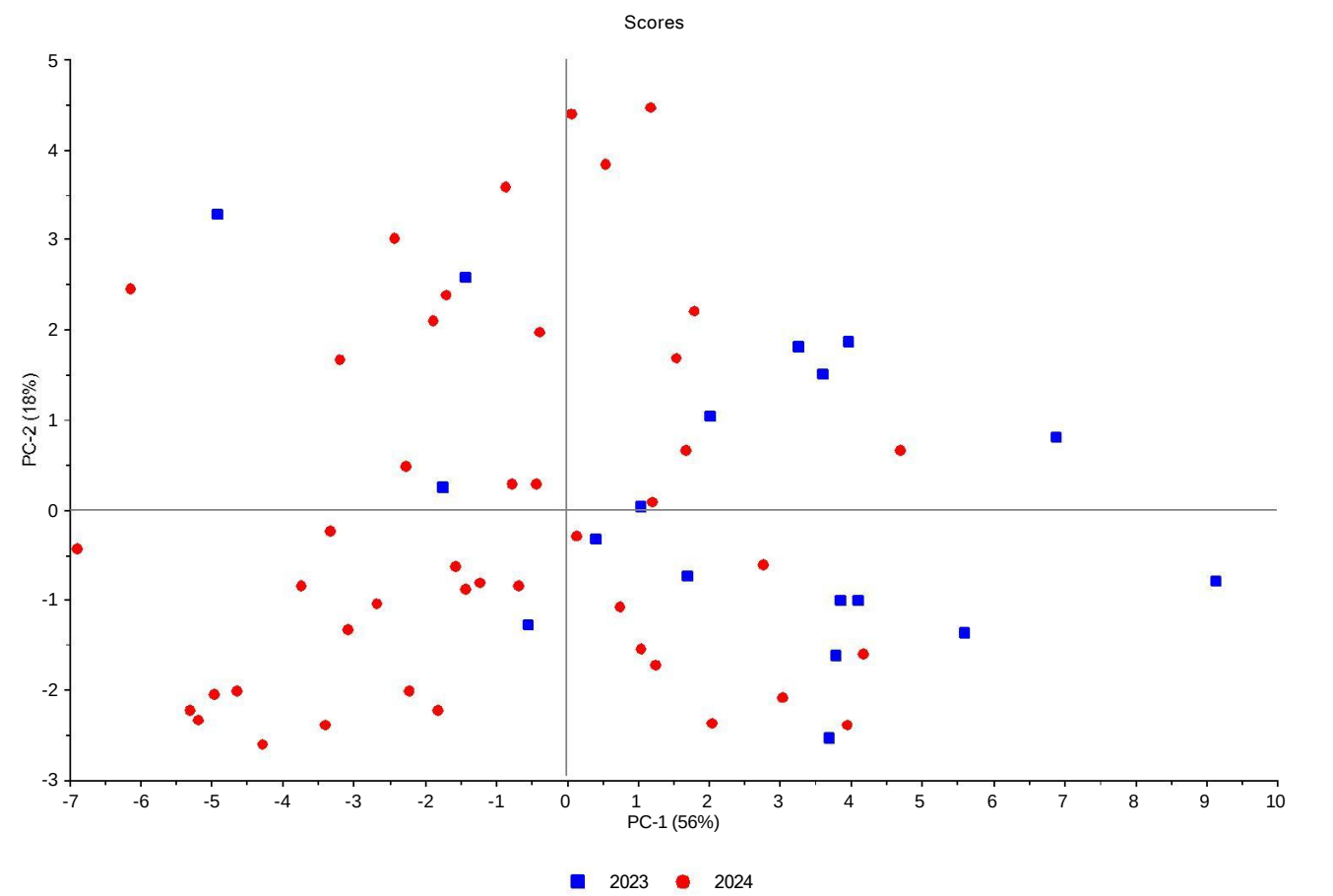


Figura 3.50. Análisis de componentes principales de los espectros procesados recogidos en 2023 y 2024

Como se puede observar en la gráfica anterior de análisis de componentes principales, los espectros recogidos en las anualidades 2024, y 2023 se entremezclan, y no presentan ningún tipo de segmentación.

Posteriormente se pasa a realizar **el modelado matemático** en cada uno de estos tres rangos espectrales, y con los diferentes analitos de estudio. Para ello se utiliza el Software Espectrométrico Unscrambler, con el que se implementa PLSR (Regresión por mínimos cuadrados parciales) en cada uno de los rangos espectrales, y con cada uno de los analitos seleccionados.

- 1. Modelos con el rango VIS-NIR, de 400 a 1000nm

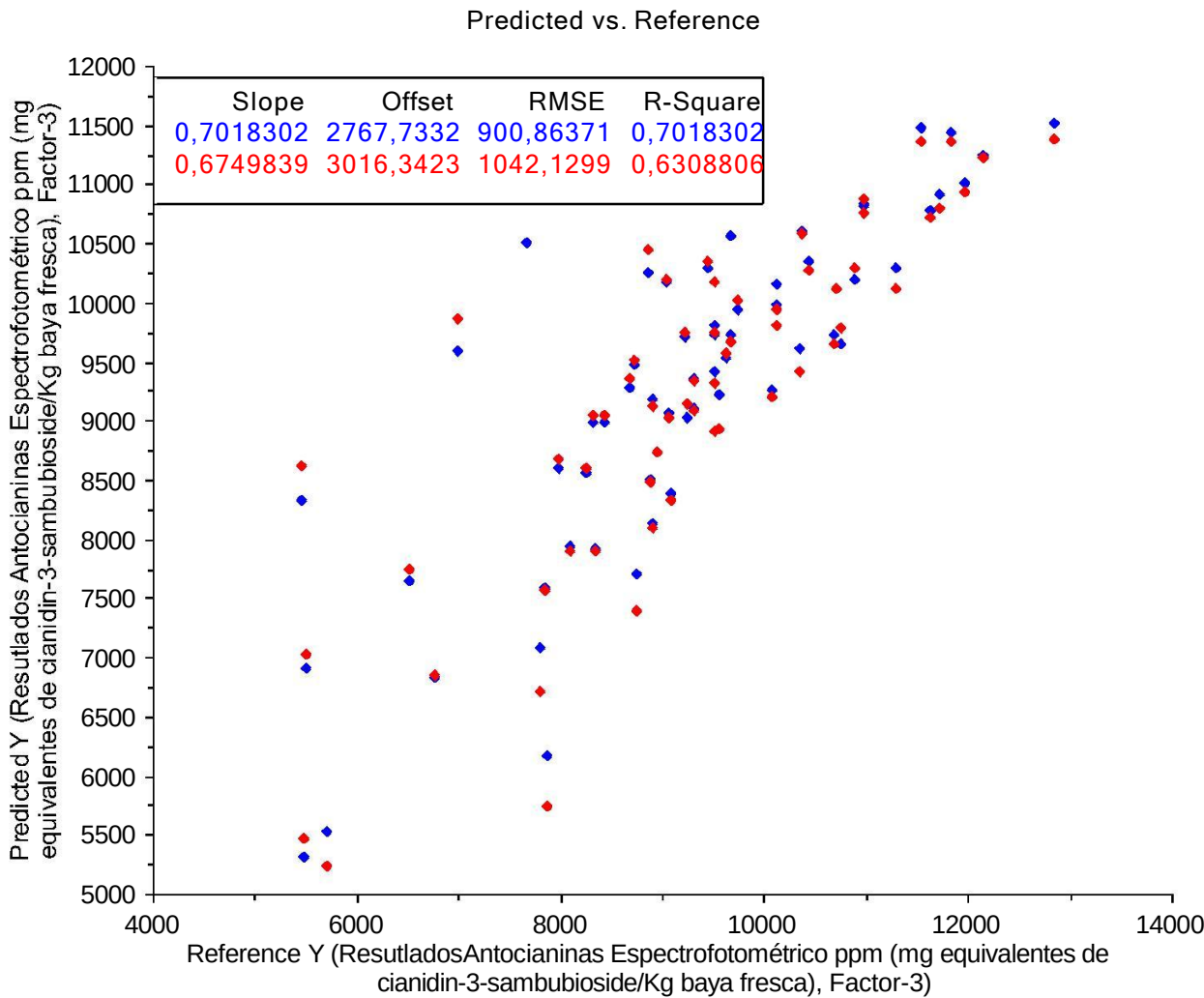


Figura 3.51. Resultado modelo predictivo en rango VIS-NIR de sambusoide.

Como se puede ver el gráfico superior se consigue una correlación muy interesante en el rango VIS-NIR en este caso con un error medio de predicción en validación cruzada de 1042,13mg/kg.

Las muestras de entrenamiento oscilan entre valores de 5.000 a 13.000mg/kg, por lo que se trata de un modelo aplicable para la predicción de este parámetro.

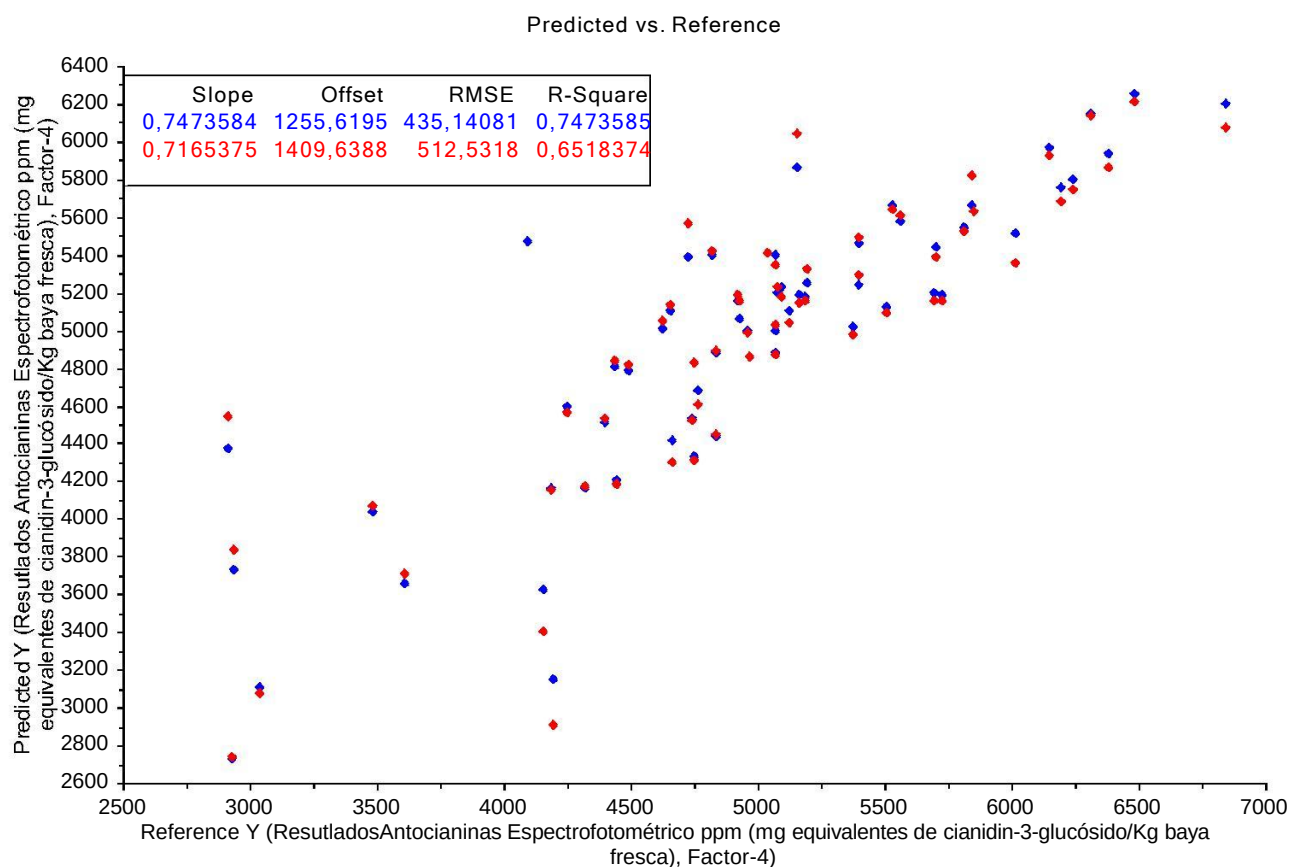


Figura 3.52. Resultado modelo predictivo en rango VIS-NIR de antocianinas

Al igual que con el parámetro de concentración en sambudioside, el modelo con las antocianinas tiene una correlación adecuada. En este caso, con un error medio de predicción en validación cruzada de 512,53mg/kg, en un rango de valores discretos de este parámetro entre 2600 y 6400mg/kg.

2. Modelos con el rango NIR, de 1000 a 1700nm

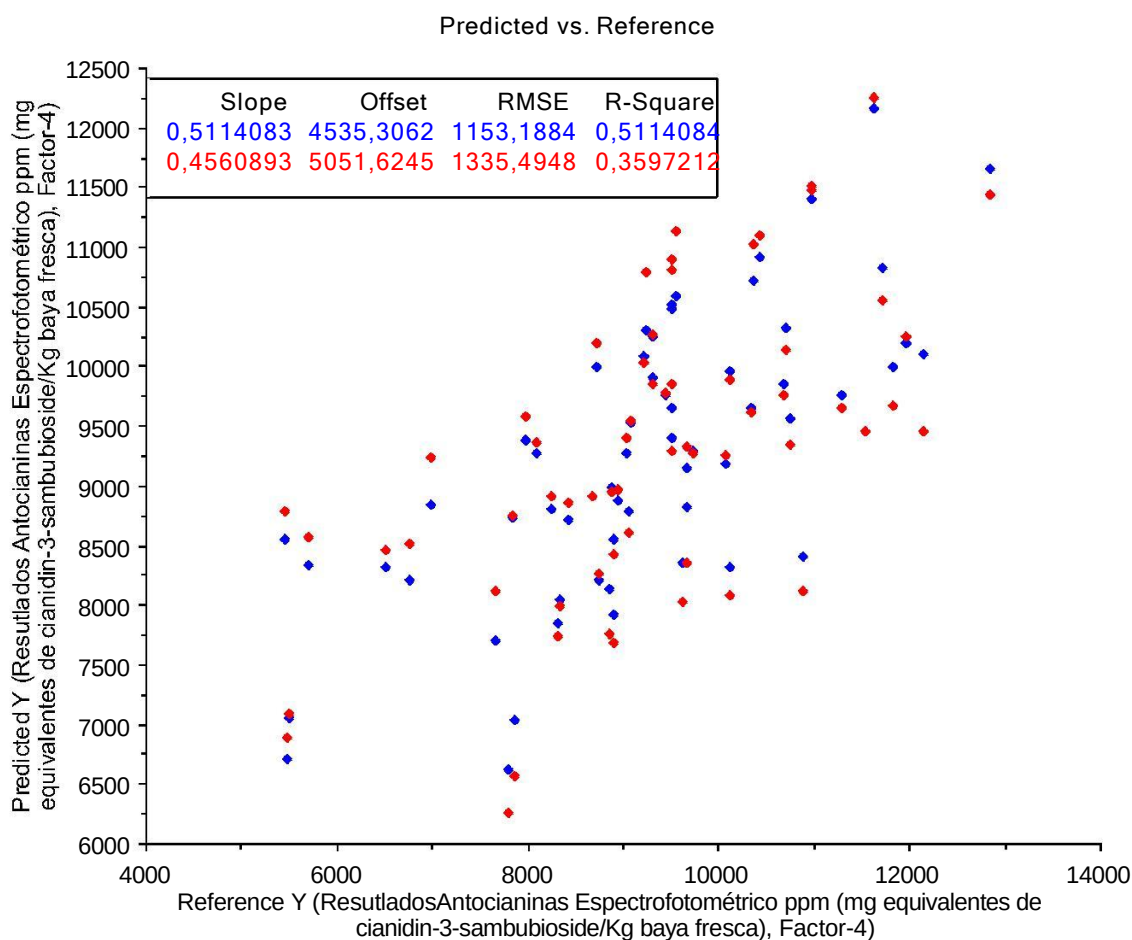


Figura 3.53. Resultado modelo predictivo en rango NIR de sambusoide

Utilizando para el modelo el rango NIR entre 1000 a 1700nm, los resultados del modelo muestran un grado de correlación bastante más bajo, y por lo tanto aumentan los valores de error medio de predicción. En el modelo del sambudioside se acumula un error medio de 1335,5mg/g, y 684mg/g para las antocioaninas como se puede ver en la figura siguiente.

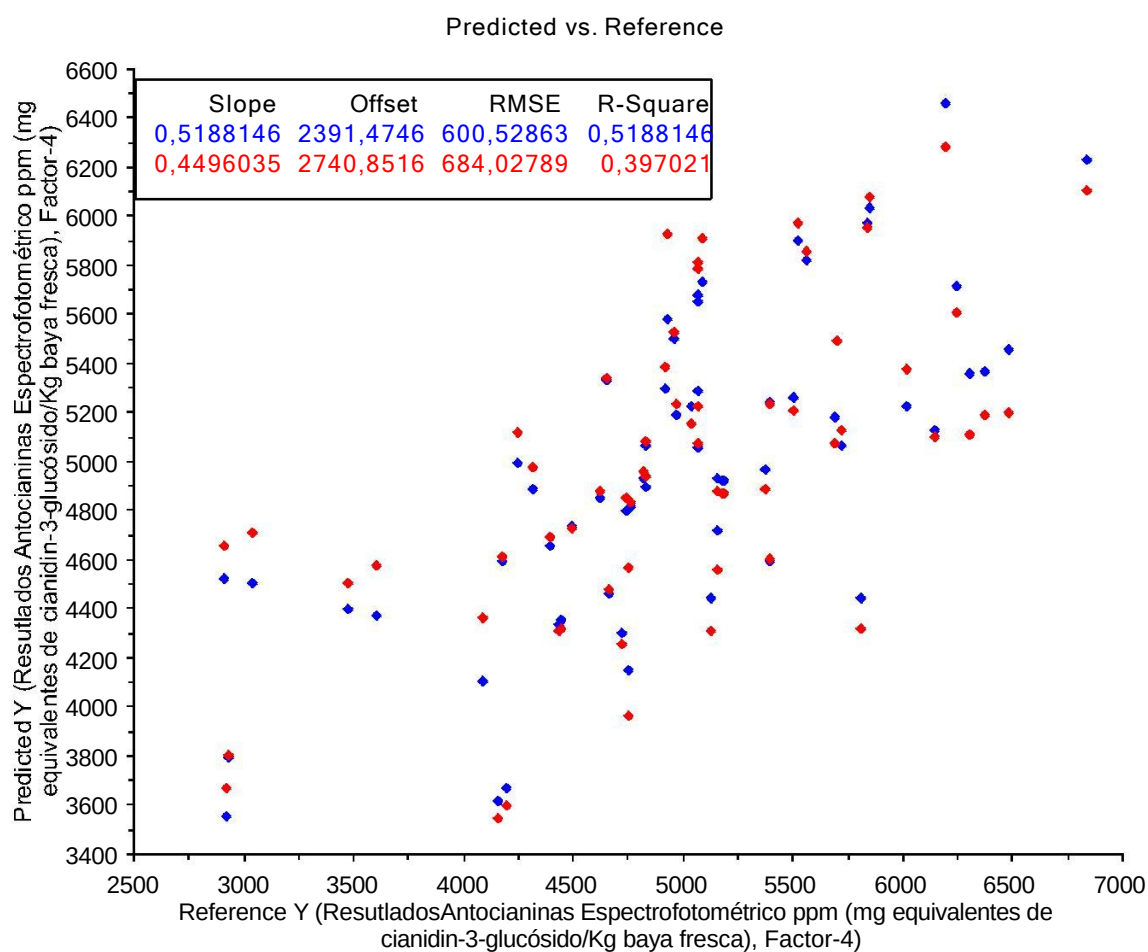


Figura 3.54. Resultado modelo predictivo en rango NIR de antocianinas

3. Modelos con el rango MIR, de 1700 a 2500nm.

En este caso no existe correlación alguna como se puede ver en la figura siguiente.

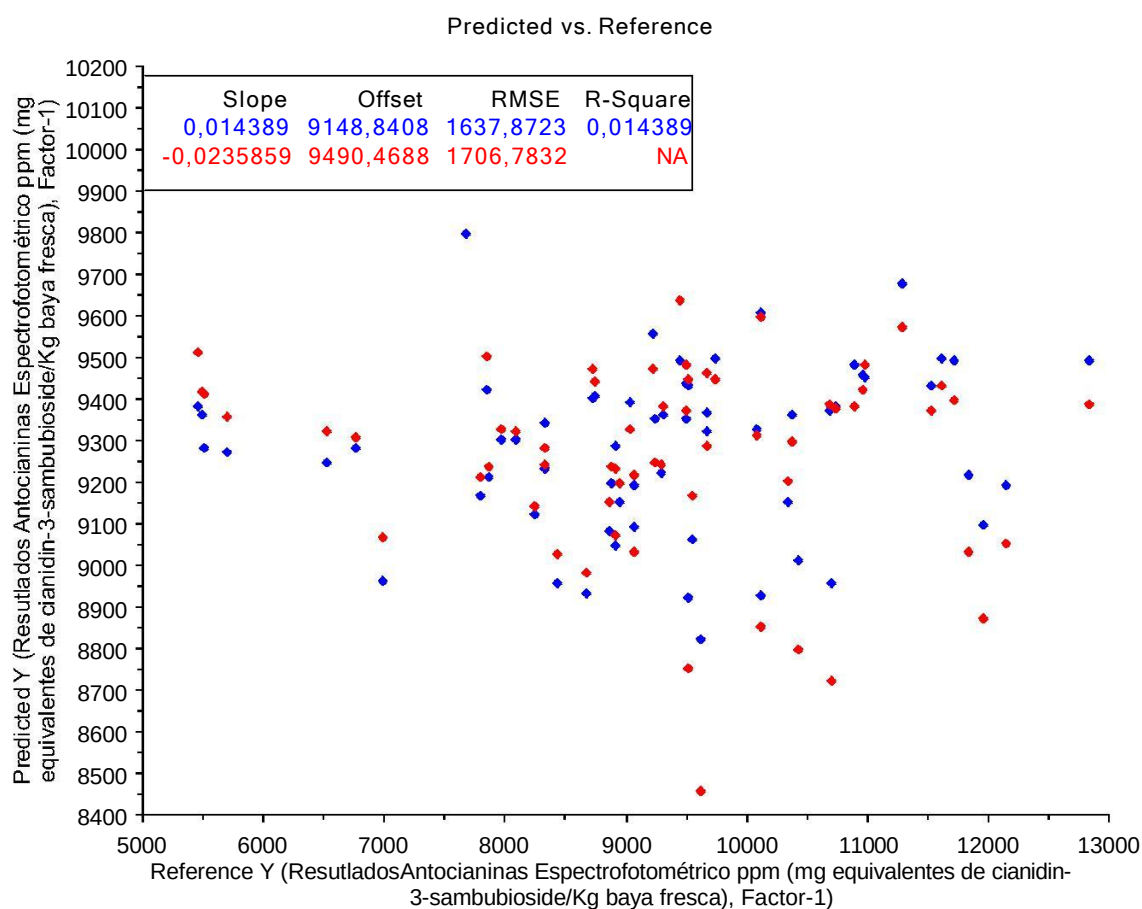


Figura 3.55. Resultado modelo predictivo en rango MIR de sambudioside

El estudio realizado revela que el desarrollo del modelo predictivo con las muestras analizadas revela una correlación interesante en el rango VIS-NIR, con un error medio de predicción más preciso que el modelado en el rango espectral NIR (300 ppm más).

Tabla 3.7. Tabla comparativa de modelos predictivos en base al rango espectral capturado.

Rango espectral	Parámetro	R-Square	RMSE (ppm)
VIS-NIR (400-1000nm)	Cianidin-3-sambusoide	0,70-0,63	900-1042
VIS-NIR (400-1000nm)	Cianidin-3-glucoxido	0.74-0.65	435-512
NIR (1000-1700nm)	Cianidin-3-sambusoide	0.511-0.36	1153-1335
NIR (1000-1700nm)	Cianidin-3-glucoxido	0.518-0.397	600-684

MIR (1700-2500nm)	Cianidin-3-sambusoide	No existe correlación	
MIR (1700-2500nm)	Cianidin-3-glucoxido	No existe correlación	

Si analizamos la gráfica de los loadings del factor 1, y factor 2 de los resultados del modelado PLSR, muestran las longitudes de onda que más información están proporcionando al modelo.

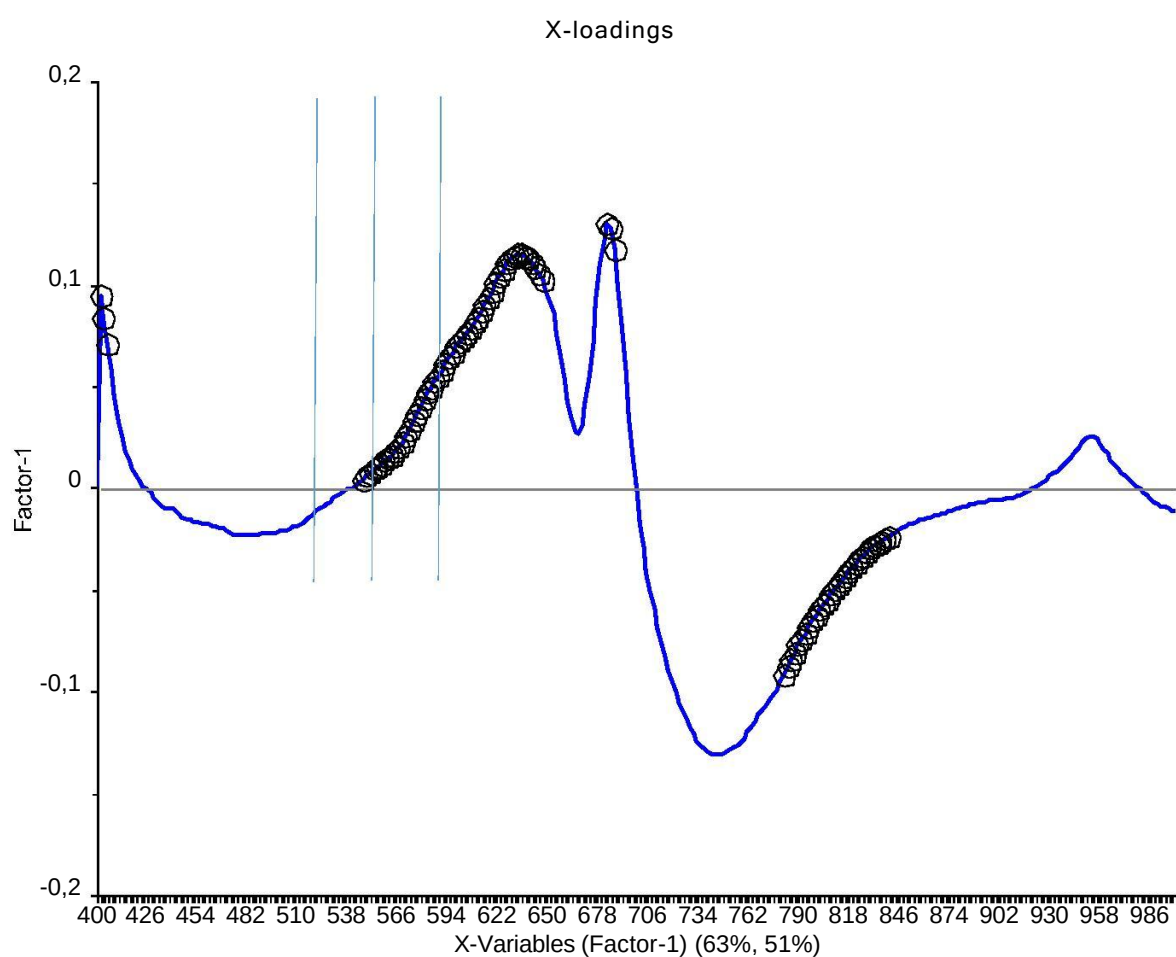


Figura 3.56. Gráfica de loading Factor 1 en el rangos VIS-NIR del parámetro Cianidin-3-sambusoide.

En la ilustración superior podemos ver el peso de determinadas longitudes de onda como 630,680y 740nm (picos y valles de la gráfica) las cuales tienen un peso importante en la generación del modelo predictivo del parámetro Cianidin-3-sambusoide.

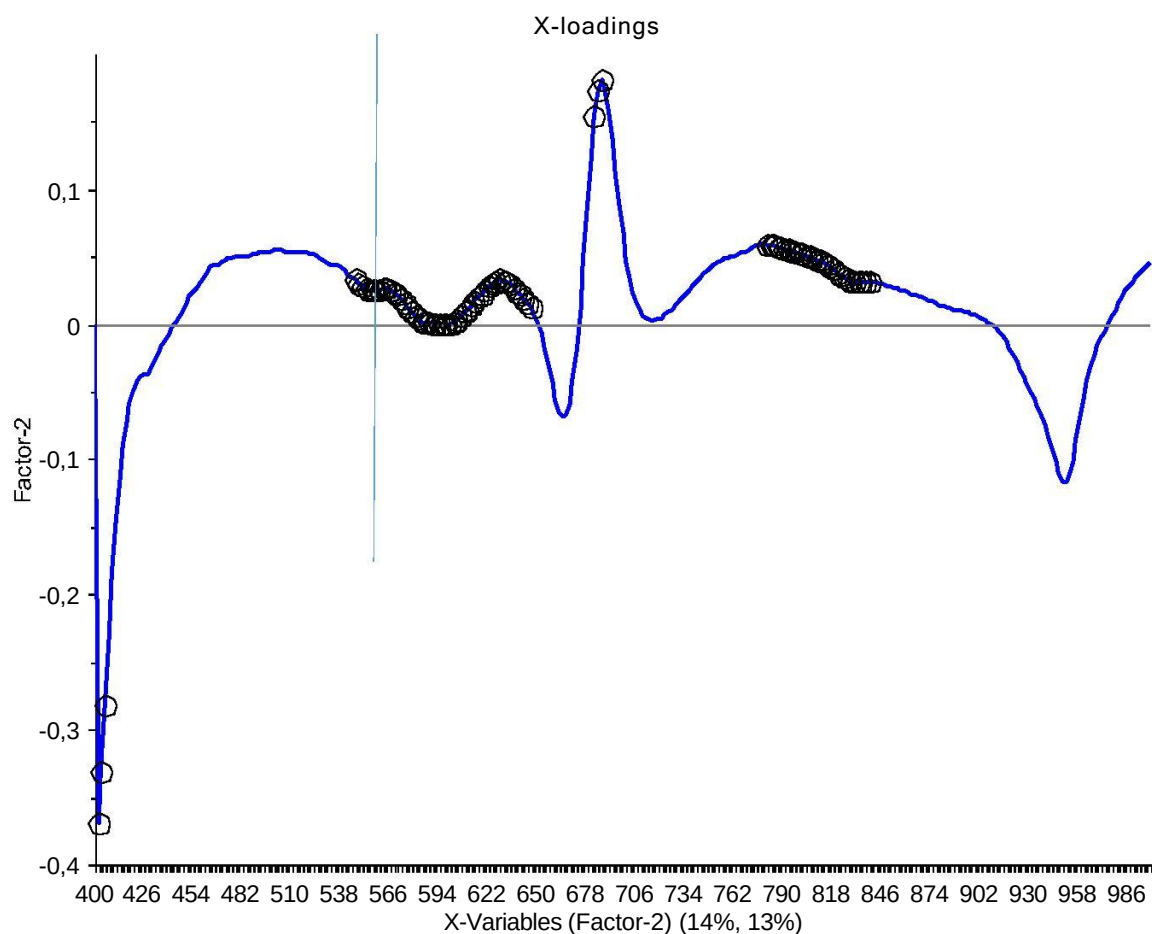


Figura 3.57. Gráfica de loading Factor 2 en el rangos VIS-NIR del parámetro Cianidin-3-sambusoide.

Las longitudes de onda de interés son las mismas para el parámetro Cianidin-3-glucoxido.

4 CONCLUSIONES DEL PROYECTO

Con el desarrollo del SAMBUCUS GO, se han logrado los objetivos establecidos para optimizar el cultivo ecológico de la especie autóctona de *S. Nigra* aplicando estrategias de manejo agronómico que han permitido alcanzar niveles superiores de compuestos bioactivos en flores y frutos. Se puede concluir que:

- Se ha conseguido optimizar la calidad del fruto y mejorar la composición de compuestos bioactivos en hojas y frutos mediante la aplicación de estrategias de manejo agronómico relacionadas con la poda, la respuesta al riego y a la fertirrigación. Esto permite un cultivo

más eficiente, reduciendo los costes de poda y riego y disminuyendo el tiempo de desarrollo fisiológico y el proceso de maduración de los frutos de Sabugueiro autóctono en Ourense.

- ▮ Se ha logrado estandarizar el control de calidad de frutos del Sabugueiro mediante técnicas NIR.
- ▮ Con la determinación y obtención de compuestos bioactivos del Sabugueiro, se ha puesto en valor el contenido de compuestos bioactivos (fenoles y antocianinas), lo cual a su vez satisface una necesidad real de mercado que demanda mayor innovación en nutrición como elemento clave de una vida saludable.
- ▮ Con los resultados obtenidos en el desarrollo del Proyecto, se han establecido criterios básicos para el diseño de plantaciones de Sabugueiro autóctono.
- ▮ Se han llevado a cabo varias labores de divulgación y transferencia al sector de los resultados que permiten poner en valor el cultivo ecológico fomentando las prácticas agrícolas sostenibles a pequeña escala.