



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Caracterización de la calidad y de las propiedades funcionales de la granada cultivada en Los Monegros.

Quality characterization and functional properties of pomegranate cultivated in Los Monegros.

Autor/es

Iván Plo Rodríguez

Director/es

Rosa Oria Almudí
Sara Remón Oliver

Facultad de Veterinaria

2019

ÍNDICE

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | ANTECEDENTES: | 4 |
| 2. | RESUMEN: | 5 |
| 3. | ABSTRACT: | 6 |
| 4. | INTRODUCCIÓN: | 6 |
| 4.1 | PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE FRUTAS: | 6 |
| 4.2 | TRANSFORMACIÓN DE FRUTAS: SUBPRODUCTOS GENERADOS: | 7 |
| 4.3 | LA GRANADA Y SUS SUBPRODUCTOS: | 8 |
| 4.4 | COMPUESTOS DE INTERÉS PRESENTES EN LA GRANADA Y SUS PROPIEDADES BIOACTIVAS: | 9 |
| 5. | OBJETIVO Y DISEÑO EXPERIMENTAL: | 11 |
| 5.1 | OBJETIVO: | 11 |
| 5.2 | DISEÑO EXPERIMENTAL: | 12 |
| 6. | MATERIALES Y MÉTODOS: | 13 |
| 6.1 | MATERIAL VEGETAL: | 13 |
| 6.2 | REACTIVOS: | 13 |
| 6.3 | CARACTERIZACIÓN COMERCIAL DE LA GRANADA: | 14 |
| 6.3.1 | <i>Calibre y peso de los frutos.</i> | 14 |
| 6.3.2 | <i>Análisis del color.</i> | 14 |
| 6.3.3 | <i>Firmeza de los arilos.</i> | 15 |
| 6.3.4 | <i>pH y acidez.</i> | 15 |
| 6.3.5 | <i>Sólidos solubles totales (SST).</i> | 15 |
| 6.3.6 | <i>Análisis sensorial de los arilos.</i> | 15 |
| 6.4 | CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE LA PIEL Y DE LOS ARILOS: | 16 |
| 6.4.1 | <i>Extracción de los compuestos fenólicos a estudiar.</i> | 16 |
| 6.4.2 | <i>Determinación de proantocianidinas.</i> | 17 |
| 6.4.3 | <i>Determinación de los compuestos fenólicos totales (TPC).</i> | 17 |
| 6.4.4 | <i>Determinación de flavonoides totales (TFC).</i> | 18 |
| 6.4.5 | <i>Determinación del contenido de antocianos totales (TAC).</i> | 18 |
| 6.4.6 | <i>Determinación de la capacidad antioxidante total mediante el método de reducción férrica (FRAP).</i> | 18 |
| 6.4.7 | <i>Determinación de la capacidad antioxidante total mediante el método de inhibición del radical libre 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).</i> | 19 |
| 6.5 | OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PARA ENSAYOS ANTIMICROBIANOS: | 20 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6.6 | DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS DE PIEL DE GRANADA: | 21 |
| 6.6.1 | <i>Ensayos en medio sólido</i> | 21 |
| 6.6.2 | <i>Ensayos en medio líquido</i> | 22 |
| 7. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN:..... | 23 |
| 7.1 | CARACTERIZACIÓN COMERCIAL DE LA GRANADA: | 23 |
| 7.1.1 | <i>Calibre, peso y rendimiento de los frutos</i> | 23 |
| 7.1.2 | <i>Análisis del color</i> | 24 |
| 7.1.3 | <i>Firmeza</i> | 25 |
| 7.1.4 | <i>pH, acidez y sólidos solubles totales (SST)</i> | 25 |
| 7.1.5 | <i>Análisis sensorial de los arilos</i> | 26 |
| 7.2 | CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE LA PIEL Y DE LOS ARILOS: | 27 |
| 7.2.1 | <i>Compuestos fenólicos totales y flavonoides</i> | 27 |
| 7.2.2 | <i>Contenido de proantocianidinas</i> | 28 |
| 7.2.3 | <i>Contenido de antocianos totales</i> | 29 |
| 7.2.4 | <i>Capacidad antioxidante total mediante el método de reducción férrica (FRAP)</i> | 30 |
| 7.2.5 | <i>Capacidad antioxidante total mediante el método de inhibición del radical libre 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)</i> | 31 |
| 7.3 | VALIDACIÓN ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS: ... | 32 |
| 7.3.1 | <i>Ensayos en medio sólido</i> | 32 |
| 7.3.2 | <i>Ensayos en medio líquido</i> | 33 |
| 8. | CONCLUSIONES: | 35 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA:..... | 37 |

AGRADECIMIENTOS:

Quisiera dedicar este trabajo de fin de grado a todas las personas que me han ayudado en la realización del mismo. Es por ello que en las siguientes líneas les quiero mostrar mi más sincero agradecimiento.

A la **Dra. Dña. Rosa Oria Almudí**, co-directora de este trabajo, catedrática del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, por guiar, estructurar y orientar la investigación del trabajo desde el inicio. Gracias por brindarme la oportunidad de trabajar dentro de este proyecto con el cual he conseguido realizar este trabajo de fin de grado.

De igual forma agradecer a la **Dra. Dña. Sara Remón Oliver**, co-directora de este trabajo, profesora asociada del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, por guiarme durante el proceso de elaboración del trabajo, estructurar la investigación, corregir las imprecisiones a la hora de la elaboración de la memoria y confiar en mí para la realización de la misma.

Agradecer especialmente a **D. David Gimeno Martínez**, investigador predoctoral del Área de Tecnología de los Alimentos y Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, por guiarme a lo largo de todo el proceso, resolver mis dudas en el laboratorio y durante la elaboración de la memoria y por seguir la evolución del trabajo desde los inicios hasta su fin.

A todos los miembros del **Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal**, en especial a Ana Pilar y a Silvia, por animarme durante los ensayos y hacer que el ambiente durante la investigación fuera tan acogedor.

Gracias por todo el tiempo que habéis invertido junto a mí en la realización de este trabajo. Gracias de corazón.

1. ANTECEDENTES:

Este Trabajo Fin de Grado (TFG) se encuadra dentro del proyecto del Plan de Desarrollo Rural del Gobierno de Aragón “Grupo Cooperación INNOGRANA”.

Este proyecto se desarrolla en Alcolea de Cinca (Huesca), enclavada a 185 metros sobre el nivel del mar, en el Valle del Ebro. Perteneciente a la comarca del Cinca Medio limita al oeste con Los Monegros, y se encuentra en entre los cursos de los Ríos Cinca y Alcanadre. Esta zona entre el Cinca y el Alcanadre forma parte de la Red Natura 2000. La economía de la localidad se basa principalmente en la actividad agrícola y ganadera.

El cultivo predominante de la zona es el arroz debido a que los suelos son altamente salinos y pobres, como sucede en muchas zonas de Los Monegros. La superficie de arroz se está reduciendo drásticamente año a año, principalmente por los costes del agua de riego (es el cultivo con mayor consumo de agua por hectárea), así como por la reducción en la rentabilidad.

Este proyecto nace de la necesidad de buscar alternativas a los cultivos que se dan en la zona del Cinca Medio que limita con Los Monegros, o zonas similares, ya que la mayoría de ellos son ineficientes en el aprovechamiento de los recursos hídricos y, además, cada día menos rentables económicamente para los productores. Los periodos de sequías cada vez son más frecuentes debido al cambio climático, por lo que muchos de estos cultivos sufren limitaciones durante estos periodos con las consiguientes pérdidas. Con un ahorro de agua y utilizando cultivos menos exigentes en riego y adaptados a suelos salinos y pobres se podría luchar contra el proceso de desertización que acucia, tanto al Valle del Ebro, como a otras partes de la Península Ibérica.

Por otro lado, hay una demanda creciente por parte de la sociedad de tomar alimentos saludables, principalmente aquellos con altos contenidos en antioxidantes. Además, esa tendencia creciente exige que estos alimentos sean lo más ecológicos y sostenibles con el medio ambiente posible.

La granada constituye un cultivo que cumpliría tanto los requisitos edafo-climáticos (adaptación a suelos áridos y cambio climático) como los requisitos de consumo (fruto rojo clasificado como superalimento por sus beneficios nutricionales).

Por tanto, el **objetivo del grupo cooperación Innograna es reducir el consumo de agua de riego del cultivo del granado**. Para ello se plantean los siguientes objetivos técnicos:

- Adaptación agronómica del cultivo en zonas áridas y con bajo riego. Para ello se ensayarán distintos tipos de mallas agrícolas (color, porcentaje de sombreado, resistencia mecánica).
- Producción de una granada de alta calidad comercial y nutricional. Gracias a las mallas se espera aumentar tanto el contenido en azúcares como el de antioxidantes de las granadas.
- Reducir el consumo de fitosanitarios para conseguir una fruta “residuo cero”.
- Promover el incremento de la rentabilidad de las explotaciones de la zona mediante un cultivo y uso alternativo y sostenible.

En este proyecto participan tres entidades privadas, además del Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Vegetales de la Universidad de Zaragoza. **Las tareas asociadas a la Universidad serán las relacionadas con la validación de la calidad de fruto, determinación del carácter diferencial y búsqueda de la sostenibilidad de los procesos.**

2. RESUMEN:

En la última década han aumentado considerablemente los estudios científicos sobre la actividad antioxidante, constituyentes bioactivos y propiedades farmacológicas de la granada. Esto ha provocado un incremento de la producción y valor de mercado debido a la popularidad de sus características saludables y a la gran adaptación del cultivo a todo tipo de suelos y climas. Se trata de un cultivo tolerante a la sequía, a la salinidad, a la clorosis férrica y a la caliza activa; es decir, es capaz de vegetar en las peores condiciones de cultivo. En este trabajo se caracterizaron comercialmente dos variedades de granada (*Punica granatum* L.), shany y emek, producidas por primera vez en la zona de los Monegros, y se determinaron las actividades antioxidantes tanto de los arilos como de la piel. Paralelamente, se ha investigado en la revalorización de residuos del procesado de la granada, realizando una extracción de los compuestos antioxidantes de la piel y validando su uso como antimicrobianos y antifúngicos. Tras la realización de este trabajo, se puede afirmar que los extractos de la piel de las variedades shany y

emek presentan actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazaki*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* y *Candida santamariae*.

3. ABSTRACT:

In the last decade, scientific studies on antioxidant activity, bioactive compounds and pharmacological properties of pomegranate have increased considerably. It has caused an increase in production and market value due to the popularity of its healthy characteristics and the great adaptation of the crop to all types of soils and climates. It is a drought, salinity, ferric chlorosis and active limestone tolerant crop; that is, it is capable of flourishing under the worst growing conditions. In this work, two varieties of pomegranate (*Punica granatum* L.), shany and emek, produced for the first time in the Monegros area, were commercially characterized. In addition, the antioxidant activity of both arils and skin was determined. At the same time, the revaluation of pomegranate processing residues was investigated, extracting the antioxidant compounds from the skin and validating their antimicrobial and antifungal features. After carrying out this work, it can be affirmed that the extracts of the skin of both varieties show antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazaki*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* and *Candida santamariae*.

4. INTRODUCCIÓN:

4.1 PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE FRUTAS:

El volumen de producción mundial de frutas y hortalizas en el año 2016 supuso un total de 1.941 millones de toneladas, situándose España en el quinto país con mayor producción por detrás de China, India, Estados Unidos y Turquía (FAOSTAT, 2016). En lo que respecta a Europa, España es el primer país en volumen de producción de frutas y hortalizas con el 25% del total (EUROSTAT, 2019). En el año 2017, se produjeron en España 28 millones de toneladas de productos hortofrutícolas, de las cuales 11 millones correspondían a frutas y frutos con cáscara (MAPA, 2017). Dentro de España, Aragón se coloca en la novena posición de las comunidades autónomas con mayor volumen de producción con un 2% del volumen total nacional (MAPA, 2017).

Según el último informe realizado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación o MAPA (2018), el consumo de fruta fresca en España alcanza un valor de 4,14 millones de toneladas en el periodo de enero a diciembre de 2018, lo que supuso unos ingresos de 6,38 mil millones de euros. Sin embargo, este consumo ha disminuido en un 1,8% en comparación al mismo periodo en el año anterior. Durante el año 2018, el consumo de fruta fresca per cápita fue de 90,49 kg, un 2,1% menos que el año anterior.

A pesar de apreciarse una disminución en el consumo de fruta fresca, el consumo de granada ha aumentado en un 20% en los últimos años debido a su expansión geográfica, al crecimiento experimentado por el turismo y al progreso de las técnicas de conservación y envasado de las mismas (Font, 2017). Además, la preocupación por la dieta y la salud en Europa ha aumentado, lo que ha permitido que estos productos hortofrutícolas encuentren una oportunidad para crecer en el mercado debido a sus características nutricionales.

Se calcula que la producción de granada supera los 3 millones de toneladas, concentrándose el 90% de su producción en Irán, India y China (Font, 2017). España es uno de los principales países productores de granada, siendo el primer país exportador en la Unión Europea. En el año 2018, se estima que se produjeron en torno a las 76.000 T (MAPA, 2018), de las cuales el 60% fueron destinadas al comercio exterior.

4.2 TRANSFORMACIÓN DE FRUTAS: SUBPRODUCTOS GENERADOS:

A pesar de que la fruta se compre principalmente en fresco, existen otras alternativas como la fruta transformada. En la categoría de productos, se engloban: la fruta deshidratada, la congelada, las conservas (escarchada, en almíbar y en mermelada), los zumos y la fruta en IV gama. Muchas de las frutas exóticas, entre ellas la granada, se venden como componente de las macedonias preparadas en IV gama. Esta categoría de productos ha ganado gran presencia en los hogares españoles, apreciándose un aumento del volumen de consumo del 135,5% con respecto al año anterior (MAPA, 2018). Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2018), cabe destacar que el gasto per cápita que destina el consumidor a este sector ha crecido, no por el precio medio (de 1,67 €/kg en el año 2018, un 7,6% menos que el año anterior), sino por el consumo per cápita (4,23 kg por persona en el año 2018, un 134,6% más que en 2017).

Para la producción de estos formatos, es necesario procesar las frutas. En estas etapas, se pelan, se deshuesan, se descascarillan y se trocean para poder adaptarlas a sus distintas formas de presentación, generando gran cantidad de residuos. Es por ello que muchos autores defienden la idea de que es necesario un cambio en la estrategia de gestión de estos residuos y **subproductos** para reaprovecharlos y reducirlos (Godfray y Garnett, 2014; De Laurentiis, Corrado y Sala, 2018).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estimó en 2011 que en torno a un tercio de la producción mundial de alimentos destinados para consumo humano se desperdiciaban, representando una importante pérdida de recursos para el sector. Más concretamente, en Europa, se calcula que unos 173 kg/persona/año de alimentos se pierden en las cadenas alimentarias, 21 de los cuales se generan durante la producción (principalmente **subproductos**) y 92 en los hogares (Stenmarck, Jensen, Queded y Moates, 2016). De acuerdo con un estudio realizado por Vanham et al. (2015), el 63% de los residuos producidos correspondían a frutas y hortalizas.

En el sector hortofrutícola, los **subproductos** pueden ser de distinta naturaleza, principalmente piel, cáscaras, huesos y restos de pulpa que en algunos casos pueden suponer en torno al 30% del peso total del fruto o incluso alrededor del 40-45% en el caso de la granada (Roy y Waskar, 1997).

4.3 LA GRANADA Y SUS SUBPRODUCTOS:

La **granada** (*Punica granatum* L.) es un pequeño arbusto originario de Oriente Medio y cuyo cultivo se ha extendido a países mediterráneos, China, India, Sudáfrica y América (Endo et al., 2010) debido a su gran versatilidad de cultivo, originando gran cantidad de genotipos locales adaptados a las distintas climatologías y requerimientos nutricionales del suelo (Ferrara et al., 2014). Es una fruta que se consume principalmente en fresco, pero también se puede encontrar en otros formatos como en mermeladas, gelatinas, en zumos o en cuarta gama lista para consumir (Pareek, Valero y Serrano, 2015). Lo más característico de este fruto son sus altas capacidades antioxidantes (Seeram et al., 2008). El zumo de granada posee tres veces más compuestos antioxidantes que el vino tinto o el té verde (Gil et al., 2000). Sin embargo, en torno al 40-50% del peso total de la fruta corresponde a la piel (Gullon, Pintado y Viuda-Matos, 2016) y a las membranas que recubren los arilos.

Debido a su alto contenido en flavonoides, fenoles y vitamina C su cultivo se ha incrementado en los últimos años. Sin embargo, las diferentes variedades (se conocen en torno a 500 genotipos distintos) y las características edafoclimáticas del cultivo condicionan su calidad comercial y nutricional siendo necesario un estudio específico para cada variedad y zona de cultivo.

Mundialmente, la variedad wonderful es de la que más se comercializa y se está introduciendo en programas de mejora genética para sacar al mercado variedades más rentables. De uno de estos programas, en Israel, aparecen dos variedades interesantes: shany y emek, que son más productivas y presentan distintas fechas de recolección que la variedad de partida. Estas dos variedades se caracterizan por poseer una coloración exterior roja brillante, corona grande, arilos jugosos, de acidez baja y con alto rendimiento de zumo (73-76 cm³ zumo/100 g arilos). En el mercado mundial se engloban dentro de las variedades “dulces”.

A la hora de la recolección y clasificación de las granadas de la variedad wonderful y sus genotipos, se aseguran de que los frutos cumplan con los siguientes patrones de calidad: frutos de calibre medio-grande, corona alargada, color externo rojo y ausencia de mohos y/o fitopatologías. Además, se caracterizan por poseer arilos con un color rojo intenso, pequeños, de sabor ácido y el piñón semiduro (Hernández y Martínez, 2010).

La piel de la granada corresponde en torno al 50-55% del peso del fruto entero y se desecha sin ninguna revalorización económica (Alexandre et al., 2018). Sin embargo, estudios previos señalan el gran potencial de utilizar este subproducto para la obtención de **compuestos bioactivos** (Kharchoufi et al., 2018), útiles frente a distintos agentes microbianos de interés alimentario.

4.4 COMPUESTOS DE INTERÉS PRESENTES EN LA GRANADA Y SUS PROPIEDADES BIOACTIVAS:

La oxidación es una de las reacciones químicas que más afecta a los alimentos, alterando sus cualidades organolépticas y reduciendo sus valores nutricionales y vida útil (Shahram y Taghian Dinani, 2019). Como una solución, la industria alimentaria sintetiza de forma artificial compuestos antioxidantes que incorpora en las formulaciones de los distintos alimentos. Sin embargo, existen estudios de que alguno de estos antioxidantes podría ser peligroso para la salud de los consumidores

(Boukroufa et al., 2015). A estos problemas, se suma la demanda por parte del consumidor por alimentos con etiquetas limpias que no incluyan conservantes o aditivos de origen químico, por lo que se está comenzando a optar por el uso de otros de origen natural.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en las plantas que se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más radicales hidroxilo. La aptitud más destacable de estos compuestos es su alta **capacidad antioxidante**, que depende en gran medida de sus propiedades regenerativas y su estructura química, lo que les habilita para neutralizar radicales libres, formar complejos con iones metálicos y unirse a moléculas de oxígeno singletes y de ozono (Shahram y Taghian Dinani, 2019). Se sabe que la granada posee una capacidad antioxidante tres veces mayor que la que presentan el vino tinto o el té verde (Gil et al., 2000), y dos, seis y ocho veces más que las uvas, el pomelo y el zumo de naranja (Rosenblat y Aviram, 2006).

Entre las distintas sustancias presentes en la piel de las granadas, caben destacar cuatro grandes grupos de compuestos: flavonoides (principalmente antocianos), taninos, ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos (Fischer, Carle y Kammener, 2011), todos ellos con grandes beneficios potencialmente terapéuticos y biológicos, que incluyen: poder antimicrobiano, anticancerígeno, antidiabético, antimutagénico, antidiabético... (Zhu y Liu, 2013), haciendo de la piel de la granada una auténtica fuente de bioactivos.

El ácido gálico, elálgico, cafeico, p-cumárico, la quercetina y el ácido vanílico son los compuestos fenólicos que se concentran en mayor cantidad en la piel de estos frutos, los cuales presentan una capacidad antimicrobiana demostrada siguiendo el método de discos en placa frente a microorganismos de importancia alimentaria como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o *Enterococcus faecalis* (Mansour et al., 2013).

5. OBJETIVO Y DISEÑO EXPERIMENTAL:

5.1 OBJETIVO:

Los objetivos del proyecto son los siguientes

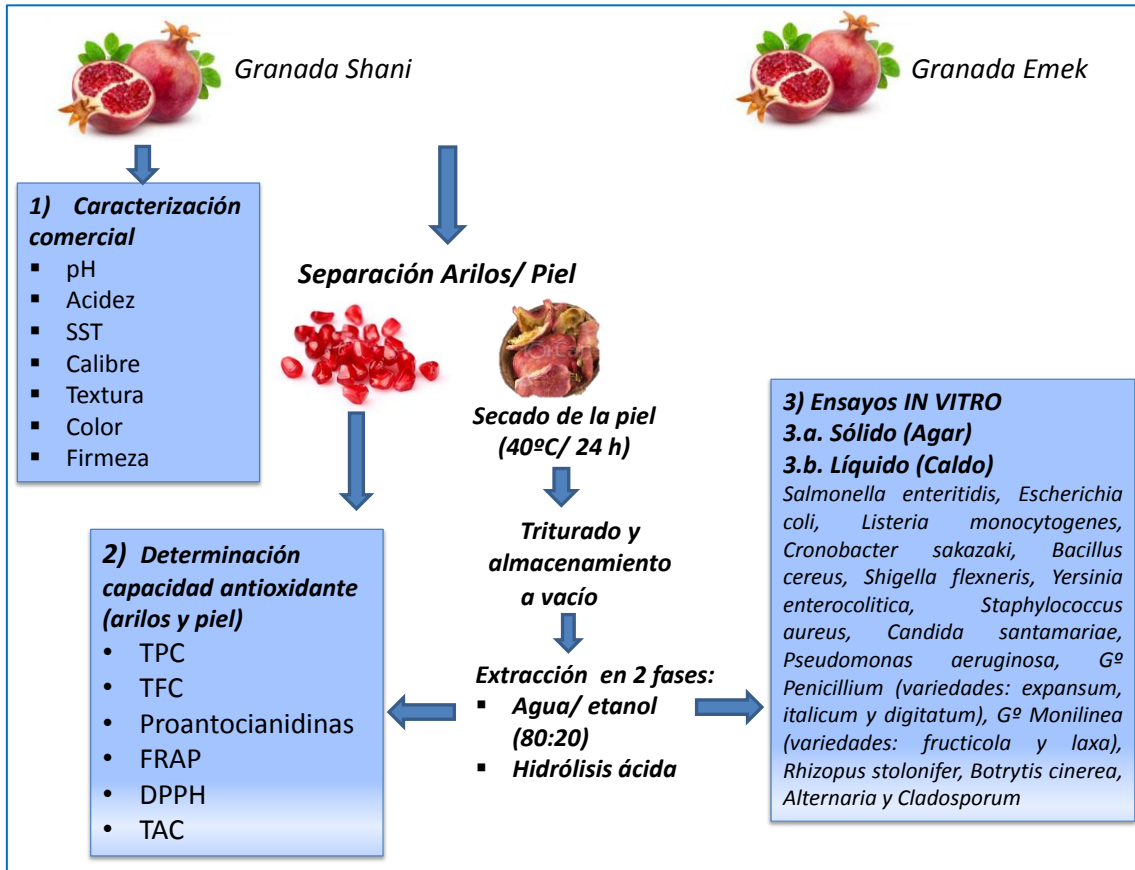
- Caracterizar los parámetros principales de la calidad de dos variedades de granada (shany y emek), y su valor diferencial, que vendrá correlacionado con el contenido en compuestos de interés funcional y tecnológico tanto de los arilos como de la piel.
- Investigar el potencial de los extractos de piel de granada de las variedades shany y emek como fuente de compuestos bioactivos para su utilización en la industria alimentaria.

De estos objetivos principales, derivan los siguientes objetivos parciales:

- Caracterización de la calidad comercial de dos variedades de (shany y emek) cultivada en zonas áridas, y determinación de su valor diferencial.
- Caracterización de los compuestos antioxidantes tanto de los arilos como de la piel de ambas variedades.
- Aprovechamiento de los subproductos a través de la puesta a punto de un método de extracción de los compuestos antioxidantes de la piel de la granada.
- Validación de la capacidad antimicrobiana y antifúngica de los extractos obtenidos frente a patógenos o agentes alterantes mediante en test *in vitro*.

5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL:

Para la consecución de todos los objetivos, se planteó el siguiente diseño experimental:



Como se muestra en el esquema experimental, el primer paso fue caracterizar comercialmente la granada midiéndose: calibre, peso y color de los frutos; pH, acidez, sólidos solubles totales (SST), color (tanto de zumos como de arilos) firmeza y análisis sensorial de los arilos.

Posteriormente, se pelaron los frutos y se separaron los arilos de la piel. La piel se secó, se trituro y se almacenó hasta su análisis. Se analizaron el contenido de fenoles totales, de flavonoides, la concentración de proantocianidinas, el contenido de antocianos, y la capacidad antioxidante mediante el método de reducción férrica (FRAP) y mediante el método de inhibición del radical libre 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) tanto en los arilos frescos como en la piel deshidratada.

Una vez determinada la actividad antioxidante de la piel, se extractaron los compuestos de interés en dos fases (la primera, por etanol:agua, y la segunda, por hidrólisis ácida).

Finalmente, se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad antimicrobiana y antifúngica de los distintos extractos frente a 19 agentes microbianos de interés agroalimentario.

6. MATERIALES Y MÉTODOS:

6.1 MATERIAL VEGETAL:

Para este Trabajo de Fin de Grado, se utilizaron dos variedades de granada (*Punica granatum* L.), emek y shany. Ambos productos proceden de explotaciones agrícolas situadas en la zona de los Monegros del agricultor Manuel Fortón.



Figura 1: Variedad shany

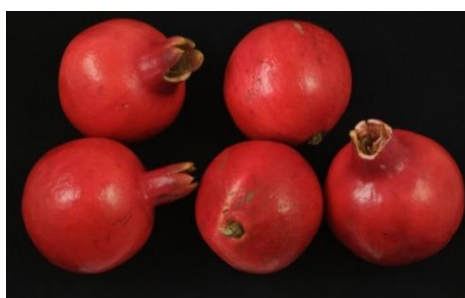


Figura 2: Variedad emek

Antes de comenzar los análisis pertinentes, se higienizaron los frutos sumergiéndolos en una disolución de 200 ppm de hipoclorito sódico durante 5 min, y se aclararon con agua destilada. Posteriormente, se pelaron para separar la piel de los arilos. Por un lado, los arilos se congelaron con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -25 °C hasta su análisis. La piel se troceó y se secó en la estufa a 45°C (Sandhya et al., 2018) durante 24 h hasta alcanzar una humedad del 28'5%. Se trituraron hasta alcanzar una apariencia pulverulenta y se almacenaron a vacío a 25°C.

6.2 REACTIVOS:

Los principales reactivos empleados en este trabajo han sido:

Carbonato de sodio (NaCO_3), nitrito de sodio (NaNO_2), cloruro de aluminio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), metanol y etanol (Panreac Química S.L.U., Barcelona); el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhirazil (DPPH), 2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ), y el ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox) (Sigma-Aldrich,

Steinheim); el reactivo Folin-Ciocalteu (Merck KGaA, Darmstadt), y patrones de calibración: ácido gálico y catequina (Sigma-Aldrich, Steinheim).

6.3 CARACTERIZACIÓN COMERCIAL DE LA GRANADA:

6.3.1 *Calibre y peso de los frutos.*

Para medir el calibre, se utilizó un pie de rey digital (Absolute AOS DIGIMATIC, Mitutoyo) para medir tanto el diámetro transversal como longitudinal de cada fruto y se calculó la media y la desviación de cada una de las variedades estudiadas. Se midieron 10 frutos de la variedad shany y 14 de variedad emek.

Además, cada fruto se pesó antes y después del pelado y se calculó el rendimiento del producto a través de la siguiente fórmula:

$$4AJE@EAJPK :'' ; L \frac{2AOK@ HK\Theta NEHKO}{2AOK@H BNQPKJPANK} H srr$$

6.3.2 *Análisis del color.*

Para caracterizar los frutos de forma externa, se midió el color de 10 fruto entero de cada variedad con un colorímetro triestímulo (Konica Minolta, Chroma meter CR-400), del que se obtuvieron tres parámetros que se relacionan con la percepción del color tal y como se produce en el cerebro humano. Este sistema de determinación del color es el espacio CIELAB y define tres magnitudes: claridad o luminosidad (L^*), croma o saturación (C^*) y tono o color (h^*). El equipo requiere una calibración del blanco con un patrón de cerámica antes de ser utilizado. Se tomaron tres medidas de cada fruto y se obtuvieron los valores de las coordenadas de color de la Commision Internacionationale de l'Eclairage (CIE): tonos amarillos (b^{*+}), azules (b^{*-}), rojizos (a^{*+}) o verdes (a^{*-}), luminosidad (L^*), tono (h^*) y croma (C^*).

Tanto los arilos como sus zumos se analizaron mediante un escáner HP SCanjetG4010 con resolución 1200 ppp. Por cada muestra de zumo se colocó una placa de Petri con 25 mL del zumo y se analizaron mediante el software Matrox Inspector 8.0. En el caso de los arilos, se partieron los frutos a la mitad y se escaneó una mitad por fruto (en total se midieron 6 frutos por variedad). Mediante la selección de un ROI (Región Óptica de Interés) en las imágenes escaneadas de cada una de las muestras, se

obtuvieron las coordenadas promedio R, G, B, tomando dos réplicas por muestra. Estas coordenadas fueron utilizadas para calcular el espacio CIELAB. El cálculo se realizó a partir de las fórmulas de conversión calibradas con 300 muestras de la Norma UNE de color (UNE 48-103-94, AENOR 1994).

6.3.3 Firmeza de los arilos.

Para su determinación se realizó un test de punción de los arilos con el texturómetro (Stable Micro Systems, TA-TX plus) con la sonda P/2N en 25 réplicas de cada variedad. El test se realizó a una velocidad de 0'5 mm/s hasta una profundidad de 1,5 mm en el arilo para medir la firmeza y elasticidad de la pulpa (Szychowski et al., 2015). Los resultados se expresaron en g y mm, respectivamente.

También se realizó un test de compresión a los arilos con 25 réplicas por variedad a una velocidad de 0'5mm/s con una sonda cilíndrica de 2 cm de diámetro. En este ensayo se midió la resistencia a la deformación y se expresó en kg (Szychowski et al., 2015).

6.3.4 pH y acidez.

Para la medida del pH y acidez de las muestras se utilizó un titulador automático (Compact Titrator, Crison). Para ello, se tomaron cinco frutos al azar de cada variedad y se transformaron en zumo. Ambas determinaciones se realizaron sobre 100mL de zumo diluido 1/10. Los análisis se realizaron por triplicado, y los resultados se expresaron en g ácido cítrico/L, el ácido orgánico mayoritario en estos frutos (Ferrara, et al., 2014).

6.3.5 Sólidos solubles totales (SST).

Los sólidos solubles totales presentes en el zumo se determinaron por refractometría, expresando los resultados en °Brix a 20°C (Ferrara, et al., 2014). Se utilizó el mismo zumo que en el apartado anterior. Se midieron las muestras por triplicado utilizando un refractómetro automático (DBX-55A, Atago).

6.3.6 Análisis sensorial de los arilos.

A un panel de cinco catadores se les dieron a probar cinco arilos tomados de forma aleatoria de cada variedad. Se les pidió que evaluaran los siguientes atributos de forma hedónica en una escala del 1 al 9: intensidad de color rojo, intensidad de aroma,

firmeza, jugosidad, intensidad de sabor, acidez, dulzor, astringencia, amargor y aceptación global. Cada muestra se codificó con tres dígitos elegidos al azar.

FICHA DE CATA DE LA GRANADA VARIEDADES SHANI Y EMEK

Fecha de realización: 31/10/2018

Atributos a valorar:

Color

1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9

Intensidad de aroma

1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9

Firmeza

1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9

Jugosidad

1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9

Intensidad de sabor

1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9

Acidez

1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9

Dulzor

1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9

Astringencia

1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9

Amargor

1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9

Aceptación global

1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9

6.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE LA PIEL Y DE LOS ARILOS:

6.4.1 Extracción de los compuestos fenólicos a estudiar.

La extracción se llevó a cabo por triplicado, pesando aproximadamente 3 g tanto de los arilos como de las pieles secas de las distintas variedades. Se colocaron en tubos Falcon de 50 mL y se añadieron 10 mL de una mezcla de etanol y agua (80:20, v:v). Se homogeneizaron las muestras con la ayuda de un ultraturrax (IKA-W) durante 30 s y se llevaron a centrifugar a 4000 rpm durante 15 min a 4°C. De

esta forma se obtuvieron los **compuestos fenólicos libres**. Estos sobrenadantes se filtraron por 0,45 µm y se guardaron a -18°C en tubos Falcon de 15 mL hasta su posterior utilización.

A los pellets resultantes de la etapa anterior, se les añadió 10 mL de metanol acidificado con HCl (1 N) al 10% y se homogeneizaron durante 30 s. Se incubaron las muestras a 85°C durante 60 min en el baño termostático y posteriormente se enfriaron en hielo. Se llevaron a centrifugar a 4000 rpm 15 min a 4°C. Se combinaron los sobrenadantes en matraces de vidrio y se llevaron al rotavapor para evaporarlos hasta sequedad a 35°C. Se recuperaron los depósitos con la mezcla de etanol al 80% y se llevaron a un volumen final de 25 mL. Se trasvasaron a tubos Falcon de 50 mL y se filtraron por 0,45 µm. Se guardaron a una temperatura de -18 °C hasta su uso. Tras esta fase, se obtuvieron **compuestos fenólicos no extraíbles** (Pérez-Jiménez et al., 2008; Newsome, Li y van Breemen, 2016; Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2018; Pérez-Ramírez et al., 2018).

Los extractos obtenidos en ambas etapas se sometieron a los análisis de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante que se detallan más adelante.

6.4.2 Determinación de proantocianidinas.

Los pellets obtenidos en la extracción anterior se llevaron a una estufa a 50°C durante 1 h. Una vez secos, se pesan entre 1 y 1,5 g de los respectivos pellets en tubos pyrex roscados y se añaden 5 mL de butanol acidificado con HCl al 37% (95:5, v:v) y 0,07% de FeCl₃. Se homogeneizan en el rotatubos y se llevan al termoblock a 100°C durante 1 h con agitación periódica. Una vez terminado el tratamiento, se enrasan en un volumen final de 10 mL con la mezcla de butanol y se mide su absorbancia a 530 nm. Así se obtendrá el contenido total de **proantocianidinas no extraíbles** (Dekazos, 1970; Pérez-Ramírez et al., 2018).

6.4.3 Determinación de los compuestos fenólicos totales (TPC).

En tubos de ensayo (Labbox) se colocaron 0,5 mL de cada extracto a los que se añadieron 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. A continuación, se añadieron otros 0,5 mL de carbonato de sodio al 7,5%, y seguidamente 7 mL de agua destilada. Tras 60

minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se determinó la absorbancia de la muestra a 760 nm utilizando un espectrofotómetro (Unicam, Waltham). Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por 100 g de peso seco, considerando que es el fenol principal en todas las frutas (Singleton y Rossi, 1965).

La curva patrón se obtuvo a partir de soluciones estándar de ácido gálico (0-250 mg/l) preparadas en matraces de 10 mL (Labbox) que fueron sometidas al mismo proceso que las muestras para determinar su absorbancia.

6.4.4 Determinación de flavonoides totales (TFC).

Para la determinación de los flavonoides totales, a 0,5 mL de extracto o solución estándar con concentraciones crecientes de catequina (0-150 mg/l) se añadieron 0,1 mL de nitrito de sodio al 5%. Transcurridos 5 minutos, se adicionaron 0,1 mL de AlCl₃ al 10%, y tras otro minuto se mezcló con 0,6 mL de NaOH 1 M. Por último, se midió la absorbancia de la mezcla a 510 nm y tras realizar los cálculos se expresó el contenido en flavonoides como mg de catequina en 100 g de peso seco (Iacopini, Camangi, Stefani y Sebastiani, 2010).

6.4.5 Determinación del contenido de antocianos totales (TAC).

Se trituraron tres réplicas de cada variedad (de 3 g cada una) en tubos Falcon de 50 mL. Se añaden 10 mL de metanol acidificado al 1% con HCl al 0,5 N+0,1 g de ácido ascórbico y se homogeneizan durante 30 s. Se maceraron los extractos en frío durante 5 min. Se filtraron a vacío, se re-extrajeron tres veces los residuos con 5 mL de metanol acidificado y se filtró a vacío tras cada extracción. Se enrasaron finalmente a 25 mL con metanol acidificado. Para medir la concentración de antocianos, se presupone que el mayoritario es la cianidina 3-O-glucósido, por lo que se miden las muestras a 525 nm. El resultado se expresa en mg de antocianos/100 g de peso fresco (Dekazos, 1970).

6.4.6 Determinación de la capacidad antioxidante total mediante el método de reducción férrica (FRAP).

Se desarrolló un procedimiento de trabajo que consistía en añadir 900 µl de reactivo FRAP junto con 120 µl de muestra en cubetas de espectrofotometría, y medir la absorbancia de la mezcla a 595 nm, tras ser incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente (Thaipong et al., 2006).

El reactivo FRAP estaba formado por tampón acetato, TPTZ y $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en proporción 10:1:1 (v:v:v). Se prepararon disolviendo: 0,1562 g de TPTZ en 2 mL de ácido clorhídrico y enrasando con agua hasta 50 mL, 0,2703 g de cloruro férrico en agua con ayuda de 1 mL de HCl en 50 mL, y 3,1 g de acetato de sodio trihidratado en 16 mL de ácido acético glacial y enrasando con agua hasta 1000 mL.

Para determinar las concentraciones finales de antioxidantes de las muestras se preparó una curva patrón de Trolox. Para ello, se partió de 50 mL de una solución madre (1000 μM en etanol:agua (80:20, v:v)). En la tabla 1 aparecen las distintas concentraciones usadas para realizar la curva de calibrado a partir de esta solución madre.

| Concentración (μM) | mL solución madre de Trolox | mL etanol:agua (80:20, v:v) |
|---|------------------------------------|------------------------------------|
| 1000 | 10 | 0 |
| 500 | 5 | 5 |
| 250 | 2'5 | 7'5 |
| 200 | 2 | 8 |
| 150 | 1'5 | 8'5 |
| 100 | 1 | 9 |
| 50 | 0'5 | 9'5 |
| 0 | 0 | 10 |

Tabla 1: Diluciones realizadas para la curva de calibrado empleada en el método FRAP de determinación de la capacidad antioxidante.

6.4.7 Determinación de la capacidad antioxidante total mediante el método de inhibición del radical libre 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

Se mezclaron 900 μl de los extractos fenólicos (en una dilución de 1/100), en la correspondiente dilución (tabla 4), en cubetas de espectrofotometría (Sarstedt Ag & Co.) junto con 900 μl de solución de radical libre DPPH preparada con anterioridad pesando 0,0131 g (Mettler Toledo, Greifensee) en un volumen total de 250 mL de etanol. Se agitó la mezcla y se incubó durante dos horas y media en oscuridad para que

se desarrollase totalmente el color y medir la absorbancia a 515 nm (Llorach et al., 2004).

| DILUCIONES | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Muestra/ punto (µL) | 900 | 450 | 225 | 110 | 60 | 30 | 15 |
| EtOH:H₂O (µL) | - | 450 | 675 | 790 | 840 | 870 | 885 |
| DPPH (µL) | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 |

Tabla 2: Volúmenes a añadir en sus respectivas cubetas de espectrofotometría.

La curva patrón se preparó a partir de una solución madre de Trolox en etanol, que se diluyó 1/100 en etanol:agua al 80%. A partir de esta solución de trabajo se realizaron diluciones seriadas desde 0 hasta 60 µM, a las que se añadieron 900 µl de DPPH para obtener la curva de calibrado tras el periodo de incubación.

6.5 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PARA ENSAYOS ANTIMICROBIANOS:

La extracción se llevó a cabo tal y como se explica en el apartado 2.2.2.1. Una vez terminadas las extracciones de los compuestos fenólicos libres y de los compuestos fenólicos no extraíbles, se combinaron ambos extractos y se guardaron a -18°C hasta su utilización. Posteriormente, los extractos se purificaron dos veces con 30 mL de hexano para eliminar sustancias coextraídas que no son de interés. Finalmente, se llevaron al rotavapor y se evaporaron hasta sequedad a 35°C. Para recuperar los residuos, se utilizó una mezcla de etanol:agua al 3% y Tween 20, para obtener una concentración stock de 300 mg de extracto seco/mL (Kharchoufi et al, 2018).

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos y determinar su concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), se obtuvieron diluciones seriadas de la solución stock (75, 100, 150, 200, 225, y 250 mg/mL).

Antes de su utilización, se hicieron pasar las distintas diluciones por filtros estériles de 0,20 µm y se almacenaron en refrigeración en viales de plástico (Eppendorf), también estériles.

6.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS DE PIEL DE GRANADA:

En la tabla 3 se detallan las especies microbianas frente a las que se testó la eficacia inhibitoria de los extractos de piel de granada. Las bacterias pertenecen a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y fueron elegidas por tratarse de patógenos de interés alimentario. En el caso de los mohos pertenecen al cepario del Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal (GIAOVE) y fueron aislados de distintos frutos por su interés como fitopatógenos y posteriormente identificados por técnicas moleculares. Las distintas cepas, conservadas en crioviales, se revivificaron incubándolas en caldo TSB a 30°C, o a 37°C en el caso de *P. aeruginosa*, durante 24 h, y en caldo PDB a 25°C durante 7 días en el caso de los mohos.

Para realizar el ensayo se estandarizó la concentración de *C. santamariae* y de las bacterias a 10⁵ UFC/mL, mientras que las soluciones de esporas de los mohos se hicieron pasar por gasas estériles para retener los micelios y estandarizar los inóculos a 10⁴ esporas/mL.

Tabla 3: Microorganismos utilizados para los ensayos de inhibición los extractos de la piel de granada

| | |
|--|---|
| <i>Salmonella enteritidis</i> CECT 4155 | <i>Escherichia coli</i> CECT 516 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935 | <i>Alternaria</i> sp. |
| <i>Shigella flexneri</i> CECT 585 | <i>Cronobacter sakazaki</i> CECT 858 |
| <i>Bacillus cereus</i> CECT 131 | <i>Cladosporium</i> sp. |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 8739 | <i>Candida santamariae</i> |
| G° <i>Penicillium</i> (<i>expansum</i> , <i>digitatum</i> , <i>italicum</i>) | G° <i>Monilinia</i> (<i>laxa</i> , <i>fructicola</i>) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> CECT 435 | <i>Botrytis cinerea</i> |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> CECT 4055 | <i>Rhizopus stolonifer</i> |

6.6.1 Ensayos en medio sólido

Para realizar los ensayos se utilizó agar Müeller-Hinton o PDA en función de los microorganismos empleados. La levadura y las bacterias se sembraron en césped por toda la superficie de la placa con hisopos estériles, mientras que los mohos se inocularon con un pincho de siembra en el centro de la placa tras haber sido introducido en la solución de esporas estandarizada.

Tras la siembra, se colocaron 4 discos estériles de celulosa de 6 mm por placa y se inocularon, por triplicado, 10 μ L de la concentración correspondiente (75, 150 o 300 mg extracto seco/mL) en tres de los discos. En el cuarto disco, se inocularon 10 μ L de etanol:agua al 3% con Tween 20, como control. Las placas se voltearon y se llevaron a estufas de incubación a 30°C durante 24 h, excepto las de *P. aeruginosa*, que se llevaron a 37°C durante 24 h, y los mohos que se llevaron a estufas de incubación a 25°C durante 7 días.

Pasados los tiempos de incubación, se midió el diámetro de inhibición de los distintos extractos con el pie de rey (Absolute AOS DIGIMATIC, Mitutoya), teniendo en cuenta el diámetro del botón de celulosa.

6.6.2 Ensayos en medio líquido.

Los ensayos en medio líquido se llevaron a cabo en placas de 48 pocillos estériles en los que se inocularon 350 μ L de caldo de cultivo, 200 μ L de la concentración correspondiente y 50 μ L del microorganismo a estudiar según el esquema que se explica en la figura 6. Los pocillos 1A y 1B fueron réplicas del blanco (solvente), 2A-8A y 2B-8B contenían los controles negativos (extracto de cada variedad a la concentración correspondiente) para comprobar que no había crecimiento microbiano, y 1C-1F fueron los controles positivos del microorganismo estudiado en cada una de las filas.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|-----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | (B) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| B | (B) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| C | (+) | (75) | (100) | (150) | (200) | (225) | (250) | (300) |
| D | (+) | (75) | (100) | (150) | (200) | (225) | (250) | (300) |
| E | (+) | (75) | (100) | (150) | (200) | (225) | (250) | (300) |
| F | (+) | (75) | (100) | (150) | (200) | (225) | (250) | (300) |

Figura 3: Esquema tipo de las placas de 48 pocillos para los ensayos de inhibición de los extractos de la piel de las variedades shany y emek. B: blanco (solvente del extracto más caldo de cultivo), control positivo (+): caldo de cultivo más microorganismo a estudiar, control negativo (-): caldo de cultivo más extracto a la concentración correspondiente, 75-300: concentración de los extractos expresada en mg/mL.

Las placas de *C. santamariae* y de bacterias se llevaron a estufas de incubación a 30°C durante 48 h (exceptuando *P. aeruginosa*, que se llevó a 37°C durante 48 h), mientras que las placas de mohos se llevaron a 25°C durante 7 días, todas en condiciones de aerobiosis. Tras el periodo de incubación se valoró visualmente el crecimiento de los microorganismos según la presencia o ausencia de turbidez o micelio. Finalmente, para comprobar si esa concentración inhibitoria también era bactericida se realizaron recuentos en placa.

Debido al volumen de las cubetas, se tuvieron que corregir las concentraciones inoculadas a los pocillos para saber cuáles eran las concentraciones reales que entraron en contacto con los microorganismos estudiados. Para ello, se utilizó la siguiente fórmula en la que: V_o es volumen inicial (μL), V_f es volumen final (μL), C_i es concentración inoculada (mg/mL) y C_r es concentración real (mg/mL).

$$C_r = \frac{V_o}{V_f} \times C_i$$

Las concentraciones reales fueron de: 25, 33,33, 50, 66,66, 75, 83,33 y 99,99 mg/mL.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

7.1 CARACTERIZACIÓN COMERCIAL DE LA GRANADA:

7.1.1 *Calibre, peso y rendimiento de los frutos.*

| Variedad | Diámetro longitudinal o D1 (mm) | Diámetro transversal o D2 (mm) | Peso por fruto (g) | Rendimiento por variedad (%) |
|----------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------|------------------------------|
| SHANY | 90,17±2,84 | 94,63±2,56 | 374,44±32,42 | 43,64 |
| EMEK | 82,66±4,17 | 86,00±3,53 | 338,53±24,30 | 42,27 |

Tabla 4: Diámetros longitudinal y transversal medios, peso medio de los frutos y rendimiento total por variedad.

Como se observa en la tabla superior, los frutos de la variedad shany presentaban tanto un tamaño como un peso superior en comparación con los de la variedad emek. Estos resultados son concordantes con los recogidos por Pareek, Valero y Serrano

(2015) sobre diferentes variedades de granada y entre los que se observan grandes variaciones de tamaño y calibre. Por ejemplo, existen variedades como la hicanzar cuyo peso en la recolección rondaría los 423,16 g (superior a las variedades de este trabajo) y sus diámetros serían de 66,77 mm para el longitudinal y 95,52 mm para el transversal, siendo el D1 superior en los frutos de las variedades shany y emek, y el D2 inferior.

Del mismo modo, el rendimiento por fruto obtenido en ambas variedades se encuentra dentro del rango establecido por otros estudios, de entre el 40 y el 45% (Pareek, Valero y Serrano, 2015).

7.1.2 *Análisis del color.*

| Variedad | L* | a* | b* | C* | h |
|---------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| SHANY | | | | | |
| Piel | 43,62±4,10 | 52,91±1,47 | 26,65±1,79 | 59,25±1,96 | 26,70±1,22 |
| Arilos | 34,91±1,07 | 10,76±1,70 | -0,72±0,34 | 10,81±1,59 | 355,29±4,12 |
| Zumo | 41,14±0,67 | 19,74±0,70 | -3,35±0,30 | 20,03±0,65 | 350,33±1,29 |
| EMEK | | | | | |
| Piel | 44,81±4,86 | 53,26±2,15 | 27,25±2,11 | 59,85±2,70 | 27,06±1,27 |
| Arilos | 34,68±0,92 | 10,10±1,61 | -0,61±0,34 | 10,14±1,59 | 355,72±2,73 |
| Zumo | 36,35±0,63 | 16,76±0,82 | -2,82±0,26 | 18,12±2,12 | 353,72±0,72 |

Tabla 5: Análisis de color de la piel, los arilos y el zumo de ambas variedades.

Ambas variedades presentan una coloración similar en la determinación del color de la piel y de los arilos. El color externo del fruto posee una tonalidad roja (a*+) bastante saturada (C*) con sutiles connotaciones amarillas (b*+) y gran luminosidad (L*), mientras que el color interno de los mismos se caracteriza por tener una ligera tonalidad roja (a*+) con notas azuladas (b*-). Al comparar los resultados obtenidos con la coloración descrita en otras variedades, se observa que emek y shany son variedades con una tonalidad roja brillante en la piel, mientras que, por ejemplo, la variedad mollar de Elche presenta una tonalidad rojo-amarillenta (Pareek, Valero y Serrano, 2015).

Aunque el análisis del color de la piel y los arilos no presentaba diferencias entre las dos variedades, sí que hay diferencias significativas en el color de los zumos. El zumo de la variedad shany posee mayor luminosidad y presenta tonos más rojizos y azulados que la variedad emek, lo que podría explicarse por la acidez del zumo que provoque

cambios en la coloración de los antocianos. Del mismo modo que en el caso del fruto, los resultados obtenidos para el color del zumo de granada corresponden a los descritos en estudios previos como el de Pareek, Valero y Serrano (2015) que demostraron que que los tonos predominantes en los zumos de granada son los rojizos, los azulados y los amarillentos, en ese orden decreciente.

7.1.3 Firmeza.

| Variedad | Firmeza por punción (g) | Firmeza por compresión (kg) | Elasticidad (mm) |
|-----------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| SHANY | 17,16±4,74 | 0,79±0,12 | 0,25±0,07 |
| EMEK | 15,69±4,68 | 0,91±0,20 | 0,22±0,11 |

Tabla 6: Firmeza de los arilos determinada por punción (g), compresión (kg) y elasticidad (mm).

Como se observa en la tabla superior, no existen diferencias significativas entre los arilos de las variedades estudiadas. Si se comparan con otros estudios realizados anteriormente, se puede concluir en que poseen mayores valores de firmeza que otras variedades como la mollar de Elche, cuya firmeza de punción y de compresión es de 7,91 g y 0,51 kg respectivamente (Szychowski, 2015). Según estudios realizados por Hernández et al. (2014), la dureza de los arilos mantiene una correlación directamente proporcional con la acidez: cuanto mayor es su acidez total, mayor su firmeza. La variedad mollar de Elche posee una acidez total menor (Pareek, Valero y Serrano, 2015) que la que presentan las variedades estudiadas en este trabajo, por lo que su firmeza será menor. De la misma forma, las variedades shany y emek presentan esa relación entre firmeza y acidez, siendo shany la que mayor firmeza y acidez registra.

7.1.4 pH, acidez y sólidos solubles totales (SST).

| Variedad | pH | Acidez (g ácido cítrico/L) | Sólidos solubles totales o SST (°Brix) |
|-----------------|-------------|-----------------------------------|---|
| SHANY | 4,33±0,024 | 7,00±0,09 | 14,12±0,044 |
| EMEK | 4,066±0,005 | 5,57±0,07 | 14,24±0,054 |

Tabla 7: pH medio, acidez media y concentración media de sólidos solubles totales.

Los resultados indican que la variedad shany presenta mayor acidez que la variedad emek y ambas presentan un contenido de sólidos solubles similar.

Los valores de acidez obtenidos en este trabajo se han comparado con los de un estudio realizado sobre distintas variedades de granada (entre ellas shany y emek) de Ferrara et al. (2014). En este estudio, las variedades shany y emek presentan una acidez 7,5 g/L y 4,9 g/L respectivamente, muy similares a las obtenidas en los análisis de este trabajo. En España las variedades de granado se catalogan de acuerdo a la clasificación propuesta por Melgarejo (1993), la cual se basa en su concentración de ácido cítrico, por lo que tanto la variedad shany como la variedad emek se encontrarían dentro de la categoría de granadas agridulces (entre 0,54 y 0,91% de ácido cítrico).

En cuanto al pH, los rangos recogidos por otros estudios son ligeramente inferiores a los resultados obtenidos en este trabajo, del orden de 3,57 (Pareek, Valero y Serrano, 2015).

En el caso de los sólidos solubles, los valores se encuentran dentro del rango de los descritos en la bibliografía consultada, ya que todas las variedades presentan valores cercanos a 14°Brix (Pareek, Valero y Serrano, 2015).

7.1.5 Análisis sensorial de los arilos.

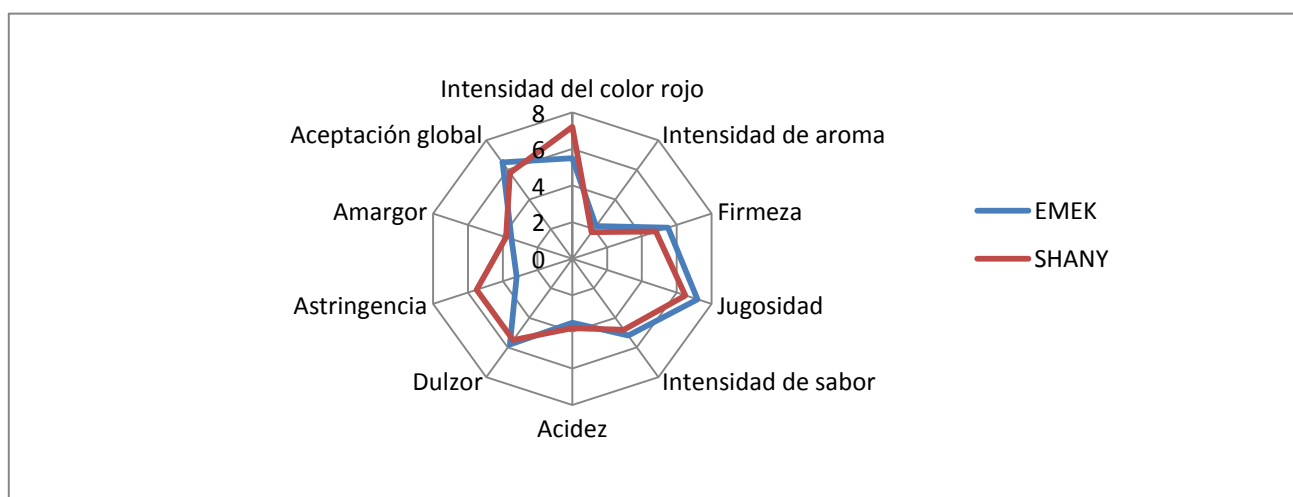


Figura 4: Análisis sensorial de los arilos de ambas variedades realizado por un panel de cinco catadores.

Según los catadores, no existen grandes diferencias entre variedades en el perfil sensorial. Sin embargo, en lo que respecta a la astringencia, se puede observar que es

mucho mayor en la variedad shany que en la emek, y que pueda deberse a una mayor concentración de compuestos fenólicos (taninos), responsables de esta sensación. La intensidad de color rojo de los arilos se percibió superior en la variedad shany con respecto a la variedad emek, mientras que el resto de atributos son similares en ambas variedades, haciendo que ambos frutos se caractericen por tener arilos bastante jugosos, con ligera acidez y firmes en boca (sobre todo en el centro leñoso).

7.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE LA PIEL Y DE LOS ARILOS:

7.2.1 Compuestos fenólicos totales y flavonoides.

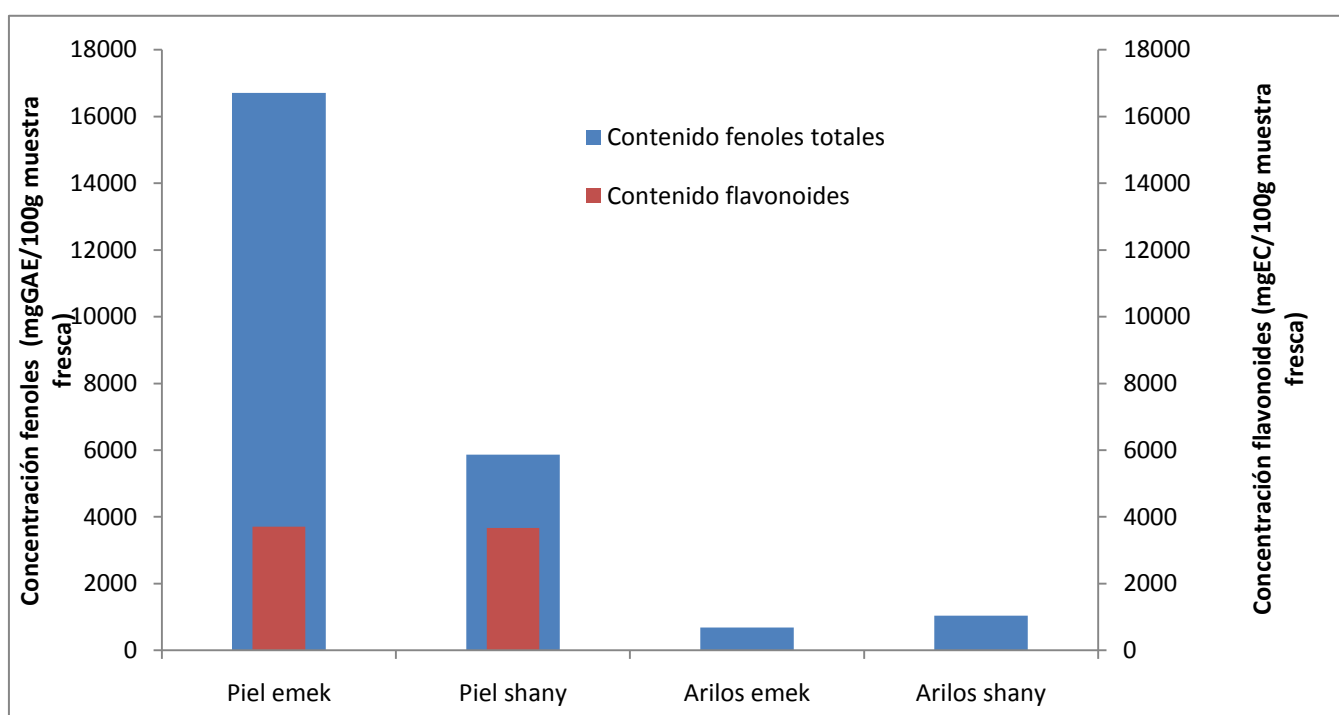


Figura 5: Contenido total de fenoles (mg EAG (equivalentes de ácido gálico)/100g de peso fresca) y flavonoides (mg EC (equivalentes de catequina)/100g de peso fresco). Comparativa entre la piel y los arilos de ambas variedades.

En la figura 5 se pueden observar grandes diferencias entre variedades y entre arilos y piel en lo que respecta al contenido de compuestos fenólicos totales. La piel de la variedad emek posee una concentración de 16706,63 mgEAG/100g, mientras que la variedad shany concentra en torno a 5861,48 mgEAG/100g. Sin embargo, el 62,57% de los compuestos fenólicos de la piel de shany corresponde a flavonoides (3667,76

mgEC/100g), muy diferente al porcentaje de flavonoides en emek, de un 22,20% (3708,11 mg EC/100g), haciendo que la cantidad de flavonoides en ambas variedades sea equiparable.

La concentración de compuestos fenólicos en los arilos de shany es de 1040,98 mgEAG/100g, superior a los 683,90 mgEAG/100g que presentan los arilos de emek. A la hora de compararlos con otros estudios, se observa que en la mayoría de los casos es la variedad shany la que supera en concentración de fenoles al resto de estudios realizados, mientras que emek queda entre las variedades con una concentración media. La comparación de la concentración de estos compuestos entre distintas variedades no es concluyente debido a que los resultados varían notablemente entre genotipos, madurez del fruto, condiciones de cultivo y análisis de parámetros.

En el caso de los arilos, se puede observar claramente que la concentración es muchísimo inferior a la observada en la piel. Estos resultados se encuentran acorde a lo establecido por otros autores, ya que la presencia de estos compuestos en la piel de la granada es mucho mayor que a lo que encontramos en sus arilos (Li et al., 2006).

7.2.2 Contenido de proantocianidinas.

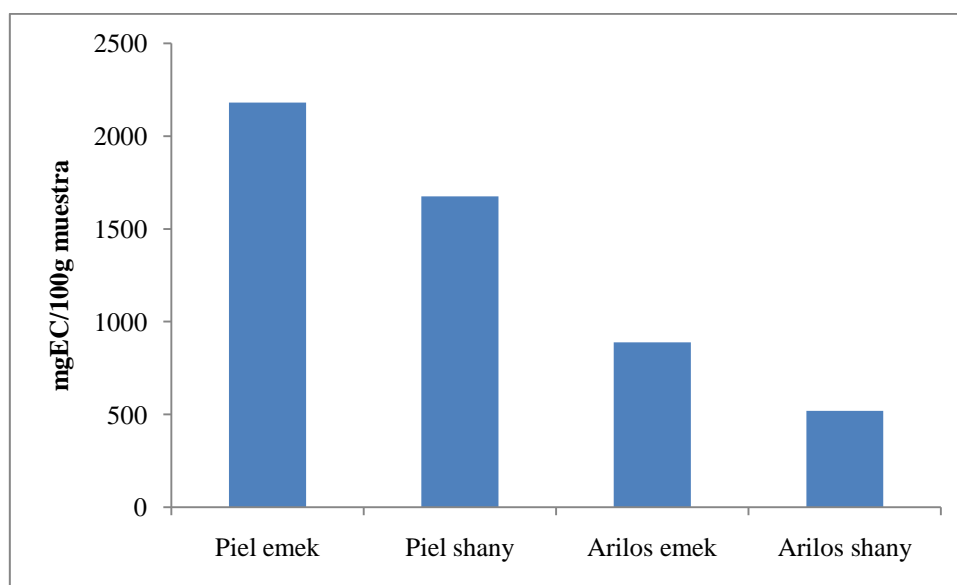


Figura 6: Comparativa del contenido de proantocianidinas no extraíbles (NEPAs) entre piel y arilos de las variedades shany y emek. Expresado en mgEC/100g muestra, siendo

Las proantocianidinas no extraíbles o taninos condensados hidrosolubles, son unos compuestos fenólicos englobados, dentro de la categoría de flavonoides, que dan sensación de astringencia y sequedad cuando son ingeridos y que además poseen propiedades antibacterianas (Kharchoufi et al., 2018).

Como se puede observar en la figura superior, el contenido en NEPAs es superior en la piel, destacando sobretodo la variedad emek frente a la variedad shany. El estudio realizado por Kharchoufi et al. (2018) sobre el potencial antimicrobiano y antioxidante de la piel de la variedad gabsi permite respaldar los resultados obtenidos en este trabajo, ya que las proantocianidinas se encuentran en una concentración mayor en la piel, lo que se traduce en una mayor actividad antioxidante.

7.2.3 Contenido de antocianos totales.

La determinación del contenido de antocianos totales se realizó sobre las dos variedades, obteniéndose los siguientes valores: 5,33 mgECG/100 g de zumo para la variedad shany y 6,94 mgECG/100 g para emek, siendo “ECG” equivalentes de cianidina-3-glucósido, el antociano que se encuentra en mayor concentración en frutas. Estos valores son concordantes con la bibliografía, ya que según un estudio realizado sobre 76 muestras de zumo de granada, la concentración de estos compuestos variaba de entre 1,1 y 63,0 mgECG/100g de zumo (Çalis_kan y Bayazit, 2012), situándose ambas variedades entre estos valores.

7.2.4 Capacidad antioxidante total mediante el método de reducción férrica (FRAP).

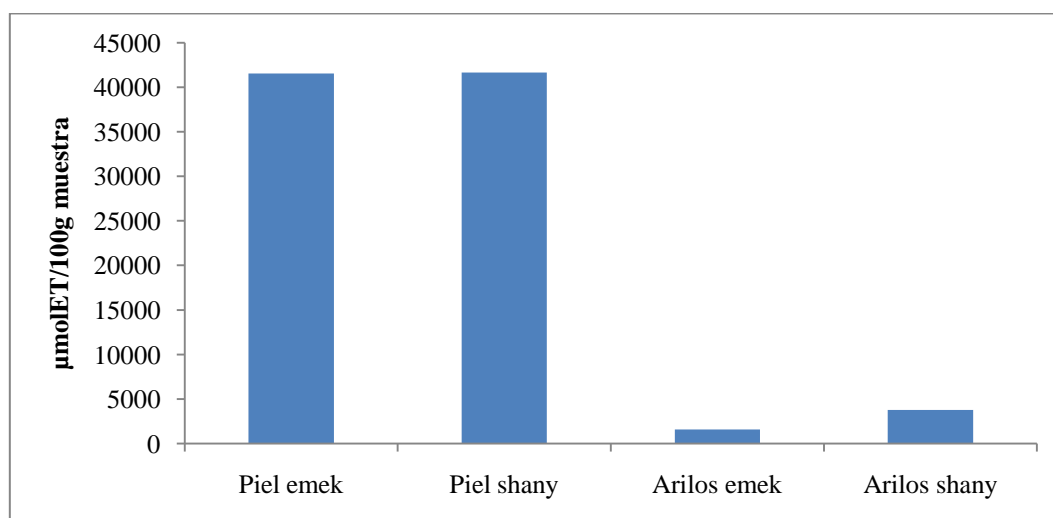


Figura 7: Capacidad antioxidante de las muestras obtenida mediante el método de reducción férrica (FRAP). Expresado en $\mu\text{molET}/100\text{g muestra}$ (ET: equivalentes de Trolox).

El método de reducción férrica es otra forma de cuantificar la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los alimentos. Al igual que en el método anterior, es la piel de ambas variedades la que mayor poder antioxidante tiene, destacando muy por encima del poder de los arilos.

En este análisis, la piel de shany y de emek poseen unos valores de 41664,06 y 41528,88 $\mu\text{molET}/100\text{g muestra}$ respectivamente, más de 10 veces superior a los datos obtenidos en los arilos (3785,50 $\mu\text{molET}/100\text{g}$ para shany y 1567,50 $\mu\text{molET}/100\text{g}$ para emek).

Con estos datos y los anteriores del apartado del método del radical libre DPPH, se puede concluir con que los resultados obtenidos son correctos. Recordemos que los compuestos fenólicos son los componentes de los alimentos encargados de evitar la oxidación de los mismos. Como se puede observar en las gráficas anteriores, la piel de ambas variedades posee mayor concentración de fenoles respecto a los arilos, lo que se traduce en una mayor actividad antioxidante por parte de las mismas.

7.2.5 Capacidad antioxidante total mediante el método de inhibición del radical libre 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

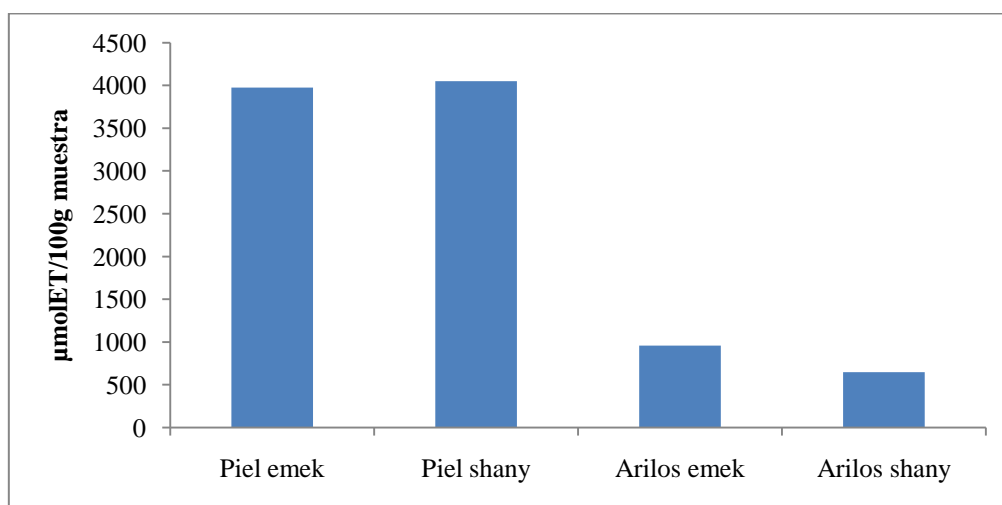


Figura 8: Capacidad antioxidante de las muestras obtenida mediante el método de inhibición del radical libre 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Expresado en $\mu\text{molTE}/100\text{g muestra}$ (TE: equivalentes de Trolox).

Como se puede observar en la figura superior, en ambas variedades es la piel la que presenta una mayor capacidad antioxidante. Esta diferencia se debe a la alta concentración de compuestos fenólicos, ya que, como se ha explicado anteriormente, son los encargados de preservar las frutas y tienen alto poder antioxidante.

Los arilos de emek y shany poseen una capacidad antioxidante de 958,41 $\mu\text{molTE}/100\text{g}$ y 645,86 $\mu\text{molTE}/100\text{g}$ respectivamente. Estas características se encuentran dentro de los valores analizados por otros autores, como por ejemplo los estudios realizados sobre la variedad hicaznar, que establece unos valores de capacidad antioxidante por este método de entre 898 y 1547 $\mu\text{molTE}/100\text{g}$ (Kaur et al., 2014).

Por otro lado, los resultados obtenidos en la piel son bastante similares: 3974,78 $\mu\text{molTE}/100\text{g}$ para emek y 4047,49 $\mu\text{molTE}/100\text{g}$ para shany. Estudios realizados sobre la piel de la variedad gabsi para analizar su perfil antioxidante hablan de valores de capacidad antioxidante por el método del radical DPPH de entre 3497,02 y 4081,43 $\mu\text{molTE}/100\text{g}$ (Kharchoufi et al., 2018). Es por ello que también se puede decir que los datos analizados son congruentes a lo consultado en la bibliografía.

7.3 VALIDACIÓN ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS:

7.3.1 Ensayos en medio sólido.

| Halo de inhibición (mm) | | | | | | | |
|--------------------------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Bacteria | [T0]= UFC/mL | EMEK | | | SHANY | | |
| | | C1 | C2 | C3 | C1 | C2 | C3 |
| <i>Shigella flexneri</i> | >10 ⁹ | - | - | 16,57±1,20 | - | 13,51±2,31 | 17,84±1,43 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,92*10 ¹⁰ | - | 16,78±0,87 | 25,60±0,70 | 17,43±1,17 | 19,79±1,81 | 28,27±1,12 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 4,4*10 ⁸ | - | 12,96±0,99 | 15,37±0,64 | 11,69±0,00 | 13,59±0,48 | 16,42±0,72 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 10 ⁵ | 11,73±0,00 | 20,99±4,43 | 22,91±2,41 | 18,73±5,31 | 26,19±1,26 | 32,01±2,65 |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 10 ⁵ | 14,86±0,00 | - | 14,43±1,22 | - | - | 16,46±0,00 |

Tabla 7: Halo de inhibición (en mm), para cada combinación de extracto-bacteria testado (Cn: concentración estudiada; C1: 75 mg e.s. (extracto seco)/mL disolución; C2: 150 mg e.s./mL; C3: 300 mg e.s./mL; [T0]: concentración del microorganismo a tiempo 0).

El tamaño del halo es proporcional a la sensibilidad que tiene el microorganismo frente a un compuesto, por lo que las bacterias que presenten mayores halos, serán más susceptibles a ver su proliferación inhibida por los extractos. En la tabla superior se muestran únicamente aquellas bacterias en las que se observó halo de inhibición.

En el primer ensayo realizado en este trabajo, sobre placas de agar sólido, se observó que simplemente cinco bacterias (*Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomona aeruginosa*) vieron su crecimiento inhibido por los extractos de ambas variedades. En la concentración de 300 mg e.s. shany/mL para las cepas de *Yersinia enterocolitica* es donde se observa el mayor halo, mientras que para los extractos de emek es *Staphylococcus aureus* a 300 mg e.s./mL el más susceptible a la inhibición.

Estudios como el realizado por Ismail et al. (2016) consiguen efectos inhibitorios frente a cepas de *Escherichia coli* y algunas especies de *Salmonella* spp., pero con las técnicas de extracción de los compuestos y las concentraciones empleadas en este trabajo no se ha observado inhibición alguna en estas especies. Tampoco se ha

presenciado esta sensibilidad a los extractos por parte del resto de microorganismos empleados en estos ensayos.

7.3.2 Ensayos en medio líquido.

| Concentración corregida (mg e.s./mL) | | | |
|--------------------------------------|--------------------------|------|----------|
| Bacteria | Actividad antimicrobiana | EMEK | SHANY |
| <i>Escherichia coli</i> | CMI | - | - |
| | CMB | - | - |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | CMI | - | - |
| | CMB | - | - |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | CMI | * | * |
| | CMB | 25 | 25 |
| <i>Shigella flexneri</i> | CMI | * | * |
| | CMB | 25 | 25 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | CMI | * | * |
| | CMB | 25 | 25 |
| <i>Cronobacter sakazaki</i> | CMI | * | 25 |
| | CMB | 25 | 33,33 |
| <i>Bacillus cereus</i> | CMI | * | * |
| | CMB | 25 | 25 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | CMI | * | * |
| | CMB | 25 | 25 |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | CMI | * | 25-33,33 |
| | CMB | 25 | 33,33 |
| Levadura | | | |
| <i>Candida santamariae</i> | CMI | * | * |
| | CMB | 25 | 25 |
| Mohos | CMI | - | - |
| | CMB | - | - |

Tabla 8: CMI (concentración mínima inhibitoria) y CMB (concentración mínima bactericida) para las diferentes combinaciones extracto-microorganismo. (*): la concentración mínima inhibitoria es inferior a 25 mg e.s./mL.

La CMI es la cantidad (mg e.s./mL) mínima de extracto necesaria para inhibir el crecimiento y la multiplicación del microorganismo, mientras que la CMB es la cantidad (mg e.s./mL) mínima de extracto necesaria para matar al microorganismo y reducir sus recuentos.

Como se puede observar en la tabla 8, todas las bacterias, exceptuando las especies *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*, y la levadura *Candida santamariae*

se comportaron de forma diferente cuando entraban en contacto con los extractos de ambas variedades. Los extractos de emek fueron más efectivos en comparación con los extractos de shany, ya que en todos los casos se observa que la concentración mínima bactericida es de 25 mg e.s./mL, mientras que para *Pseudomona aeruginosa* con los extractos de shany la CMB fue de 33,33 mg e.s./mL.

En comparación con otros estudios, vemos que los extractos de shany y emek son más efectivos para el control de *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* y *B. cereus*, pero no tanto para *S. aureus*. En los estudios realizados por Alexandre et al. (2018) se observa que *L. monocytogenes* tiene una CMB de >125 mg e.s./mL y que *P. aeruginosa* y *B. cereus* tienen una CMB de 62,5 mg e.s./mL, mientras que *S. aureus* tiene una CMB inferior a la obtenida en este trabajo, de orden de 7,82 mg e.s./mL.

En las baterías de pocillos donde se realizaron los ensayos no se observaron diferencias entre los pocillos control de mohos (microorganismo + medio líquido, sin extracto) y los de moho + medio líquido + extracto, por lo que ninguna de estas variedades es efectiva frente a mohos. Sin embargo, sí existen variedades efectivas frente a mohos como la variedad gabsi, donde se observa efectividad frente a microorganismos como *S. cerevisiae*, *P. digitatum* y *P. putida* (Kharchoufi et al., 2018).

Como se puede apreciar en las tablas 7 y 8, existen grandes diferencias en lo que respecta al comportamiento de los extractos tanto en medio sólido como en medio líquido frente a los distintos microorganismos. En medio líquido se obtuvieron mejores resultados que en medio sólido, viendo que la efectividad de los extractos era mayor de lo que se creía al comienzo del trabajo.

8. CONCLUSIONES:

Primera

Las dos variedades de granada shany y emek cultivadas en los Monegros presentan diferencias significativas en el calibre/peso, en la acidez y en la firmeza, siendo la variedad shany la que posee mayor calibre, peso, firmeza y acidez.

Segunda

El análisis del color de la piel y los arilos no refleja diferencias entre las dos variedades, pero sí que se observan diferencias significativas en el color de los zumos. El zumo de la variedad shany posee mayor luminosidad y presenta tonos más rojizos que el zumo de la variedad emek, lo que podría explicarse por la mayor acidez de esta variedad que provoca cambios en la coloración de los antocianos.

Tercera

En la valoración sensorial, los catadores no detectan grandes diferencias en el perfil sensorial de ambas variedades. Únicamente se detectan ligeras diferencias, en la astringencia y color. La variedad shany se percibe como más astringente, y puede correlacionarse con la mayor concentración de compuestos fenólicos (taninos), descrita para esta variedad.

Cuarta

Los diferentes métodos utilizados para evaluar la cantidad de compuestos antioxidantes (contenido fenoles totales y flavonoides, contenido en proantocianidinas, capacidad antioxidante por FRAP, y capacidad antioxidantes por DPPH) indican que la capacidad antioxidante de la piel de ambas variedades es muy superior a la de los arilos.

Quinta

La comparación de la capacidad antioxidante de ambas variedades indica que en el caso de la piel es la variedad emek la que presenta mayor contenido en fenoles, proantocianidinas, y capacidad antioxidante determinada por DPPH.

Sin embargo en el caso del estudio de los arilos, es la variedad shany la que presenta un mayor contenido en antocianos, fenoles totales y capacidad antioxidante determinada por FRAP.

Sexta

La acción antibacteriana de los extractos obtenidos *in vitro* es significativamente mayor en el medio líquido que en el medio sólido.

Séptima

Los compuestos aislados de la piel de ambas variedades presentan actividad antibacteriana frente a las cepas estudiadas de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* y *Candida santamariae* a una concentración de 25 mg e.s./mL.

Octava

Los extractos de la variedad emek son más eficaces frente a las cepas de *Cronobacter sakazaki* y *Pseudomona aeruginosa* que los de la variedad shany.

Novena

Los extractos de las variedades estudiadas no presentaron ni actividad antibacteriana frente a *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* en ninguno de los medios ni actividad antifúngica frente a los mohos elegidos.

9. BIBLIOGRAFÍA:

Alexandre, E. M. C. Et al. (2018) “Antimicrobial activity of pomegranate peel extract performed by high pressure and enzymatic assisted extraction”, *Food Research International*, 115, pp. 167-176.

Boukroufa, M. et al. (2015) “Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, pp. 72-79.

Çalışkan, O. y Bayazit, S. (2012) “Phytochemical and antioxidant attributes of autochthonous Turkish pomegranates”, *Scientia Horticulturae*, 147, pp. 81-88.

De Laurentiis, V., Corrado, S. y Sala, S. (2018) “Quantifying households waste of fresh fruit and vegetables in the EU”, *Waste Management*, 77, pp. 238-251.

Dekazos, E.D. (1970) “Quantitative determination of anthocyanin pigments during maturation and ripening of red tart cherries”, *Journal of Food Science*, 35 (3), pp. 237-241.

Endo, E. H. et al. (2010) “Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*”, *Research in Microbiology*, 161, pp. 534-540.

EUROSTAT (2019) *Database*. Luxemburgo: Comisión Europea.

FAOSTAT (2016) *Database*. Nueva York: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Ferrara, G. et al. (2014) “Characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes collected un Puglia region, Southeastern Italy”, *Scientia Horticulturae*, 178, pp. 70-78.

Fischer, U. A., Carle, R. y Kammerer, D. R. (2011) “Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS[®]”, *Food Chemistry*, 127, pp. 807-821.

Font, I. (2017) “El granado en España. Tradición y modernidad”, *Fruticultura*, 58. Disponible en: <http://fruticultura.quatrebcn.es/el-granado-en-espana-tradicion-y-modernidad> [Consultado 09-09-2019].

Gil, M. I. et al. (2000) “Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, pp. 4581-4589.

- Godfray, H. C. J. y Garnett, T. (2014) "Food security and sustainable intensification", *Philosophical Transactions of The Royal Society B, Biological Science*, 369.
- Gullon, B., Pintado, M. E., Viuda-Martos, M. (2016) "Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from coproduct of juice extraction", *Food Control*, 59, pp. 94-98.
- Hernández, F. et al. (2014) "Fruit quality characterization of seven pomegranate accessions (*Punica granatum* L.) grown in Southeast of Spain", *Scientia Horticulturae*, 175, pp. 174-180.
- Hernández, F. y Martínez, J. J. (2010) "El Granado", *I Jornadas nacionales sobre el granado: Producción, economía, industrialización, alimentación y salud*. Elche, 26-27 octubre 2010. Valencia: SPE3 S.L., pp. 28-41.
- Iacopini, P., Camangi, F., Stefani, A. y Sebastiani, L. (2010) "Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of *Malus x domestica* Borkh in a peroxynitrite-induced oxidative process", *Journal of Food Composition and Analysis*, 23 (6), pp. 518-524.
- Ismail, T. et al. (2016) "Antioxidant, Antimicrobial and Urease Inhibitory Activities of Phenolics-Rich Pomegranate Peel Hydro-Alcoholic Extracts", *Journal of Food Biochemistry*, 40 (4), pp. 550-558.
- Kaur, C. et al. (2014) "Characterization of antioxidants and hypoglycemic potential of pomegranate grown in India: A preliminary investigation", *Journal of Food Biochemistry*, 38, pp. 397-406.
- Kharchoufi, S. et al. (2018) "Antimicrobial and antioxidant features of 'gabsi' pomegranate peel extracts", *Industrial Crops & Products*, 111, pp. 345-352.
- Li, Y. et al. (2006) "Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract", *Food Chemistry*, 96, pp. 254-260.
- Llorach, R., Tomás-Barberán, F. y Ferreres, F. (2004) "Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, pp. 5109-5116.
- Melgarejo, P. (1993) *Selección y tipificación varietal de granado*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia., pp. 617.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2017) *Informe del consumo alimentario en España*. Madrid: MAPA, Secretaría General Técnica. Ministerio de Agricultura, Pesca y

Alimentación (2018) *Informe del consumo alimentario en España*. Madrid: MAPA, Secretaría General Técnica.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2018) *Superficies y producciones anuales de cultivos*. Madrid: MAPA, Secretaría General Técnica.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2019) *Cifras del sector de frutas y hortalizas*. Madrid: MAPA, Subdirección General de frutas y hortalizas y viticultura.

Mansour, E. et al. (2013) “Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of peel extract from Tunisian pomegranate”, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, pp. 1393-1403.

Newsome, A. G., Li, Y., van Breenen, R. B. (2016) “Improved quantification of free and ester-bound gallic acid in foods and beverages by UHPLC-MS/MS”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, pp. 1326-1334.

Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2011) *Pérdida y desperdicio de alimentos*. Disponible en: <http://www.fao.org/food-loss-and-food-waste/es/>

Pareek, S., Valero, D. y Serrano, M. (2015) “Postharvest biology and technology of pomegranate”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, pp. 2360-2379. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.7069>

Pérez-Jiménez, J. et al. (2008) “Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results”, *Food Research International*, 41, pp. 274-285.

Pérez-Jiménez, J. y Saura-Calixto, F. (2018) “Fruit peels as sources of non-extractable polyphenols or macromolecular antioxidants: Analysis and nutritional implications”, *Food Research International*, 111, pp. 148-152.

Pérez-Ramírez, I.F. et al. (2018) “Comprehensive characterization of extractable and nonextractable phenolic compounds by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight of a grape/pomegranate pomace dietary supplement”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, pp. 661-673.

Rosenblat, M. y Aviram, M. (2006) “In Vitro Studies in Pomegranates”. En: Seeram, N. P. y Heber, D. (Eds.). *Ancient Roots to Modern Medicine*. Nueva York: Taylor and Francis Group.

Roy, S. K. y Waskar, D. P. (1997) “Pomegranate”. En: Miltra, S. (Ed.). *Postharvest Physiology and Storage of Tropical and Subtropical Fruits*. Wallingford: Cab International.

- Sandhya, S. et al. (2018) "Preparation of pomegranate peel extract powder and evaluation of its effect on functional properties and shelf life of curd", *LWT- Food Science and Technology*, 92, pp. 416-421.
- Seeram, N. P. et al. (2008) "Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 1415-1422.
- Shahram, H. y Taghian Dinani, S. (2019) "Influences of electrohydrodynamic time and voltage on extraction of phenolic compounds from orange pomace", *LWT- Food Science and Technology*, 111, pp. 23-30.
- Singleton, V. L. y Rossi, J.A. (1965) "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents", *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (3), pp. 144-158.
- Stenmarck, A., Jensen, C., Quedsted, T. y Moates, G. (2016) *Estimates of European food waste levels*. Luxemburgo: Comisión Europea.
- Szychowski, P. J. et al. (2015) "Instrumental and sensory texture attributes of pomegranate arils and seeds as affected by cultivar", *LWT- Food Science and Technology*, 60, pp. 656-663.
- Thaipong, K. et al. (2006) "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts", *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (6-7), pp. 669-675.
- Vanham, D. et al. (2015) "Lost water and nitrogen resources due to EU consumer food waste", *Environmental Research Letters*, 10 (8).
- Zhu, C. y Liu, X. (2013) "Optimization of extraction process of crude polysaccharides from Pomegranate peel by response surface methodology", *Carbohydrate Polymers*, 92 (2), pp. 1197-1202.