

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

Master Universitario Oficial de
Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo



Residuo de granada ecológica en la industria del
zumo como posible fuente de conservantes
naturales para productos cárnicos:

EFECTO ANTIMICROBIANO

TRABAJO FIN DE MASTER

Septiembre – 2015

AUTOR: Marina Cano Lamadrid

DIRECTORA: Esther Sendra Nadal

CO-DIRECTOR: Ángel A. Carbonell Barrachina



Se autoriza al alumno **D. MARINA CANO LAMADRID** a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Residuo de granada ecológica como posible fuente de conservantes naturales para productos cárnicos: efecto antimicrobiano”, bajo la dirección de D. Esther Sendra Nadal, y la codirección de D. Angel Carbonell Barrachina, debiendo cumplir las directrices para la redacción del mismo que están a su disposición en la asignatura.

Orihuela, 12 de febrero de 2015

Fdo.: Gema Romero Moraleda,
Directora del Master Universitario en Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo





**MASTER UNIVERSITARIO OFICIAL DE
AGROECOLOGÍA, DESARROLLOR RURAL Y
AGROTURISMO**

VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2014/2015

Directora y co-director del trabajo
Esther Sendra Nadal y Ángel. A. Carbonell Barrachina

Dan su visto bueno al Trabajo Fin de Máster

Título del Trabajo
Residuo de granada ecológica en la industria del zumo como posible fuente de conservantes naturales para productos cárnicos: EFECTO ANTIMICROBIANO
Alumna
Marina Cano Lamadrid

Orihuela, a 30 de Julio de 2015

 Esther Sendra	 Ángel Carbonell
Firma/s directores/es trabajo	



MASTER UNIVERSITARIO OFICIAL DE AGROECOLOGÍA, DESARROLLO RURAL Y AGROTURISMO

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Título: Residuo de granada ecológica en la industria del zumo como posible fuente de conservantes naturales para productos cárnicos: EFECTO ANTIMICROBIANO

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

Autor: Marina Cano Lamadrid

Directora y co-director: Esther Sendra Nadal y Ángel A. Carbonell Barrachina

Convocatoria: Septiembre

Número de referencias bibliográficas: 41

Número de tablas: 4

Número de figuras: 5

Palabras clave (5 palabras): Punicalagina, co-producto, polifenoles, extractos, Mollar.

RESUMEN:

El objetivo de este trabajo fue la determinación del perfil polifenólico y las propiedades antimicrobianas de los extractos obtenidos a partir de la piel de granada ecológica para evaluar su posible potencial como un ingrediente antimicrobiano para elaborar productos transformados ecológicos. Las propiedades antibacterianas de los diferentes extractos (hexano, etil acetato, acetona y metanol, de polaridad creciente) fueron evaluados frente a: *Listeria innocua*, *Achromobacter denitrificans* y *Aeromonas faecalis*. Todos los extractos mostraron actividad antimicrobiana (excepto extracto de hexano: sin actividad) frente a todas las bacterias estudiadas, aunque el extracto de etil acetato no fue efectivo frente a *A. denitrificans*. El perfil polifenólico fue determinado por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). Cinco compuestos fueron identificados. El principal componente identificado fue la punicalagina en los extractos de acetona y metanol. El ácido elágico fue el principal compuesto encontrado en el extracto de etil acetato. El aumento de polaridad en el solvente de extracción conllevó un aumento de la actividad antimicrobiana de los extractos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. GRANADA.....	8
1.1.1. PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS	
1.2. PRODUCTOS CÁRNICOS.....	11
1.2.1. Producción ecológica de productos cárnicos	
1.3. RESIDUOS EN LA INDUSTRIA DEL ZUMO.....	14
1.4. TENDENCIAS DE LOS ADITIVOS NATURALES COMO SUSTITUTO DE ADITIVOS SINTÉTICOS.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	21
3.2. EXTRACCIÓN.....	22
3.3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS.....	23
3.3.1. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	
3.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	24
3.4.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento	
3.4.2. Método de determinación de la actividad antimicrobiana por difusión.	
3.4.3. Método de determinación de la actividad antimicrobiana por microdilución: determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).	
3.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1. EXTRACCIÓN.....	29
4.2. PERFIL POLIFENÓLICO.....	29
4.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	31
4.3.1. Determinación MIC	
4.3.2. Método de difusión	
5. CONCLUSIONES.....	35
6. BIBLIOGRAFÍA.....	38

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1.GRANADA

España es uno de los principales productores europeos de granada (*Punica granatum* L.) y su producción está principalmente localizada en las provincias de Murcia y Alicante (Melgarejo *et al.*, 2010) donde los climas son cálidos llegando a las temperaturas óptimas para su maduración (Nuncio-Jáuregui *et al.*, 2015). En estas localidades los organismos encargados para el control del cumplimiento de la legislación, para ser producción en ecológico, son públicos: Comité de Agricultura Ecológica de la Comunidad Valenciana y Consejo de Agricultura Ecológica de la Región de Murcia, respectivamente.

La legislación que se aplica en la producción de leñosos en Agricultura Ecológica responde a los reglamentos siguientes mediante el control de los organismos correspondientes (en cada una de las Comunidades Autónomas):

- R (CE) Nº 834/2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el R (CE) Nº 2092/91 y,
- R (CE) Nº 889/2008 por el que se establecen disposiciones de aplicación del R (CE) Nº 834/2007 del Consejo con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control.

Destacar que actualmente la Unión Europea se encuentra en proceso de preparar una nueva norma para la producción ecológica y que por tanto en breve los textos citados serán derogados parcial o totalmente. EL borrador de la propuesta está disponible en eur-lex: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=COM:2014:0180:FIN>

En los objetivos y los principios específicos aplicables en materia agraria (citados en los reglamentos mencionados anteriormente) se dice expresamente que la producción ecológica está basada en:

“el mantenimiento y aumento de la vida y la fertilidad natural del suelo, la estabilidad y la biodiversidad del suelo, la prevención y el combate de la compactación y la erosión de suelo, y la nutrición de los vegetales con nutrientes que procedan principalmente del ecosistema edáfico”,

realizando especial hincapié en:

“el mantenimiento de la salud de los vegetales mediante medidas preventivas, como la elección de especies y variedades apropiadas que resistan a los parásitos y a las enfermedades, la rotaciones apropiadas de cultivo, los métodos mecánicos y físicos y la protección de los enemigos naturales de las plagas”.

En España se cultivan esencialmente dos grupos de variedades autóctonas (Mollar y Valenciana), aunque existen otras variedades muy interesantes como Albar de Blanca, Agridulce de Ojós, Borde de Albaterra, Borde de Ojós, Casta del Reino, Piñón tierno de Ojós, etc. (Melgarejo *et al.*, 2003). El grupo de variedades Mollar es el más cultivado en España, y se utiliza también en otros países de la UE. Sus frutos se cosechan de finales de septiembre a mediados de noviembre. El grupo de variedades denominado Valenciana es mucho más temprano, recolectándose desde primeros de Agosto a mediados de septiembre. Sin embargo, sus frutos son menos demandados por su inferior calidad y tamaño.

La granada es conocida en algunos países como la fruta del Edén por su excelente sabor y las propiedades beneficiosas para la salud (Akhtar *et al.*, 2015) disminuyendo el riesgo de enfermedades (Martinez *et al.*, 2006) por ello en los últimos años la granada ha mostrado un aumento interés y ha ganado elevada popularidad

(Hasnaoui *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la granada y sus extractos poseen actividad preventiva y atenuante frente a numerosas enfermedades como cáncer (Orgil *et al.*, 2014), diabetes tipo 2 (Banihani *et al.*, 2013) y enfermedades cardiovasculares (Al-Jarallah *et al.*, 2013; Hamound *et al.*, 2014). Estas propiedades no se encuentran solamente en la parte comestible, sino en las otras fracciones (piel, semillas, flores, hojas...) aunque se consideran como residuos contienen incluso más valor nutricional y componentes bioactivos que la parte comestible (Orgil *et al.*, 2014). Además nos aporta propiedades funcionales (antioxidantes, fibra dietética), antimutagénicas y antimicrobianas (Malviya *et al.*, 2013).

1.1.1. Propiedades antimicrobianas

La granada tiene un elevado contenido en polifenoles incluyendo ellagitanninos (punicalaginas y ácido eláxico) (Figura 1 y 2) y otros flavonoides (Tabaraki *et al.*, 2012). Estos compuestos tienen una relación lineal con la actividad antibacteriana en diversos microorganismos (Shan *et al.*, 2007).

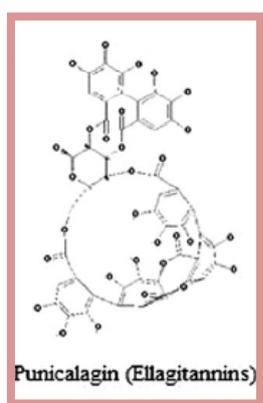


Figura 1. Punicalagina

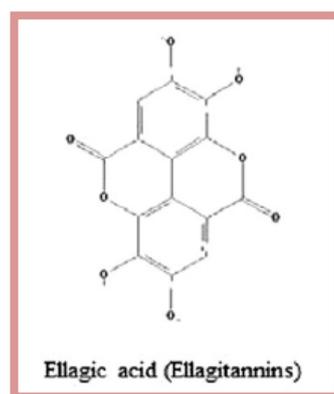


Figura 2. Ácido eláxico

(Akhtar *et al.*, 2015)

La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos puede ser debido a diversos modos de acción:

- El tipo de microorganismo y el tipo de pared celular se piensa que tiene un papel importante en su forma de acción (Shan *et al.*, 2007).
- Pueden desnaturalizar enzimas (Furneri *et al.*, 2002) pero también pueden unirse a sustancias como minerales, vitaminas y carbohidratos haciéndolos no disponibles para los microorganismos (Shadidi *et al.*, 2004).
- Pueden ser absorbidos por la pared celular, provocando la pérdida y la función de esta (Hugo *et al.*, 1971).
- La presencia de punicalaginas actuando en las membranas celulares precipitando las proteínas (Vasconcelos *et al.*, 2003).

1.2. PRODUCTOS CÁRNICOS

Es bien conocido como la legislación alimentaria es cambiante año tras año, cambios recientes en cuanto a los derivados cárnicos los últimos años hace necesaria la aclaración entre las diferentes definiciones que existen para determinar a día de hoy de que estamos hablando para evitar cualquier tipo de confusión. La reglamentación en la que se basan las definiciones que a continuación se mencionan es:

- R (CE) Nº 853/2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.
- R (CE) Nº 1333/2008, sobre aditivos alimentarios de uso autorizado en los derivados cárnicos.
- R (CE) Nº 601/2014, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) Nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a las

categorías de carnes y a la utilización de aditivos alimentarios en preparados de carne.

- RD Nº 474/2014, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos.

Un “producto transformado” es aquel producto alimenticio obtenido de la transformación de productos sin transformar. Estos productos pueden contener ingredientes que sean necesarios para su elaboración o para conferirles unas características específicas.

Los “derivados cárnicos” son los productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes o menudencias de los animales citadas en el punto 1.1 del anexo I del Reglamento 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal y sometidos a operaciones específicas antes de su puesta al consumo.

Un “producto cárnico” se incluye en la definición de “productos transformados”, siendo un aquel resultante de la transformación de la carne o de la nueva transformación de dichos productos transformados, de modo que la superficie de corte muestre que el producto ha dejado de poseer las características de la carne fresca, las características de la carne fresca desaparecen completamente.

Los “preparados de carne” se definen como la carne fresca, incluida la carne que ha sido troceada, a la que se han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos, o que ha sido sometida a transformaciones que no bastan para alterar la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, para eliminar las características de la carne fresca.

1.2.1. Producción ecológica de productos cárnicos

Los principios generales de producción ecológica deben cumplirse:

- El diseño y la gestión adecuada de los procesos biológicos basados en sistemas ecológicos que utilicen recursos naturales propios del sistema.
- La restricción del recurso a medios externos.
- La estricta limitación del uso de medios de síntesis.

El artículo 6 del Reglamento N° 834/2007 se habla de los principios específicos aplicables a la transformación de alimentos ecológicos en los que además de cumplir con los principios generales de producción ecológica citados anteriormente, la producción de transformados deben cumplir lo siguiente:

- Los ingredientes de la producción de alimentos deben ser agrarios ecológicos a excepción de que no se disponga.
- Se debe restringir al mínimo el uso de aditivos alimentarios, de ingredientes no ecológicos.
- Exclusión de sustancias o métodos de transformación que puedan inducir a error sobre la verdadera naturaleza del producto.

Teniendo en cuenta que la materia prima principal (la carne) de este tipo de productos deben ser procedentes de explotaciones ecológicas regladas con las normas presentes en el artículo 14 del Reglamento N° 834/2007 en el que se especifica:

- Origen de los animales.
- Especificaciones de las prácticas permitidas en la explotación y las condiciones de estabulación.

- Reproducción de los animales.
- Piensos.
- Prevención de enfermedades y al tratamiento veterinario.
- Limpieza y desinfección en los locales e instalaciones ganaderos.

1.3. RESIDUOS EN LA INDUSTRIA DEL ZUMO

Durante el procesado de alimentos, normalmente se generan grandes cantidades de co-productos incluyendo semillas, pulpa, piel, cáscara, etc. Aunque estos co-productos han sido considerados como residuos, muchos estudios muestran como estos son fuentes elevadas de compuestos valiosos como compuestos fenólicos y otros compuestos bioactivos que muestra funcionalidades incluyendo la actividad antimicrobiana (Balasundram *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2009). Co-productos de frutas y vegetales son fuentes potencialmente valiosas de minerales, ácidos orgánicos y fenólicos con un elevado rango de propiedades antimicrobianas (Chanda *et al.*, 2010). La transformación industrial de vegetales y zumo genera grandes cantidades de co-productos ricos en compuestos bioactivos que podrían ser susceptibles para otros fines (Viuda-Martos *et al.*, 2009).

La granada es principalmente consumida en crudo debido a sus propiedades nutricionales ya que los arilos contienen proteínas, fibras, vitaminas, minerales, pectina, azúcares, polifenoles. (Viuda-Martos *et al.*, 2010). Los arilos también son utilizados para elaborar una elevada cantidad de productos de granada como mermeladas, miel, etc. (Mousavinejab *et al.*, 2009), especialmente, zumo fresco el cual puede ser obtenido a partir de los arilos o a partir del fruto entero. Una vez se ha

extraído el zumo, los restos están principalmente compuestos de pulpa y bagazo (Viuda-Martos *et al.*, 2012). En peso fresco, estos residuos representan el 50 % de la cantidad que se necesita para producir el zumo. Por tanto, esto ha hecho que se generen una elevada cantidad de residuos en los países productores (Estados Unidos, España, Irán, China e India) (Hasnaoui, 2014). El reciclado o reutilización de estos co-productos puede reducir los costes de tratamiento (Vagi *et al.*, 2007). Con una visión agroecológica podríamos pensar en compostar estos residuos pero la gran cantidad de polifenoles hace que sea difícil su compostaje, ya que inhibe la acción microbiana y el proceso bioxidativo controlado no sería óptimo (al no alcanzar las temperaturas necesarias). Dependiendo de la disponibilidad de una adecuada tecnología, pueden ser convertidos en productos comerciales, sustitutos de aditivos alimenticios o como ingredientes de nuevos productos (Sánchez-Zapata *et al.*, 2009).

1.4.TENDENCIA DE LOS ADITIVOS NATURALES COMO SUSTITUTO DE ADITIVOS SINTÉTICOS

En las industrias agroalimentarias se está generando una corriente muy importante en ser “sostenibles”, por lo que se han generado diferentes terminologías asociadas a ello, tales como co-producto, revalorización y ecoeficiencia entre otros.

La ecoeficiencia tiene como objetivo proporcionar productos de calidad a la vez que se reduce el uso de recursos y la contaminación mediante:

- Búsqueda de alternativas.
- Cambios en los procesos.
- Eliminación o reducción residuos.

- Empleo de envases biodegradables.
- Optimización de los recursos renovables.

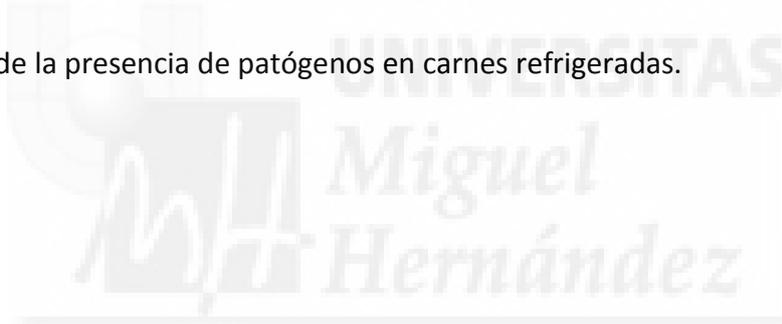
Además de la preocupación a nivel empresarial-global, los consumidores están preocupados y se cuestionan sobre la inocuidad de los conservantes sintéticos utilizados en los alimentos (Al-Zoreky, 2009). Los efectos carcinogénicos de los aditivos sintéticos en alimentos ha aumentado el interés de fuentes naturales con funciones tecnológicas y de conservación en los alimentos (Tabaraki *et al.*, 2012). En los últimos años, se ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda de encontrar antimicrobianos naturales que puedan inhibir el crecimiento microbiano y fúngico en alimentos para aumentar la calidad y la vida útil (Gyawali *et al.*, 2014).

La importancia de los aditivos o ingredientes naturales en alimentos está aumentando debido al uso más extendido de componentes naturales en alimentos, cosméticos y en la industria farmacéutica, seguido de las directivas europeas a favor de los compuestos naturales frente a los sintéticos (Viuda-Martos *et al.*, 2012). Como resultado, hay un aumento de la demanda de productos naturales que puedan servir como alternativa (Tajkarimi *et al.*, 2010).

En producción ecológica la importancia es mayor, ya que como se mencionada en la legislación, en relación a la transformación de alimentos ecológicos el Reglamento (CE) Nº 834/2007 (en su última versión consolidada que incorpora las modificaciones que incorpora el Reglamento (UE) Nº 517/2013) establece que se obtendrá principalmente a partir de ingredientes de origen agrario principalmente de agricultura y ganadería ecológica como se ha mencionado anteriormente. A la hora de determinar si un producto se obtiene principalmente a partir de ingredientes de origen

agrícola, no se tendrán en cuenta el agua y la sal de mesa que se hayan añadido; únicamente se podrán utilizar aditivos, coadyuvantes tecnológicos, agentes aromatizantes, agua, sal, preparados de microorganismos y enzimas, minerales, oligoelementos, vitaminas, aminoácidos y otros micronutrientes en los alimentos para usos nutricionales específicos si han sido autorizados para su uso en la producción ecológica de conformidad con la legislación vigente.

El presente trabajo aborda el estudio del residuo de corteza de granada de cultivo ecológico como fuente de extractos naturales antimicrobianos, y pretende aportar conocimiento para la conservación de productos cárnicos es por ello que los extractos obtenidos se evaluarán frente a bacterias alterantes de carnes refrigeradas o indicadoras de la presencia de patógenos en carnes refrigeradas.



OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo es contribuir a la oferta de conservantes naturales para la industria ecológica, en este caso concreto utilizando como materia prima la piel de granada de cultivo ecológico, reconocida por su riqueza en compuestos fenólicos.

Objetivos específicos:

- Obtener extractos a partir de piel de granada con disolventes de un amplio rango de polaridad (hexano, acetato de etilo, acetona y metanol) y determinar su rendimiento de extracción.
- Caracterizar el perfil de compuestos polifenólicos de cada uno de los extractos.
- Determinar la capacidad antibacteriana de cada uno de los extractos frente a 3 bacterias seleccionadas en base a sus características alterantes o indicadoras de patógenos en productos cárnicos refrigerados.



MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

La granada (*Punica granatum* L.) de variedad "Mollar", se obtuvo de una finca localizada en Alquería (Murcia) certificada por el Consejo de Agricultura Ecológica de la Región de Murcia (CAERM) a través de la empresa "A pleno Sol" localizada en Orihuela, el cual tiene certificación de Sistema Participativo de Garantía (SPG) tomando como base la participación activa de los consumidores y se construyen a partir de la confianza, las redes sociales y el intercambio de conocimiento.

La obtención de la piel de granada se realizó en los laboratorios del Departamento de Tecnología Agroalimentaria siguiendo el procedimiento descrito por Viuda-Martos *et al.*, (2013) con algunas modificaciones (**Figura 1**):

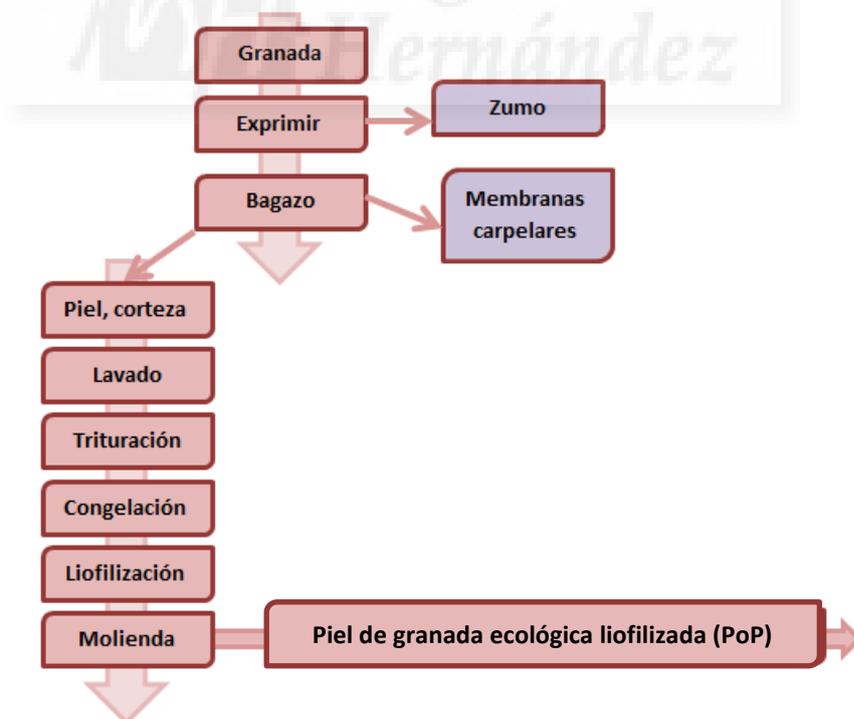


Figura 1. Esquema seguido para la obtención del co-producto: Piel de granada

3.2. EXTRACCIÓN

La extracción se llevó a cabo utilizando cuatro disolventes con diferente polaridad

(Figura 2):

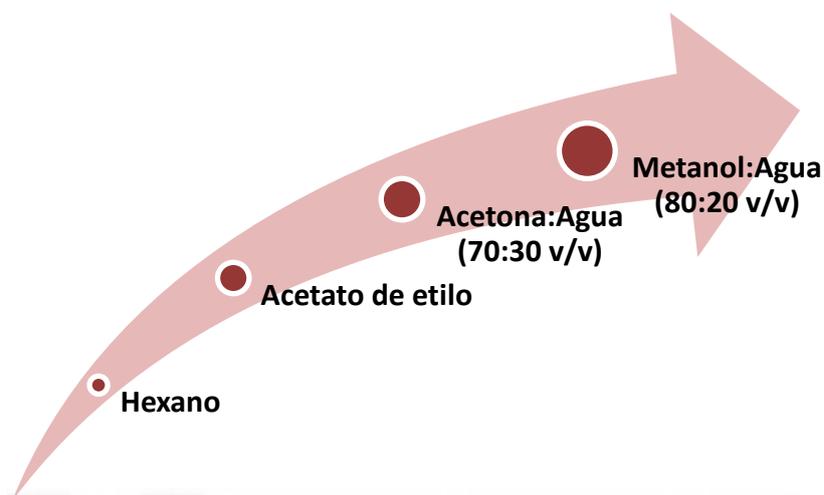


Figura 2. Disolventes utilizados con polaridad creciente (de izquierda a derecha).

Para obtener los extractos (PoPx), se colocaron 5 g de PoP en un tubo de centrífuga de polietileno de alta densidad (HDPE) y 30 ml de disolvente. Esta operación se realizó para cada uno de los disolventes en ensayo (Figura 2), posteriormente se realizó una homogeneización utilizando un Ultra-Turrax (IKA, T25D, Staufen, Alemania) durante 3 min a 18.000 rpm. A continuación tras centrifugar (Centrífuga C30P B. Braun Biotech International) a 2739 g (20 min, 4 °C) se transfirió el sobrenadante a un matraz de fondo redondo para llevarlo hasta sequedad utilizando una evaporador rotatorio R-205 (Büchi, Flawil, Suiza) bajo presión reducida (< 100 mbar) a 40 °C. Al final del proceso, para cada uno de los análisis que se realizaron (perfil polifenólico y actividad antimicrobiana). Cada extracción se realizó por triplicado para cada uno de los cuatro disolventes ensayados, para poder calcular el rendimiento de extracción y composición de los extractos obtenidos en:

- PoPh: hexano.
- PoPact: acetato de etilo.
- PoPac: acetona:agua (70:30 v/v).
- PoPm: metanol:agua (80:20 v/v).

Cada uno de ellos se disolvió en metanol (100 mg mL^{-1}) para la determinación del perfil polifenólico o en Muller Hinton (100 mg mL^{-1}) para actividad antibacteriana.

3.3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

3.3.1. Análisis por Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La determinación de los compuestos polifenólicos de cada uno de los PoPx (PoPh, PoPact, PoPac y PoPm) se realizó utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con el instrumento HPLC Hewlett-Packard serie 1200 (Woldbronn, Alemania) equipado con UV-Vis detector Diodo-Array. Las condiciones de análisis se especifican en la **Tabla 1** siguiente:

Tabla 1. Condiciones de la determinación de los compuestos fenólicos.

Volumen de inyección de muestra (μL)	20
Columna utilizada	Columna C18 Teknokroma (Mediterranea sea18, 25 x 0,4 cm, partícula 5 micras tamaño. Teknokroma, Barcelona, España)
Cromatogramas	280 nm
Gradiente de elución	1 mL min^{-1}
Fase móvil	Disolvente A: Ácido fórmico:Agua (4.5:95.5) Gradiente: 95% A (10 min), 75% A (20 min), 50% A (40 min), 20% A (50 min) and 20% A (60 min).

	Disolvente B: Acetonitrilo.
Patrones utilizados	Catequina, epicatequina, cafeico, ferúlico, p-cumárico, elágico, gálico, punicalagina, rutina y quercetina. (Extrasynthese, Genay, Francia).
Identificación compuestos	Comparación de los espectros de absorción UV y tiempos de retención de cada compuesto con los de patrones puros inyectaron en las mismas condiciones.
Cuantificación	A través de curvas de calibración de compuestos estándar como media de tres repeticiones.

3.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

3.4.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento

Se seleccionaron para el estudio bacterias alterantes de productos cárnicos refrigerados, así como indicadores de patógenos. Se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia. Se cultivaron las cepas siguientes durante 24 horas a 37 °C, en el caldo de cultivo Mueller-Hinton (MH):

- *Listeria innocua* CECT 910
- *Achromobacter denitrificans* CECT 449
- *Alcaligenes faecalis* CECT 145

Para poder ser empleadas como inóculo, se reactivaron hasta conseguir una densidad de 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) mL⁻¹.

3.4.2. Método de determinación de la actividad antimicrobiana por difusión.

La acción antibacteriana de la PoPx (100 mg mL^{-1}) fue probada en las bacterias descritas utilizando el método de difusión descrito por Smith-Palmer *et al.*, (1998). Los pocillos se realizaron asépticamente en el agar en el centro de la placa, con el fin de añadir $100 \text{ }\mu\text{L}$ de extracto. Las zonas de inhibición alrededor de los pozos se midieron utilizando una regla milimétrica transparente. Se identificaron dos zonas bien diferenciadas: zona de actividad bactericida y zona de actividad bacteriostática (Smith - Palmer *et al.*, 1998). Para cada uno de los extractos extracto y microorganismos estudiados a la concentración mencionada se realizaron tres repeticiones (**Figura 3**). La actividad bacteriostática es la capacidad de inhibir el crecimiento del microorganismo sin llegar a destruirlo, mientras que la actividad bactericida significa la destrucción de estos. El medio utilizado fue agar Mueller Hinton (MHA) (Oxoid Ltd. Reino Unido)

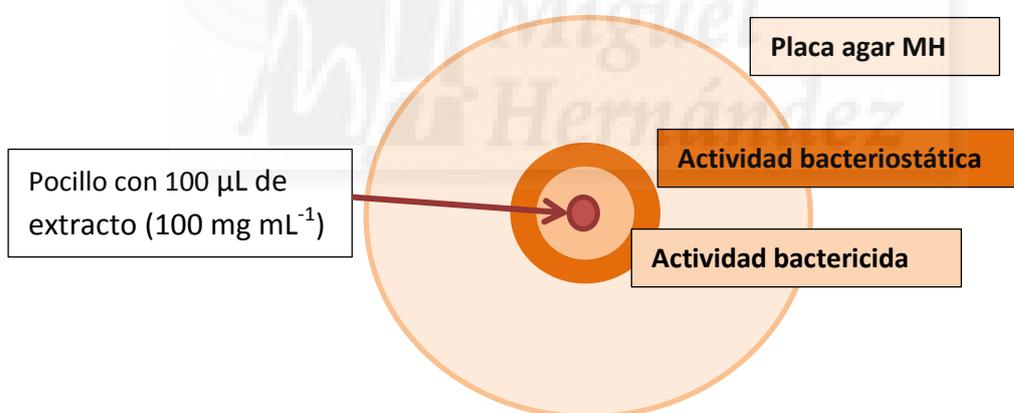


Figura 3. Simulación de la determinación de la acción antibacteriana por difusión en pocillo para cada uno de los extractos y microorganismos estudiados, diferenciándose dos zonas.

3.4.3. Método de determinación de la actividad antimicrobiana por microdilución: determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del crecimiento antimicrobiano de los extractos estudiados se realizó por el método microdilución en caldo de cultivo Mueller Hinton (MH) propuesto por Abate *et al.*, (1998), con algunas modificaciones.

Los cuatro extractos obtenidos fueron suspendidos hasta alcanzar un rango de concentraciones de 100 a 50 mg mL⁻¹ en MH y esterilizados por filtración a través de filtros de Nylon de 0.22 µm. Se preparó la microplaca de 96 pocillos (Iwaki, Japan) para cada uno de los extractos para cada uno de los microorganismos estudiados (añadiendo 20 µL de suspensión microbiana conteniendo alrededor de 10⁶ UFC ml⁻¹ en cada uno de los pocillo) para cada una de las concentraciones (**Figura 4**). Se obtuvo un volumen final de cada pocillo de 300 µL.

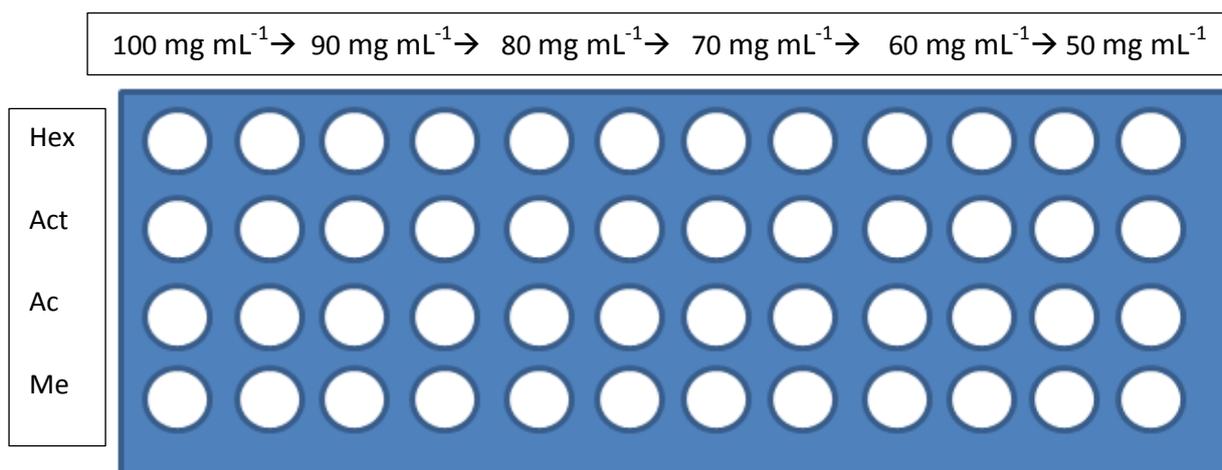


Figura 4. Simulación de la microplaca utilizada para el ensayo MIC.

El contenido de los pocillos se mezcló mediante un agitador a 150 rpm, durante 2 min, previamente a la incubación durante 24 horas a 37 °C. Tras la incubación se añadió a cada pocillo un volumen de 25µL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma Life Science) disuelto en DMSO a una concentración de 0.8 mg mL⁻¹. Tras una hora de incubación se comprobó en qué pocillos se había reducido el MTT como consecuencia del metabolismo microbiano, evidenciándose esto por un viraje del color amarillo del tetrazol inicialmente añadido, al color púrpura correspondiente al formazan producido.

La MIC se consideró como el valor de la concentración de cada uno de los PoPx del primer pocillo en el que no se produjo viraje de color (mínima concentración de PoPx a la que no hubo actividad metabólica microbiana). Los resultados fueron confirmados sembrando cada uno de los pocillos (cada una de las concentraciones y cada uno de los extractos) en placas con medio de agar MHA (10 mL). El procedimiento se repitió tres veces para cada microorganismo.

3.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y Test de Rangos Múltiples (Test de Tukey) tras previamente calcular el valor medio, la desviación típica y el error de la medida. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SPSS versión 21 .0 (IMB SPSS Statistics Software, Inc., Chicago, IL, USA).

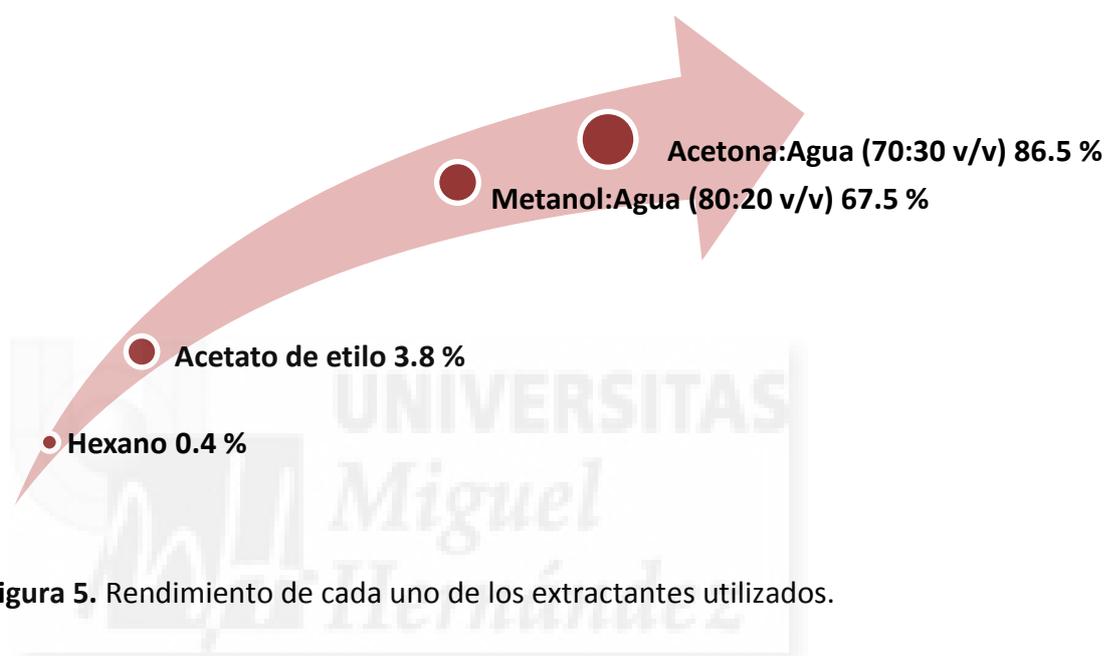
RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXTRACCIÓN

El disolvente utilizado para extracción mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) en el rendimiento de extracción, los cuales fueron como se muestra a continuación en orden decreciente (**Figura 5**):



4.2. PERFIL POLIFENÓLICO

En la **Tabla 2** se muestra el perfil polifenólico, determinado a través de HPLC, de los cuatro PoPx. Un total de cinco compuestos fenólicos fueron identificados como punicalaginas (PC), ácido elágico (EA) y derivados del ácido elágico (EAd1, EAd2 y EAd3) en todos los extractos excepto EAd1 que no se detectó en PoPact. En PoPh no se detectó ninguno de los compuestos mencionados.

En este trabajo, el valor mostrado como PC es la suma de los dos isómeros (α -punicalagina y β -punicalagina) como generalmente se expresa por otros autores (Calín-

Sánchez., 2013; Nuncio-Jáuregui *et al.*, 2015) ya que la columna y las condiciones utilizadas no son capaces de diferenciar los isómeros correctamente.

Tabla 2. Perfil polifenólico de los cuatro extractos de piel de granada ecológica (PoPx).

Compuesto	PoPx liofilizado ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	PoPm	PoPac	PoPact	PoPh
Punicalagina	5177 \pm 249 ^{b†}	7939 \pm 103 ^a	14 \pm 5 ^c	nd ^{††}
Ácido elágico	603 \pm 12 ^b	1026 \pm 17 ^a	171 \pm 3 ^c	nd
Derivado 1 ácido elágico	823 \pm 80 ^b	1026 \pm 12 ^a	nd ^{††}	nd
Derivado 2 ácido elágico	293 \pm 8 ^b	494 \pm 4 ^a	20 \pm 2 ^c	nd
Derivado 3 ácido elágico	283 \pm 10 ^b	528 \pm 6 ^a	22 \pm 8 ^c	nd

PoPm: extracto metanol –agua (80 % v/v); PoPac: 70 % extracto acetona (70 % v/v); PoPac: extracto etil acetato; PoPh: extracto hexano. [†]Valores seguidos de letras diferentes en la misma línea significa que fueron estadísticamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ($p < 0.05$) ^{††}nd = por debajo de LOQ [límite de cuantificación determinado mediante tres repeticiones de la desviación estándar de los blancos, límite de detección (LOD), multiplicado por el factor de dilución apropiado.

Los resultados mostraron que PoPac ($p < 0,05$) tuvo los contenidos más altos de todos los compuestos fenólicos identificados seguido por POPm. El principal compuesto encontrado en POPm y PoPac fu PC ($p < 0,05$), mientras que en PoPact fue EA. Los resultados obtenidos fueron similares que los publicados por otros autores (Gullón *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2008; Sarkhosh *et al.*, 2007), quienes mencionaron que los compuestos polifenólicos más abundantes en la cáscara de granada fueron PC seguidos por EA. En investigaciones anteriores en cuanto a la extracción fenólica (Akhtar *et al.*, 2015; Nuncio-Jáuregui *et al.*, 2015; Al-Zoreky *et al.*, 2009), el disolvente utilizado fue metanol o metanol-agua dado su alto rendimiento de extracción, sin

embargo en este trabajo el disolvente más efectivo fue acetona-agua, aunque el rendimiento de extracción de metanol también fue alto.

El uso de disolventes orgánicos en el procesado de fabricación de ingredientes de alimentos, en general y en alimentos ecológicos, en particular, está regulado y los aspectos medioambientales debe tenerse en cuenta para el uso de ellos como disolventes utilizados para la extracción (Tabaraki *et al.*, 2012). En este caso la acetona y metanol (los disolventes más eficaces en este trabajo) son ambos biodegradables.

4.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

4.3.1. Determinación MIC

La mínima concentración inhibitoria (MIC), expresada en mg ml⁻¹, de los extractos frente a *L. innocua*, *A. faecalis* y *A. denitrificans* se presenta en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de los extractos de piel de Granada ecológica (PoPx) frente *L. innocua*, *A. faecalis* y *A. denitrificans*. Se indica la concentración de extracto en el medio que inhibe totalmente el crecimiento de las bacterias

Microorganismo	MIC (mg mL ⁻¹)			
	PoPm	PoPac	PoPact	PoPh
<i>L. innocua</i> CECT 910	50 [†]	50	50	NA ^{††}
<i>A. faecalis</i> CECT 145	70 ^b	70 ^b	100 ^a	NA
<i>A. denitrificans</i> CECT 449	100 ^a	80 ^b	NA ^{††}	NA

PoPm: extracto metanol –agua (80 % v/v); PoPac: 70 % extracto acetona (70 % v/v); PoPea: extracto etil acetato; PoPh: extracto hexano. [†] Valores seguidos de letras diferentes en la misma línea significa que fueron estadísticamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ($p < 0.05$); ^{††}NA = No activo

Todos los extractos mostraron actividad antimicrobiana contra todas las bacterias analizadas excepto PoPact contra *A. denitrificans* y PoPh que no fue efectivo contra ninguno de los microorganismos estudiados. La bacteria más

sensible fue *Listeria innocua* se inhibió en presencia de 50 mg ml⁻¹ de todos PoPx excepto PoPh, es a la vez la única Gram positiva de las bacterias ensayadas No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en los valores de MIC de PoPac y POPm contra *A. faecalis*, mientras la MIC de PoPact fue de 100 mg ml⁻¹ ($p < 0,05$). Con respecto a *A. denitrificans*, PoPact no fue efectivo. En general, el extracto más activo fue PoPac ($p < 0,05$), seguido de POPm.

La actividad inhibidora de PoPx contra los microorganismos puede ser debido a los compuestos polifenólicos presentes en los extractos principalmente PC y EA o sus derivados. Las proteínas de alto peso molecular pueden reaccionar con compuestos polifenólicos constituyendo moléculas complejas, que pueden reaccionar con la enzima oxireductasa (enzimas celulares) que existe en la pared celular de las bacterias (Tehraniifar *et al.*, 2011) afectando a la estructura de la membrana celular, que conduce a una pérdida de la homeostasis celular (Li et al, 2014). Hay varios trabajos que identifican estos compuestos con actividad antimicrobiana (Agourram *et al.*, 2013; Abuelsaad *et al.*, 2013; Reddy *et al.*, 2007; Shan *et al.*, 2007). En estudios previos, el EA presentó actividad antibacteriana frente a ambos patógenos Gram-positivos y Gram-negativos (Miguel et al, 2010).

4.3.2. Método de difusión

La eficacia antimicrobiana de los diferentes PoPx contra las bacterias estudiadas se evaluó utilizando el método de difusión para medir las zonas de inhibición presentada. La **Tabla 4** muestra la actividad antibacteriana de los PoPx (100 µL de cada uno de los extractos a una concentración de 100 mg ml⁻¹) determinada aplicando el método de difusión.

Todos los extractos fueron efectivos contra *L. innocua* (Gram-positiva), excepto PoPh que no tuvo actividad antimicrobiana ninguna. El valor máximo de efecto bacteriostático fue de 2,4 mm correspondiente a POPm y presentando un escaso efecto bactericida. En cuanto a los otros microorganismos estudiados (ambos Gram-negativos), no se observó efecto antimicrobiano (bacteriostático y bactericida) de PoPx utilizando los extractos estudiados.

Tabla 4. Efecto antibacteriano de PoPx (100 mg mL^{-1}) en cada uno de los microorganismos estudiados, aplicando el método de difusión expresado en mm de halo de inhibición.

Microorganismo	Diámetro de la zona de inhibición (mm) [†]			
	PoPm	PoPac	PoPea	PoPh
<i>L. innocua</i> CECT 910	2.4±0.2 (1.2±0.1) ^{††}	1.9±0.3 (1.4 ±0.1)	1.4±0.1 (0.9±0.1)	nd
<i>A. faecalis</i> CECT 145	nd*	nd	nd	nd
<i>A. denitrificans</i> CECT 449	Nd	nd	nd	nd

[†]Los valores muestran las medias de tres repeticiones. *No se ha detectado actividad inhibitoria

^{††}Valores dentro de los corchetes indican actividad bactericida (no crecimiento), mientras que los otros alores indican actividad bacteriostática (ligero crecimiento detectado).

Dado que el efecto inhibidor sólo se detectó frente a la bacteria Gram-positivas ensayada, puede ser debido a la relación de la naturaleza de la pared celular y el mecanismo de acción de los extractos. Para poder asegurarse de esta posible relación, se requiere de futuras investigaciones para estudiar los mecanismos de acción de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas frente a los mismos extractos.

Estos resultados mostraron también que los extractos tienen poca difusividad para el medio ambiente circundante y que sus mecanismos de acción inhibitoria

requieren el contacto directo con las bacterias diana, visto que los resultados obtenidos por microdilución, en que la bacteria está en contacto con el extracto la mostraron efectos antimicrobianos mayores. Así que su efecto inhibitorio sería eficaz, si estos extractos se utilizaran como parte de la formulación de alimentos, así como en recubrimientos o películas antimicrobianas que implican contacto agente-bacteria.



CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

- Es posible obtener extractos con actividad antimicrobiana a partir de la corteza de granada de cultivo ecológico. Ello permitiría por un lado revalorizar un subproducto de la industria ecológica y por otro obtener un extracto natural de origen ecológico para la industria de alimentos ecológicos.
- La polaridad del disolvente empleado afecta al rendimiento. A mayor polaridad, mayor rendimiento de extracción de compuestos de la piel liofilizada de granada.
- Los componentes detectados en piel de granada fueron punicalaginas y ácido elágico y sus derivados. La polaridad del disolvente empleado afecta a la cantidad y tipología de compuestos fenólicos extraídos.
- La extracción con acetona:agua (70:30) dio lugar a la mayor actividad antimicrobiana.
- La actividad antimicrobiana está relacionada con el contenido en compuestos fenólicos puesto que el extracto obtenido con acetona:agua (70:30) presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos.
- Los extractos obtenidos en acetato de etilo y hexano no se consideran de utilidad por su bajo rendimiento de extracción, escasa capacidad de extracción de compuestos fenólicos y baja capacidad antimicrobiana, además de por la naturaleza de estos compuestos.
- Los extractos de granada precisan de entrar en contacto directo con las bacterias diana para ser efectivos antimicrobianos.
- Los extractos de corteza de granada, procedentes de cultivo ecológico controlado y certificado son una valiosa aportación a la seguridad

alimentaria de los extractos. Los extractos antimicrobianos así obtenidos podrían ser considerados como fuente de compuestos conservantes que ejercerían su efecto antimicrobiano para elaborar alimentos ecológicos o para ser incluidos en coberturas comestibles o envases.



BIBLIOGRAFÍA



6. BIBLIOGRAFÍA

- Abate, G., Mshana, R. N., and Miorner, H. (1998). Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2, 1011–1016.
- Abuelsead, A. S. A., Mohamed, I., Allam, G., Al-Solumani, A. A. (2013). Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against *Aeromonas hydrophila* in a murine model. *Life Sciences*, 93, 714-722
- Agourram, A., Ghirardello, D., Rantsiou, K., Zeppa, G., Belviso, S., Romane, A., *et al.*, (2013). Phenolic content, antioxidant potential and antimicrobial activities of fruit and vegetables by-products extracts. *International Journal of Food Properties*, 16(5), 1092-1104.
- Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., Sestili, P. (2015). Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*, 174, 417-425.
- Al-Jarallah, A., Igdoura, F., Zhang, Y., Teneder, C. B., White, E. J., MacDonald, M. E., *et al.*, (2013). The effect of pomegranate extract in coronary artery atherosclerosis in SR-BI/APOE double knockout mice. *Atherosclerosis*, 228 (1), 80-89.
- Al-Zoreky, N. S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 244-248.
- Balasundran, N., Sundram, K., Sammam, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 151-156.

- Banihani, S., Swedan, S., Alguraan, Z. (2013). Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutrition Research*, 33 (5), 341-348.
- Calín-Sánchez, A., Figiel, A., Hernández, F., Melgarejo, P., Lech, K. Carbonell-Barrachina, A. A. (2013). Chemical composition, antioxidant activity and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) arils and rind as affected by drying method. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1644-1654.
- Chanda, S., Bravalia, Y., Kaneira, M., Rakholiya, K. (2010). Fruit and vegetable peel—strong natural source of antimicrobics. In *Current Research, Technology and Educations Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (Vol. 2)*: (pp. 444-450). Spain: Fomatex Research Center.
- Funeri, P. M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N., Bisignano, G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20(4), 293-196.
- Gullón, B., Pintado, M., Perez-Alvarez., J. A., Viuda-Martos, M. (2016). Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. *Food Control*, 59, 94-98.
- Gyawali, R., Ibrahim S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429.
- Hamoud, S., Hayek, T., Volkva, N., Attias, J., Moscovic, D., Rosenblat, M., *et al.*, (2014). Pomegranate extract (POPx) decreases the atherogenicity of serum and of human monocyte-derived macrophages (HMDM) in simvastatin-treated

hypercholesterolemic patients: A double-blinded, placebo-controlled, randomized, prospective pilot study. *Atherosclerosis*, 232, 204-210

Hasnaoui, N., Wathélet, B., Jiménez-Araujo, A. (2014). Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. *Food Chemistry*, 160, 196-203.

Hugo, W. B., Broomfield, S. F. (1971). Studies on the mode of action of the phenolic antibacterial agent fentichlor against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 3. The effect of fentichlor on the metabolic activities of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 34(3), 579-591.

Li, G., Xu, Y., Wang, X., Zhang, B., Shi, C., Zhang, W., Xia, X. (2014). Tannin-rich fraction from pomegranate rind damages membrane of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11 (4), 1-7

Lu, J., Ding, K., Yuan, Q. (2008). Determination of punicalagin isomers in pomegranate husk. *Chromatographia*, 68, 303-306.

Malviya, S., Jha, A., Hettiarachchi, N. (2013). Antioxidant and Antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 1-6.

Melgarejo, P., Salazar, D. M. (2003). Tratado de Fruticultura para Zonas Áridas y Semiáridas; Ed. Madrid: Mundi-Prensa

Melgarejo, P., Hernández, F., Legua P. (2010). El granado. In Proceedings of I Jornadas Nacionales sobre el Granado: Producción, Economía, Industrialización, Alimentación y Salud 8 pp. 36-37). Elche (Alicante), Spain: Universidad Miguel Hernández de Elche, Departamento de Producción Vegetal y Microbiología.

- Miguel, M., Neves, M., Antunes, M. (2010). Pomegranate (*Punica granatum* L.): a medicinal plant with myriad biological properties a short review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 2836-47.
- Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., Khodaparast, M. H. H. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry*, 115, 1274-1278.
- Nuncio-Jáuregui, N., Munera-Picazo, S., Calín-Sánchez, A., Wojdylo A., Hernández F., Carbonell-Barrachina A. A. (2015). Bioactive compound composition of pomegranate fruits removed during thinning. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 1-19.
- Orgil, O., Schwartz, E., Barruch, L., Matityahu, I., Mahajna, J. Amir, R. (2014). The antioxidative and anti-proliferative potential non-edible organs of the pomegranate fruit and tree. *LWT-Food Science and Technology*, 58, 571-577.
- Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. L., Ferrira, D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, elagitannins and phenolic acid from *Punica granatum* L. *Planta Medica*, 73(5), 461-467.
- Sánchez-Zapata, E., Fuentes-Zaragoza, E., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Pérez-Álvarez, J. A. (2009). Preparation of dietary fibre powder from tiger nut (*Cyperus esculentus*) milk ("horchata") byproducts and its physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7719-7725.

- Shadini, F., Naczk, M. (2004). Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press. P. 352-355.
- Shan, B., Cai, Yi-Z., Brooks, J. D., Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1), 112-119.
- Sarkhosh, A., Amani, Z., Fatahi, R., Ghorbani, H., Hadian, J. (2007). A review on medicinal characteristic of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (22), 13-24.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology*, 26, 118 – 122.
- Tabaraki, R., Heidarizadi, E., Benvdi, A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response Surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 16-23.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S., Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21 (9), 1199-1218.
- TehraniFar, A., Selahvarzi, Y., Jharrazi, M. Bajhsg, V. J. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, 34, 1523-1527.

- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Mutujhukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 5987-6000.
- Vagi, E., Simandi, B., Vasa, R.K.P., Daood, H., Kery, A., Doleschall, F., Nagy, B. (2007). "Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products." *Journal of Supercritical Fluids*, 40(2), 218-226.
- Vasconcelos, L. C. S., Sampaio, M. C. C., Sampaio, F. C., Higino, J. S. (2003). Use of Punica Granatum as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses*, 46, 192-196.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A. (2009). Effect of adding citrus waste water, thyme and oregano essential oil on the chemical, physical and sensory characteristics of a bologna sausage. *Innovativa Food Science and Emergins Tecnology*, 10, 655-660.
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 635-654.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Martín-Sánchez, A., Sánchez-Zapata, E., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., Pérez-Álvarez, J. A. (2012). Chemical, physico-chemical and functional properties of pomegranate (Punica granatum L.) bagasses poder co-product. *Journal of Food Engineering*, 1100, 220-224.

Viuda-Martos, M., Pérez-Álvarez, J. A., Sendra, E., Fernández-López, J. (2013). In vitro antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peel powder extract obtained as coproduct in the juice extraction process. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37, 772-776.

