



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**Estrategias tecnológicas para optimizar la producción y la vida útil de
zumo de granada (*Punica granatum* cv. Mollar)**

Tesis Doctoral

Salud Vegara Gómez

Elche (Alicante), 2014



Dr. Antonio Ferrer Montiel, Director del *Instituto de Biología Molecular y Celular* de la Universidad Miguel Hernández.

DA SU CONFORMIDAD a la lectura de la Tesis Doctoral titulada: “Estrategias tecnológicas para optimizar la producción y la vida útil de zumo de granada (*Punica granatum* cv. Mollar)”, presentada por Dña. Salud Vegara Gómez para optar al grado de Doctora, la cual ha sido realizada en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que conste los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche (Alicante),
a de de 2014.

Fdo. Dr.



Dra. Nuria Martí Bruñá, Profesor Contratado Doctor de la Universidad Miguel Hernández, **Dr. Manuel Valero Roche**, Profesor Titular de Microbiología y Dr. **Domingo Saura López**, Profesor Titular en el Área de Tecnología de los Alimentos de la misma universidad,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación que conduce a la obtención del grado de Doctora: “Estrategias tecnológicas para optimizar la producción y la vida útil de zumo de granada (*Punica granatum* cv. Mollar)”, que es autora Dña. Salud Vegara Gómez, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que consten los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche (Alicante) a de de 2014.

Dra. Nuria Martí Bruñá- Directora

Dr. Manuel Valero Roche- Director

Dr. Domingo Saura López- Director

Resumen

La granada se ha convertido en un producto atractivo para el consumidor tanto por sus propiedades organolépticas como nutricionales. En este estudio se han evaluado la utilización de distintas técnicas para la obtención y estabilidad del zumo de granada de la variedad Mollar de Elche. Inicialmente se determinó la eficiencia de extracción de zumo de granada mediante la utilización de distinta maquinaria (prensas, licuadoras...), observando la influencia en la composición del zumo obtenido en presencia o no de corteza, así como su caracterización como referencia para la industria productora del mismo. Además, se ha evaluado el efecto de distintas tecnologías de estabilización del zumo sobre su composición físico-química, compuestos con actividad biológica y rendimientos, así como su color ya que éste experimenta un enturbiamiento cuando es sometido a tratamientos térmicos. Se han realizado ensayos de clarificación convencional (albúmina y bentonita) y filtración tangencial (microfiltración y ultrafiltración) con el fin de eliminar los compuestos responsables de dicho enturbiamiento no observándose diferencias en cuanto a composición del zumo, pero si una mejora del color con la filtración tangencial. También, se ha evaluado el efecto del tratamiento térmico de pasteurización sobre las características del zumo de granada, mediante la realización de ensayos de laboratorio a distintos tiempos y temperaturas y de esta forma realizar la selección de dos tratamientos (65 °C 30 s y 90 °C 5 s) para llevar a cabo estudios a escala piloto. Como resultado del estudio de pasteurización se pudo concluir que temperaturas bajas de pasteurización logran reducir la carga microbiana inicial del zumo hasta valores seguros en comparación con tratamientos de pasteurización convencionales a mayores temperaturas, y producen una menor pérdida y degradación del color y compuestos bioactivos. Para finalizar el estudio se realizó un ensayo de vida útil de dos zumos, turbio y clarificado, a temperaturas de refrigeración (5 °C) y ambiente (25 °C), pudiendo concluir que la temperatura de almacenamiento es uno de los mayores parámetros que influyen en la degradación del zumo de granada. Para concluir, destacar que la utilización conjunta de varias técnicas desarrolladas en este trabajo puede permitir la obtención de un zumo de granada atractivo para el consumidor y estable en el tiempo.



AGRADECIMIENTOS

Este estudio forma parte del Proyecto “Producción de zumo de caqui (*Diospyros kaki* L.) y de Industrialización de la granada (*Punica granatum* L.)” y ha sido financiado por la Fundación Agroalimed. Se ha llevado a cabo en el Laboratorio y Planta Piloto de Extracción de Zumos del Campus de Desamparados de la Universidad Miguel Hernández de Elche y los Laboratorios de investigación del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández. Además también agradecer al laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Ciencias y Tecnología de los Alimentos del CEBAS-CSIC por su colaboración.

Estoy muy agradecida a los Doctores Nuria Martí, Manuel Valero y Domingo Saura, directores y supervisores de este trabajo, por su orientación e interés en mi formación.

Quiero expresar mi gratitud a la Doctora Lorena Funes, con la que he compartido largos días de trabajo, por crear una excelente atmósfera de trabajo y ayudarme en todo lo posible de manera desinteresada.

A tod@s l@s compañer@s de batalla, Eva González, Estefanía Sáez, Nieves Muñoz, María Berenguer, Sara Gea, Tabita Ana Cenusa, Laura Tomás, Almudena Perez, María Herranz y Enrique Barraión por su inestimable colaboración.

Quería agradecer a mis padres Francisco y Noëla. No tengo palabras para agradecer todo el esfuerzo y el apoyo que habéis tenido durante todos estos años. Gracias por darme la base de lo que soy, por apoyarme al 100 % y por estar siempre pensando en lo mejor para mi.

Finalmente, mi más sincero agradecimiento para Antonio. Sin su cariño, estímulo y comprensión, este trabajo no hubiera sido posible.

Elche, 2014

Salud Vegara Gómez



ARTÍCULOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

DOCTORAL

La presente tesis doctoral ha dado lugar a varios trabajos publicados y pendientes de publicación en revistas científicas en los campos de la ciencia y tecnología de los alimentos. En el apartado de Anexos pueden ser consultados y en este apartado serán listados:

Artículos publicados

1. Changes on indigenous microbiota, color, bioactive compounds and antioxidant activity of pasteurized pomegranate juice.

Pedro Mena, Salud Vegara, Nuria Martí, Cristina García-Viguera, Domingo Saura, Manuel Valero

Food Chemistry 141 (2013) 2122-2129

Índice de Impacto: 3,655

2. Approaches to understanding the contribution of anthocyanins to the antioxidant capacity of pasteurized pomegranate juices

S. Vegara, P. Mena, N. Martí, D. Saura, M. Valero

Food Chemistry 141 (2013) 1630-1636

Índice Impacto: 3,655



3. Effect of pasteurization process and storage on color and shelf-life of pomegranate juices.

Salud Vegara, Nuria Martí, Pedro Mena, Domingo Saura, Manuel Valero

LWT-Food Science and Technology 54 (2013) 592-596

Índice Impacto: 2,545

4. Chemical guide parameters for Punica granatum cv. 'Mollar' fruit juices processed at industrial scale

Salud Vegara, Nuria Martí, Luis Coll, Pepe Lorente, Domingo Saura, Manuel Valero

Food Chemistry 147 (2014) 203-208

Índice Impacto: 3,655

Artículos pendientes de publicación

5. Clarification of pomegranate juice at industrial scale.

Salud Vegara, Nuria Martí, Domingo Saura, Manuel Valero



ÍNDICES



ÍNDICE

CAPÍTULO 0. OBJETIVO	3
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GRANADO	9
1.2 PRODUCCIÓN E IMPORTANCIA ECONÓMICA	12
1.3 COMPOSICIÓN Y PARTES DE LA GRANADA	19
1.4 COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA GRANADA	20
1.4.1 ANTOCIANOS	23
1.4.1.1 COPIGMENTACIÓN	26
1.4.2 DERIVADOS DEL ÁCIDO ELÁGICO	28
1.5 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA GRANADA	30
1.6 TÉCNICAS DE PROCESADO Y ESTABILIZACIÓN DEL ZUMO DE GRANADA	33
1.6.1 CLARIFICACIÓN DE ZUMO DE GRANADA	34
1.6.1.1 CLARIFICACIÓN CONVENCIONAL DE ZUMO DE GRANADA	34
1.6.1.2 CLARIFICACIÓN POR FILTRACIÓN TANGENCIAL	37
1.6.1.2.1 TIPOS DE FILTRACIÓN POR MEMBRANAS	38
1.6.1.2.2 PARÁMETROS BÁSICOS DE DISEÑO Y OPERACIÓN	40
1.6.2 PASTEURIZACIÓN DE ZUMO DE GRANADA	49
1.6.2.1 FACTORES QUE AFECTAN A LA PASTEURIZACIÓN	50
1.6.2.2 TRATAMIENTOS DE PASTEURIZACIÓN FRECUENTES EN LOS ZUMOS	53
1.6.2.3 EFECTOS DE LA PASTEURIZACIÓN EN ZUMOS	53



1.6.3 ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL	54
-----------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA	59
--------------------------------	-----------

2.1 DETERMINACIÓN DE PH	61
2.2 CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES	61
2.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	61
2.4 DETERMINACIÓN DEL COLOR	62
2.4.1 CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS: ABSORBANCIA 420, 520 Y 700 NM	63
2.4.2 DETERMINACIÓN PARÁMETROS DE COLOR TRIESTÍMULO: MÉTODO CIELAB	63
2.5 DENSIDAD DE COLOR TOTAL	64
2.6 ÍNDICE DE PARDEAMIENTO	65
2.7 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE-MÉTODO TEAC, FRAP, ORAC	65
2.7.1 MÉTODO TEAC	66
2.7.2 MÉTODO FRAP	67
2.7.3 MÉTODO ORAC	67
2.8 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU	68
2.9 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN FENOLES TOTALES POR ESPECTROFOTOMETRÍA	69
2.10 ANTOCIANOS COPIGMENTADOS, MONOMÉRICOS Y POLIMÉRICOS	69
2.11 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC	71
2.12 DETERMINACIONES VARIAS	72
2.13 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS	74
2.14 CLARIFICACIÓN CONVENCIONAL	74
2.15 FILTRACIÓN TANGENCIAL	75
2.16 PASTEURIZACIÓN	76
2.16.1 EN CAPILARES DE VIDRIO	76
2.16.2 EN PASTEURIZADOR TUBULAR	76



2.17 VIDA ÚTIL	77
-----------------------	-----------

CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN DE ZUMO DE GRANADA	79
--------------------------------------------------	-----------

3.1 INFLUENCIA DEL PROCESADO EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ZUMO DE GRANADA	81
3.1.1 INFLUENCIA DEL CORTE SOBRE EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ARILOS	81
3.1.2 INFLUENCIA DEL PENSADO	83
3.1.3 INFLUENCIA DEL PENSADO EN LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL ZUMO DE GRANADA	84
3.1.4 CONCLUSIONES	85
3.2 PRODUCCIÓN DE ZUMO DE GRANADA	86

CAPÍTULO 4. AUTENTIFICACIÓN DE ZUMO DE GRANADA	89
-------------------------------------------------------	-----------

4.1 CARACTERIZACIÓN DE ZUMO DE GRANADA Y COMPARACIÓN CON PARÁMETROS DE AIJN	92
4.1.1 SECCIÓN A. REQUERIMIENTOS DE CALIDAD EN ZUMO DE GRANADA	93
4.1.2 SECCIÓN B. CRITERIOS PARA LA AUTENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ZUMOS DE GRANADA	95
4.1.3 PERFIL DE ANTOCIANOS	100
4.1.4 ELAGITANINOS EN ZUMOS DE GRANADA	102
4.1.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y POLIFENOLES TOTALES EN ZUMOS DE GRANADA	103
4.2 ADULTERACIÓN Y MALAS PRÁCTICAS EN EL PROCESADO	106
4.2.1 ÁCIDOS ORGÁNICOS	107
4.2.2 AZÚCARES	107
4.2.3 MINERALES	108



4.2.4 METALES PESADOS	108
4.2.5 AMINOÁCIDOS	109
4.2.6 COLOR ROJO: ANTOCIANOS Y EXTRACTOS COLOREADOS	109

CAPÍTULO 5. CLARIFICACIÓN DE ZUMO DE GRANADA	117
-----------------------------------------------------	------------

5.1 CLARIFICACIÓN CONVENCIONAL DE ZUMO DE GRANADA	121
5.1.1 EFECTO DE CLARIFICANTES EN ZUMO DE GRANADA	121
5.1.1.1 FOTOGRAFÍAS DE LOS ZUMOS CLARIFICADOS	131
5.1.2 EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN EN ZUMO DE GRANADA	133
5.1.2.1 FOTOGRAFÍAS DE LOS ZUMOS CLARIFICADOS Y	142
5.1.3 CONCLUSIONES	146
5.2 CLARIFICACIÓN DE ZUMO DE GRANADA POR FILTRACIÓN TANGENCIAL	148
5.2.1 TEST DE AGUA	148
5.2.2 ESTUDIO DE MICROFILTRACIÓN Y ULTRAFILTRACIÓN	149
5.2.2.1 RESULTADOS DEL CAUDAL DE FILTRACIÓN	150
5.2.2.2 RESULTADOS DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	151
5.2.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN LOS PARÁMETROS	
FISICOQUÍMICOS DEL ZUMO DE GRANADA PREVIO A LA FILTRACIÓN TANGENCIAL	154
5.2.3.1 RESULTADOS FISICOQUÍMICOS	155
5.2.4 ESTUDIO DE FILTRACIÓN TANGENCIAL DE ZUMO PRETRATADO	
ENZIMÁTICAMENTE	158
5.2.4.1 RESULTADOS DEL CAUDAL DE FILTRACIÓN	158
5.2.4.2 RESULTADOS DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	160
5.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	167
5.2.6 CONCLUSIONES	168



CAPÍTULO 6. PASTEURIZACIÓN DE ZUMO DE GRANADA **173**

6.1 PASTEURIZACIÓN DE ZUMO DE GRANADA EN CAPILARES DE VIDRIO	175
6.1.1 DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA INICIAL DEL ZUMO	176
6.1.2 DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN TIEMPO/TEMPERATURA	176
6.2 PASTEURIZACIÓN DE ZUMO DE GRANADA SEMIINDUSTRIAL	177
6.2.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PASTEURIZACIÓN SOBRE LA MICROBIOLOGÍA DEL ZUMO	177
6.2.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PASTEURIZACIÓN SOBRE EL COLOR DEL ZUMO	179
6.2.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PASTEURIZACIÓN SOBRE EL PH DEL ZUMO	184
6.2.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PASTEURIZACIÓN SOBRE LOS POLIFENOLES TOTALES DEL ZUMO	185
6.2.5 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PASTEURIZACIÓN SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	186
6.3 CONCLUSIONES	189

CAPÍTULO 7. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL **191**

7.1 ESTUDIO DE VIDA ÚTIL DE ZUMO DE GRANADA	193
7.2 INFLUENCIA DEL ALMACENAMIENTO EN LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ZUMO DE GRANADA	193
7.3 INFLUENCIA DEL ALMACENAMIENTO EN EL PH DE	196
7.4 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN EL COLOR ROJO DE ZUMO DE GRANADA	198
7.5 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA DENSIDAD DE COLOR TOTAL DE ZUMO DE GRANADA	200



7.6 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN EL PARDEAMIENTO DE ZUMO DE GRANADA	203
7.7 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN EL CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES DE ZUMO DE GRANADA	204
7.7.1 ABSORBANCIA 280 NM	205
7.7.2 MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU	206
7.8 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ZUMO DE GRANADA	210
7.8.1 MÉTODO ABTS	210
7.8.2 MÉTODO FRAP	212
7.8.3 MÉTODO ORAC	213
7.9 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN ANTOCIANOS COPIGMENTADOS, POLIMÉRICOS Y MONOMÉRICOS DE ZUMO DE GRANADA	215
7.10 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN ANTOCIANOS TOTALES DE ZUMO DE GRANADA	219
7.11 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN ANTOCIANOS INDIVIDUALES DE ZUMO DE GRANADA	222
7.12 FOTOGRAFÍAS DE LOS ZUMOS A LO LARGO DEL ALMACENAMIENTO	225
7.13 CONCLUSIONES	228

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	231
---------------------------------	------------

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA	237
---------------------------------	------------

CAPÍTULO 10. ANEXOS	261
----------------------------	------------

ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL	291
---------------------------------------------------	------------



ÍNDICE FIGURAS

FIGURA 1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE GRANADAS	12
FIGURA 2. EVOLUCIÓN DE LA SUPERFICIE TOTAL DE GRANADOS	13
FIGURA 3. EVOLUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GRANADAS	13
FIGURA 4. EVOLUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GRANADAS EN ESPAÑA (TONELADAS)	14
FIGURA 5. ESTRUCTURA DE LOS FLAVONOIDES	22
FIGURA 6. ESTRUCTURA DE ÁCIDOS FENÓLICOS	22
FIGURA 7. ESTRUCTURA DE LOS TANINOS	23
FIGURA 8. ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS ANTOCIANOS	24
FIGURA 9. CAMBIOS PRODUCIDOS EN LA ESTRUCTURA DE LOS ANTOCIANOS ANTE VARIACIONES DEL pH	25
FIGURA 10. ESTRUCTURA DEL ÁCIDO ELÁGICO	28
FIGURA 11. ESTRUCTURA DE UNA PUNICALAGINA	29
FIGURA 12. FILTRACIÓN TANGENCIAL O CROSSFLOW FILTRATION	37
FIGURA 13. FORMA GENERAL DE LAS GRÁFICAS FLUJO DE VOLUMEN FRENTE A GRADIENTE DE PRESIÓN.	45
FIGURA 14. POLARIZACIÓN POR CONCENTRACIÓN	47
FIGURA 15. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS TRES ETAPAS DE DESCENSO DE LA DENSIDAD DE FLUJO DE PERMEADO CON EL TIEMPO	48
FIGURA 16. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DONDE SE MUESTRA CÓMO EL TIEMPO EJERCE DISTINTOS EFECTOS DEPENDIENDO DE LA TEMPERATURA EN LAS REACCIONES QUÍMICAS, BIOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS	50
FIGURA 17. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA EN PLACA	62



FIGURA 18. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DEL SISTEMA TRIDIMENSIONAL O ESPACIO DE COLOR CIELAB	64
FIGURA 19. REACCIÓN DE LOS ANTOCIANOS CON BISULFITO PARA FORMAR COMPUESTOS NO COLOREADOS (ANTOCIANOS-ÁCIDO SULFÓNICO)	70
FIGURA 20. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL EQUIPO DE FILTRACIÓN	75
FIGURA 21. INFLUENCIA DEL TIPO DE CORTE EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ARILOS	82
FIGURA 22. INFLUENCIA DEL PENSADO EN EL RENDIMIENTO DE ZUMO	83
FIGURA 23. INFLUENCIA DEL PENSADO EN LA COMPOSICIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ZUMO DE GRANADA	85
FIGURA 24. DIAGRAMA DE PRODUCCIÓN DE ZUMO DE GRANADA	87
FIGURA 25. PERFIL TÍPICO DE ANTOCIANOS EN ZUMO DE GRANADA. 1) DELFINIDINA 3,5-DIGLUCÓSIDO, 2) CIANIDINA 3,5-DIGLUCÓSIDO, 3) PELARGONIDINA 3,5-DIGLUCÓSIDO, 4) DELFINIDINA 3-GLUCÓSIDO, 5) CIANIDINA 3-GLUCÓSIDO Y 6) PELARGONIDINA 3-GLUCÓSIDO	110
FIGURA 26. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE CLARIFICACIÓN EN EL COLOR ROJO DE ZUMO DE GRANADA (A) BENTONITA Y (B) OVOALBÚMINA	122
FIGURA 27. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE CLARIFICACIÓN EN LA TURBIDEZ DE ZUMO DE GRANADA (A) BENTONITA Y (B) OVOALBÚMINA	123
FIGURA 28. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE CLARIFICACIÓN EN EL PARDEAMIENTO DE ZUMO DE GRANADA (A) BENTONITA, (B) OVOALBÚMINA	125
FIGURA 29. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE CLARIFICACIÓN EN LA DENSIDAD DE COLOR TOTAL DE ZUMO DE GRANADA (A) BENTONITA Y (B) OVOALBÚMINA	127



FIGURA 30. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE CLARIFICACIÓN EN EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES DE ZUMO DE GRANADA (A) BENTONITA Y (B) OVOALBÚMINA	128
FIGURA 31. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE CLARIFICACIÓN EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ZUMO DE GRANADA (A) BENTONITA Y (B) OVOALBÚMINA	130
FIGURA 32. EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN EN EL COLOR ROJO DE ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A) BENTONITA Y (B) OVOALBÚMINA	134
FIGURA 33. EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN EN LA TURBIDEZ DE ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A) BENTONITA Y (B) OVOALBÚMINA	135
FIGURA 34. EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN EN EL PARDEAMIENTO DE ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A) BENTONITA Y (B) OVOALBÚMINA	137
FIGURA 35. EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN EN LA DENSIDAD DE COLOR TOTAL DE ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A) BENTONITA Y (B) OVOALBÚMINA	138
FIGURA 36. EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN EN EL CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES DE ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A) BENTONITA Y (B) OVOALBÚMINA	140
FIGURA 37. EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A) BENTONITA Y (B) OVOALBÚMINA	141
FIGURA 38. CAÍDA DE CAUDAL DURANTE FILTRACIÓN TANGENCIAL	150
FIGURA 39. CAÍDA DEL CAUDAL DE FILTRACIÓN CON MEMBRANA DE 0.2 μM (A) Y 0.1 μM (B) EN ZUMOS DE GRANADA SIN Y CON PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO CON 350 PPM DE VISCOZYME L Y 150 PPM DE FRUCTOZYM COLOR Y 150 PPM DE VISCOZYME L Y 350 PPM DE FRUCTOZYM COLOR	159



FIGURA 40. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PASTEURIZACIÓN EN EL COLOR ROJO DE ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B) (AP = ANTES DE PASTEURIZAR)	180
FIGURA 41. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PASTEURIZACIÓN EN LA DENSIDAD DE COLOR TOTAL DE ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	181
FIGURA 42. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PASTEURIZACIÓN EN EL ÍNDICE DE PARDEAMIENTO DE ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	183
FIGURA 43. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PASTEURIZACIÓN EN EL PH ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	184
FIGURA 44. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PASTEURIZACIÓN EN EL CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES DE ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	186
FIGURA 45. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PASTEURIZACIÓN EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	187
FIGURA 46. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN EL PH DE ZUMOS DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	197
FIGURA 47. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN EL COLOR ROJO DE ZUMOS DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	199
FIGURA 48. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA DENSIDAD DE COLOR DE ZUMOS DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	201
FIGURA 49. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN EL PARDEAMIENTO DE ZUMOS DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	203
FIGURA 50. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA ABSORBANCIA A 280 NM DE ZUMOS DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	206



FIGURA 51. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN EL CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES DE ZUMOS DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	207
FIGURA 52. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ABTS DE ZUMOS DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	211
FIGURA 53. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO FRAP DE ZUMOS DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	212
FIGURA 54. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ORAC DE ZUMOS DE GRANADA CLARIFICADO (A) Y TURBIO (B)	214
FIGURA 55A. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN ANTOCIANOS INDIVIDUALES EN ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO (A→ D) ■ DP 3,5dG ● CY 3,5dG ▲ PG 3,5dG □ DP 3G ○ CY 3G △ PG 3G	223
FIGURA 55B. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN ANTOCIANOS INDIVIDUALES EN ZUMO DE GRANADA TURBIO (E→ H) ■ DP 3,5dG ● CY 3,5dG ▲ PG 3,5dG □ DP 3G ○ CY 3G △ PG 3G	224



ÍNDICE TABLAS

TABLA 1. ANTOCIANOS MÁS EXTENDIDAS EN LA NATURALEZA	24
TABLA 2. PARÁMETRO VS IFU PARA CARACTERIZACIÓN DE ZUMO DE GRANADA	73
TABLA 3. REQUERIMIENTOS DE CALIDAD EN ZUMOS DE GRANADA	93
TABLA 4. PARÁMETROS DE CALIDAD PARA LA EVALUACIÓN DE LA AUTENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ZUMOS DE GRANADA	96
TABLA 5. CONTENIDO EN AMINOÁCIDOS EN ZUMO DE GRANADA	99
TABLA 6. CAMBIOS EN EL CONTENIDO EN ANTOCIANOS INDIVIDUALES EN ZUMO FRESCO Y COMERCIALIZADO DE GRANADA VARIEDAD “MOLLAR”	101
TABLA 7. CONTENIDO EN PUNICALAGINAS, PUNICALINAS Y ÁCIDO ELÁGICO EN ZUMOS DE GRANADA VARIEDAD “MOLLAR”	102
TABLA 8. CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ZUMOS DE GRANADA “MOLLAR”	104
TABLA 9. VALORES LÍMITE DE METALES PESADOS	108
TABLA 10. ANTOCIANOS INDIVIDUALES DE FRUTOS ROJOS	112
TABLA 11. TEST DE AGUA	149
TABLA 12. RESULTADOS FISCOQUÍMICOS DE ZUMOS DE GRANADA CLARIFICADOS POR MICROFILTRACIÓN Y ULTRAFILTRACIÓN	152
TABLA 13. RESULTADOS FISCOQUÍMICOS DE ZUMOS DE GRANADA HIDROLIZADOS ENZIMÁTICAMENTE	156
TABLA 14. RESULTADOS FISCOQUÍMICOS DE ZUMOS DE GRANADA PRETRATADOS ENZIMÁTICAMENTE Y CLARIFICADOS POR MICROFILTRACIÓN Y ULTRAFILTRACIÓN	161



TABLA 15. PORCENTAJES DE PÉRDIDA EN LOS PARÁMETROS DE ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO POR FILTRACIÓN TANGENCIAL	165
TABLA 16. RECUENTO TOTAL Y REDUCCIONES LOGARÍTMICAS (RED LOG) DE ZUMO DE GRANADA TURBIO PASTEURIZADO	176
TABLA 17. EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA REDUCCIÓN MICROBIOLÓGICA DE ZUMOS DE GRANADA PASTEURIZADOS (MEDIA ± SD)	178
TABLA 18. INCREMENTO EN LA POBLACIÓN MICROBIANA (LOG UFC/ML ± SD) CON EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO A TEMPERATURA AMBIENTE (25 °C) EN ZUMOS DE GRANADA PASTEURIZADOS Y NO PASTEURIZADOS	194
TABLA 19. INCREMENTO DE LA POBLACIÓN MICROBIANA (LOG UFC/ML ± SD) DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN CONDICIONES DE REFRIGERACIÓN (5 °C) EN ZUMO DE GRANADA TURBIO Y CLARIFICADO PASTEURIZADOS Y SIN PASTEURIZAR	195
TABLA 20. CORRELACIÓN ENTRE DENSIDAD DE COLOR TOTAL Y ABSORBANCIA A 520 NM	202
TABLA 21. CORRELACIÓN ENTRE ABSORBANCIA A 280 NM Y MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU	209
TABLA 22. % ANTOCIANOS COPIGMENTADOS, MONOMÉRICOS Y POLIMÉRICOS (MEDIA ± SD) EN ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO	216
TABLA 23. % ANTOCIANOS COPIGMENTADOS, MONOMÉRICOS Y POLIMÉRICOS (MEDIA ± SD) EN ZUMO DE GRANADA TURBIO	217
TABLA 24A. CONTENIDO EN ANTOCIANOS TOTALES EN ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO SIN PASTEURIZAR Y PASTEURIZADO (MG/L)	219
TABLA 24B. CONTENIDO EN ANTOCIANOS TOTALES EN ZUMO DE GRANADA TURBIO SIN PASTEURIZAR Y PASTEURIZADO (MG/L)	221



TABLA 25. CORRELACIÓN ENTRE ANTOCIANOS TOTALES POR HPLC Y ABSORBANCIA

A 520 NM

222





ÍNDICE IMÁGENES

IMAGEN 1. GRANADO	9
IMAGEN 2. FLOR DEL GRANADO	10
IMAGEN 3. GRANADAS	11
IMAGEN 4. ARILOS DE DISTINTAS VARIEDADES	16
IMAGEN 5. GRANADAS VARIEDAD MOLLAR	17
IMAGEN 6. GRANADAS VARIEDAD VALENCIANA	17
IMAGEN 7. GRANADA VARIEDAD ESPAÑOLA	18
IMAGEN 8. GRANADA VARIEDAD WONDERFUL	18
IMAGEN 9. ZUMO DE GRANADA CONTROL (SIN TRATAMIENTO DE CLARIFICACIÓN)	131
IMAGEN 10. ZUMOS CLARIFICADOS CON BENTONITA SÓDICA (0.1 → 2 G/L)	131
IMAGEN 11. ZUMOS CLARIFICADOS CON OVOALBÚMINA (0.1 → 2 G/L)	132
IMAGEN 12. ZUMO DE GRANADA CONTROL. PASTEURIZACIÓN 65 °C 30 s	142
IMAGEN 13. ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO CON BENTONITA SÓDICA (0.1 → 2 G/L)	
Y PASTEURIZADO A 65 °C 30 s	142
IMAGEN 14. ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO CON BENTONITA CALCO-SÓDICA (0.1 →	
2 G/L) Y PASTEURIZADO A 65 °C 30 s	143
IMAGEN 15. ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO CON OVOALBÚMINA (0.1 → 2 G/L) Y	
PASTEURIZADO A 65 °C 30 s	143
IMAGEN 16. ZUMO DE GRANADA CONTROL. PASTEURIZACIÓN 90 °C 5 s	144
IMAGEN 17. ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO CON BENTONITA SÓDICA (0.1 → 2 G/L)	
Y PASTEURIZADO A 90 °C 5 s	144
IMAGEN 18. ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO CON BENTONITA CALCO-SÓDICA (0.1 →	
2 G/L) Y PASTEURIZADO A 90 °C 5 s	145



IMAGEN 19. ZUMO DE GRANADA CLARIFICADO CON OVOALBÚMINA (0.1 → 2 G/L) Y PASTEURIZADO A 90 °C 5 S	145
IMAGEN 20. PLACAS DEL ANÁLISIS DE ANTOCIANOS COPIGMENTADOS, MONOMÉRICOS Y POLIMÉRICOS	218
IMAGEN 21. ZUMOS ALMACENAMIENTO: 14 DÍAS	225
IMAGEN 22. ZUMOS ALMACENAMIENTO: 21 DÍAS	225
IMAGEN 23. ZUMOS ALMACENAMIENTO: 28 DÍAS	226
IMAGEN 24. ZUMOS ALMACENAMIENTO: 45 DÍAS	226
IMAGEN 25. ZUMOS ALMACENAMIENTO: 60 DÍAS	226
IMAGEN 26. ZUMOS ALMACENAMIENTO: 90 DÍAS	227
IMAGEN 27. ZUMOS ALMACENAMIENTO: 120 DÍAS	227





LISTADO DE ABREVIATURAS

?: Porcentaje

Abra: Abreviatura

Abs: Absorbancia

AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride

ABTS: catión radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzoatotiazoin-6-sulfonato)

AE: Ácido Elágico

AOAC: Scientific Association Dedicated to Excellence in Analytical Methods-
Asociación científica dedicada a la excelencia en los métodos de análisis

AP: Antes de pasteurizar

BI: Índice de pardeamiento

Cy: Cianidina

Cm: centímetro

DG: Diglucósido

DO: Densidad óptica

Dp: Delfinidina

EAG: Equivalentes ácido Gálico

ET: Equivalentes Trolox

FC: Folin-Ciocalteu

FL: Fluoresceína

FRAP: Capacidad del plasma para reducir hierro

g: Gramo

G: Glucósido

GC: Cromatografía de gases



h: Hora

Ha: Hectárea

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HTP: Alta temperatura de pasteurización

Ic: Incontable

IFU: International Federation of Fruit Juice Producers- Federación internacional de productores de zumo

L: Litro

L.C: Límite de cuantificación

Log: Logaritmo

LTP: Baja temperatura de pasteurización

m: Metro

M: Molar

MARM: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente

Min: Minutos

mL: Mililitro

MRS: MRS agar

NC: No cuantificado

ND: No determinado

nm: Nanometro

°C: Grado centígrado

ORAC: Capacidad de absorción de radicales oxígeno

PCA: Agar de recuento en placa

PDA: Agar patata dextrosada

Pg: Pelargonidina



PTM: Presión transmembrana

Ppm: Partes por millón

PS: Polisulfona

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

PVPP: Polivinilpirrolidona

Red Log: Reducción logarítmica

Rpm: Revoluciones por minuto

S: Segundos

SB: Agar Sabouraud

SD: Desviación estándar

SS: Sólidos solubles

t: Tonelada

Tª: Temperatura

TCD: Densidad de color total

TPTZ: Tripiridil triazina

Tto: Tratamiento

UF: Ultrafiltración

Ufc: unidades formadoras de colonias

UV: Ultravioleta

μL: Microlitro

μm: Micrometro

CAPÍTULO 0. Objetivo





CAPÍTULO 0. OBJETIVO

La granada pertenece a la Familia Punicaceae y se corresponde con la especie *Punica granatum* L. Es un fruto muy atractivo e interesante ya que posee un elevado número de propiedades beneficiosas para la salud además de un excelente sabor. El creciente aumento de trabajos científicos que relatan las múltiples bondades de las granadas se está viendo traducido en un incremento del consumo de productos derivados como el zumo de granada, así como en un aumento de las producciones.

El objetivo de este trabajo es desarrollar protocolos de actuación para la producción industrial de zumo de granada turbio y clarificado de forma rentable, así como establecer las condiciones de tratamiento y almacenamiento del zumo para que este mantenga su atractivo color rojo y los compuestos bioactivos del mismo durante el máximo tiempo posible.

Las actuales tecnologías utilizadas en la producción del zumo de granada todavía están siendo desarrolladas ya que, la variedad de las granadas utilizadas, el estado de la fruta así como los procesos de manipulación para la extracción de zumo juegan un papel muy importante en la calidad del producto final. Además, la maquinaria utilizada para la obtención del zumo puede variar la composición del mismo, sobre todo en cuanto al contenido en compuestos bioactivos.

Una vez el zumo ha sido obtenido, el desarrollo de actuaciones con el objetivo de mantener las cualidades del mismo son necesarias, tanto para mantener su calidad microbiológica como organoléptica. Por ello, los tratamientos de pasteurización y las condiciones de almacenamiento son un paso muy importante para evaluar la vida útil del producto. En el caso del zumo de granada, son pocos los estudios realizados sobre la vida útil del mismo a pesar de haberse observado cómo las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del zumo varían con el almacenamiento.

Las modificaciones de técnicas utilizadas en la industria de zumos para su obtención, así como la puesta a punto de métodos o combinaciones de técnicas para evitar la degradación del zumo durante el almacenamiento son los pilares básicos en los



que se basa esta tesis doctoral, utilizando siempre como materia prima granadas de la variedad Mollar de Elche.



CAPÍTULO 1. Introducción





CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El nombre científico de la granada, es *Punica granatum*. “Punica” le fue atribuido por los romanos, ya que este arbusto fue introducido en las zonas mediterráneas por los cartagineses durante las Guerras Púnicas y “granatum” a lo referente a la densidad de granos que está lleno el fruto.

Es originaria de Oriente Medio y se extendió hacia el este de China y al oeste de África. Los árabes fueron los que la introdujeron en España, citándola ya en el siglo XIII Gonzalo de Berceo en uno de sus poemas, donde la llama milgrana (milgranos), por la abundancia de sus semillas. Las granadas proliferaron sobretodo en el sur de la Península, donde finalmente la ciudad de Granada tomó este nombre. Con la conquista de América, los colonos españoles llevaron esta fruta al continente.

1.1 Características generales del granado

Porte

El granado (*Punica granatum L.*) es un árbol caducifolio, a veces con porte arbustivo, de 3 a 6 m de altura, con el tronco retorcido. Su madera es dura y la corteza escamosa de color grisáceo. Las ramas jóvenes son más o menos cuadrangulares o angostas y de cuatro alas y posteriormente se vuelven redondas con corteza de color café grisáceo. La mayoría de las ramas, pero especialmente las pequeñas ramas axilares, son en forma de espina o terminan en una espina aguda; la copa es extendida.



Imagen 1. Granado



Sistema radicular

Presenta un sistema radicular con una raíz nudosa consistente, con corteza rojiza donde se encuentra un alcaloide, llamado peletierina o punicina.

Hojas

Sus hojas son de color verde brillante, lustrosas por el haz y con el borde entero. Nacen opuestas o casi opuestas sobre las ramas o bien agrupadas formando haces, tienen forma lanceolada abovada, un pecíolo corto y son ligeramente correosas. Generalmente miden 2-8 x 0.8-2 cm, y tienen un nectario apical que segrega azúcares (fructosa, glucosa, sucrosa); las estípulas son rudimentarias y difíciles de apreciar.



Imagen 2. Flor del granado

Flores

Hermafroditas, solitarias o reunidas en grupos de 2-5 al final de las ramas nuevas y de 3-4 cm de diámetro. Son grandes y de color rojo, lustrosas, acampanadas, subsentadas, con 5-8 pétalos y sépalos, persistiendo el cáliz en el fruto. En algunas variedades las flores son abigarradas e incluso matizadas en blanco. Florece en mayo-julio, aunque algunas variedades lo hacen más tarde.



Fruto

El fruto, la granada, es una baya denominada balausta de forma redonda, que tiene un color que varía de amarillo a rojo-púrpura. Poseen un diámetro de 5-12 cm y su cubierta es lisa y de textura correosa. Son esféricas, algo aplanadas y con un cáliz persistente, que puede tener una longitud de 1-6 cm. Las numerosas semillas están rodeadas de una pulpa, la parte comestible, de color rosada a rojo-púrpura, jugosa y ácida. La pulpa es algo astringente y las semillas son angulares y duras por dentro. La capa externa de la testa está cubierta por una capa delgada o pulpa jugosa, roja, rosa o blanco amarillenta, astringente y ácida.



Imagen 3. Granadas

Condiciones edafoclimáticas

Los climas más favorables para el desarrollo del cultivo del granado son los climas tropicales, subtropicales y de tipo Mediterráneo; también puede desarrollarse en climas de tipo templado pero, en estos climas, el fruto no llega a madurar de manera satisfactoria, por lo que se utiliza como ornamental. El cultivo precisa de veranos cálidos y secos, coincidiendo con la época de maduración del fruto, ya que son necesarias altas temperaturas durante la época de maduración para producir un fruto de buena calidad. Sin embargo, los frutos de mejor calidad se producen en las regiones con inviernos frescos y veranos cálidos y secos. El granado presenta un alto requerimiento de agua y humedad en sus raíces y bajo estas condiciones los frutos presentan mayor calidad. Esto no quiere decir que el granado no soporte bien la sequía y que bajo condiciones de estrés no llegue a vegetar a costa de producir poco (Melgarejo y Salazar, 2003).

En cuanto al tipo de suelo, las granadas producen mejor en los suelos profundos y ricos en materia orgánica, pero están adaptadas a muchos tipos de suelos que van

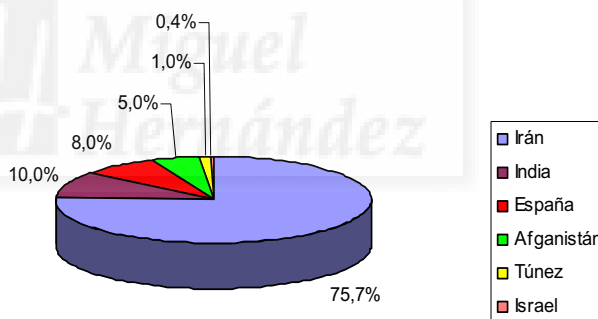


desde los arenosos hasta los arcillosos. Los rendimientos son usualmente bajos en los suelos arenosos y los frutos tienen un color pobre en los arcillosos. Crecen óptimamente en suelos profundos, húmedos y con un pH que varía entre 5.5 y 7.0. Pero, por lo general el granado no es exigente en suelo. Los terrenos alcalinos le son favorables; incluso los excesos de humedad favorecen su desarrollo. El suelo ideal debe ser ligero, permeable, profundo y fresco. Le es indiferente la alcalinidad o acidez del suelo. Es tolerante a la sequía, a la salinidad, a la clorosis férrica y a caliza activa.

1.2 Producción e importancia económica

Como podemos observar en el gráfico (**Figura 1**), Irán es el país de mayor producción a nivel mundial (como se aprecia en el gráfico un 75.7 %) seguida de la India (con un 8 %) y España (con un 5 %). A nivel nacional, la importancia económica del granado es muy notable, ya que es uno de los principales países productores y exportadores de Europa.

La costa mediterránea, y más específicamente la Comunidad Valenciana, es la zona más importante de este cultivo siendo la provincia de Alicante la principal productora, abarcando el 93 % de la producción nacional.



**Figura 1. Producción mundial de granadas
MARM (2011)**

La granada, casi desconocida para los españoles tiene paradójicamente un alto reconocimiento en el extranjero. Un 80 % de la producción es exportada, mientras el 20 % restante es el que cubre las necesidades nacionales. Las exportaciones son muy elevadas debido a la gran demanda de este producto. Sólo un 15 % de las ventas corresponden a Rusia, la potencia europea que más granada demanda y mejor paga. En



cuanto a las importaciones, la procedente de Turquía, Argel y Marruecos no representan competencia porque sólo cubren la temporada que en España no se produce granada.

Según los datos estadísticos aportados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MARM) entre el año 2002 y el año 2011, la superficie total de granados plantados en España comienza a disminuir desde el año 2002 (**Figura 2**). En este año, la superficie total cultivada fue de 2927 ha y según los datos del año 2011, esta superficie fue inferior, unas 2610 ha, a pesar de que parece que la superficie de plantación está aumentado.

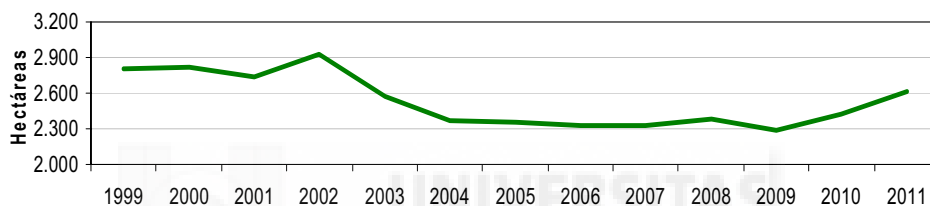


Figura 2. Evolución de la superficie total de granados

De igual modo, la producción de granadas también comienza a disminuir desde el año 2002 (37424 toneladas), hasta alcanzar en el año 2011 una producción de 32606 toneladas (**Figura 3**). Además, sólo 614 toneladas se dedicaron a la transformación de esta fruta.

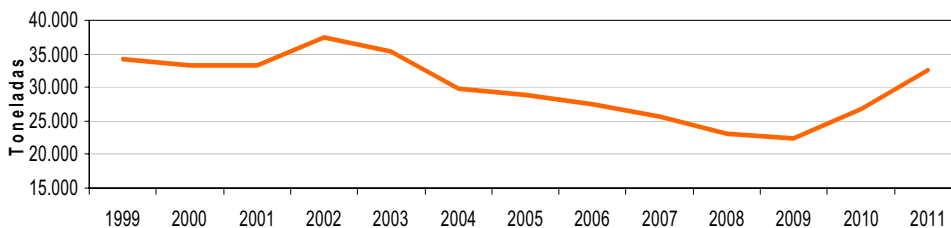


Figura 3. Evolución de la producción de granadas



Históricamente el cultivo de granado era practicado mayoritariamente en la Región de Murcia y la provincia de Alicante pero, en los últimos años, quizá debido a las condiciones de extrema sequía, se ha producido un descenso de la superficie cultivada en la Región de Murcia mientras que en Andalucía ha aumentado significativamente la superficie cultivada. Aún así podemos decir que en España se cultivaron unas 2610 ha, siendo la comunidad autónoma con mayor superficie cultivada la C. Valenciana (2130 ha), concentrándose la mayor parte de estas hectáreas cultivadas en la provincia de Alicante (2029 ha), seguida de Andalucía (244 ha) y, por último, la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (180 ha) (MARM, 2011), concentrándose en éstas tres comunidades el 93 % de la producción de granado en España (Figura 4).

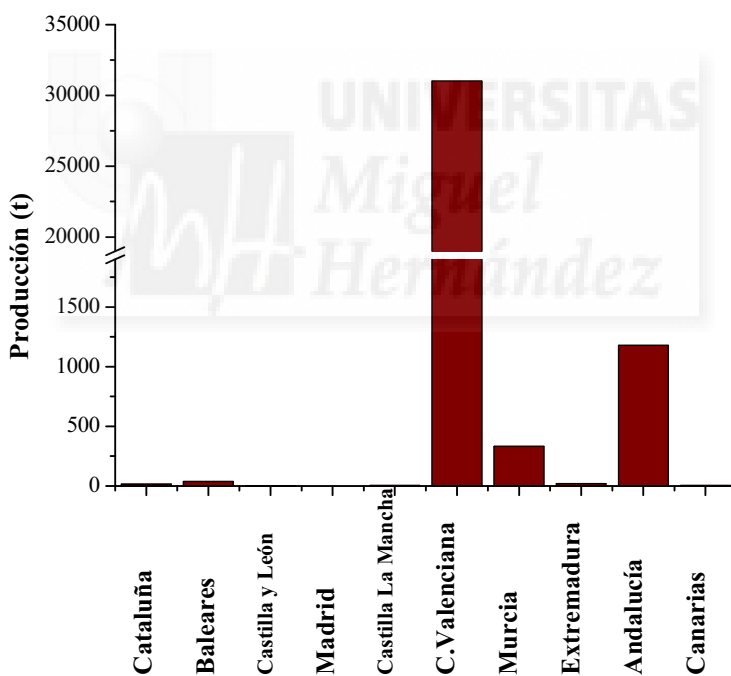


Figura 4. Evolución de la producción de granadas en España (toneladas)



Variedades

La granada es un fruto muy atractivo e interesante ya que posee un elevado número de propiedades beneficiosas para la salud además de un excelente sabor. Existe un sin número de variedades de granadas, las cuales dependen del lugar de origen. En total se han descrito más de 3000 variedades. La granada presenta un germoplasma muy variado y fenotipos también diversos. Hay granadas de colores diversos desde rosadas, rojas, verdes hasta negras y hay algunas con condiciones de alta productividad y adaptadas al mercado creciente actual y otras que pertenecen al mercado étnico tradicional o a regiones específicas. En términos generales existen variedades dulces y agridulces.

España, y en concreto la zona del Sudeste, es el principal productor europeo de granadas, siendo “Mollar de Elche” y “Valenciana” los grupos varietales más cultivados. Sin embargo, otras variedades de granada provenientes de otros países están ganando terreno en el mercado de consumo en fresco. Además, la principal variedad empleada para la obtención de zumos de granada es la variedad “Wonderful”, la más cultivada en el mundo.

Cultivo del granado en Asia y Norte de África

Es la región en la cual la granada adquiere mayor importancia dado que es un cultivo tradicional. Se distinguen dos grandes regiones productoras:

- La mayor en Asia central: Irán, India, Pakistán, Afganistán.
- La zona mediterránea: España, Israel, Egipto, Túnez, Turquía.

En general se exporta en fresco solamente una pequeña parte. La exportación de granadas representa apenas el 1-5 % de la producción.



Variedades de India

Dholka: Esta variedad es cultivada en India con fines comerciales. Es un fruto grande, de piel amarillo-rojizo con sectores rosado oscuro y púrpura en la base. Tiene piel delgada, carnosa, es dulce y sus semillas son blancas y duras.

Ganesh (GBG-1): Es una selección de la variedad Dholka, de alta producción. Los frutos son de tamaño mediano con los arilos rosados, semilla suave.

Cultivo de granado en el sur de Europa

A pesar que el granado está ampliamente difundido en toda la región el Mediterráneo, adquiere importancia comercial principalmente en España. Las producciones de Portugal, Italia y Grecia son reducidas, no se exporta y tienen poca importancia dentro de la fruticultura de cada país.

La importancia económica del granado en España es muy notable, ya que es uno de los principales países productores, siendo el mayor productor y exportador de Europa. La costa mediterránea, y más específicamente la Comunidad Valenciana, es la zona más importante de este cultivo. La provincia de Alicante es la principal productora, abarcando el 93 % de la producción nacional (MARM, 2010).

Variedades españolas:

Blanca: De fruto mediano, piel lisa, arilos rosados.

Pignonenca: De fruto grande, coloreado, de semilla muy dura.



Imagen 4. Arilos de distintas variedades



Mollar de Elche: Corresponde a una variedad población, la más cultivada en España (96 % de la producción española). Sus frutos son rosados, de tamaño medio (262 g), presentando un rendimiento promedio de semillas de un 72.7 % y un contenido en fibra bruta de la semilla de 3 a 8 %. Algunos ejemplares presentan gran calidad de fruta y productividad, cosechándose en España entre septiembre y diciembre. El contenido en sólidos solubles de su parte comestible se sitúa entre 13-18 ° Brix y su acidez entorno a 0,2-0,4 g ácido cítrico/L.



Imagen 5. Granadas Variedad Mollar

Tendral: Corresponde a una variedad población. El árbol es de vigor medio y productivo. Presenta frutos de calibre medio (185 g), de color externo sobre fondo amarillo. Los granos son pequeños, con piñon tierno y delgado, y muy azucarados. Presenta un contenido de fibra bruta en la semilla de 8.37 %. Tiene piel delgada y fina que no se presta para el transporte a grandes distancias, lo que también contribuye a que su vida en postcosecha sea más breve.

Valenciana: Al igual que la variedad Mollar, corresponde a una variedad población, con fruta de menor calidad y de cosecha más temprana, siendo esta última característica la que determina el mejor precio que alcanza en comparación con las granadas de Mollar de Elche, debido a la escasez de fruta fresca en esta época. Se cosecha entre agosto y septiembre. Tiene un contenido en sólidos solubles de entre 13-14 ° Brix y una acidez de 0,15-0,3 g ácido cítrico/L.



Imagen 6. Granadas Variedad Valenciana



Cultivo del granado en América

Variedades de Estados Unidos.

Española: Tiene frutos de tamaño mediano, de piel amarillo pálido con zonas rosadas o rojas. Arilos de color rosado y de sabor dulce, no ácidos.



Imagen 7. Granada Variedad Española

Wonderful: Es la variedad más cultivada mundialmente y se empieza a recolectar a finales de septiembre hasta febrero. Es de fruto grande, de un color externo rojo profundo. Las semillas son pequeñas y medianamente duras, relativamente ácidas. Es la variedad de granado más cultivada en California e Israel. Además, presenta un contenido en sólidos solubles de entre 13-18 ° Brix y una acidez de 2-3 g ácido cítrico/L.



Imagen 8. Granada Variedad Wonderful

Granada: Es una variedad de maduración temprana muy cultivada en California. Originaria de California, corresponde a una mutación de Wonderful y fue descubierta en 1966. Aunque tiene un tamaño más pequeño que la variedad Wonderful, alcanza los mejores precios en el mercado debido a que madura 1 mes antes que ésta.

Paper Shell: También llamada Spanish Sweet, tiene frutos gruesos, de color amarillo jaspeado de púrpura. Granos pequeños, rojos, perfumados, muy azucarados. Árbol rústico y fértil.



Variedades de Turquía

Hicaznar (Alanya): De color amarillo rojizo, granos de color rojo oscuro, de sabor dulce amargo. Se utiliza sólo para exportación.

Silifke Asisi (Icel): De color rojo, granos rojos, variedad de sabor dulce-amargo.

Kandhari: Color rosa profundo o rojo. Dulce.

Granada de Provence: muy resistente al frío (-15 °C) algunos hasta los -17 °C, floración en junio y julio pudiendo continuarse sobre el final del verano, flor simple de color anaranjado, madurez en el otoño (septiembre a octubre), granos duros, forma espesa si no esta cortada, el tamaño del árbol varía de 1,5 a 3 metros, la madurez es tardía en las frutas.

1.3 Composición y partes de la granada

La granada tiene valiosos compuestos en diferentes partes de la fruta. La composición química de los frutos varía en función de la variedad, zona de cultivo, el clima, la madurez, el cultivo la práctica, y las condiciones de almacenamiento. Existen estudios donde se muestran variaciones significativas en el contenido de los ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, azúcares solubles, vitaminas y minerales de granadas dependiendo de las condiciones de cultivo (Mirdehghan y Rahemi, 2007; Tezcan et al., 2009).

La granada se puede dividir en cuatro partes: la cáscara, las membranas carpelares, las semillas y los arilos. Generalmente contiene 8 carpelos en los que se encuentran los arilos (porción comestible), representado éstas un porcentaje comprendido entre el 40 y el 75 %, dependiendo de las variedades; las membranas carpelares y la corteza representan el 25-60 % del peso del fruto, siendo esta una importante fuente de compuestos bioactivos tales como los compuestos fenólicos,



flavonoides, elagitaninos y proantocianidinas (Li et al., 2006), además de minerales como sodio, potasio, nitrógeno, calcio, fósforo y magnesio. La porción leñosa de los arilos (semillas) varía entre el 5 y el 15 %. El fruto completo posee aproximadamente un 80 % de agua. Los arilos, de consistencia leñosa con testa carnosa o pulposa, de forma prismática, sin albumen, embrión recto, y cotiledones enrollados el uno con el otro, de color rosa, granate o blanco, son muy jugosos. Los arilos contienen 85 % de agua, 10 % de azúcares totales, principalmente fructosa y glucosa, y el 1,5 % de pectina, ácidos orgánicos, como ácido ascórbico, ácido cítrico y ácido málico, y compuestos bioactivos tales como compuestos fenólicos y flavonoides, principalmente antocianos. Las semillas son una rica fuente de lípidos totales, entre el 12-20 % del peso total de la semilla. El aceite se caracteriza por un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados como el linolénico, linoleico, y otros lípidos, tales como el ácido punícico, el ácido oleico, ácido esteárico, y ácido palmítico (Fadavi et al., 2006). Las semillas también contienen proteínas, fibra, vitaminas, minerales (principalmente potasio, nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio y sodio), pectina, azúcares, polifenoles, isoflavonas (genisteína, principalmente) y coumestrol (Midehghan y Rahemi, 2007).

1.4 Compuestos fenólicos de la granada

Unos de los principales compuestos responsables de la mayoría de las propiedades funcionales de muchos alimentos, entre ellos de la granada, son los compuestos fenólicos.

Los fenoles son compuestos que poseen uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo. Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y son los metabolitos secundarios más abundantes de plantas, con más de 8.000 estructuras fenólicas conocidas en la actualidad, que van desde moléculas simples tales como ácidos fenólicos a sustancias altamente polimerizados tales como taninos. Los compuestos fenólicos de las plantas están generalmente involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión de agentes patógenos, parásitos y depredadores, así como contribuyen a los colores de las plantas. Están presentes en todos los órganos de las plantas y por tanto son una parte integral de la dieta humana.



Los compuestos fenólicos son los componentes mayoritarios de los alimentos de origen vegetal (frutas, verduras, los cereales, legumbres, chocolate, etc) y bebidas (té, café, cerveza, vino, etc...), y en parte son responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos vegetales. Por ejemplo, los fenoles contribuyen al amargor y astringencia de frutas y zumos de frutas, debido a la interacción entre compuestos fenólicos, principalmente procianidinas y glicoproteínas de la saliva. Los antocianos, uno de los seis subgrupos de un gran grupo de compuestos polifenólicos de las plantas conocidas como flavonoides, son los responsables del color naranja, rojo, azul y púrpura de muchas frutas y verduras como manzanas, granadas, fresas, remolachas y cebollas.

Los compuestos fenólicos de la planta incluyen los flavonoides (**Figura 5**), ácidos fenólicos (**Figura 6**), taninos (**Figura 7**) y los menos frecuentes estilbenos y lignanos. Los flavonoides son los polifenoles más abundantes en nuestra dieta. La estructura básica de los flavonoides es un núcleo flavano, que contiene 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos (C6-C3-C6), denominados como A, B y C. Los flavonoides se encuentran divididos en seis subgrupos: flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, isoflavonas, y antocianos, dependiendo del estado de oxidación del anillo central C. Su variación estructural en cada subgrupo se debe en parte al grado y al patrón de hidroxilación, metoxilación, prenilación, o glicosilación. Algunos de los flavonoides más comunes incluyen quercetina, un flavonol abundante en la cebolla, el brócoli y la manzana; catequina, un flavonoide presente en el té y varias frutas, naringenina, la flavanona principal de pomelo; cianidina-glucósido, un antociano abundante en las frutas de bayas (grosellero negro, frambuesa, mora, etc...) y la granada, y la daidzeína, genisteína y la gliciteína, las principales isoflavonas de la soja.

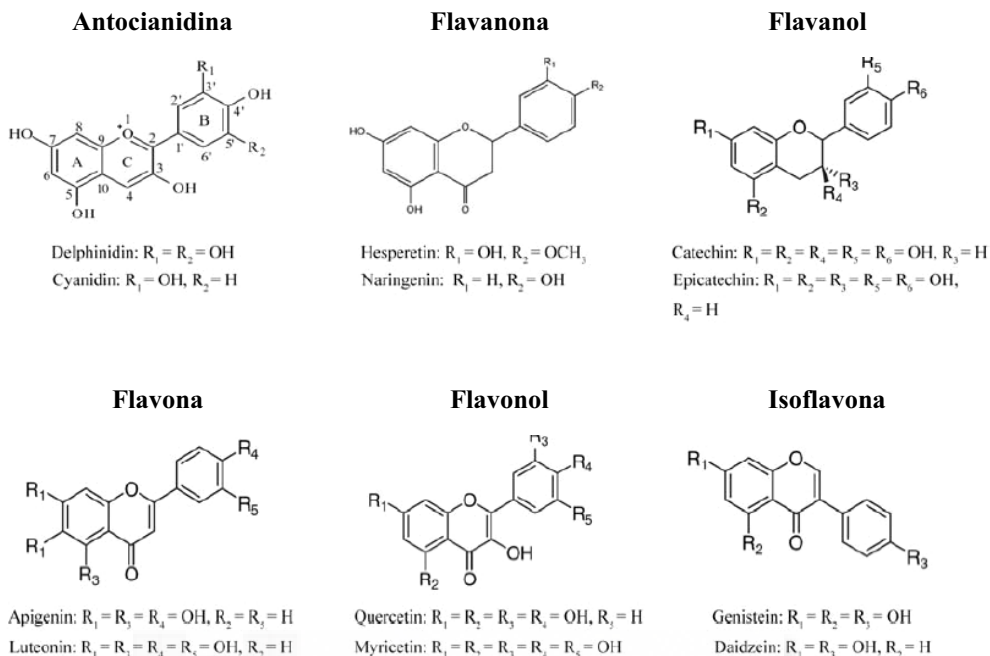
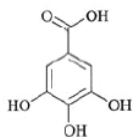


Figura 5. Estructura de los flavonoides

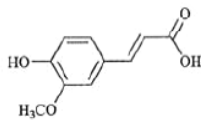
Los ácidos fenólicos se pueden dividir en dos clases: derivados del ácido benzoico tales como ácido gálico, y derivados del ácido cinámico, tales como ácido cumárico, cafeico y ferúlico.

Ácido Hidrobenzoico

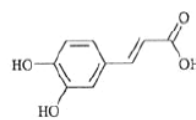


Gallie acid

Ácido Hidroxicimámico



Ferulic acid



Caffeic acid

Figura 6. Estructura de ácidos fenólicos

Los taninos son otro grupo importante de polifenoles en nuestra dieta y por lo general se subdividen en dos grupos: (1) taninos hidrolizables y (2) taninos



condensados. Los taninos hidrolizables son compuestos que contienen un núcleo central de glucosa u otro poliol esterificado con ácido gálico, también llamado galotaninos, o con ácido hexahydroxydiphenico, también llamados elagitaninos. Las reacciones de oxidación intermoleculares dan lugar a muchos compuestos oligoméricos que tiene un peso molecular entre 2000 y 5000 Daltons (Khanbabaee, 2001). Los taninos condensados son oligómeros o polímeros de flavan-3-ol unidos a través de un anillo de carbono interflavano. También se conocen como proantocianidinas porque se descomponen en antocianos debido a reacciones de oxidación catalizadas por ácido y por calentamiento en soluciones de alcohol ácidas.

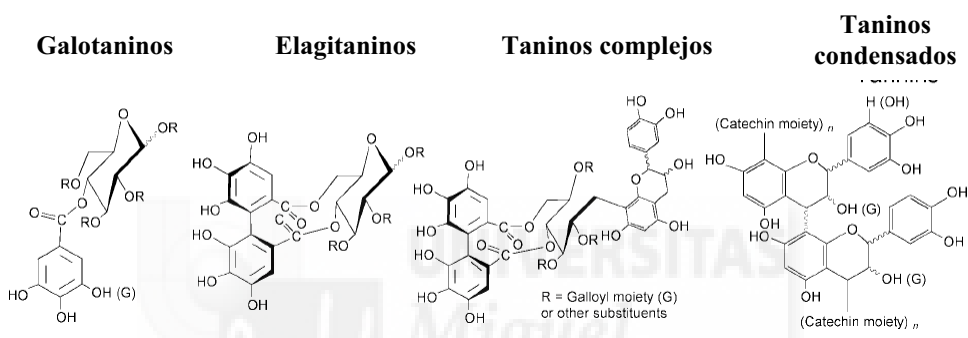


Figura 7. Estructura de los taninos

1.4.1 Antocianos

Los antocianos son el grupo más grande e importante de los flavonoides presentes en las granadas y son considerados los responsables del color rojo, siendo este un atributo de calidad importante. El color rojo depende de la concentración en antocianos que éstas contengan y del tipo de antociano.

Tienen una estructura básica denominada aglicona o antocianidina, cuya estructura más importante es el catión flavilio (2-fenilbenzopirilo), aunque también presenta grupos hidroxilo y metoxilo en diferentes posiciones de la cadena (Figura 8). A lo largo de la historia se han podido describir 12 estructuras distintas de antocianos en la naturaleza, que se diferencian entre sí en el número y la posición que tienen estos grupos hidroxilo y metoxilo dentro de la cadena (Du et al., 1975).

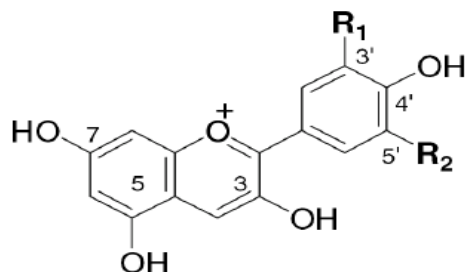


Figura 8. Estructura básica de los antocianos

Los grupos hidroxilos de las posiciones 3, 5 y 7 pueden presentar glicosilaciones. Esta forma de heterósido es la frecuente en la naturaleza. La fracción azucarada normalmente va unida al grupo hidroxilo que está presente en la posición 3 de la aglicona. Los azúcares más comunes que podemos encontrar en los antocianos son glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y xilosa. Estos compuestos también ocurren en forma acilada, siendo los grupos acilo más comunes los ácidos cinámico (ρ -cinámico), acético, málico, malónico y succínico (De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008).

Tabla 1. Antocianos más extendidas en la naturaleza

Antocianidinas	Abra	R1	R2	λ_{max}
Pelargonidina	Pg	H	H	494
Cianidina	Cy	OH	H	506
Delfinidina	Dp	OH	OH	508
Peonidina	Pn	OCH ₃	H	506
Petunidina	Pt	OCH ₃	OH	508
Malvidina	Mv	OCH ₃	OCH ₃	510

Abra= abreviaturas

Los antocianos son estructuras inestables, fácilmente oxidables y muy sensibles a cambios en la temperatura, la composición atmosférica o a los rayos UV; también les afecta la presencia en el medio de SO₂, además de cambios en el pH. Tienen, a su vez,



la capacidad de reaccionar con metales como Fe, Cu, Al y Sn presentes en el medio o en la envoltura de las células (De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008).

Los antocianos son solubles tanto en agua como en disoluciones alcohólicas. En solución acuosa son más estables cuanto más bajo es el pH; disueltos en agua, podemos encontrar a los antocianos como cuatro estructuras en equilibrio: catión flavilio, base quinoidal, carbinol o pseudobase y chalcona C. Dependiendo del pH de la disolución y de la estructura del antociano en cuestión, las cantidades de cada estructura pueden variar (Figura 9): a pH bajo la forma predominante es el catión flavilio (color rojo) y, a medida que ascienda el pH, va disminuyendo la cantidad de catión flavilio aumentando al mismo tiempo las cantidades de las otras estructuras, variando el color hacia el azul (bases quinoidales), aunque también pueden ser incoloras (pseudobases y chalconas) (De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008). Por lo general, una acilación del antociano va a producir un incremento de la proporción relativa de la cantidad del catión flavilio, lo que protegerá el color rojo a pH más altos, incrementando la estabilidad del antociano.

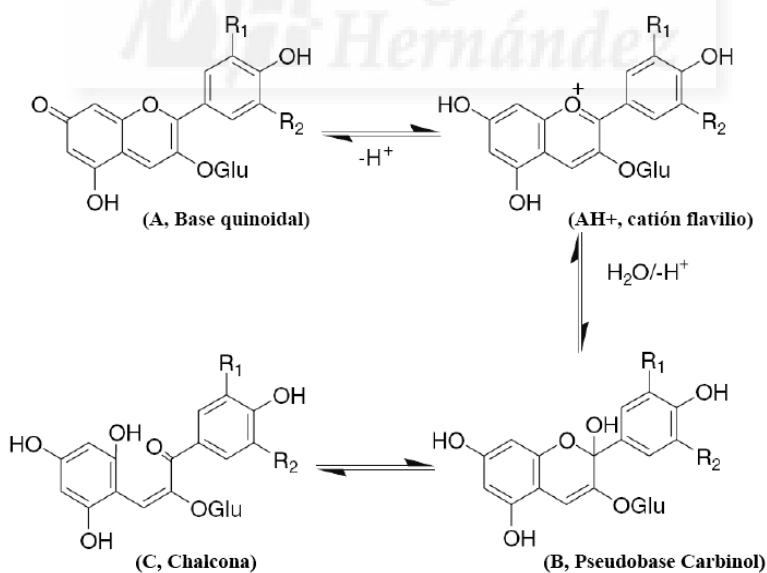


Figura 9. Cambios producidos en la estructura de los antocianos ante variaciones del pH



En el caso de la granada, se han identificado 6 antocianos como los responsables del color: delfinidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido; cianidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido y pelargonidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido (González-Molina et al., 2009; Mena et al., 2011; Turfan et al., 2011; Varasteh et al., 2012; Zhang et al., 2009) y además se ha relacionado estos compuestos con su acción antioxidante (protegen frente a los radicales libres retrasando el proceso de envejecimiento de las células), aspecto muy estudiado durante los últimos años en gran cantidad de frutos, entre los que se incluye la granada. La actividad captadora de radicales libres de estos flavonoides ha sido demostrada (Espín et al., 2000; Ferrari et al., 2010; Rosenblat et al., 2006), lo que hace que un 10 % de la capacidad antioxidante del zumo de granada se deba a la presencia de estos polifenoles. La capacidad antioxidante del zumo de granada es tres veces superior a la del vino tinto y a la del té verde (Gil et al., 2000). Estos compuestos también pueden utilizarse como colorantes naturales, adicionándolos a otros alimentos.

1.4.1.1 Copigmentación

El color de los antocianos puede ser estabilizado y mejorado por reacciones de copigmentación. El fenómeno de la copigmentación fue observado alrededor de 1916 por Willstätter and Zollinger, ya que notaron que el color del pigmento de la uva, malvidina 3-glucósido, pasaba de azul a rojo por la adición de taninos o de ácido gálico.

La copigmentación es un fenómeno en el cual los antocianos y otros compuestos orgánicos decolorados o iones metálicos, forman moléculas o complejos de asociación, generando un incremento de la intensidad de color (Boulton, 2001). En el sector alimentario, este fenómeno es considerado una interacción muy importante ya que el color es uno de los factores de calidad más importante en la aceptación del producto (Eiro y Heinonen, 2002). Algunos investigadores sugieren que la copigmentación de los antocianos con otros compuestos (copigmentos) es el mismo mecanismo de estabilización del color ocurrido en las plantas (Mazza y Brouillard, 1987; Mazza et al., 1999). Los copigmentos son sistemas ricos en π -electrones que son capaces de asociarse con iones flavilio, pobres en electrones. Esta asociación confiere una protección frente al ataque nucleofílico del agua en la posición 2 del ion flavilio (Matsufuji et al., 2003) y



de otras especies como peróxido o dióxido de azufre en la posición 4 ([García-Viguera y Bridle, 1999](#)).

Los copigmentos no son generalmente coloreados, pero cuando se mezclan con los antocianos, ocurre una reacción produciendo un efecto hiperacrómico y un cambio batocrómico en el espectro de absorción. Los copigmentos pueden ser flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleóticos, polisacáridos, metales y otros antocianos.

Como todas las reacciones de los antocianos, las reacciones de copigmentación están afectadas por pH, temperatura, concentración, solventes y las estructuras de las moléculas. Según diversos autores, la concentración de antocianos necesarias para que las reacciones de copigmentación sea posible es 3.5×10^{-5} M.

Los mecanismos más importantes de copigmentación son las formaciones de complejos inter e intramoleculares. La asociación entre antocianos o polimerización y la complejación con metales pueden también mantener el color.

La copigmentación intermolecular se define como las interacciones entre antocianos coloreados y pigmentos no coloreados, que no se unen covalentemente a la molécula de antociano ([Brouillard, 1982](#)). Los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas han sido sugeridos como el mecanismo mediante el cual se mantienen unidos, resultando un complejo 1:1 antociano-pigmento. La interacción intermolecular puede ocurrir con la forma de catión flavilio y la base quinonoidal de los antocianos.

La copigmentación intramolecular supone una acilación covalente de la molécula del antociano que estabiliza el antociano. Se cree que la copigmentación intramolecular es más fuerte y eficaz que la intermolecular en la estabilización del color, probablemente debido a la fortaleza de la unión de los enlaces ([Cabrita et al., 2000](#); [Rein, 2005](#); [Tsai y Huang, 2004](#)).



1.4.2 Derivados del ácido elágico

El ácido elágico es un polifenol que se puede hallar en estado libre en algunos alimentos aunque siempre en una cantidad relativamente pequeña. Suelen presentarse con más frecuencia en forma de elagitaninos, y también podemos encontrarlo en la naturaleza como derivados C-glicosídicos de estos ácidos. La granada contiene mayoritariamente el elagitanino punicalagina y, en menor cantidad, ácido elágico libre y glicósidos de éste como el glucósido, el ramnósido o el arabinósido (Clifford y Scalbert 2000).

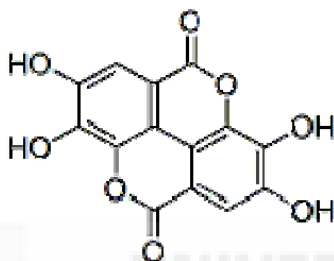


Figura 10. Estructura del ácido elágico

La actividad biológica más estudiada del ácido elágico es su posible actividad anticancerígena, pero también se le atribuyen propiedades beneficiosas para la salud como su capacidad antioxidante y actividad microbiana (Gil et al., 2000; Seeram, 2005; Seeram et al., 2004). Thiem y Golinska, 2004 comprobaron que el ácido elágico presente en moras (*Rubus chamaemorus* L.) tiene actividad antimicrobiana frente a algunas bacterias Gram positivas. La actividad anticancerígena in vitro del ácido elágico ha sido comprobada en diversas líneas celulares, de tejido mamario y próstata (Saleem et al., 2002), así como de vejiga y de cáncer de colon (Narayanan y Re, 2001).

La biodisponibilidad del ácido elágico ha sido ampliamente estudiada en los últimos años. Los estudios realizados en distintos animales muestran diferencias muy significativas en función del roedor empleado, lo que ocasiona que estos resultados deban ser tomados con precaución puesto que la extrapolación a humanos podría inducir errores. Un estudio llevado a cabo por Seeram et al., (2004) describe la absorción y acumulación de ácido elágico en plasma tras la ingestión de una dosis de zumo de granada; sin embargo, errores metodológicos podrían poner en duda tales resultados (Cerdá et al., 2004) en humanos. En un estudio realizado posteriormente por el mismo



grupo de investigación (Seeram et al., 2006), se proporcionó a 18 personas 180 mL de zumo de granada que contenía 387 mg/L de antocianos, 1561 mg/L de punicalaginas, 121 mg/L de ácido elágico y 417 mg/L de otros taninos hidrolizables. Como resultado, se obtuvo la presencia de metabolitos de ácido elágico en plasma y orina en formas conjugadas y libres.

Actualmente, se piensa que el ácido elágico libre, al igual que ocurre con el liberado de los elagitaninos por hidrólisis en el tracto digestivo, es transformado por la microflora colónica a urolitinas (Cerdá et al., 2004; Cerdá et al., 2003; Larrosa et al., 2006). Así, la presencia de urolitinas en fluidos orgánicos se ha propuesto como un marcador de la ingesta de elagitaninos y ácido elágico (Cerdá et al., 2004; Seeram et al., 2008).

Los polímeros de ácido elágico más estudiados de la granada son las **punicalaginas**. Las punicalaginas pertenecen al grupo de los elagitaninos; los elagitaninos son taninos hidrolizables, en los cuales el ácido hexahidroxi-difénico forma di-ésteres con azúcares, generalmente β -D-glucosa o ácido quínico (Madrigal-Carballo et al., 2009). Las estructuras monoméricas de los elagitaninos se pueden oxidar en el interior de las plantas y dar lugar a estructuras dímeras, trímeras y tetrámeras. Estos polímeros se pueden hidrolizar en presencia de ácidos o de bases dando ácido elágico (Häkkinen et al., 2000).

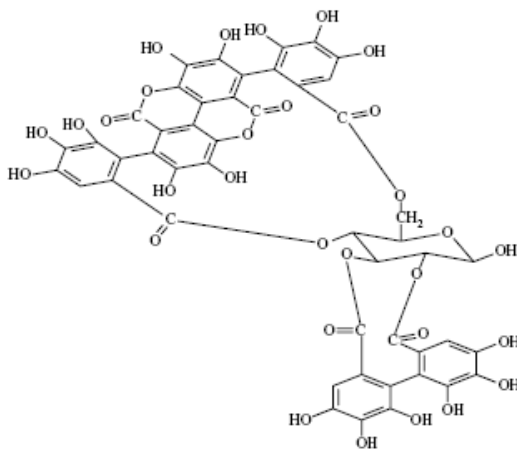


Figura 11. Estructura de una punicalagina



Los elagitaninos están presentes en diferentes especies de plantas pertenecientes a las familias *Rosaceae*, *Fabaceae*, *Punicaceae*, *Anacardiaceae* y *Juglandaceae* (Clifford y Scalbert, 2000). Las principales fuentes de elagitaninos que se pueden encontrar dentro de nuestra dieta son las nueces, las fresas, la granada, frambuesas y derivados de éstas (mermeladas, zumos, etc.) y, en menor proporción, en bebidas que son envejecidas en barricas de roble y donde los elagitaninos de la madera pasan al vino, brandy, whisky, etc (Cerdá et al., 2004).

La biodisponibilidad de las punicalaginas y el resto de elagitaninos sigue las mismas pautas que las ya descritas para el ácido elálgico. Esto es debido a que, como ya se ha comentado, los elagitaninos se hidrolizan en el tracto digestivo para formar ácido elálgico (Cerdá et al., 2004).

El consumo de alimentos ricos en elagitaninos se ha asociado siempre con propiedades beneficiosas para la salud, como en el caso de las plantas medicinales chinas (Okuda et al., 1992), o el consumo de zumo de granada en Japón (Mori-Okamoto et al., 2004). Dentro de las propiedades beneficiosas que se les atribuyen a los elagitaninos se puede destacar su actividad antioxidante, anticancerígena, hepatoprotectora, así como su papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Faria et al., 2007; Gil et al., 2000; Larrosa et al., 2006; Lee et al., 2010; Sartippour et al., 2008; Seeram et al., 2004).

1.5 Propiedades funcionales de la granada

El creciente aumento de la preocupación del consumidor por unos hábitos alimenticios saludables ha llevado a un incremento en la demanda de frutas y hortalizas ricas en compuestos bioactivos (Niva, 2007). Los frutos rojos como la granada han demostrado tener un alto contenido de compuestos bioactivos, lo que los ha situado en la primera línea del mercado de zumos funcionales, además de consumirse como jaleas, vinos, mermeladas y también en fórmulas terapéuticas, cosméticos y condimento (Fadavi et al., 2005).



La granada posiblemente pueda ejercer efectos beneficiosos en la salud, debido a su alto contenido en compuestos fenólicos con alta actividad biológica demostrada. Para poder atribuir a la granada esta función, sería necesario identificar los componentes bioactivos específicos que ayuden en determinados problemas o enfermedades de las personas. En la actualidad, existe un gran interés en la comunidad científica en las propiedades funcionales de la granada. En la base de datos de Science Direct (2013) se citan alrededor de 3476 trabajos científicos sobre la granada, siendo los publicados sobre sus propiedades (antioxidantes, antimicrobianos, beneficios en enfermedades vasculares, diabetes y cáncer) y sus derivados, tales como semillas, cáscara y zumo unos 1924 trabajos.

La granada puede ser considerada como un alimento funcional porque tiene compuestos valiosos (polifenoles) en diferentes partes de la fruta que muestran efectos funcionales y medicinales. El contenido en polifenoles solubles en el zumo de granada depende del cultivo, variedad de granada utilizada, el clima, la madurez, de la misma manera que las condiciones de procesado y pasteurización juegan un papel importante en el color, sabor, textura, así como en su capacidad antioxidante y la actividad antibacteriana (Negi y Jayaprakasha, 2003).

En la actualidad no existen muchos estudios sobre el efecto del consumo del zumo de granada en personas, pero sí numerosos estudios realizados con algunos de los polifenoles presentes en el zumo de manera individual, pudiendo extrapolar los efectos producidos con ellos individualmente al conjunto en el zumo. Estos efectos beneficiosos de los zumos de granada han sido atribuidos a propiedades antioxidantes de los polifenoles, derivados del ácido elágico, isómeros de la punicalagina, otros taninos hidrolizables y flavanoles como los antocianos (Gil et al., 2000).

En cuanto a la actividad antioxidante, los compuestos presentes en el zumo y en otras partes de la granada han sido estudiados in vitro e in vivo (Çam et al., 2009; Mousavinejad et al., 2009; Singh et al., 2002), obteniéndose como conclusión que la presencia de polifenoles como punicalagina, ácido elágico y antocianos está relacionada con un aumento de la actividad antioxidante, siendo además las punicalaginas las mayores responsables.



Además, los compuestos polifenólicos presentes en la granada han mostrado tener una actividad antiproliferativa, antiinvasiva y pro-apoptótica en diversas líneas celulares de cáncer (colon, próstata y mama) y modelos animales (Afaq et al., 2005; Hamad y Al-Momene, 2009; Lansky et al., 2005; Lansky y Newman, 2007; Syed et al., 2007) además de ejercer un efecto antihepatotóxico (Celik et al., 2009). Los antocianos parece ser que producen una disminución de la proliferación de las células de colon HT-29 aunque es dependiente de la concentración y además, González-Sarriás et al., 2009 sugiere que el ácido elálgico y sus metabolitos (urolitinas) a altas concentraciones en la dieta, pueden contribuir a la prevención del cáncer de colon por modulación de la expresión de múltiples genes de las células epiteliales que revisten el colon.

Estos compuestos también pueden mejorar la salud cardiovascular como se ha demostrado en diversos estudios (Davidson et al., 2009; De Nigris et al., 2007; Faria et al., 2007; Koyama et al., 2010; Larrosa et al., 2006; Sartippour et al., 2008), en los cuales se han encontrado evidencias del efecto de los mismos en la atenuación de arterosclerosis, disminución de la presencia de marcadores de inflamación en sangre, reducción del óxido nítrico y disminuyendo la disfunción endotelial (Vaskonen et al., 2007).

El efecto antidiabético no ha sido muy estudiado, sin embargo, existen evidencias de que el consumo de zumo de granada o sus derivados pueden afectar en la glucemia por distintas vías como la absorción de la glucosa en el intestino o por tejidos periféricos (Scalbert et al., 2005).

La granada y sus componentes (sobretudo extractos de piel) también poseen efectos antimicrobianos inactivando o inhibiendo el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* (Parashar et al., 2009; Prashanth et al., 2001; Puupponen-Pimia et al., 2001) y antivirales frente a HIV-1 (Neurath et al., 2005) e Influenza virus (Song et al., 2005), siendo los elagitaninos los compuestos con mayor actividad.

En cuanto a otros estudios realizados para prevenir o mejorar algunas enfermedades, se podría decir que los polifenoles presentes en el zumo de granada o en



otros componentes de la misma pueden ayudar a mejorar la calidad del esperma ya que existen evidencias de un aumento en la concentración de esperma en el epidídimo y aumento de la motilidad espermática por el consumo de zumo de granada (Türk et al., 2008; Türk et al., 2010) y la disfunción eréctil de hombres (Azadzoï et al., 2005; Forest et al., 2007), aunque varios de estos estudios han sido descartados por la EFSA (2010).

1.6 Técnicas de procesado y estabilización del zumo de granada

La composición del zumo de granada varía dependiendo de la variedad de la granada utilizada, las condiciones de crecimiento y maduración del fruto, así como de las técnicas de extracción del zumo y los tratamientos de estabilización del mismo para alargar su vida útil.

Para la extracción del zumo, la fruta puede procesarse de distintas maneras, influyendo finalmente en la concentración de compuestos bioactivos (Miguel et al., 2004). El zumo se puede producir a partir de únicamente arilos, mediante la separación total de la corteza y los mismos y también puede producirse sin la separación entre arilos y corteza. La presencia de corteza durante la obtención del zumo puede producir una mayor astringencia que si sólo se utilizan arilos.

Ya que la granada es un fruto estacional, existe la necesidad de realizar tratamientos al zumo para alargar su vida útil y que el producto esté presente en el mercado a lo largo de todo el año. Existen distintos procesos de estabilización del zumo, como la pasteurización y últimamente, los tratamientos con microondas (Fazaeli et al., 2011; Tiwari et al., 2009), altas presiones (Ferrari et al., 2010; Sánchez-Moreno et al., 2005), irradiación y calentamiento ohmico (Swart et al., 2003), etc... que están siendo utilizados en diversos tipos de zumos. Además de realizar un tratamiento térmico al zumo, es posible realizar un tratamiento previo al mismo, ya no sólo para mantener su seguridad, sino para mantener el zumo estable durante el almacenamiento después de la pasteurización. Por ello, la clarificación convencional y la filtración tangencial pueden ser unos pasos fundamentales en el proceso de producción del zumo de granada.



1.6.1 Clarificación de zumo de granada

El objetivo de la clarificación es la eliminación de sustancias que causan la turbidez en el zumo y prevenir la sedimentación durante el almacenamiento o los procesos de concentración (Vardin, 2003). Además, mediante la clarificación puede disminuir la astringencia del zumo debido a que gran parte de los taninos del mismo pueden ser eliminados. Por lo general, la presencia de fragmentos celulares y de pectina insoluble han sido los responsables de la formación de la turbidez de forma inmediata a la obtención del zumo recién prensado, mientras que el enturbiamiento durante el tratamiento del zumo puede ser debido a la polimerización o reacciones de condensación formando complejos poliméricos entre polisacáridos, azúcares, iones metálicos y proteínas (Alper et al., 2011).

1.6.1.1 Clarificación convencional de zumo de granada

La clarificación convencional consiste en un tratamiento químico empleando agentes clarificantes directamente en el zumo, el cual puede haber sido sometido o no a un tratamiento bioquímico con enzimas. Los agentes clarificantes utilizados comúnmente para la clarificación de zumos de frutas incluyen bentonita, gelatina, polivinilpirrolidona (PVPP) o combinaciones de estos.

La utilización de agentes clarificantes requiere una optimización de los métodos de preparación, así como la elección de los agentes clarificantes adecuados para eliminar los compuestos responsables del enturbiamiento pero sin eliminar los compuestos bioactivos presentes en el zumo.

La bentonita es un agente efectivo para la estabilización de las proteínas, sin embargo, parece ser que además ejerce un efecto eliminando también algunos polifenoles.

La fuerte carga eléctrica negativa de la bentonita y su distribución superficial ejerce una acción importante sobre las proteínas. La presencia de cargas positivas en las proteínas disueltas hace posible su floculación por la bentonita. En este caso, el pH desempeña un importante papel y su valor explica el por qué del tratamiento estabilizante de los zumos es más eficaz que si se aplica a otras bebidas.



Las proteínas naturales que podemos encontrar en los zumos se pueden clasificar en dos grupos:

- a) Proteínas inestables al calor, termolábiles, que son fácilmente eliminadas por la bentonita a temperatura ambiente.
- b) Proteínas estables a la acción del calor, termoestables, sobre las que la bentonita no ejerce ninguna acción floculante.

La adición de bentonita a los zumos y vinos contribuye el tratamiento más utilizado desde hace años para la estabilidad proteica. Aunque existen gran variedad de bentonitas comerciales, las más utilizadas en el tratamiento son las bentonitas sódicas.

La dosis a utilizar dependerá de la materia prima de partida. En el caso de fracciones proteicas comprendidas entre 60000 y 100000 Daltons, la bentonita ejerce poco o ningún efecto desproteinizante. Su elevado volumen limita el acceso al espacio interfoliar de la bentonita.

Se han estudiado diferentes factores que influyen en la acción de la bentonita sobre las proteínas destacando:

- a) El valor de pH: Cuanto más bajo sea el valor del pH tanto más enérgica será la acción desproteinizante de la bentonita.
- b) La acción de los taninos: Los taninos tienden a obstaculizar la interacción de la bentonita con las proteínas.
- c) La influencia de la temperatura: No se ha observado ningún efecto negativo en la acción de la bentonita.

Existen diversos estudios en vino y zumos de frutos rojos en donde se ha observado el efecto de la bentonita sobre los antocianos. En varios de ellos, afirman que la bentonita ejerce un efecto negativo sobre la concentración de antocianos,



disminuyendo su porcentaje entre un 30-80 %, siendo esta pérdida independiente de la concentración de bentonita utilizada. Además, los antocianos monoglucosilados son los que se absorben preferentemente (Balik, 2003; Fang et al., 2006; Molina, 1994; Stankovi et al., 2004; Tükyilmaz et al., 2012).

Las colas orgánicas (albúmina y gelatina) son moléculas con carga positiva en rangos de pH bajos como son los zumos de frutas y reacciona con los polifenoles cargados negativamente.

El éxito de la clarificación con colas depende del grado de hidrólisis de ésta y del grado de polimerización de los polifenoles con los que ella flocula. Una cola poco hidrolizada ($P_m > 140000$ Daltons) reacciona rápidamente formando un coloide tanino-cola muy voluminoso y estable. Esta calidad de cola que forma coloides grandes necesita menos taninos para flocular. Las colas muy hidrolizadas arrastran más polifenoles totales. Las cortas cadenas de proteínas pueden quedar en la solución del zumo formando complejos capaces de precipitar con el tiempo (5 a 6 días).

Al igual que en el caso de la bentonita, la dosis a utilizar dependerá de la materia prima y el efecto de la misma en la composición del zumo no depende de la concentración utilizada. Además, el efecto de la cola es menor en los antocianos que la bentonita, precipitando hasta un máximo del 60 % de polifenoles y un 15 % de antocianos (Molina, 2000).

PVPP es un adsorbente de polifenoles bien conocidos y con pocas excepciones, cuanto más unidos estén los grupos hidroxilos al núcleo del polifenol, más se une a PVPP. La posible reutilización de PVPP debido a su insolubilidad en agua es la razón principal por la que se acepta la utilización de la misma en el procesado de la industria de los zumos.

La filtración por membranas está reemplazando a la clarificación convencional de los zumos, con la ventaja de que no es necesario eliminar los clarificantes después del proceso y que, es un sistema de clarificación en continuo, sin necesidad de mantener el zumo almacenado durante el tratamiento. Mediante este proceso se selecciona el tamaño de compuestos que desean ser eliminados, influyendo de forma mínima en la calidad del zumo (Echavarría et al., 2011). Además, otro parámetro importante es que el



contenido en polifenoles de los zumos no se ve disminuido con el tratamiento (Gökmen et al., 2001).

1.6.1.2 Clarificación por filtración tangencial

La definición genérica de la filtración es la separación de dos o más componentes que forman parte de un fluido. La aplicación de las tecnologías de membranas para la conservación y obtención de alimentos es claramente una tecnología emergente en el sector alimentario. El proceso de separación se fundamenta en la permeabilidad selectiva de un componente o más del líquido a través de la membrana y en un gradiente de presión hidrostática.

El proceso de filtración tangencial (o Crossflow filtration) consiste en el paso del zumo a través de una membrana mediante el cual se separa por presión los componentes del zumo dependiendo del tamaño. En esta aplicación, la diferencia de presión fuerza a que parte del flujo de la alimentación atraviese la membrana hacia el lado del filtrado y el resto de dicho flujo fluye tangencialmente al medio filtrante a lo largo de toda su superficie, barriendo continuamente las partículas que pudieran depositarse y reincorporándolas a la alimentación (**Figura 12**).

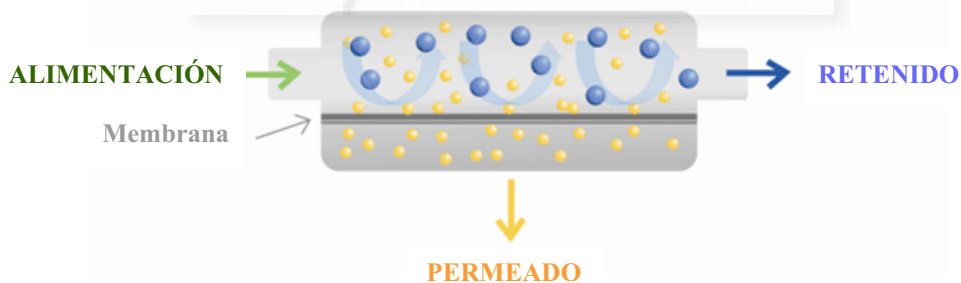


Figura 12. Filtración tangencial o crossflow filtration

Crossflow Sampler Modified Fouling Index Ultrafiltration (CFS-MFIUF)—An alternative Fouling Index. Sim, 2010.

Las partículas y macromoléculas que son demasiado grandes para pasar a través de los poros de la membrana se retienen en el lado de aguas arriba de la membrana. Sin embargo, los componentes retenidos no se depositan en la superficie de la membrana sino que en su lugar son barridos por el flujo tangencial. Solamente una pequeña parte



del flujo atravesará la membrana convirtiéndose en permeado, y la mayor parte irá a parar al depósito de retenido.

1.6.1.2.1 Tipos de filtración por membranas

Los procesos de membranas de filtración más importantes en la industria alimentaria son: microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa. Todas estas tecnologías actúan como tamices moleculares. La relación tamaño de sustancias/distribución de tamaño de poros permite la exclusión de moléculas en el permeado. Así, las sustancias mayores que el tamaño de los poros serán rechazadas por la membrana, y las sustancias cuyo tamaño esté comprendido entre el mayor y menor tamaño de poro serán parcialmente integradas.

Microfiltración

Las membranas utilizadas para realizar la microfiltración tienen tamaños de poro de 0.1 μm o mayores, pudiendo separar tamaños de partículas dentro del rango 0.1-10 μm . Proporciona una elevada eliminación de sólidos suspendidos, partículas finas, bacterias, macromoléculas y algunas coloidales. Su presión de funcionamiento es similar a la de UF. Se utilizan membranas microporosas del tipo filtro profundo dispuestas en cartuchos, que se instalan en línea y del tipo tamiz, que se disponen en diferentes configuraciones y que operan en la forma filtración tangencial. Las presiones de trabajo son más bajas que en el resto de procesos, entre 0.1 y 7 bar.

En muchos casos, las partículas son adsorbidas a la superficie de los poros lo cual reduce significativamente su diámetro efectivo; simultáneamente se puede producir una deposición de partículas en la superficie de la membrana, que forman una capa o un segundo filtro. Con frecuencia, estos dos fenómenos son suficientes para retener partículas más pequeñas que el propio diámetro del poro.



Ultrafiltración

Tienen tamaños de poro que van desde 0.1 μm hasta 0.001 μm . Este tipo de membranas suele permitir el rechazo de macromoléculas, todo tipo de microorganismos, coloidales y otro tipo de partículas. La presión de trabajo se mantiene baja entre 1 y 10 bares. Las membranas más utilizadas son las anisótropas donde una delgada capa de poros de pequeño diámetro se encuentra unida, sin discontinuidad, a otra capa más gruesa y microporosa.

Nanofiltración

Tienen poros de un tamaño inferior a 0.001 μm , lo que permite la eliminación de la mayoría de las especies como iones polivalentes (calcio y magnesio), elimina contaminantes de hasta 0.001 μm como bacterias, virus, materia orgánica, sales, pesticidas, excepto iones monovalentes y moléculas de bajo peso molecular.

Ósmosis inversa

Consiste en generar, mediante una membrana permeable al agua, una solución acuosa con bajo contenido en sal a partir de otra con alto contenido en sal. En la ósmosis inversa el proceso de separación se debe a la diferencia de solubilidad y difusividad en la membrana de los componentes de la solución acuosa.

Los tipos de filtración más comúnmente utilizados en la industria alimentaria son la ultrafiltración y microfiltración. Se están utilizando grandes rangos de tamaño de poro, desde 18000 Da de corte de peso molecular hasta 0.2 μm . Sin embargo, si el tamaño de poro de membrana excede 25000 Daltons, los taninos pueden pasar en el zumo clarificado y dando como resultado un color marrón y sabor fuerte ([Katasonova y Fedotov, 2009](#)).



1.6.1.2.2 Parámetros básicos de diseño y operación

La fase inicial de implementación de un sistema de filtración tangencial desde el punto de vista ingenieril pasa por la definición y obtención (a través de Producción/I+D) de los siguientes parámetros de operación:

- Crossflow de proceso
- Presión Transmembrana
- Superficie a instalar y volumen muerto máximo aceptable
- Tipos de membrana
- Temperatura
- Componentes del zumo y tratamiento previo
- Ensuciamiento y polarización por concentración
- Limpieza

Para poder llegar a delimitar estos parámetros, previamente es necesario especificar y consolidar conceptos como el tipo de membrana a utilizar, las concentraciones de trabajo, especificación de compuestos a eliminar, rendimientos esperados del proceso, control y efectividad de los procesos de limpieza, etc. La combinación de todos ellos conformará un conjunto de normas y requerimientos de configuración así como límites de operación que condicionarán el diseño del equipo.

Ratio de Crossflow: (l/h.m²)

Por Crossflow entendemos el caudal de barrido que circula tangencialmente a la superficie de la membrana, es decir, la cantidad de líquido que pasa a través de la membrana en un tiempo y área determinado. Cada proveedor de membrana recomienda unos valores de Crossflow diferentes que son función de la etapa (proceso o limpieza de la membrana) así como también de los promotores de turbulencia en el canal de alimentación de la misma (existen diferentes promotores de turbulencia específicos de cada proveedor).



En general, un valor elevado de Crossflow proporciona:

- Mayor flujo y mitiga los efectos de colmatación provocados por el propio producto procesado.

No obstante, unos elevados valores de Crossflow también pueden tener efectos negativos en el proceso tales como:

- Una mayor recirculación del producto a través de la bomba de proceso a lo largo del tiempo, provoca en algunas ocasiones la degradación de la calidad del producto (efecto cizalla) y un aumento de la T^a del mismo, efecto que debe ser contrareestado mediante fluidos de refrigeración y por lo tanto incrementando los costes de explotación de la instalación. Para mitigar este efecto cizalla se intenta trabajar a velocidades bajas de bomba, con lo que los equipos de bombeo deben sobredimensionarse, así también como la sección de descarga necesaria y por lo tanto se incrementa el volumen muerto del equipo (lo que obliga a utilizar soluciones de postlavado para la recuperación del producto y esto provoca diluciones del mismo y por lo tanto una disminución del rendimiento final obtenido) así como también los costes de inversión y explotación.

Presión Transmembrana (PTM) (bar)

Para lograr la filtración de líquido a través de la membrana es necesario la existencia de una fuerza que haga que este líquido atraviese. La presión transmembrana (PTM) es la fuerza motriz de la filtración tangencial y se define como la presión media aplicada desde la alimentación hasta el lado del filtrado de la membrana. En un flujo tangencial la presión media transmembranal se determina mediante la ecuación siguiente:

$$PTM [\text{bar}] = [(PE + PR)/2] - Pf \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

- PTM: presión media a través de la membrana (bar)
- PE: presión a la entrada del módulo de membrana (bar)
- PR: presión de salida del módulo de membrana (bar)
- Pf: presión de permeado (bar)



En una filtración tangencial el flujo de filtrado incrementa a medida que aumenta la PTM pero hasta un cierto límite y después se mantiene constante, por lo que es conveniente llegar a un compromiso entre la disminución del tiempo de proceso por un elevado caudal de filtrado, y la posible colmatación que se pueda favorecer en las membranas por un exceso de presión aplicada o de flujo normal a través de la membrana. Es por este motivo que resulta muy conveniente diseñar el sistema de filtración tangencial con algunos elementos o válvulas de control que nos permitan regular no tan solo la presión aplicada a las membranas sino también el caudal de filtrado en cada momento.

Superficie de filtración (Área de membrana)

La superficie de filtración instalada viene determinada en función del tiempo de proceso que se requiera y es función directa del volumen total a procesar y el flujo de proceso (filtrado de la membrana entre el área y el tiempo).

La elección de tiempos de proceso elevados provocan:

- Menor superficie necesaria
- Reducción de los costes de explotación
- Reducción del volumen muerto del equipo
- Reducción de las pérdidas de rendimiento.

Por otro lado:

- Aumenta el riesgo de degradación de la calidad del producto.
- Aumento el riesgo de la contaminación de producto.

Tipos de membranas

Las membranas de filtración tangencial presentan un marcado mecanismo de retención por acción de tamizado, por diferencia de tamaño de sus poros, aunque también puede existir una cierta retención en su interior por adsorción, que con el



tiempo pueden llegar a colmatarse. De tal forma que estas membranas deben responder a las siguientes exigencias: eficacia de separación mediante una porosidad regular y conocida, elevado rendimiento de permeación y elevada resistencia mecánica, química y térmica, que permite proceder a su limpieza y esterilización periódica.

Según la aplicación requerida, se utilizan diversos materiales. Las dos clases genéricas son las membranas orgánicas y las minerales, llamadas así por la naturaleza del material utilizado para su fabricación.

Las membranas orgánicas, las más antiguas, se fabrican con diversos polímeros (acetato de celulosa, polietilsulfona, polietileno, polifluoruro de vinilideno, polipropileno, acrilonitrilo...), cuya elección se efectúa en función de las necesidades: tipos de reacciones químicas posibles, necesidad de homologación alimentaria, temperatura de trabajo, etc. Este material normalmente posee una resistencia al ataque químico, altas temperaturas y concentraciones de oxidación que surgen cuando la membrana es limpiada químicamente.

Las membranas orgánicas tienen límites de resistencia mecánica, química y a la temperatura, lo que dio lugar en los ochenta a la utilización de nuevos materiales, tales como el zirconio o el titanio. Las membranas minerales satisfacen exigencias nuevas: trabajo con productos químicos, abrasivos o con altas temperaturas, necesidad de esterilización con vapor..., abriendo así nuevas vías a las técnicas de filtración tangencial. Estos materiales presentan una buena estabilidad térmica y química, pero presentan el inconveniente de que se procesan a temperaturas muy elevadas, incrementando mucho el coste energético de su fabricación.

Temperatura

El aumento de la temperatura tiene un efecto favorable a la filtración, pues disminuye la viscosidad del líquido a filtrar y también el efecto de la polarización de la concentración. En una solución con proteínas por ejemplo, se incrementa la difusividad de las mismas y, por tanto, se reduce la resistencia por ensuciamiento.



Componentes del zumo de fruta

Los zumos de frutas contienen coloides que pueden conducir a problemas durante el proceso de filtración. Estos coloides son de la fruta o pueden estar formados por microorganismos durante el periodo de almacenamiento. La pectina es un polisacárido estructural de la pared celular que se encuentra en todas las plantas superiores. Está principalmente compuesto por polímeros lineales de ácido D-galacturónico. Las pectinas son agentes formadores de geles presentes en los zumos, cuya estructura en forma de fibra impide el proceso de clarificación del zumo mediante la reducción significativa del flujo y el rendimiento (Srimanta et al., 2008).

Por lo tanto, los zumos ricos en pectinas se deberán ser sometidos a tratamientos enzimáticos para despectinizar, pretratando con enzimas como pectinasa, que ayudarán a la clarificación disminuyendo la viscosidad y la suciedad, aumentando así el flujo (Hea et al., 2007). Sin embargo, la rápida reducción del flujo de permeado se sigue produciendo lo que dificulta la aplicación de la filtración en el procesado industrial del zumo.

Las pectinasas son hoy unas de las enzimas principales utilizadas en el procesado de zumos de frutas a nivel industrial. Estas enzimas son principalmente responsables de la degradación de las largas y complejas moléculas de pectina, que se producen como polisacáridos estructurales en la lámina media y en las paredes primarias de células de plantas jóvenes. Se ha sugerido que las pectinasas son capaces de romper los complejos formados entre ésta y las proteínas. La dosis, tiempo y la temperatura debe ser determinado en ensayos dependiendo del grado de maceración requerido y el tipo de fruta utilizada (Bagger-Jørgensen y Meyer, 2004).

Ensuciamiento y polarización

Uno de los mayores obstáculos que dificulta la aplicación de los procesos de filtración tangencial es el fenómeno de descenso de la cantidad de flujo de permeado con el tiempo. Este fenómeno se denomina comúnmente ensuciamiento, como traducción directa del término “fouling”, haciendo referencia a una serie de mecanismos que representan una resistencia adicional al paso de líquido a través de la membrana.



El ensuciamiento, al disminuir la velocidad de producción de permeado, incrementa la complejidad de las operaciones con membranas, dado que el sistema ha de ser detenido frecuentemente para someterlo a operaciones de limpieza que reestablezcan la densidad de flujo de permeado. El elevado coste de estas operaciones hace que la filtración tangencial sea, algunas veces, menos viable económicamente para muchos de los problemas de separación.

Es claro que la presión sólo puede aumentarse hasta un cierto valor debido a consideraciones de resistencia mecánica del equipo y también por consideraciones de transporte de materia en el líquido debido a que un mayor flujo de permeado aumenta la compactación de materiales depositados en la membrana, induciendo su gelificación (**Figura 13**).

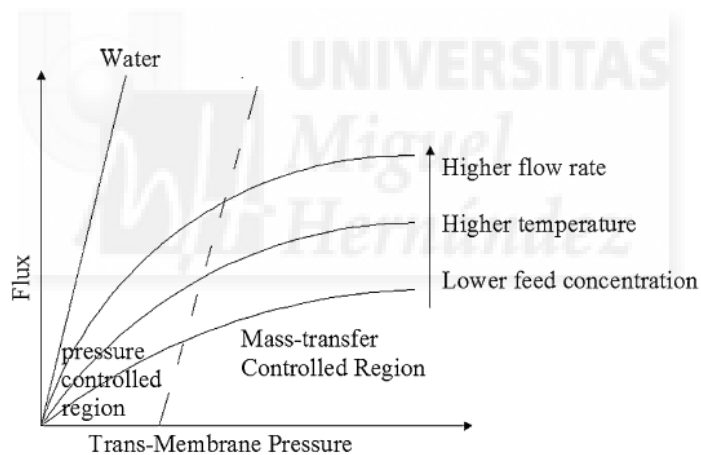


Figura 13. Forma general de las gráficas flujo de volumen frente a gradiente de presión. Fuente: (Mulder, 1996)

El ensuciamiento de las membranas de filtración tangencial se debe a varios mecanismos que pueden actuar juntos o por separado en las distintas etapas del proceso de filtración. Estos mecanismos son:



- *Taponamiento de los poros de la membrana*, tanto a nivel superficial como en el interior de los mismos, debido a que el tamaño de las moléculas de soluto es similar al de los poros de la membrana.

- *Formación de capa gel*, debida al establecimiento de una red tridimensional entre las macromoléculas de soluto y el disolvente. La concentración en la capa gel es constante para unas determinadas condiciones experimentales (**Figura 14**); pero varía con la velocidad tangencial y la concentración de la alimentación para un mismo soluto.

- *Adsorción de moléculas* sobre la superficie de membrana, debido a afinidades químicas entre la membrana y el soluto. La adsorción puede producirse también en el interior de los poros, reduciendo así el diámetro efectivo de los mismos.

- *Formación de depósitos* sobre la superficie de la membrana o en el interior de la misma por precipitación de las moléculas de soluto o sedimentación de materia en suspensión.

De todos estos mecanismos, los dos primeros, taponamiento de los poros de la membrana y formación de capa gel, son los mecanismos esenciales que explican el ensuciamiento de las membranas de filtración. Los dos restantes pueden afectar a uno o ambos de los mecanismos esenciales.

Otro fenómeno que también contribuye al descenso de la densidad de flujo de permeado con el tiempo es la polarización por concentración (**Figura 14**). Dicho fenómeno consiste en el incremento de la concentración del soluto que no es capaz de atravesar la membrana en las cercanías de la superficie de la misma. Este incremento de la concentración de soluto se debe al transporte convectivo del mismo causado por la presión transmembranal.

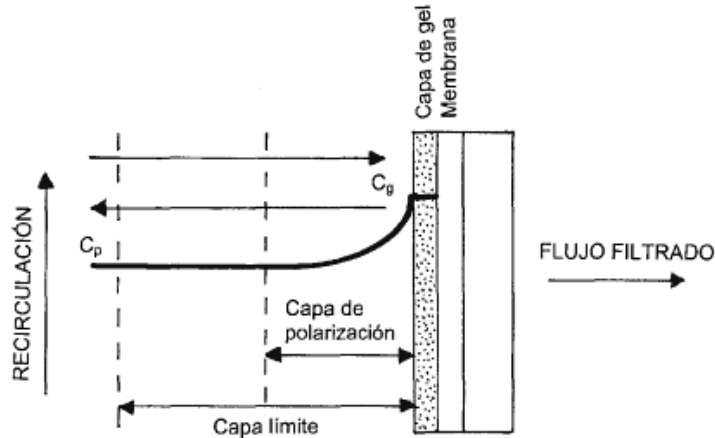


Figura 14. Polarización por concentración

Fuente: (Hidalgo, 2003)

La polarización por concentración no se considera como un mecanismo de ensuciamiento, ya que es un fenómeno intrínseco al proceso de concentración y no afecta a las propiedades de la membrana. El ensuciamiento requiere limpieza para su eliminación, mientras que la polarización por concentración desaparece al parar el proceso.

La **Figura 15** muestra una curva típica de la evolución de la densidad de flujo de permeado con el tiempo para un proceso de filtración. La zona I se corresponde con un rápido descenso inicial de la densidad de flujo de permeado. La zona II representa un descenso gradual que se prolonga durante un tiempo significativamente más largo que la zona I. Finalmente, la zona III corresponde a la densidad de flujo de permeado estacionaria.

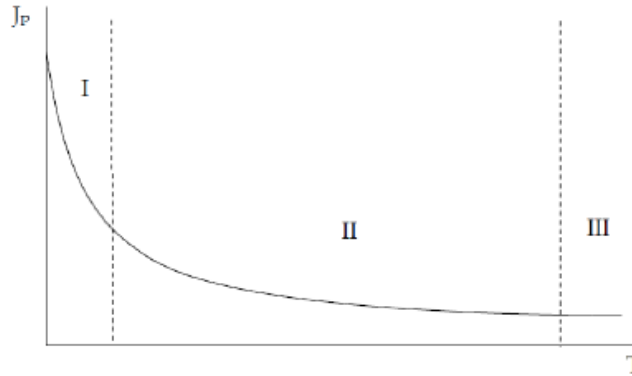


Figura 15. Representación esquemática de las tres etapas de descenso de la densidad de flujo de permeado con el tiempo

Limpieza de membranas

La limpieza es una parte esencial del proceso de filtración con membranas. Durante la operación, las membranas se colmatan produciéndose un descenso en el rendimiento. Llegado a un nivel mínimo aceptable, los agentes responsables de la colmatación deben eliminarse mediante el proceso de limpieza.

Existen pocos estudios cuantitativos que comparen la eficacia de los distintos protocolos para diferentes sistemas de filtración. En términos generales, la limpieza puede ser de distinta naturaleza: física, química y biológica (Cheryan, 1998).

- Química: en forma de detergentes o agentes de limpieza. La limpieza es, esencialmente, una reacción físico-química. Los agentes de limpieza solubilizan o dispersan las sustancias contaminantes.
- Térmica: en forma de calor, debido a la naturaleza de la acción de los agentes químicos, su eficiencia se incrementará con la temperatura.
- Mecánica: en forma de alta velocidad en las conducciones y en ocasiones elementos de fricción, cuando los agentes químicos no son lo bastante efectivos.



El efecto de estos métodos en la eficacia de la limpieza depende de un cuarto factor, el tiempo de limpieza.

1.6.2 Pasteurización de zumo de granada

Tradicionalmente, los tratamientos térmicos han sido utilizados ampliamente en la industria alimentaria. El tratamiento térmico de los alimentos induce modificaciones biológicas, físicas y químicas que conducen a cambios sensoriales, nutricionales y texturales. En general, el tratamiento térmico de los alimentos implica una mayor seguridad y calidad del producto. La calidad del alimento, en cuanto al punto de vista nutricional, seguridad microbiológica y aspectos sensoriales depende de un rango de variables como la calidad del material de partida, las técnicas de procesado, empaquetado y almacenamiento.

Los tratamientos térmicos pueden ser clasificados de acuerdo a la intensidad del tratamiento de calentamiento: pasteurización (entre 70-100 °C), esterilización (110-120 °C) y tratamiento de alta temperatura (140-160 °C). La razón por la cual el tratamiento térmico es efectivo es que la rapidez de las reacciones incrementa con la temperatura. Las reacciones químicas siempre incrementan con la temperatura; reacciones bioquímicas y microbiológicas también incrementan con la temperatura, pero por encima de una cierta temperatura, las enzimas y microorganismos se inactivan. Las reacciones físicas no son dependientes generalmente de la temperatura. Varias reacciones con importancia en la calidad del alimento tienen temperaturas de sensibilidad distintas y esto puede ser utilizado para realizar tratamientos que produzcan los menores efectos en el producto (**Figura 16**).

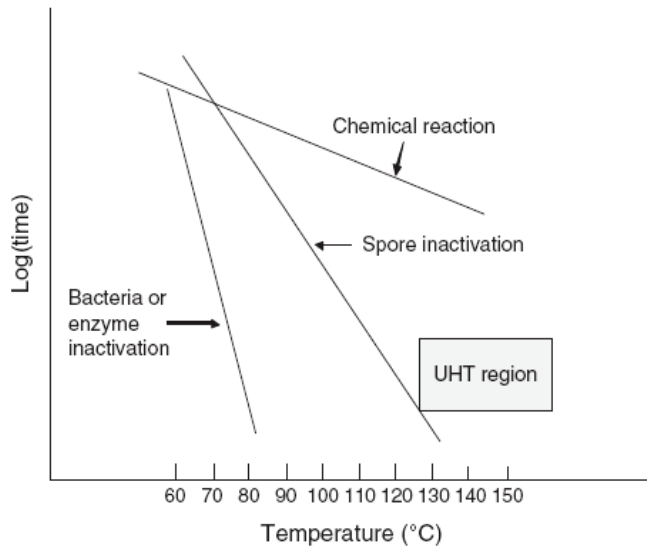


Figura 16. Diagrama esquemático donde se muestra cómo el tiempo ejerce distintos efectos dependiendo de la temperatura en las reacciones químicas, bioquímicas y microbiológicas (van Boekel, 2009)

1.6.2.1 Factores que afectan a la pasteurización

Las características del alimento son muy importantes para establecer la mejor relación de temperatura y tiempo necesaria para obtener un producto seguro. Existen una serie de factores que influyen en el proceso de pasteurización como son la acidez del alimento, los microorganismos presentes en el mismo, la forma del alimento y sus propiedades térmicas.

La acidez del alimento

La acidez determina el grado de supervivencia de un organismo bacteriano. La principal clave para averiguar este parámetro es el pH, cabe decir que históricamente los alimentos se han considerado ácidos o poco ácidos. Hay que considerar que la mayoría de las bacterias tóxicas como las de la especie *Clostridium botulinum* ya no están activas por debajo de un valor de 4,5. Los alimentos se pueden considerar como ácidos si están por debajo de este valor de pH (la mayoría de las frutas se encuentran en este



rango, sobre todo los cítricos). En el caso de alimentos con un pH superior, es necesario un tratamiento térmico de 121 °C durante 3 minutos (o un proceso equivalente) como procesamiento mínimo (es decir, la leche, las verduras, las carnes, el pescado, etc.). No obstante, muchos de estos alimentos se convierten en ácidos cuando se les añade vinagre, zumo de limón, etc., o simplemente fermentan cambiando su valor de acidez. La causa de este efecto reside en la desactivación de la actividad microbiana debida a la simple influencia que posee por el valor de la acidez, indicada por el pH, sobre la condición de vida de estos microorganismos.

En nuestro caso, el zumo de granada tiene un pH ácido, inferior a 4 y por tanto, un tratamiento térmico adecuado nos permitiría obtener un producto microbiológicamente estable con propiedades organolépticas y nutricionales similares a los de la fruta de partida. Sin embargo no se debe descartar la presencia de levaduras y hongos que resisten medios ácidos con temperaturas de pasterización inferiores a los 100 °C.

Microorganismos resistentes

Dependiendo de su origen, los zumos contienen diversos microorganismos y es necesario reducir la concentración total de sus poblaciones mediante la pasteurización. En general, los microorganismos más comúnmente presentes en los zumos se tratan de levaduras y hongos, seguidos de coliformes fecales, todos ellos presentes en las zonas de cultivo de las frutas que por los métodos de extracción del zumo pasarán a estar presentes en él.

Algunos organismos y bacterias cultivados en los alimentos son resistentes a la pasteurización, como los bacilos de las especies *Bacillus cereus* (pudiendo llegar a prosperar cultivos de éstos incluso a bajas temperaturas), y *Bacillus stearothermophilus*. No obstante la resistencia a la eliminación térmica depende en gran medida del pH, actividad de agua, o simplemente de la composición química de los alimentos, la facilidad o probabilidad de volver a ser contaminados (en lo que se denomina en inglés "postprocessing contamination", o PPC).



Según la Food and Drug administration (FDA), para que un zumo sea seguro microbiológicamente, es necesario la reducción de 5 unidades logarítmicas de los microorganismos patógenos pertinentes, es decir, de aquellos microorganismos resistentes reconocidos por las autoridades dependiendo de cada tipo de alimento. Generalmente estos microorganismos son *Salmonella sp* y *Escherichia coli* O157:H7.

Forma del alimento

Mencionar la forma como un factor a tener en cuenta en la pasteurización del alimento es equivalente a decir que lo que influye es la superficie exterior del alimento. Cabe pensar que el principal objetivo del proceso de pasteurización es el incremento de la razón entre la capacidad de enfriamiento y la superficie del mismo. De esta forma, el peor ratio corresponde a los alimentos similares a una esfera. En el caso de los alimentos líquidos, se procura que tengan formas óptimas para que la variación de temperatura, tanto en calentamiento como en enfriamiento, pueda obtener ratios óptimos.

Propiedades térmicas del alimento

Algunas propiedades térmicas del alimento afectan de forma indirecta al rendimiento final de la pasteurización sobre el mismo, como la capacidad calorífica (la cantidad de energía que hay que introducir por unidad de masa de alimento para que suba de temperatura), la conductividad térmica (garantiza la homogeneidad del proceso en el alimento), la inercia térmica (los alimentos con menor inercia térmica son más susceptibles de ser pasteurizados que los que poseen mayor inercia).



1.6.2.2 Tratamientos de pasteurización frecuentes en los zumos

Los zumos envasados (e incluso los néctares) se someten a dos tipos diferentes de procesos de pasteurización: por un lado existen los zumos sin procesar (crudos); por otro, los zumos ultrapasteurizados o zumos estériles.

Los productores de zumos están familiarizados con los procesos de pasteurización y con ambos métodos: el VAT o proceso "batch" (65 °C 30 minutos en recipientes estancos, empleado en los productores de pequeño tamaño de producción) y el UHT (138 °C 1-3 segundos, empleado en los productores de mayor producción).

El método HTST (72 °C 15 segundos) es aceptado en la industria, ya que no produce una degeneración apreciable del sabor. La pasteurización es muy efectiva en los zumos debido a que son medios ácidos y evitan la proliferación de microorganismos esporulados, los más resistentes a las altas temperaturas. En muchos países como Estados Unidos, el 95 % de los zumos comercializados son pasteurizados. En algunas ocasiones se exige por parte de los organismos encargados de la vigilancia e higiene alimentaria que se le indique al consumidor que está tomando un "zumo crudo" (FDA).

1.6.2.3 Efectos de la pasteurización en zumos

El color rojo característico de la granada así como de su zumo es un criterio de calidad importante, siendo los principales responsables del mismo los antocianos (colores rojo, naranja y azul), pigmentos solubles que se localizan en vacuolas. El deterioro de los colores primarios en los zumos de frutas que contienen antocianos se produce como consecuencia de la degradación de antocianos monoméricos, la polimerización de antocianos y la subsiguiente formación de color marrón (Somers y Evans, 1986). Los factores que afectan a la estabilidad de los antocianos incluyen la temperatura de procesado y almacenamiento, la naturaleza química de los antocianos (acilación o glucosilación), pH, ácido ascórbico, el peróxido de hidrógeno, azúcares, la luz y los metales. La magnitud y duración del tratamiento térmico ejercen una gran influencia sobre la estabilidad de los antocianos.



El zumo de granada es un producto con una alta concentración de polifenoles. Estos compuestos son altamente reactivos y buenos sustratos de enzimas como la polifenoloxidasa, peroxidasa, glicosidasa y esterasa. Las consecuencias del tratamiento térmico en los polifenoles difieren dependiendo de su concentración, estructura química, estado de oxidación, localización en las células, posibles interacciones con otros compuestos del zumo y el tipo de tratamiento térmico utilizado.

El calentamiento después del prensado de las granadas inhibe la enzima polifenoloxidasa (PPO) que causa la formación de color marrón por oxidación de los polifenoles (Skrede et al., 2000). La PPO también degrada los antocianos monoméricos indirectamente mediante la formación de O-quinonas de polifenoles durante el pardeamiento enzimático que reacciona y degrada los antocianos monoméricos.

Además, los compuestos que contribuyen a la alta capacidad antioxidante de la granada se atribuyen al grupo de las punicalaginas, seguido de los taninos hidrolizables, antocianos y ácido elágico (Gil et al., 2000). Estos compuestos también pueden verse afectados por el tratamiento de pasteurización y almacenamiento, disminuyendo así la calidad del zumo de granada.

1.6.3 Almacenamiento y vida útil

La calidad de los alimentos se define como el conjunto de propiedades que influyen en su aceptación por el consumidor y que diferencian unos de otros. La calidad de los alimentos es un estado dinámico que se mueve continuamente hacia niveles más bajos. Así pues, para cada alimento en particular, hay un periodo determinado, después de su producción o elaboración, durante el cual mantiene el nivel requerido de sus cualidades organolépticas y de seguridad, bajo determinadas condiciones de conservación. Este periodo se define como vida útil del alimento correspondiente (Casp y Abril, 2003).

Los principios de evaluación de la vida útil son necesarios para mejorar y desarrollar el almacenamiento y distribución de los alimentos, es decir, para la optimización de la cadena alimentaria. Para establecer la vida útil de un alimento es



esencial determinar qué factores limitan esta vida útil; tales factores pueden causar cambios químicos, físicos y biológicos que se traducen en un cambio en las características sensoriales del alimento (Casp y Abril, 2003).

Los cambios en los alimentos deberían ser estudiados durante el procesado y almacenamiento real del alimento; sin embargo, los cambios producidos durante el almacenamiento son a menudo demasiado pequeños o demasiado lentos para ser estudiados dentro de un determinado marco de tiempo.

Además de todos los procesos mencionados anteriormente, el almacenamiento del zumo también representa una fase crítica de transformación del zumo de granada (Fischer et al., 2011; Martí et al., 2002; Uzuner et al., 2011). La duración y temperatura de almacenamiento del zumo es una variable muy importante a controlar. En varios estudios se ha evaluado el efecto de las condiciones de almacenamiento sobre compuestos aislados como antocianos y otros polifenoles utilizando temperaturas entre 0 y 20 °C en condiciones de oscuridad o con luz. Los mejores resultados obtenidos parecen ser los que se han mantenido las muestras de estudio a baja temperatura y en oscuridad (Alighourchi et al., 2008; Gil et al., 2000; Miguel et al., 2004).

Durante el almacenamiento del zumo de granada se producen reacciones de degradación, polimerización, copigmentación y pardeamiento no enzimático que cambian las características de los zumos en general y del zumo de granada en concreto (Alighourchi et al., 2008; Mullen et al., 2007; Uzuner et al., 2011; Zafrilla et al., 2001). Por ello, es necesario encontrar las condiciones adecuadas de extracción, clarificación, filtración, pasteurización y almacenamiento del zumo para preservar las características, la composición y aumentar la vida útil del mismo, sin dejar de lado la seguridad.

CAPÍTULO 2. Metodología





CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2.1 Determinación de pH

El pH como medida de acidez iónica de las soluciones ensayadas fue medido con un pH-metro (modelo GLP 21, Crison, Barcelona) directamente en el zumo a temperatura ambiente (25 °C).

2.2 Contenido en sólidos solubles

Los sólidos solubles disueltos en los zumos se analizaron con un refractómetro (Abbe WYA-S, Optic Ivymen[®] System, Barcelona, Spain) a 25° C. Los valores se expresaron como ° Brix.

2.3 Análisis microbiológicos

Para determinar la microbiología inicial de los zumos se realizaron diluciones seriadas decimales del zumo y se sembraron 100 µL en distintos medios de cultivo selectivos y diferenciales con el objetivo de cuantificar el crecimiento de hongos, levaduras, bacterias lácticas y microorganismos aerobios mesófilos viables. Para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos se empleó *agar de recuento en placa* (PCA, plate count agar). Para levaduras y mohos se empleó *Agar Sabouraud Cloranfenicol* y *Agar de patata dextrosada (PDA, Potato Dextrose Agar)*. Y por último, *MRS Agar* para bacterias lácticas. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h y posteriormente se realizó el recuento (**Figura 17**).

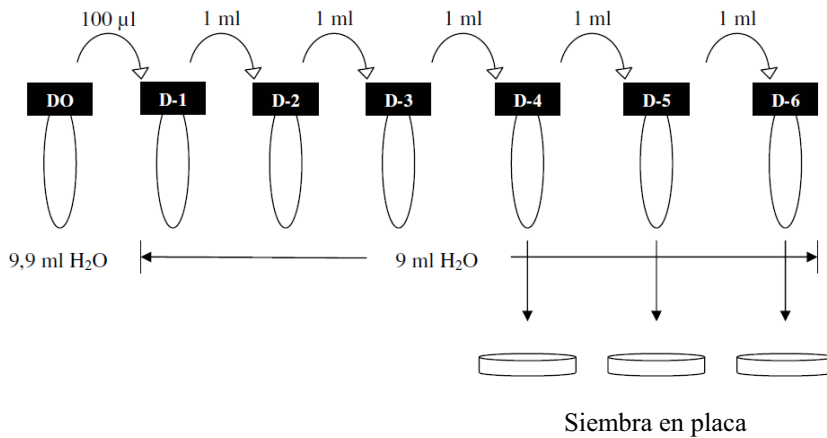


Figura 17. Esquema del procedimiento de siembra en placa

La microbiología de los zumos pasteurizados y almacenados a lo largo del tiempo se determinó mediante la siembra directa de 100 µL de zumo en agar de recuento en placa, incubación a 30 °C durante 48 h y posterior recuento.

2.4 Determinación del color

El color es uno de los factores de calidad más importantes de los zumos ya que, de él depende en gran parte la aceptación o no del consumidor. Disminuciones en el color, inicialmente causadas por el pardeamiento no enzimático reduce la aceptación por parte del consumidor. El almacenamiento puede también causar alteraciones en el color de los zumos por acción de tratamientos térmicos, aire y la oxidación de los compuestos del mismo.



2.4.1 Determinación de las características cromáticas: Absorbancia 420, 520 y 700 nm

Los espectrofotómetros de reflectancia miden la cantidad proporcional de luz reflejada por una superficie como una función de las longitudes de onda para producir un espectro de reflectancia.

Con un lector de placas Spectrostar Omega (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Alemania), se determinaron todas las longitudes de onda en el espectro visible y se tomaron los datos obtenidos a 420 nm (longitud de onda a la que absorben mayoritariamente las sustancias con tonalidades amarillas), a 520 nm (longitud de onda a la que absorben mayoritariamente las sustancias con tonalidades rojas) y a 700 nm (turbidez) (Guzman, 2010) de los zumos previamente diluidos en agua destilada con el objetivo de que la absorbancia no fuese superior a 1.

2.4.2 Determinación de parámetros de color triestímulo: Método CIELab

Para poder determinar la calidad del color de forma sistemática es necesario realizar medidas objetivas del color, así como de la concentración de pigmentos. En este contexto, el color denota la apariencia visual del producto mientras que los pigmentos o colorantes son los compuestos químicos que imparten el color observado.

La medida de color pretende cuantificar de forma precisa la percepción psicovisual del color. Uno de los criterios objetivos más utilizados para la medida del color es el sistema C.I.E. $L^*a^*b^*$ (Comision Internationale de l'Eclairage) adoptado para la determinación y especificación de las características del color (**Figura 18**) (McLaren, 1980). En dicho sistema se definen las coordenadas de color como:

- L^* : luminosidad. Atributo de una sensación visual según la cual el área parece reflejar difusamente o transmitir más o menos luz. Varía de 0 a 100. El 100 corresponde al blanco y el 0 al negro.
- a^* : representa la variación rojo-verde, con valores positivos y negativos.



- b^* : representa la variación amarillo-azul, cuando es positivo contribuye al color amarillo y si es negativo al azul.
- El tono o color representado como *hue* (h), se calcula en función de los parámetros a^* y b^* : $h = \text{artg}(b^*/a^*)$ (expresado en grados).
- El parámetro *Chroma* (C^*), indicativo de intensidad de color, se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula: $C^* = (b^{*2} + a^{*2})^{1/2}$.

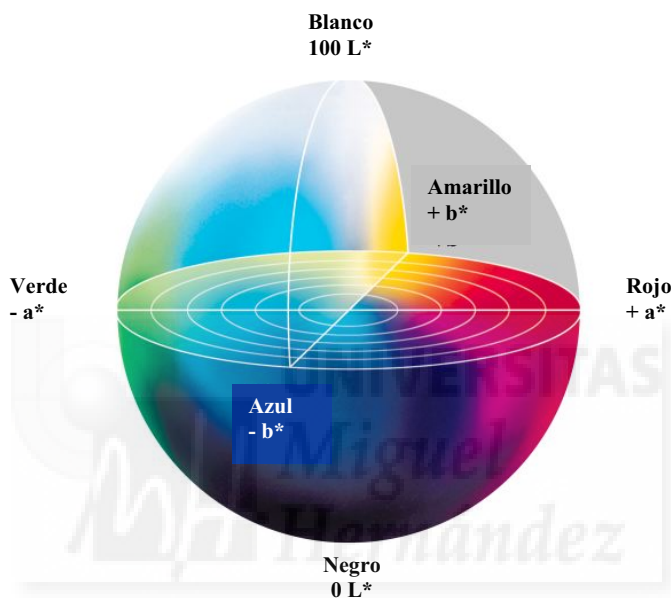


Figura 18. Representación gráfica de los parámetros de color del sistema tridimensional o espacio de color CIELab

Los cambios en el color de los zumos fueron determinados con un colorímetro Hunter Lab. ColorFlex 45/0 (Reston, VA, EE.UU.) equipado con una fuente de luz D_{65} y un ángulo de observación de 10° . La escala de color escogida fue *CIE Lab* (1958), por la que se determinaron los parámetros CIE L (luminosidad: 0, negro; 100, blanco), CIE a (+, rojo; -, verde) y CIE b (+, amarillo; -, azul), *Chroma* y *Hue*.

2.5 Densidad de color total

La densidad de color total (TCD), fue expresada como el valor de absorbancia de los compuestos marrones que presentan un máximo a 420 nm con respecto a la



absorbancia máxima del zumo de granada a 533 nm (color rojo). Los zumos de granada se diluyeron en agua destilada en cada caso para obtener una absorbancia inferior a 1 y se midió la absorbancia en un lector de placas Spectrostar Omega (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Alemania). La densidad de color total se determinó mediante la **ecuación X** (Alper et al., 2005; Ferrari et al., 2010), en función de la absorbancia a 420 nm (A_{420}), 533 nm (A_{533}) y a 700 nm (A_{700}), y el factor de dilución (DF):

$$\text{TCD} = [(A_{420} + A_{533}) - 2(A_{700})] \cdot \text{DF} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

2.6 Índice de pardeamiento

El índice de pardeamiento (BI), expresado como la relación entre la absorbancia a 430 nm y la absorbancia a 520 nm según Malien-Aubert et al., 2000, se determinó en las muestras de zumo de granada diluidos en agua destilada y su determinación utilizando un lector de placas Spectrostar Omega (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Alemania).

2.7 Determinación de la capacidad antioxidante. Método ABTS, FRAP y ORAC

Debido a la diversidad química de los compuestos fenólicos y a la compleja composición y disposición en plantas, frutas, zumos, extractos, etc..., es muy costoso e ineficiente separar cada capacidad antioxidante de cada compuesto fenólico para estudiarlo individualmente. Por ello, a pesar de que se encuentren formando complejos, es necesario establecer convenientemente métodos efectivos de cuantificación de los compuestos fenólicos de los mismos para evaluar los beneficios en la salud actuando conjuntamente.

Una gran variedad de métodos de determinación de capacidad antioxidante como la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (ABTS), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y la capacidad de reducir iones de hierro (FRAP), están siendo comúnmente utilizados para la cuantificación de la capacidad antioxidante de polifenoles en frutas y vegetales.



Los métodos ABTS y FRAP están basados en la transferencia de electrones. Estos ensayos miden la capacidad de un compuesto antioxidante de transferir un electrón para reducir radicales, metales o carbonilos, y se monitoriza mediante la observación de cambios de color. La reacción finaliza cuando ya no se producen cambios de color. El grado de degradación del color es proporcional a la concentración de antioxidante. Las sondas oxidantes utilizadas son ácido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS⁺) en el método ABTS y Fe³⁺ (2,4,6-tripiridyl-s-triazina)₂Cl₃ en FRAP.

El método ORAC es un ensayo basado en la medida de la capacidad de los antioxidantes de captar radicales libres por donación de átomos de hidrógeno. El ensayo implica una reacción competitiva en cadena en la que el antioxidante y el sustrato compiten por la generación térmica de radicales peroxilo a través de la descomposición de compuestos azo.

En los tres métodos, los resultados se expresan como mmoles de equivalentes Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; Fluka Chemika, Neu-Ulm, Suiza), un análogo sintético de la vitamina E, o tocoferol, por kilo o litro de muestra. En el caso del método FRAP, también puede utilizarse FeSO₄ como sustancia de referencia.

2.7.1 Método ABTS

El radical ABTS⁺ se generó químicamente según el método de [Re et al., 1999](#). Para ello, 10 mg de ABTS comercial (ácido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico; Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se disolvieron en 2 mL de agua Milli-Q. Posteriormente, para la activación del radical se mezcló con 605 µL de una disolución de persulfato potásico (K₂S₂O₈) preparada a 2.85 mg/mL. La mezcla se dejó incubando a temperatura ambiente y en oscuridad durante 12 h.

A continuación, se realizó una dilución de esta solución hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 a 734 nm. De esta solución diluida se añadió en una placa de 96 pocillos 200 µL por pocillo y se midió la absorbancia a 734 nm (absorbancia inicial).



Posteriormente se añadieron 20 μL de la muestra diluida en agua destilada 1:100 centrifugada a 2500 g 15 minutos, los patrones de Trolox y agua destilada como blanco y se evaluó la variación de absorbancia a 734 nm tras 6 minutos de reacción, a 25 °C mediante espectrofotometría en un lector de placas Spectrostar Omega (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Alemania).

2.7.2 Método FRAP

Este ensayo mide la capacidad de una sustancia de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Se emplea el reactivo TPTZ (Sigma, St. Louis, MO, EEUU), incoloro cuando está unido al Fe^{3+} (complejo tripiriltriaca férrica; $\text{Fe}^{3+}\text{-TPZT}$), y adquiere una coloración azul al reducirse a ión ferroso a bajo pH. Este ensayo se llevó a cabo según el método de [Benzie y Strain, 1996](#), con algunas modificaciones.

La mezcla de reacción inicial (solución FRAP) constó de 25 mL de tampón acetato sódico (300 mM, pH= 3,6), 2.5 ml de TPTZ (10 mM en 40 mM de HCl) y 2.5 mL de cloruro férrico hexahidratado 20 mM ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Posteriormente, esta solución se calentó a 37 °C durante 10 minutos y finalmente se añadieron 250 μL en cada pocillo de una placa de 96 pocillos para registrar la absorbancia a 593 nm (absorbancia inicial). En cada uno de los pocillos se añadieron 40 μL de las muestras centrifugadas a 3000 rpm 15 minutos, filtradas por 0.45 μm y diluidas 1:50, patrones y blanco por triplicado y se midió la absorbancia final a 593 nm en un lector de placas Spectrostar Omega (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Alemania).

2.7.3 Método ORAC

Para ensayar la capacidad del zumo para eliminar los radicales peroxilo se utilizó el método ORAC que utiliza fluoresceína (FL) como la sonda fluorescente (ORACFL) ([Ou et al., 2001](#)). En este ensayo se realiza la medición de la fluorescencia en una muestra antioxidante en la que se han generado radicales peroxilo por la descomposición de 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). La cinética de caída de intensidad de la fluorescencia se mide continuamente en condiciones fisiológicas (pH 7.4 y 37 °C). Este método se considera como el simulador



del comportamiento de la actividad antioxidante de los polifenoles en sistemas biológicos (Ou et al., 2002).

El zumo se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, y el sobrenadante se preparó para el análisis diluyendo éste con 75 mM de solución tampón de fosfato a pH 7.4. El sistema de análisis automatizado se llevó a cabo en un analizador espectrofluorométrico Fluostar Galaxy (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Alemania). Inicialmente, la fluoresceína preparada a una concentración tal que la concentración final en el pocillo sea de 90 nM se calentó a 37 °C. En una placa de 96 pocillos negra se colocaron 160 µl de FL, 20 µL de cada muestra diluida 1:100 y patrones de Trolox. Una solución AAPH (12.8 mM) recién preparada se utilizó para cada experimento. La temperatura de la incubadora se mantuvo a 37 °C y la fluorescencia de FL se registró cada minuto después de la adición de AAPH.

2.8 Determinación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu

El ensayo Folin Ciocalteu (FC) se basa en la transferencia de electrones en un medio alcalino de los compuestos fenólicos a los complejos de ácido fosfomolibdico / fosfotúngstico para formar complejos azules (posiblemente $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$) que se determina espectroscópicamente a 750 nm (Singleton et al., 1999; Singleton y Rossi, 1965). El ácido gálico es utilizado como el estándar de comparación y los valores se expresan como miligramos de ácido gálico por kilo o litro de muestra. Debido a la naturaleza química del reactivo FC, mediante la determinación con este método se detectan tanto fenoles totales como otros sustratos de oxidación. Los otros sustratos de oxidación presentes en la muestra pueden interferir en la medición de fenoles totales de forma inhibitoria, aditiva o puede mejorarla. Los efectos inhibitorios podrían ser debidos a la competencia entre los oxidantes con el reactivo de FC y / o oxidación de la muestra por el aire una vez se ha alcalinizado. Por esta razón, el FC reactivo se añade delante del álcali. Los efectos aditivos pueden producirse por la presencia de fenoles simples, aminas aromáticas, altos niveles de azúcar o ácido ascórbico en las muestras. Singleton et al., 1999 discuten los efectos de los compuestos de interferencia y los métodos para la corrección de estos factores. Sin embargo, a pesar de estos inconvenientes, la prueba de FC es simple y reproducible y ha sido ampliamente



utilizada para la cuantificación de los compuestos fenólicos de plantas, extractos y zumos.

La cantidad de compuestos fenólicos totales se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu, adaptado a microescala. En una placa de 96 pocillos se colocaron en cada uno 50 μL del reactivo de Folin (Sigma, Steinheim, Alemania). Seguidamente, se añadieron 10 μL de muestra de zumo de granada diluida en agua destilada, 100 μL de carbonato de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania) acuoso al 20 % y 100 μL de agua destilada. Se agitó la mezcla y se dejaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. La detección se realizó a 750 nm en un lector de placas Spectrostar Omega (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Alemania). Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico (Doesder. Chem. Co., Barcelona, España) por litro de zumo.

2.9 Determinación del contenido en fenoles totales por espectrofotometría

Los compuestos polifenólicos presentan un máximo de absorción a 280 nm, por lo que la medida de la absorbancia a esta longitud de onda en muestras en las que la concentración de proteínas no es alta puede permitir cuantificar la concentración de polifenoles.

2.10 Antocianos copigmentados, monoméricos y poliméricos

Los antocianos son compuestos lábiles, fácilmente oxidables y que condensan con otros polifenoles formando pigmentos poliméricos marrones. [Somers y Evans, 1986](#) desarrollaron un método basado en la utilización de bisulfito de sodio, un reactivo de blanqueo para determinar el color polimérico y el oscurecimiento de los vinos. Los antocianos monoméricos se combinan con bisulfito para formar un ácido sulfónico incoloro (**Figura 19**). Además, los productos poliméricos de la degradación de los antocianos son resistentes a la decoloración por bisulfito. Este método ha sido aplicado a una amplia variedad de productos ricos en antocianos y ha resultado ser extremadamente útil para el control de la degradación de los antocianos durante el procesamiento y el almacenamiento ([Giusti y Wrolstad, 2001](#)).

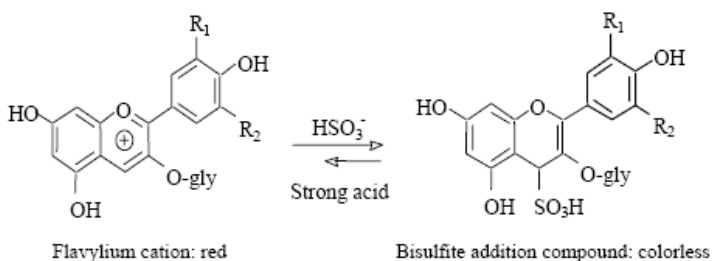


Figura 19. Reacción de los antocianos con bisulfito para formar compuestos no coloreados (antocianos-ácido sulfónico) (Wrolstad et al., 2005)

Por otro lado, la adición de acetaldehído a muestras con alto contenido en antocianos produce un incremento del color rojo por la asociación o polimerización de estos con otros compuestos fenólicos (antocianos copigmentados). En experimentos con disoluciones modelo, la adición de acetaldehído a las muestras no produjo ningún efecto si éstas no contenían mezclas de antocianos y otros compuestos polifenólicos (Dallas et al., 1996).

Los antocianos copigmentados, monoméricos y poliméricos fueron determinados utilizando el método de (Mazza et al., 1999) con algunas modificaciones. Para ello, 20 μL de acetaldehído al 10 % (v/v) se añadieron a 2 mL de zumo. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 45 minutos y pasado este tiempo se realizó la medida de la absorbancia a 520 nm (A_{acet}). Por otro lado, a 2 mL de zumo se añadieron 260 μL de SO_2 al 5 % (p/v) y se midió la absorbancia a 520 nm (A_{SO_2}). Además, también se midió la absorbancia a 520 nm del zumo diluido en agua destilada y se multiplicó por el factor de dilución (A_{zumo}). El porcentaje en antocianos copigmentados, monoméricos y poliméricos se calcularon con las ecuaciones 3 \rightarrow 5:

$$\% \text{ copigmentados} = [(A_{\text{acet}} - A_{\text{zumo}})/A_{\text{acet}}] * 100 \quad \text{(Ecuación 3)}$$

$$\% \text{ monoméricos} = [(A_{\text{zumo}} - A_{\text{SO}_2})/A_{\text{acet}}] * 100 \quad \text{(Ecuación 4)}$$

$$\% \text{ poliméricos} = [A_{\text{SO}_2}/A_{\text{acet}}] * 100 \quad \text{(Ecuación 5)}$$



2.11 Determinación de compuestos fenólicos por HPLC

Los compuestos fenólicos se analizaron en cada una de las muestras durante el almacenamiento por triplicado. Todas las muestras se centrifugaron 15 minutos a 2500 g a temperatura ambiente. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de PVDF de 0.45 μm (Millex HV13, Millipore, Bedford, Mass., USA) previo a su inyección en el HPLC-DAD.

Los análisis de las muestras fueron llevados a cabo en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución de la marca Agilent[®] (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, EEUU), compuesto por los módulos: un desgasificador de microvacío, una bomba cuaternaria, un inyector automático termostatzado estándar, un compartimento de columna termostatzado y un detector de diodos, todos ellos de la serie 1100, controlado mediante el software Chemstation. Para la separación se empleó una columna de fase reversa LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 250 x 4 mm (d.i), equipada con una precolumna C₁₈ (Lichrocart 4-4; Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil utilizada fue agua : ácido fórmico (95:5, v/v) como eluyente A y metanol calidad HPLC como eluyente B. El caudal de flujo empleado en la separación fue de 1 mL/min. El gradiente comenzó con un 1% del eluyente B, manteniendo las condiciones isocráticas durante 5 minutos. A partir de aquí pasó a un 20 % de B al minuto 20, 40 % al minuto 30, 95 % al minuto 35 y a un 1 % al minuto 41. Se utilizó un volumen de inyección de 20 μL . Para la identificación de los diferentes compuestos se comparó la forma y la longitud de onda máxima de absorción de los espectros ultravioleta y el tiempo de retención de los mismos con estándares externos.

Los cromatogramas se registraron a distintas longitudes de onda con el fin de detectar las distintas clases de compuestos fenólicos de interés: 280 nm para el ácido elágico, 360 nm para las punicalaginas y 520 nm para los antocianos. Las punicalaginas α y β se cuantificaron por comparación con un patrón externo de punicalaginas, el ácido elágico con un patrón de ácido elágico y todos los antocianos se cuantificaron como cianidina 3-glucósido. Los resultados fueron expresados como mg /L.



2.12 Determinaciones varias

Para la caracterización del zumo de granada (Capítulo 4) como propuesta para actualizar la nueva guía de AIJN (Asociación de Industrias de Zumo y Néctares de la Unión Europea) se realizaron distintos análisis en un laboratorio externo certificado por AENAC siguiendo las normas IFU revisadas en los años 2005 y 2008. A continuación se muestra una tabla (**Tabla 2**) con los distintos análisis realizados y las normas IFU utilizadas para cada uno.





Tabla 2. Parámetro vs IFU para caracterización de zumo de granada

Parámetro	IFU
Densidad relativa 20/20	IFU 1
°Brix	IFU 8
Acidez volátil	IFU 5
Etanol	IFU 52
Ácido Láctico, método enzimático	IFU 53
Patulina HPLC	IFU Recomendación nº 2
Ácido L-ascórbico	IFU 17
Arsénico y metales pesados	AAS
Hidroximetilfurfural	IFU 69
Ácido D-málico método enzimático	IFU 64
Acidez valorable a pH 8.1	IFU 3
Ácido Cítrico método enzimático	IFU 22
Ácido L-málico método enzimático	IFU 21
Ácido D-Isocítrico método enzimático	IFU 54
Cenizas	IFU 9
Sodio	IFU 33
Potasio	IFU 33
Magnesio	IFU 33
Calcio	IFU 33
Fósforo total	IFU 50
Nitratos	IFU 48
Sulfatos	IFU 36
Índice de formol	IFU 30
Glucosa método enzimático	IFU 55
Fructosa método enzimático	IFU 55
Sacarosa método enzimático	IFU 56
Sorbitol método enzimático	IFU 62



Tabla 2 (Continuación). Parámetro vs IFU para caracterización de zumo de granada

Parámetro	IFU
Aminoácidos	IFU 57
Extracto libre de azúcar	ELA(g/l) = sólidos solubles totales – azúcares (glucosa+fructosa+sacarosa)
Cobre	IFU 13 Recomendación nº 7
Zinc	IFU 16 Recomendación nº 7
Hierro	IFU 15 Recomendación nº 7
Estaño	IFU 39 Recomendación nº 7

2.13 Tratamiento estadístico de datos

Los análisis de las muestras fueron llevados a cabo por triplicado. Para la realización de los análisis estadísticos (Análisis de la Varianza (ANOVA) y mínima diferencia significativa (Fisher's test) se utilizó el programa Statgraphics® Plus para Windows 3.0 (Statistical Graphic Corp. and Graphic Software Systems Inc., Rockville, Maryland, USA). En el caso de los estudios de correlaciones, se utilizó también el test de Fisher y se utilizó el programa estadístico Origin8.

2.14 Clarificación convencional

La clarificación convencional del zumo de granada de la variedad Mollar se realizó mediante la utilización de dos clarificantes: Granubent Pore-Tec® (bentonita sódica granulada) y Albuvin (albúmina). La bentonita se rehidrató en diez veces su peso en agua durante 12 horas y se eliminó el exceso de agua transcurrido este tiempo. En el caso de la albúmina, ésta se mezcló con una parte de agua fría espolvoreando y se dejó reposar durante 30 minutos. La pasta obtenida se diluyó en una cantidad de agua igual a 10 veces el peso de la gelatina utilizada.

Para determinar la concentración de clarificante óptima para la clarificación del zumo sin perder sus características físico-químicas y organolépticas se realizaron pruebas con distintas concentraciones de estos clarificantes (0, 0.1, 0.25, 0.5 l y 2 g/L), teniendo en cuenta el peso del clarificante sin rehidratar.

El zumo de granada se dividió en conos de decantación de 5 L, el clarificante se añadió, se agitó y se mantuvo a 5 °C durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, los zumos se trasvasaron recogiendo la parte superior y se procedió al análisis de las muestras obtenidas.

2.15 Filtración tangencial

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando un equipo semiindustrial. La temperatura de alimentación del zumo se ajustó mediante la recirculación de agua en el tanque. Se utilizó una bomba rotacional para la introducción del zumo en la membrana de filtración tangencial. Un transmisor acoplado con un inversor fue utilizado para mantener y controlar la presión a los niveles deseados (**Figura 20**). El zumo permeado fue recogido en un tanque al igual que el retenido y se mantuvieron en recirculación.

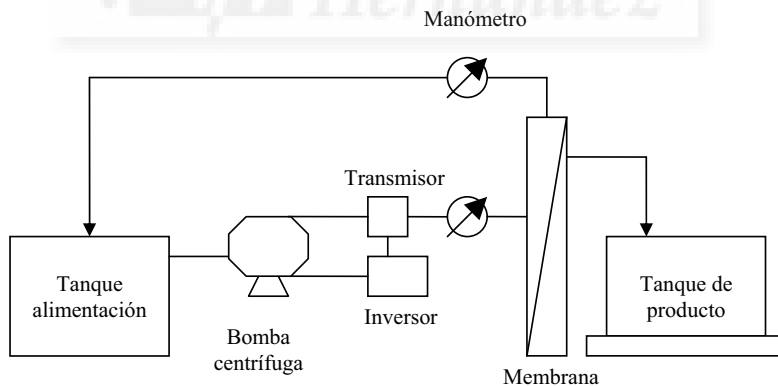


Figura 20. Representación esquemática del equipo de filtración

Las membranas utilizadas en los ensayos fueron membranas de dos materiales distintos, polisulfona (PS) y polietersulfona (PES) y con dos tamaños de poro también distintos, 0.2 μm y 0.1 μm respectivamente. La superficie de las membranas era el



mismo, 1.8 m². Con estos tamaños de poro se puede decir que se realizaron ensayos de microfiltración y ultrafiltración.

Las membranas se regeneraron con hidróxido de sodio 0.1 N y posterior lavado con agua y se sometieron a un tratamiento enzimático con enzima Viscozyme al 0.4 % durante 24 horas después de su utilización. Una vez pasado este tiempo, se lavaron con abundante agua para eliminar el contenido enzimático.

El pretratamiento enzimático de los zumos para posteriormente ser clarificados tangencialmente fue realizado con dos enzimas distintas, Viscozyme® L (Novozymes) con actividad celulasa y hemicelulasa y Fructozym® color (Erbslöh) con actividad pectinasa.

2.16 Pasteurización

2.16.1 En capilares de vidrio

Para la pasteurización del zumo de granada en capilares de vidrio, se tomó una muestra de zumo de granada y se llenaron capilares de vidrio con 100 µL de muestra. Una vez llenos, se sellaron por ambas aberturas y se pasteurizaron en un baño de aceite con un control de temperatura. Una vez pasteurizados, los capilares se enfriaron en agua con hielo y se recuperó la muestra de zumo mediante la ruptura del capilar en una cabina de flujo laminar.

2.16.2 En pasteurizador tubular

El ensayo de pasteurización se realizó en un pasteurizador semindustrial tubular de 25 L/h de capacidad (Prototipo Mipaser). Las temperaturas y tiempos de tratamiento aplicados se seleccionaron a partir de los resultados obtenidos en ensayos previos a pequeña escala (capilares de vidrio). Las combinaciones seleccionadas fueron de 65 °C durante 30 segundos y 90 °C durante 5 segundos. El zumo pasteurizado se recogió en recipientes estériles estancos y se mantuvieron así hasta su análisis.



2.17 Vida útil

Los zumos de granada turbio y clarificado pasteurizados a 65 °C 30 segundos y 90 °C 5 segundos en un pasteurizador semiindustrial se envasaron en envases de polipropileno de 20 mL con tapón de rosca y se almacenaron a dos temperaturas distintas, 25 °C y 5 °C. Durante esta etapa se realizaron determinaciones analíticas con el fin de determinar el período de vida útil óptimo, tomando muestras a los 0, 7, 14, 21, 28, 45, 60, 75, 90 y 120 días de almacenamiento.

Las muestras almacenadas a 25 °C sólo se mantuvieron en almacenamiento durante 45 días debido a que el color del zumo ya era totalmente pardo y se decidió retirarlo del estudio.



CAPÍTULO 3. Producción de zumo de granada





CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN DE ZUMO DE GRANADA

Las propiedades de los zumos y sus características están vinculadas a su proceso de obtención, elaboración y manipulación. Las tecnologías de producción de zumo de granada son objeto de estudio ya que, del proceso de obtención depende en gran parte la rentabilidad económica, así como parece ser un factor clave sobre la calidad final del producto.

La calidad del zumo de granada, su composición nutricional, seguridad microbiológica y aspectos sensoriales, depende de variables tales como el material vegetal, técnicas de procesado, envasado, pasteurización y almacenamiento. Dentro de cada uno de estos parámetros, las buenas prácticas y condiciones de manipulación del zumo pueden suponer un mantenimiento o mejora del mismo, obteniendo un zumo apetecible y seguro para el consumidor, así como un producto que presente una vida útil larga y que mantenga los compuestos bioactivos disponibles a lo largo del tiempo.

Por ello, el estudio de técnicas y las etapas de producción del zumo puede ser un paso importante ya que, de la optimización de cada una de ellas dependerá la composición final del mismo y la calidad organoléptica.

3.1 Influencia del procesado en el rendimiento de extracción de zumo de granada

En este apartado se evaluarán distintas metodologías de separación de corteza y arilos de la fruta, así como la influencia de distintas formas de prensado en el rendimiento de obtención de zumo y en la composición de compuestos bioactivos finales en los mismos.

3.1.1 Influencia del corte sobre el rendimiento de extracción de arilos

La separación de los arilos y la corteza de la granada es una tarea complicada pero muy importante sobre el rendimiento de obtención del zumo.



En esta experiencia se evaluó la influencia de realizar distintos cortes en granadas de la variedad Mollar de Elche antes de ser introducidas en un sistema de desgranado para separar los arilos de la corteza. Se utilizaron granadas enteras, granadas cortadas en dos mitades mediante un corte ecuatorial y granadas cortadas en cuatro trozos mediante un corte ecuatorial y otro transversal. Cada uno de estos lotes fueron introducidos en una despalilladora-estrujadora y se obtuvieron los rendimientos en arilo de cada uno. Los resultados se muestran en la **Figura 21**.

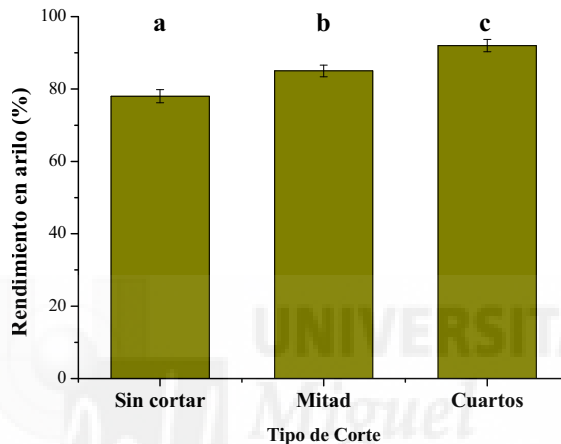


Figura 21. Influencia del tipo de corte en el rendimiento de extracción de arilos

Como se puede observar en la figura, el aumento en el número de cortes en la fruta parece aumentar el rendimiento en la separación del arilo y la corteza y como consiguiente, se podría incrementar el rendimiento de extracción de zumo. Si comparamos los resultados obtenidos de la extracción de zumo con granadas sin cortar, cortadas por la mitad y en cuartos, el incremento observado es de un 9,4 % en el caso de granadas cortadas por la mitad y de un 18,8 % en el caso de las granadas cortadas en cuartos. Además, el test de ANOVA evidencia que existen diferencias significativas ($P < 0.05$; Test Fisher) entre el tipo de corte y el rendimiento de extracción de los arilos.

3.1.2 Influencia del prensado

En este estudio se ensayó la variación en el rendimiento de extracción de zumo de granada de la variedad Mollar de Elche mediante distintos procedimientos. Para la obtención del zumo se utilizó una prensa neumática semi-industrial, una licuadora doméstica y una licuadora industrial. El material vegetal de partida fueron arilos desgranados a mano en el caso de la prensa neumática y la licuadora doméstica y además, se evaluó la influencia de la presencia de corteza en el rendimiento con prensa hidráulica. En el caso de la utilización de la licuadora industrial, los arilos fueron separados mediante un sistema de desgranado automático y se obtuvieron dos lotes de partida distintos: un lote con arilos limpios de corteza y un lote con un 50 % de corteza. Además también se estudió la influencia de la utilización de la fruta entera en la licuadora industrial. Los resultados se muestran en la **Figura 22**.

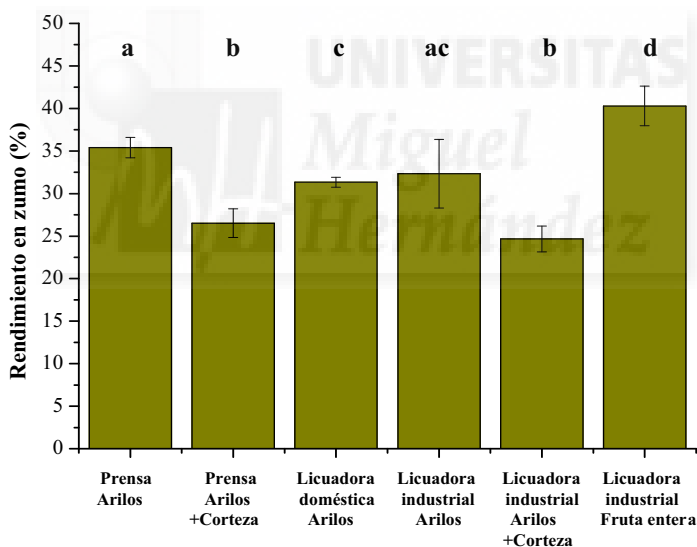


Figura 22. Influencia del prensado en el rendimiento de zumo

En cuanto al rendimiento de obtención de zumo dependiendo del tipo de metodología para su obtención, podemos decir que en el caso de la prensa neumática se obtiene un mayor rendimiento en zumo si se prensan sólo los arilos que si se prensa la fruta partida por la mitad con la corteza. Parte de los arilos quedan dentro de las membranas carpelares y se mantienen sin ser prensados.



Si comparamos los resultados de la prensa neumática con los resultados obtenidos para la licuadora industrial utilizando solamente arilos, no se observan diferencias significativas ($P < 0.05$; Test Fisher), de igual modo que si se utilizan los arilos junto con la corteza. Además, los resultados obtenidos para la licuadora industrial muestran que existen diferencias significativas en los resultados del procesado de sólo arilos, arilos y corteza y la fruta entera ($P < 0.05$; Test Fisher). Sin embargo, el zumo obtenido a partir de fruta entera y con parte de corteza presenta una alta astringencia y un rojo menos intenso (aparece una coloración marrón) que si sólo se utilizan arilos para la producción del zumo, debido posiblemente al arrastre de compuestos procedentes de la corteza.

3.1.3 Influencia del prensado en los compuestos bioactivos del zumo de granada

Granadas de la variedad Mollar de Elche se sometieron al prensado en una prensa neumática con el objetivo de estudiar la influencia de la presencia o no de corteza en el momento del prensado sobre la concentración de compuestos bioactivos finales en el zumo de granada. Para ello, un lote de granadas (3 kg) se sometieron a una separación manual de la corteza y los arilos y posteriormente éstos últimos se prensaron. El segundo lote de granadas (3 kg), se partieron por el eje ecuatorial y se prensaron sin separar los arilos de la corteza. El zumo resultante de ambos lotes se analizó para determinar las concentraciones de ácido elágico, punicalaginas y antocianos totales por HPLC. Los resultados obtenidos expresados en mg/L se muestran en la **Figura 23**.

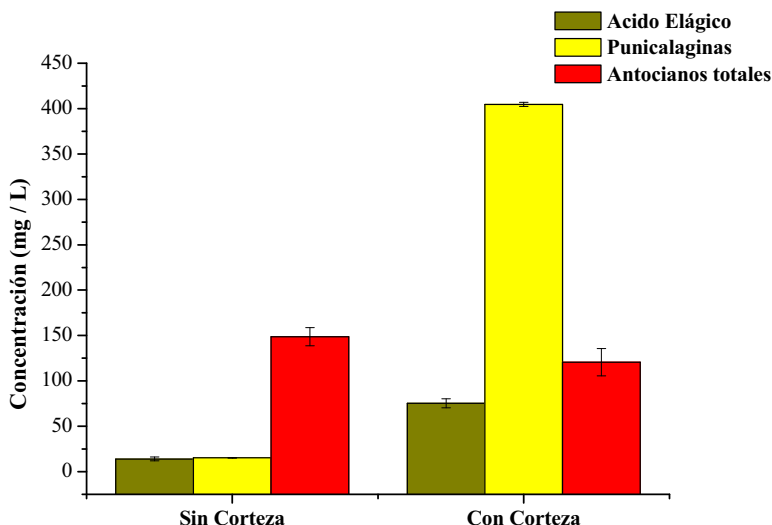


Figura 23. Influencia del prensado en la composición de compuestos bioactivos en zumo de granada

Los resultados obtenidos de este ensayo indican que el zumo obtenido a partir de únicamente arilos ($P < 0.02$; Test Fisher) presenta mayor contenido en antocianos totales (148.8 ± 10 vs 120.7 ± 15). Además, se observó una gran influencia en cuanto a la presencia de la corteza en el momento del prensado ya que tanto el contenido en ácido elágico como la concentración de punicalagina aumentan ($P < 0.01$ en ambos casos; Test Fisher).

3.1.4 Conclusiones

- El aumento en el número de cortes en la fruta produce un incremento en el rendimiento de desgranado.
- La presencia de corteza influye de forma negativa en el rendimiento de obtención del zumo.
- Los zumos obtenidos partiendo de granadas con corteza presentan mayor contenido en compuestos bioactivos que los obtenidos de arilos únicamente.



3.2 Producción de zumo de granada

Una vez se han obtenido las condiciones de procesado óptimas de la fruta para la extracción del zumo de granada con rendimiento elevado, se estableció un protocolo de actuación para la producción del zumo, con el objetivo de mantener su color rojo, evitar pérdidas de los compuestos bioactivos interesantes en el zumo y además que permanezca estable a lo largo del periodo de almacenamiento.

En la siguiente figura (**Figura 24**), se representa el diagrama de procesado de la fruta desde el inicio hasta su transformación en zumo, así como los subproductos que se obtienen. Inicialmente, la granada se somete a un proceso de lavado y calibrado. Las frutas seleccionadas pasan a un sistema de corte y descascarado cuyo objetivo es la separación de la corteza y los arilos sin que se produzca la extracción de zumo y molienda de la corteza. La corteza se utilizará para la obtención de extractos vegetales de alto valor biológico y los arilos pasarán a un sistema de prensado para la extracción del zumo. El zumo que se obtiene es un zumo turbio que contiene un bajo contenido en pulpa (2 %). A su vez, este zumo puede someterse a un proceso de clarificación estática en frío en tanques refrigerados, posterior centrifugación y tratamiento con clarificantes o filtración tangencial para la obtención de zumo clarificado. Una vez eliminadas las partículas en suspensión, el zumo se somete a un tratamiento térmico para la inactivación de enzimas y la reducción de población microbiana.

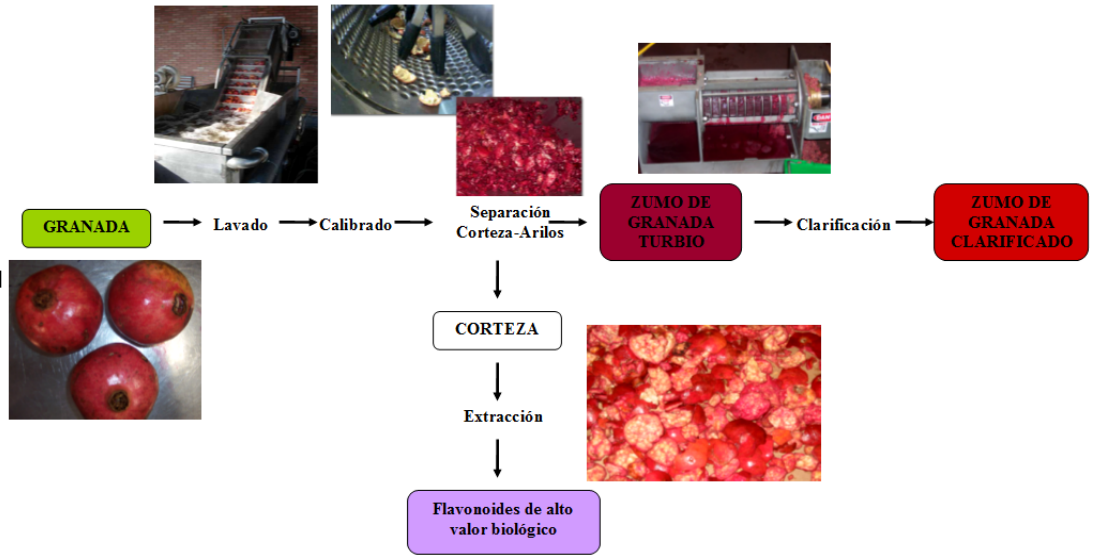
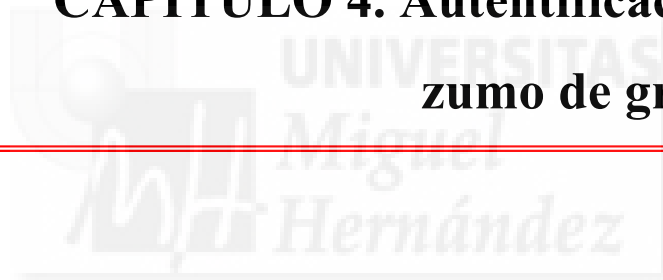


Figura 24. Diagrama de producción de zumo de granada

Con esta línea de actuación, se planificaron ensayos de clarificación, pasteurización y almacenamiento del zumo de granada para mantener sus cualidades durante el mayor tiempo.

CAPÍTULO 4. Autenticación de zumo de granada





CAPÍTULO 4. AUTENTIFICACIÓN DE ZUMO DE GRANADA

Existen muchas investigaciones realizadas sobre la composición química de la fruta de la granada y su zumo relacionando algunos parámetros importantes como el color y la composición química con la variedad, la zona de cultivo, el clima, el grado de maduración, técnicas de cultivo y condiciones de poscosecha (Akbarpour et al., 2009; Al-Maiman y Ahmad, 2002; Fischer-Zorn y Ara, 2007; Riyahi et al., 2011; Zhang et al., 2009). Además, las condiciones de procesado y almacenamiento influyen sobre los cambios que se producen en el zumo a lo largo de su vida útil (Alper et al., 2005; Maskan, 2006). Por tanto, la composición del zumo de granada dependerá de estos factores y además, de las técnicas de extracción y procesado del zumo a lo largo de su producción.

En general las investigaciones médicas y nutricionales han catapultado al zumo de granada a una posición importante en el mercado aumentando su valor en comparación con otros zumos. Sin embargo, esto constituye una necesidad de desarrollo y producción de mejores productos a un menor coste para poder competir entre los productores de zumo de granada, convirtiéndose la adulteración del mismo en un posible problema. Por esta razón, es necesario establecer los criterios de autenticidad y el control de identidad del zumo de granada (Eksi y Özhamamci, 2009).

La Asociación de la Industria europea de Zumos y Néctares (AIJN, 2008) estableció mediante la publicación de las Guías del Código de Prácticas, las directrices para la autenticación y la evaluación de la calidad de los zumos y néctares (cumpliendo la legislación de la Unión Europea), constituyendo en la actualidad el documento básico de referencia internacional para los controles oficiales y de las empresas dedicadas a la fabricación y comercialización de estos productos. En el caso del zumo de granada, en 2008 se publicó la guía con valores basados en zumos puros y auténticos de granadas, obtenidos a partir de frutos maduros y sanos de distintas variedades y de procedencias geográficas distintas extraídos mediante procedimientos mecánicos.

El objetivo de este capítulo fue contribuir al conocimiento de las características químicas de zumos de granada comerciales obtenidos de frutos enteros de granadas de



la variedad española “Mollar”. De acuerdo con los métodos IFU (Federación Internacional de Productores de Zumos de Frutas, París, Francia), se emplearon diferentes técnicas de análisis para estudiar los perfiles químicos completos que incluyen antocianos, azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y minerales, así como la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en muestras de zumos recogidos en fábricas y comprados en supermercados locales.

4.1 Caracterización de zumo de granada y comparación con parámetros de AIJN

Para la caracterización del zumo de granada se analizaron nueve muestras de zumos obtenidos de distintas fábricas de producción del mismo en el año 2012. Además, se analizaron otras nueve muestras de zumos de granadas compradas en supermercados locales. Todos los análisis de las muestras se realizaron por triplicado.

Una parte de los análisis de las muestras fueron llevados a cabo en un laboratorio certificado externo y otra parte fueron llevados a cabo en los laboratorios del grupo de investigación. A continuación se mostrarán los resultados obtenidos de la cuantificación de la concentración de azúcares, ácidos, metales, minerales, nitratos y sulfatos, compuestos bioactivos y aminoácidos, así como valores de capacidad antioxidante obtenida mediante distintos métodos, comparando estos valores con los rangos propuestos por AIJN en 2008 para el zumo de granada.

Los resultados se han dividido en dos secciones para mostrarlos de igual formato que el establecido por la guía de AIJN. En la *sección A* se mostrarán los resultados de los parámetros que caracterizan los requerimientos de calidad y en la *sección B* los resultados de los criterios más relevantes evaluados para la autenticación y caracterización de los zumos de granada.

**4.1.1 Sección A. Requerimientos de calidad en zumo de granada**

Los resultados relacionados con la composición, higiene y los requerimientos industriales de los zumos de Granada de la variedad “Mollar” se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Requerimientos de calidad en zumos de granada

1. Requerimientos industriales					
	Unidades	L.C	Media \pm SD	Rango de variación	Propuesta AIJN
Densidad relativa 20/20 del zumo	-		1.063 \pm 0.0009	1.061 - 1.064	1.0568
Sólidos solubles	°Brix	0.1	15.47 \pm 0.23	15.15 - 15.71	Min. 14
2. Requerimientos higiénicos					
Acidez volátil como ácido acético	g/L	0.01	0.358 \pm 0.09	0.2 - 0.4	Max. 0.4
Etanol	g/L	0.02	0.05 \pm 0,01	0.02 - 0.1	Max. 3.0
Ácido D/L Láctico	g/L	0.02	0.11 \pm 0.02	0.1 - 0.14	Max. 0.5
Patulina	μ g/L	5	5.00 \pm 0.01	< 5	*na
3. Requerimientos ambientales					
<i>Arsénico y metales pesados</i>					
Arsénico (As)	mg/L	0.01	< 0.005		Max. 0.1
Plomo (Pb)	mg/L	0.01	< 0.01		Max. 0.05
Mercurio (Hg)	mg/L	0.01	< 0.01		Max. 0.01
Cadmio (Cd)	mg/L	0.01	< 0.01		Max. 0.05
4. Requerimientos de composición					
5-Hidroxiacetilfurfural (5-HMF)	mg/L	1	1.00 \pm 0.01	< 1	Max. 20

*na: no analizado

De acuerdo con los resultados mostrados, la **densidad relativa** de los zumos de granada varía entre 1.061 y 1.064, que corresponde con 15.15 y 15.71 °Brix. Según la



guía de AIJN 2008 para el zumo de granada, los valores mínimos aceptables son 1.057 (14 °Brix).

El **ácido acético**, **etanol** y **ácido láctico** no están presentes en las frutas sanas; son indicadores de contaminación por microorganismos como levaduras, bacterias acéticas y bacterias lácticas. La detección de estos compuestos a bajas concentraciones puede ser indicativo de una buena calidad de las granadas de partida así como de buenas prácticas de procesado.

Del mismo modo, la presencia de **patulina**, compuesto generado por hongos es 10 veces menor al máximo aceptable por la legislación (50 µg/L) (Reglamento Comunitario 1425/2003 y Real Decreto 481/2004). La patulina es una toxina producida por hongos de distintas especies de *Penicillium* como *P. expansum*, *P. sclerotiorum* y *P. glabrum* produciendo una podredumbre azulada durante el almacenamiento de las granadas (Palou et al., 2010) y que también puede encontrarse en verduras, frutas y cereales. Debido a su carácter mutagénico y teratogénico y los posibles riesgos para la salud de los consumidores, muchos países tienen regulaciones para reducir el nivel de patulina. El grado de contaminación del alimento está relacionado con el grado de podredumbre, por lo tanto, cuanto mayor tiempo ha estado la granada en las cámaras de almacenamiento más probabilidad hay de que esté presente esta toxina en el zumo procesado.

Los **metales pesados** presentes en los fertilizantes y los suelos contaminados pueden transmitirse a las frutas y en consecuencia, pasar a los subproductos de las mismas durante el procesado. Ejemplos de metales pesados perjudiciales que causan graves efectos en la salud de los seres humanos son el arsénico, plomo, mercurio, cadmio y cromo. Los análisis de metales pesados realizados por espectrometría de absorción atómica llevados a cabo en los zumos de granada de este trabajo indicaron que se encontraban por debajo del límite de detección y por tanto, los valores son aceptables.

Un atractivo color rojo es una de las principales características de los zumos de frutos rojos y por lo tanto, el pardeamiento producido durante el procesado es una desventaja en la calidad de los zumos. Cuando la reacción de Maillard tiene lugar entre



compuestos amino y carbonilo se produce la subsiguiente formación de **5-hidroxiacetilfurfural** (HMF) y otros productos que causan el desarrollo indeseable de color marrón (Bozkurt et al., 1999). HMF está prácticamente ausente en zumos frescos y sin tratar, pero su concentración tiende a aumentar como resultado de los procesos de calentamiento o almacenamiento a largo plazo. Por lo tanto, el HMF se puede utilizar como un índice de la frescura y la calidad de los zumos (Min et al., 2007). En el caso del zumo de granada, los niveles de este parámetro están por debajo del límite de cuantificación, por lo que podemos decir que el tratamiento de pasteurización realizado en la industria no supone una degradación considerable de la calidad del zumo.

4.1.2 Sección B. Criterios para la autenticación y caracterización de los zumos de granada

Los resultados de los análisis químicos de los zumos de granada se muestran en la **Tabla 4**.

El perfil de **ácidos orgánicos** de un zumo es una importante fuente de información sobre las características sensoriales de los mismos, puesto que cada ácido otorga unas propiedades organolépticas distintas al producto.

Como se indica en la tabla anterior, el pH del zumo de granada se sitúa alrededor de 3.5. Además, la acidez valorable calculada como ácido cítrico anhídrido a pH 8.1 en los zumos de granada típicos varían entre 2.6 and 2.8 g/L, situándose dentro del rango establecido por AIJN, a pesar de que este rango es bastante amplio.



Tabla 4. Parámetros de calidad para la evaluación de la autenticación y caracterización de zumos de granada

	Unidades	L.C	Media \pm SD	Rango de variación	Propuesta AIJN
Acidez valorable a pH 8.1	g/L	0.2	2.72 \pm 0.08	2.6 - 2.8	2.0 - 45.0
Ácido Cítrico	g/L	0.2	2.52 \pm 0.22	2.3 - 2.8	1.0 - 48.0
Ácido D-Isocítrico	mg/L	20	20 \pm 0.40	< 20	10 - 140
Ratio ácido Cítrico/Isocítrico	-			111-145	*nr
Ácido L-málico	g/L	0.2	1.32 \pm 0.05	1.3 - 1.4	Max. 1.5
Ácido D-málico	mg/L	10	10 \pm 0.10	< 10	Np
Cenizas	g/L	0.2	3.18 \pm 0.43	2.84 - 3.85	2.5 - 6.0
Sodio (Na)	mg/L	1	4.88 \pm 0.38	4.3 - 5.3	Max. 30
Potasio (K)	mg/L	1	2597.5 \pm 216.08	2400 - 2900	1300 - 3000
Magnesio (Mg)	mg/L	1	22.56 \pm 4.00	17.6 - 28.5	20 - 110
Calcio (Ca)	mg/L	1	6.70 \pm 0.71	5.8 - 7.5	5 - 120
Fósforo (P)	mg/L	10	84.00 \pm 4.36	81 - 89	50 - 170
Cobre (Cu)	mg/L	0.05	0.23 \pm 0.02	0.21 - 0.27	Max. 5.0
Zinc (Zn)	mg/L	0.01	0.52 \pm 0.07	0.44 - 0.58	Max. 5.0
Hierro (Fe)	mg/L	0.01	0.20 \pm 0.17	0.09 - 0.5	Max. 5.0
Estaño (Sn)	mg/L	0.05	<0.05		Max. 100
Nitrato (NO₃)	mg/L	1	3.00 \pm 1.63	1.4 - 4.6	Max. 15
Sulfato (SO₄)	mg/L	10	92.37 \pm 15.27	76.3 - 106.7	Max. 200
Glucosa	g/L	2	63.20 \pm 1.48	61.4 - 65	40 - 80
Fructosa	g/L	2	66.65 \pm 1.11	65.3 - 68	45 - 100
Glucosa/Fructosa	-		0.95 \pm 0.02	0.8 - 0.95	0.8 - 1
Sacarosa	g/L	2	2.0 \pm 0.10	< 2	Nd
Extracto libre de azúcar	g/L	1	35.52 \pm 1.06	34.2 - 36.6	20 - 60
Manitol	g/L		na		2 - 7
Sorbitol	mg/L	20	46.16 \pm 1.27	44.7 - 46.9	Max. 250

*nr, análisis no realizado; np, no presente; nd, no detectable.



El ácido predominante en el zumo de granada de la variedad “Mollar” de Elche es el cítrico, encontrándose en un rango de 2.3-2.8 g/L y el segundo ácido más importante es el L-málico (1.3-1.4 g/L). El nivel de ácido D-isocítrico en los zumos de granada depende en gran medida de la variedad utilizada ya que, las variedades dulces como es el caso de la “Mollar” de Elche presentarán niveles bajos (10-70 mg/L) de éste ácido, mientras que las ácidas presentarán niveles mayores (60-140 mg/L) (AIJN). Además, el ratio cítrico/isocítrico se sitúa en valores bajos en el caso del zumo de granada (Zhang et al., 2009).

El contenido en ácido D-málico no es detectado en el análisis y el L-málico se sitúa casi en el límite máximo de lo recomendado por AIJN. Parece ser que las variedades dulces presentan mayor contenido en L-málico que las demás.

En cuanto al contenido en **azúcares**, la fructosa y glucosa son los azúcares mayoritarios en el zumo de granada.

En los resultados presentados en la tabla puede observarse como el contenido de glucosa (61.4-65.0 g/L) y fructosa (65.3-68.0 g/L) en los zumos de Granada son prácticamente iguales. En todos los zumos analizados el contenido en fructosa fue mayor que el de glucosa, pero sin embargo el ratio glucosa/fructosa se mantuvo en un rango de 0.8 a 0.95. Este resultado se incluye dentro del ratio glucosa/fructosa de 0.8-1.0 establecido por la Asociación de Industrias de Zumo y Néctares de la Unión Europea AIJN (2008).

La sacarosa se encontró en concentraciones pequeñas, pudiéndose considerar este parámetro un signo de calidad en zumos frescos de granada (Melgarejo et al., 2000; Mena et al., 2011). También cabe destacar que el valor obtenido para el extracto libre de azúcar es indicativo de que la variedad de granada utilizada para la realización es dulce ya que, cuanto más dulce sea la variedad mayor será este valor (AIJN, 2008).

Hay que destacar la presencia de **sorbitol** en el zumo de granada, un azúcar presente de modo natural en algunas frutas, y que según la guía de AIJN la presencia en determinados zumos puede indicar adulteraciones. Sin embargo, podemos observar



cómo en el caso del zumo de granada presenta mayores cantidades que las propuestas en la guía de [AIJN, 2008](#).

Además del contenido en ácidos y azúcares, en la **tabla 4**, se presentan los resultados obtenidos en cuanto a **minerales** presentes en el zumo de granada. Las cenizas representan el contenido total de minerales que presenta el zumo de granada, situándose este valor entre 2.84 and 3.85 g/L.

En los resultados obtenidos del análisis del contenido en minerales determinados individualmente observamos las siguientes concentraciones ordenadas de mayor a menor: potasio (2400-2900 mg/L) > fósforo (81-89 mg/L) > magnesio (17.6-28.5 mg/L) > calcio (5.8-7.5 mg/L) > sodio (4.3-5.3 mg/L). También parece ser que el zumo de granada es rico en fósforo, magnesio y calcio y en menor proporción zinc, cobre y hierro.

Observando estos resultados podemos afirmar que el potasio es el mineral principal en el zumo de granada y hasta incluso se conocen valores superiores a 2400 mg/L. También destacar que presenta una concentración de sodio baja, por lo que le confiere buenas aptitudes frente al sector de población hipertenso. Los componentes minerales de los zumos de granada analizados se ajustan a los valores propuestos por [AIJN, \(2008\)](#).

El avance permanente de la producción de zumos de granada y la necesidad de aumentar y optimizar la producción, ha conducido a incorporar variedades genéticas y manejos de los suelos inadecuados, además de incrementar el uso de fertilizantes. Esto ha producido la variación en las cantidades de nitrógeno en las frutas y por ello es importante el estudio del contenido en **nitratos y sulfatos** en las mismas. El contenido en nitrato en el zumo de granada de la variedad “Mollar” de Elche es bajo pero sin embargo, el contenido de sulfatos es mayor.

Además de los compuestos anteriormente citados, los **aminoácidos**, presentes en alimentos y bebidas, también son importantes para la nutrición humana y afectan a la calidad de los alimentos incluyendo sabor, aroma, y color ([Kirimura et al., 1969](#)). Los resultados obtenidos de su cuantificación se muestran a continuación (**Tabla 5**):



Tabla 5. Contenido en aminoácidos en zumo de granada

Parámetro	Unidades	L.C	Media ± SD	Rango de variaciones	Propuesta AIJN
Índice de formol	mL NaOH 0.1 N/100 mL	0.1	8.85 ± 0.81	8.1 – 8.7	5 – 20
Ácido Aspártico	mg/L	5	119.00 ± 13.11	106 - 136	53 - 240
Serina	mg/L	5	123.25 ± 11.18	108 - 133	63 - 158
Ácido Glutámico	mg/L	5	137.80 ± 4.87	133 - 145	76 - 147
Glicina	mg/L	2	14.00 ± 1.22	12 - 15	3.5 – 14
Histidina	mg/L	2	6.80 ± 1.30	5 – 8	6 – 30
Asparragina	mg/L	5	17.00 ± 1.00	16 - 18	16 – 92
Glutamina	mg/L	5	158.75 ± 15.22	136 - 168	160 - 760
Arginina	mg/L	5	69.50 ± 6.61	62 - 78	< 15 - 120
Treonina	mg/L	5	13.00 ± 1.00	12 - 14	10 – 33
Alanina	mg/L	5	35.20 ± 2.28	33 - 38	32 - 116
Prolina	mg/L	5	22.00 ± 1.41	20 - 23	< 10 - 23
Cisterna	mg/L	5	<5 ± 0.01	< 5	n.i
Tirosina	mg/L	5	16.25 ± 0.96	15 - 17	3 – 18
Valina	mg/L	5	40.33 ± 5.03	35 - 45	15 – 45
Metionina	mg/L	5	20.00 ± 2.16	17 - 22	6 – 30
Lisina	mg/L	5	7.20 ± 0.45	7 – 8	7 – 66
Isoleucina	mg/L	5	<5 ± 0.01	< 5	1 – 4
Leucina	mg/L	5	5.33 ± 0.58	< 5 - 6	2 – 8
Fenilalanina	mg/L	5	5.00 ± 0.01	< 5	Trazas

* n.i = no identificado

El número de formol refleja la cantidad de aminoácidos libres en el zumo de granada, obteniéndose unos resultados que varían entre 8.1 y 8.7 ml de NaOH 0.1N/100 mL. Generalmente, los niveles de los aminoácidos libres en zumos de granada son bajos pero varían ampliamente (AIJN, 2008). El contenido en asparragina fue bajo, mientras que se encontró una concentración relativamente alta de glutamina. Los aminoácidos que se encontraron en mayor cantidad fueron la glutamina, ácido glutámico, serina y ácido aspártico, los encontrados en menor concentración fueron arginina, valina y alanina y cisteína, iso-leucina y fenilalanina se encontraron en niveles mínimos.



4.1.3 Perfil de antocianos

El perfil de antocianinos es un parámetro crítico para la caracterización de los zumos de granada. El típico perfil de antocianinos de zumos de diferentes variedades de granada y la procedencia geográfica se caracteriza por delfinidina (Dp), cianidina (Cy) y pelargonidina (Pg) 3-glucósidos (3G) y 3,5 diglucósidos (3,2DG) (Gil et al., 1995).

En la **tabla 6** se muestran los resultados obtenidos de cada uno de los antocianos así como los antocianos totales en los zumos de granada de la variedad “Mollar” de Elche.

Estos seis antocianos son los responsables del color rojo-púrpura de zumo de granada. Las concentraciones de antocianos en los zumos frescos de granadas de la variedad “Mollar” son, en orden decreciente, Cy3G ($60,43 \pm 23,64$ mg/L), seguido por Cy3,5DG ($39,13 \pm 16,08$ mg/L), DP3,5DG ($26,65 \pm 20,72$ mg/L), Dp3G ($21,59 \pm 13,72$ mg/L), Pg3G ($9,06 \pm 6,20$ mg/L), y PG3,5DG ($2,19 \pm 1,33$ mg/L).

El procesado y el almacenamiento presentaron una gran influencia en la degradación de las antocianos individuales, como se indica por los cambios en su contenido (**Tabla 6**).



Tabla 6. Cambios en el contenido en antocianos individuales en zumo fresco y comercializado de granada variedad “Mollar”

	Unidades	L.C	Media ± SD	Rango de variación
Delfinidina 3,5-diglucósido				
Zumo fresco	mg/L	3	26.65 ± 20.72	12.22 – 71.00
Procesado y almacenado	mg/L	3	17.87 ± 6.74	13.98 - 33.00
Cianidina 3,5-diglucósido				
Zumo fresco	mg/L	3	39.13 ± 16.08	15.98 - 67.00
Procesado y almacenado	mg/L	3	19.30 ± 3.47	15.54 - 25.00
Pelargonidina 3,5-diglucósido				
Zumo fresco	mg/L	3	2.19 ± 1.33	1.00 - 5.00
Procesado y almacenado	mg/L	3	1.62 ± 0.58	1.00 - 2.39
Delfinidina 3-glucósido				
Zumo fresco	mg/L	3	21.59 ± 13.72	8.55 - 46.00
Procesado y almacenado	mg/L	3	5.25 ± 2.19	2.89 - 9.00
Cianidina 3-glucósido				
Zumo fresco	mg/L	3	60.43 ± 23.64	21.69 - 81.00
Procesado y almacenado	mg/L	3	12.91 ± 6.32	5.00 - 21.00
Pelargonidina 3-glucósido				
Zumo fresco	mg/L	3	9.06 ± 6.20	2.00 - 20.00
Procesado y almacenado	mg/L	3	1.55 ± 0.80	0.79 - 2.91
Antocianos totales				
Zumo fresco	mg/L	3	159.05 ± 71.07	62.43 - 276.00
Procesado y almacenado	mg/L	3	58.50 ± 17.13	41.33 - 90.00

En las muestras de zumos comerciales la Cy3,5DG (19,30 ± 3,47 mg/L) fue la más abundante, seguido de Dp3,5DG (17,87 ± 6,74 mg/L) y Cy3G (12,91 ± 6,32 mg/L).



En general, los antocianos diglucosilados parecen tener más estabilidad que los monoglucosilados como concluyeron [Alighourchi y Barzegar, 2009](#) en su estudio realizado en zumo de granada sobre la degradación de los antocianos individuales.

4.1.4 Elagitaninos en zumos de granada

Entre los elagitaninos, la punicalagina es el más característico y se encuentra casi exclusivamente en los zumos de granada ([Zhang et al., 2009](#)). En el capítulo 3 de esta tesis se muestran las diferencias que existen entre el procesado de los arilos únicamente y la presencia de corteza de granada en el momento de la obtención del zumo. Según otros autores, la mayor fuente de punicalagina se encuentra en la corteza de la granada ([Talcott y Krenek, 2012](#)), por lo que su presencia en el zumo no es suficiente para establecer la autenticidad del zumo de granada, ya que puede ser añadida mediante extractos de corteza al zumo.

En la **tabla 7**, se muestran los resultados de la concentración de punicalaginas, punicalinas y ácido elágico en las muestras de zumo de granada.

Tabla 7. Contenido en punicalaginas, punicalinas y ácido elágico en zumos de granada variedad “Mollar”

	Unidades	L.C	Media ± SD	Rango de variación
Punicalagina α	mg/L	10	292.13 ± 56.81	230.90 - 359.40
Punicalagina β	mg/L	10	265.20 ± 73.29	190.40 - 413.45
Punicalaginas totales	mg/L	10	623.71 ± 185.93	503.70 - 762.85
Punicalina α	mg/L	10	153.07 ± 23.86	125.85 - 211.60
Punicalina β	mg/L	10	143.91 ± 29.21	98.90 - 187.34
Punicalinas totales	mg/L	10	296.98 ± 42.86	239.90 - 364.50
Ácido Elágico	mg/L	5	322.26 ± 61.65	268.67 - 389.64

Dado que todos los zumos de granada comercializados poseían una moderada a alta concentración de elagitaninos, los cambios producidos durante el procesado y el almacenamiento fueron mínimos.



La concentración de punicalaginas en el zumo de granada osciló entre 503,70 y 762,85 mg/L, siendo el anómero α encontrado en mayor cantidad que el anómero β , de igual modo que los resultados obtenidos por otros autores (Gil et al., 2000). El contenido en punicalinas es inferior que el de punicalaginas (239,9-364,5 mg/L) y el de ácido elágico fue de entre 268,67 y 389,64 mg/L.

4.1.5 Capacidad antioxidante y polifenoles totales en zumos de granada

Los efectos beneficiosos para la salud del consumo de zumo de granada se relacionan con sus altos niveles de polifenoles antioxidantes (Seeram et al., 2008). La alta actividad antioxidante encontrado en los zumos comerciales elaborados a partir de frutas enteras se atribuye principalmente a los taninos hidrolizables procedentes de la corteza en la que predominan las punicalaginas (Gil et al., 2000; Tzulker et al., 2007).

El contenido en polifenoles totales y la capacidad antioxidante en los zumos de granada “Mollar” se presentan en la **Tabla 8**.

Las muestras de zumo mostraron una cantidad alta de polifenoles totales determinadas por el método Folin-Ciocalteu de entre 1136 hasta 3581 mg/L.

En cuanto a la capacidad antioxidante, los zumos de granada comerciales poseen una alta capacidad antioxidante (18-20 ABTS), tres veces superior que el vino y el té verde (6-8 ABTS) (Gil et al., 2000), hecho que coloca a la granada como el principal alimento en base a sus propiedades antioxidantes in vitro. Sin embargo, como se observará a continuación, el método de medida utilizado de esta capacidad antioxidante y el efecto in vivo del mismo están bajo revisión.

Existen numerosos estudios in vitro para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos. Sin embargo, no existe ningún método estandarizado oficial y por ello, es recomendable evaluar la capacidad antioxidante de los productos mediante distintos métodos de medida. Los antioxidantes pueden actuar mediante varias rutas para secuestrar los radicales, descomponiendo los peróxidos y quelando los iones metálicos.



Por ello, la capacidad antioxidante debe ser evaluada por diferentes métodos con mecanismos químicos diferentes (Kulkarni et al., 2004). Dependiendo de la reacción química utilizada, los métodos de medida de la capacidad antioxidante pueden ser agrupados en dos clases: métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno y métodos basados en la transferencia de hidrógeno.

Ambos métodos pueden ocurrir en paralelo, y el mecanismo dominante dependerá de la estructura del compuesto antioxidante y sus propiedades, su solubilidad y coeficiente de partición y el medio donde se encuentre (Prior et al., 2005). Los resultados diferentes obtenidos en los diferentes métodos pueden suponer un dilema. Sin embargo, es conocido que los mecanismos de los compuestos antioxidantes en matrices biológicas son más complejos y dependen de más factores, por lo que los valores obtenidos son orientativos para comparar in vitro unos con otros.

En este caso, se determinó la capacidad antioxidante de los zumos de granada mediante tres métodos basados en dos mecanismos: el método ABTS y FRAP de transferencia de electrones y el ORAC de transferencia de hidrógeno.

En la **tabla 8** se muestran los resultados de cada método, utilizando como compuesto de referencia Trolox y en el caso del método FRAP también FeSO_4 .

Tabla 8. Contenido en polifenoles totales y capacidad antioxidante de zumos de granada “Mollar”

	Unidades	L.C	Media \pm SD	Rango de variación
Polifenoles totals	mg/L	20	2402.16 \pm 695.06	1136.20 - 3581.10
ABTS	mmol Trolox/L	0.1	23.78 \pm 4.88	17.60 - 30.50
FRAP	mmol Fe^{2+} /L	0.1	43.96 \pm 9.25	32.10 - 56.70
	mmol Trolox/L	0.1	13.04 \pm 2.03	10.40 - 15.80
ORAC	mmol Trolox/L	0.1	10.11 \pm 0.96	8.84 - 11.81

Los resultados muestran grandes diferencias dependiendo del método utilizado y del compuesto de referencia. En el estudio realizado por Mena et al., 2011 donde realizó



la medida de la capacidad antioxidante por el método ABTS y FRAP de distintas accesiones de granadas variedad Mollar, obtuvo resultados similares a los obtenidos en esta caracterización para el método FRAP (10.30 – 13.70 mmoles ET/L). Sin embargo, en el caso del método ABTS, los valores obtenidos fueron superiores a los de [Mena et al., 2011](#) (13.05 – 14.70 mmoles ET/L), [González-Molina et al., 2009](#) (15 mmoles ET/L) y [Pérez-Vicente et al., 2004](#) (17 mmoles ET/L).

La utilización de distintos métodos de determinación de la capacidad antioxidante puede ser una buena forma de cribado y comparación entre distintos alimentos o compuestos. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) seleccionó como método analítico estándar de capacidad antioxidante el método ORAC y proporcionó durante años una base de datos de valores de este parámetro en distintos alimentos. Sin embargo, en el año 2010 estas bases de datos fueron retiradas puesto que se consideró que el análisis de la capacidad antioxidante puede ser una información útil para la comparación pero no era correcto su utilización como soporte para declaraciones de propiedades saludables. El aviso enviado por la USDA consistió de los siguientes puntos:

Hay evidencias de que los valores que indican la capacidad antioxidante no tienen relevancia a los efectos de los compuestos bioactivos específicos, incluidos los polifenoles, en la salud humana.

No hay evidencia de que los efectos beneficiosos de los alimentos ricos en polifenoles se puedan atribuir a las propiedades antioxidantes de estos alimentos.

Los datos de la capacidad antioxidante de los alimentos obtenidos in vitro (tubo de ensayo) no pueden extrapolarse a los efectos in vivo (humanos) y los ensayos clínicos para probar los beneficios de los antioxidantes han producido resultados variados.

Actualmente se conoce que las moléculas antioxidantes presentes en los alimentos tienen una amplia gama de funciones, muchas de las cuales no están relacionadas con la capacidad de absorber radicales libres.



Mediante todos estos puntos se reconoce que la evidencia de los estudios epidemiológicos que el consumo de ciertos alimentos se asocia con un menor riesgo de ciertas enfermedades puede no tener nada que ver con la hipótesis antioxidante de la capacidad antioxidante de las sustancias químicas presentes en estos alimentos.

Por todo ello, para poder establecer el método de determinación de la capacidad antioxidante estándar para el zumo de granada nuestra propuesta sería la realización de estudios celulares para comprobar realmente la capacidad antioxidante del zumo de granada en una matriz compleja y correlacionarla con el método que más se ajuste a ello.

4.2 Adulteración y malas prácticas en el procesado

Además del incremento del interés y la demanda del zumo de granada, también es patente la adulteración del zumo realizada por dos razones: la alta demanda y escasez del mismo y la necesidad de obtener un zumo con unas buenas características organolépticas.

Dentro de las adulteraciones a las que puede ser sometido el zumo de granada podemos encontrar: (i) la adición de agua, (ii) la adición de azúcares para enmascarar la astringencia de los taninos (en el caso de que el procesado haya sido con la fruta completa), (iii) la adición de pequeñas cantidades de zumos de frutas coloreadas tales como grosella, cereza, aronia, uva, fresa y manzana (Eksi y Özhamamci, 2009; Zhang et al., 2009), (iv) la adición de colorantes, (v) el uso de aminoácidos como glicina o ácido glutámico o hidrolizados de proteínas con el objetivo de incrementar el contenido de aminoácidos una vez diluido el zumo, y (vi) la adición de extracto procedente de la corteza de la granada con el fin de aumentar su concentración de compuestos fenólicos con alta capacidad antioxidante, aunque esto se consideraría más una estrategia comercial para mejora del producto que un fraude.

Con el objetivo de demostrar las adulteraciones y manipulaciones en el zumo de granada es necesario el establecimiento de una guía con valores estándar y de calidad del zumo. Por ello, en el apartado anterior, se presentan los resultados de los análisis



realizados a zumos de granada variedad Mollar de Elche con el objetivo de poder establecer posibles fraudes mediante la identificación de variaciones en estos parámetros determinados.

A continuación se irán analizando las posibles manipulaciones que puedan realizarse en el zumo de granada y cómo pueden variar las concentraciones de ciertos componentes del mismo.

4.2.1 Ácidos orgánicos

Las posibles adulteraciones del zumo de granada en cuanto al perfil de ácidos orgánicos pueden detectarse como un aumento del ácido málico y tartárico por encima de los niveles encontrados, indicando que ha podido producirse una adición de piel o zumo de uva. También puede verse modificado por la adición de ácido cítrico o zumos como el de grosella, ricos en ácido cítrico, pudiendo detectar este hecho como una relación entre el ácido cítrico y el isocítrico muy alta.

4.2.2 Azúcares

Uno de los análisis básicos utilizados en la industria de zumos es la determinación del contenido en sólidos solubles expresados como grados brix, que puede ser equiparable al contenido en azúcares que presenta el zumo. Este parámetro puede verse afectado por muchos factores incluyendo la variedad, la región de producción, año de crecimiento y el nivel de madurez de la fruta. Según la propuesta de AIJN, el grado mínimo de grados Brix del zumo de granada debe ser 14,0 (AIJN, 2008).

Valores inferiores a este pueden indicar la utilización de fruta con un índice de madurez muy bajo o la adición de agua al zumo y, valores superiores pueden indicar la adición de jarabes de glucosa o fructosa que incrementen este valor. Para poder establecer posible adulteración con jarabes, el ratio de glucosa/fructosa es un indicador importante, ya que a valores superiores a 1 indican este fraude.



También, la adición de zumos de pera, manzana, cereza y aronia podría en este caso detectarse por una concentración alta de sacarosa, así como la presencia superior de sorbitol. El sorbitol se encuentra en alta concentración en el zumo de pera (10-25 g/L zumo) y manzana (2,5-7 g/L zumo) (Real Decreto 1518/2007), siendo superior en el caso del zumo de granada (46.16 g/L zumo).

4.2.3 Minerales

El contenido en minerales puede sufrir variaciones en la parte comestible en el zumo de granada y por consiguiente en el zumo, ya que depende de las condiciones climáticas y de producción y del tipo de suelo en el que ha sido cultivada la fruta. Con el perfil mineral del zumo de granada obtenido se puede determinar la región de la cual la fruta ha sido recogida. Sin embargo, este parámetro no puede ser considerado de interés en cuanto a la adulteración.

4.2.4 Metales pesados

Los metales pesados son elementos que presentan numerosos efectos tóxicos, siendo la disfunción renal el principal efecto por una exposición prolongada, de ahí que tenga un impacto negativo sobre la calidad del alimento y esté sujeto a medidas, tanto a nivel europeo como a nivel internacional, dirigidas a minimizar su presencia en los alimentos. El Reglamento 1881/2006 fija los contenidos máximos para estos metales en ciertos productos alimenticios (Tabla 9).

Tabla 9. Valores límite de metales pesados

Valores	
Estaño	100 mg/kg en zumos de frutas enlatados
Arsénico	0.1 mg/kg en zumos de frutas
Cadmio	0.05 mg/kg en fruta de partida
Plomo	0.05 mg/kg en zumos de frutas
Mercurio	0.05 mg/kg en zumos de frutas



El nivel máximo de partida permitido en el caso del cadmio está establecido en fruta de partida, no existiendo valor fijado en zumos. Sin embargo, en éstos no deben sobrepasar este valor.

Los metales pesados no suponen un identificador sobre la adulteración de los zumos pero si es un requisito ambiental que deben cumplir todos los zumos.

4.2.5 Aminoácidos

Los aminoácidos son buenos marcadores para definir la autenticidad de los zumos de frutas aunque su uso es complicado por la variabilidad de la composición natural de la fruta (Nagy et al., 1988). En el caso del zumo de granada de variedad Mollar de Elche, el aminoácido predominante es la Glutamina y el ácido Glutámico. Variaciones en el perfil puede ser indicativo de la adición de otros zumos.

La presencia de altos niveles de prolina en el zumo puede ser un indicativo de la adición de piel o zumo de uva al zumo de granada. Sin embargo, como hemos podido observar en el apartado de caracterización, el contenido en prolina del zumo es mayor del indicado por la guía de AIJN 2008 y debería ser revisado. Niveles superiores a estos podría indicar adulteración.

4.2.6 Color rojo: antocianos y extractos coloreados

Como se ha comentado anteriormente, el perfil característico de antocianos en zumo de granada está compuesto por 6 antocianos identificados como delphinidina, cianidina y pelargonidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido. En la **Figura 25** se el perfil típico de antocianos de zumo de granada identificados mediante HPLC.

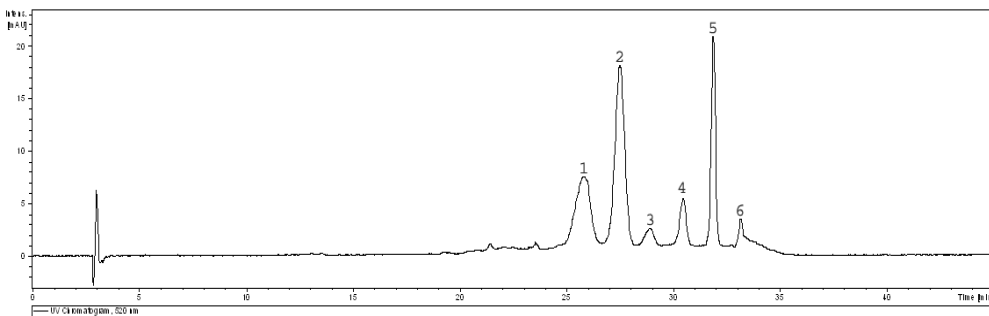


Figura 25. Perfil típico de antocianos en zumo de granada. 1) delfinidina 3,5-diglucósido, 2) cianidina 3,5-diglucósido, 3) pelargonidina 3,5-diglucósido, 4) delfinidina 3-glucósido, 5) cianidina 3-glucósido y 6) pelargonidina 3-glucósido

Por lo tanto, la adición de zumos procedentes de frutos rojos para incrementar este color en el zumo de granada puede detectarse mediante la observación de variaciones en este perfil. La aparición de otros picos en el cromatograma es un indicativo de la adición de otros zumos, extractos de cortezas o frutas coloreadas.

A continuación se presenta una tabla (**Tabla 10**) con distintos frutos rojos que pueden ser utilizados para aumentar el color rojo del zumo de granada. En la tabla se muestran los antocianos individuales de cada uno de ellos detectados por HPLC/MS por otros autores ([Borges y Crozier, 2012](#); [Borges et al., 2010](#); [Díaz-García et al., 2013](#); [Goiffon et al., 1999](#); [Husson et al., 2013](#); [Mullen et al., 2007](#); [Obón et al., 2011](#); [Seeram et al., 2005](#); [Skrede et al., 2000](#)).

Podemos observar cómo algunos de los frutos rojos presentan antocianos iguales (seleccionados en amarillo) y distintos a la granada. En sombreado se muestran los antocianos característicos de la fruta en concreto y que no se encuentran en zumo de granada ni en otros frutos rojos mostrados en la tabla.

Por ejemplo, la grosella negra presenta delfinidina 3-rutinósido, un antociano que no se encuentra en ninguna otra fruta de la tabla y cuya presencia en el zumo de granada podría indicar de forma inequívoca su presencia.



Sin embargo, existen algunas frutas como por ejemplo la fresa, que presenta los mismos antocianos que otros frutos rojos por lo que no se podría decir con certeza que el zumo de granada se ha adulterado con zumo de fresa. En el cromatograma aparecerían otros picos distintos a los del perfil para la granada pero podría tratarse de otros frutos rojos y no se podría determinar si es fresa exactamente.



Tabla 10. Antocianos individuales de frutos rojos

	Granada	Grosella negra	Grosella roja	Fresa	Cereza	Frambuesa	Saúco	Uva	Arándano negro	Zanahoria púrpura	Arándano europeo	Arándano ácido
Cy 3-glu	x		x	X	x	x	x	x	x		x	x
Cy 3,5-diglu	x						x					
Cy 3-sam,5-glu							x					
Cy 3-sopho						x			x			
Cy 3-gala									x		x	x
Cy 3-(2 glu-ruti)			x		x	x			x			
Cy 3-sam							x					
Cy 3-ara									x		x	x
Cy 3-xyI-gala-ferulic												
Cy 3-xyI-glu-gala												
Cy 3-xyI-gala												
Cy 3 (2GxyI-ruti)			x									
Cy 3-ruti			x		x							
Dp 3-glu	x	x						x	x		x	
Dp 3,5-diglu	x											
Dp 3-gala												
Dp 3-ara									x		x	
Dp 3-ruti												
Pg 3-glu	x			X								
Pg 3,5-diglu	x											

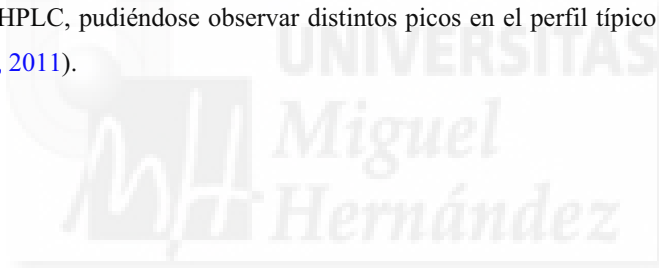


Continuación	Granada	Grosella negra	Grosella roja	Fresa	Cereza	Frambuesa	Saúco	Uva	Arándano negro	Zanahoria púrpura	Arándano europeo	Arándano ácido
Pg 3-sopho						x						
Pg 3-ruti				X					x			
Pg 3-gala				X		x			x			
Pt 3-gala									x			
Pt 3-glu					x				x			
Pt 3-ara				X					x			
Mv 3-gala									x			
Mv 3,5-diglu								x				
Mv 3-ara												
Mv 3-glu								x				
Pn 3,5-diglu								x				
Pn 3-gala									x			x
Pn 3-ruti									x			
Pn 3-glu								x	x			x
Pn 3-ara									x			x



Además de la adulteración del zumo de granada con otros zumos de frutas coloreados, el zumo puede ser adulterado con corteza de la propia granada, no pudiendo detectarse mediante cromatografía ya que también presenta los compuestos típicos de la misma. Sin embargo, la concentración alta de los mismos puede indicar la adición de extracto de corteza al zumo. Esta práctica no podría decirse que se trata de una adulteración ya que la corteza es de la propia granada y además, el proceso de obtención del zumo puede hacer que la corteza esté en contacto con el zumo y pueda extraer sus compuestos pasando a formar parte del mismo.

También puede ser común la adulteración del zumo con compuestos coloreados como pueden ser: amaranto (E-123), rojo Ponceau 4R (E-124), rojo Cochinilla A (E-120), rojo Allura AC (E-129), Rojo 2 G (E-128), Azorubina (E-122), Eritrosina (E-127). Estos compuestos también pueden ser fácilmente detectados mediante métodos químicos o HPLC, pudiéndose observar distintos picos en el perfil típico de la granada (Obón et al., 2011).



CAPÍTULO 5. Clarificación de zumo de granada





CAPÍTULO 5. CLARIFICACIÓN DE ZUMO DE GRANADA

La granada contiene un número considerable de azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos fenólicos como el ácido gálico, ácido protocatecuico, clorogénico, cafeico, ferúlico, p-cumárico, catequina y quercetina (Mena et al., 2011; Poyrazoglu et al., 2002) así como enzimas, proteínas, pectinas y complejos insolubles poliméricos (coloides). Los compuestos fenólicos confieren al zumo de granada el color, astringencia y amargor (De Simon et al., 1992; Rouseff, 1990), siendo estos compuestos junto con los coloides y proteínas los responsables de la formación de la turbidez en los zumos de frutas durante la concentración y el almacenamiento (Macheix et al., 1990; Spanos et al., 1990).

La turbidez está formada por los complejos de proteína-polifenoles en los cuales, las moléculas de proteínas se mantienen unidas no covalentemente con los compuestos polifenólicos que actúan como puentes, pudiendo ser disipados por el calentamiento.

Muchos autores han propuesto modelos para explicar la formación de complejos proteína-polifenol y su precipitación. La mayoría de estos modelos proponen que los complejos de proteína y polifenol se forman por múltiples interacciones débiles (principalmente hidrofóbicas) entre las cadenas laterales de los aminoácidos y los anillos aromáticos de los polifenoles, indicando que la asociación de polifenoles con proteínas es principalmente un fenómeno de superficie. A veces estas interacciones pueden ser complementadas por enlaces puente hidrógeno, los cuales pueden jugar un rol importante en la estabilización de los complejos. La formación del complejo ocurre entonces debido al carácter hidrofóbico de ambas moléculas y en segundo lugar, cuando se da la posibilidad de formación de enlaces puente hidrógeno, éstos pueden estabilizar el complejo pero sin alterar las modificaciones fundamentales obtenidas en el primer paso. Otros autores también proponen cambios en la conformación tridimensional de la proteína como procesos de desnaturalización y renaturalización, los cuales estarían acompañados por el complejamiento con el polifenol.

Por tanto, para poder obtener un zumo luminoso, limpio y que además no sea astringente, es necesaria la utilización de agentes clarificantes o tecnologías que nos permitan prevenir o eliminar estos complejos, optimizando la técnica dependiendo de los complejos formados.



Diferentes tipos de agentes clarificantes han sido utilizados para la eliminación de polifenoles en zumos de frutas, como por ejemplo la gelatina, bentonita, carbón activado, caseína y polivinilpolipirrolidona (PVPP), (Artik et al., 1994; Balik, 2003; Fang et al., 2006; Molina, 1994, 2000; Stankovi et al., 2004; Tüküymaz et al., 2012), sin embargo, todos ellos han sido utilizados en procesos en “batch”, aumentando el tiempo y el coste del proceso. Los procesos de filtración con membranas han sido utilizados en la industria alimentaria debido a que requieren menor mano de obra y son más eficientes en cuanto al tiempo de procesado que la clarificación convencional. Por ello, el coste de operación utilizando tecnología de membrana es mucho menor que el proceso tradicional (Yazdanshenas et al., 2010).

El proceso de filtración por membrana depende del tamaño de los compuestos que se quieran separar. En la industria de zumos los dos tipos de filtración de membrana más utilizados son la ultrafiltración (UF) y la microfiltración (MF) capaces de separar partículas en el zumo de entre 0.01–0.1 μm y 0.1–10 μm , respectivamente (Girard et al., 2000).

Los coloides pueden producir un descenso en el caudal de filtración durante el tratamiento, por lo que un tratamiento previo de los zumos con enzimas como pectinasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas, carbohidrasas, glucanasas o arabanases pueden incrementar este flujo debido a la reducción del tamaño de las partículas y el descenso de la viscosidad (Stutz, 1993; Yu y Lencki, 2004; Hoondal et al 2002, Landbo et al 2004; Barros et al 2004; Santón et al 2008; Pap et al 2011; Pinelo et al 2010).

En este capítulo, se presentan los resultados del efecto de clarificación mediante filtración tangencial en algunas propiedades físico-químicas del zumo de granada, tales como la turbidez, el pH, sólidos solubles totales, el contenido en polifenoles totales, color y compuestos bioactivos utilizando membranas en el rango de UF (tamaño de poro de 0,1 μm) y MF (tamaño de poro de 0,2 μm). Además, se presentan los cambios producidos en estos parámetros en el zumo de granada sometido a un pretratamiento enzimático con enzimas antes y después de la clarificación y la comparación del proceso de filtración tangencial con la clarificación convencional con albúmina y bentonita.



5.1 Clarificación convencional de zumo de granada

El zumo de granada fue sometido a un estudio de clarificación convencional o clarificación por encolado mediante la utilización de bentonita y ovoalbúmina a distintas concentraciones, con el objetivo de determinar el efecto de estos clarificantes sobre el color, el contenido en polifenoles totales y la capacidad antioxidante del zumo.

Además, el zumo una vez clarificado se sometió a dos tratamientos de pasteurización de 65 °C 30 segundos y 90 °C 5 segundos, para comprobar si el tratamiento térmico del zumo de granada clarificado provoca la formación de complejos entre los posibles compuestos que puedan quedar en el zumo y que incrementen la turbidez.

5.1.1 Efecto de clarificantes en zumo de granada

Efecto en el color rojo

La clarificación convencional produce un gran efecto en el color rojo del zumo de granada (Turfan et al., 2011). Por ello, se determinó el color rojo de los zumos de granada de la variedad Mollar antes y después de clarificar mediante la medida de la absorbancia a 520 nm.

Como puede observarse en la **Figura 26**, los clarificantes utilizados producen una disminución del color rojo de los zumos. Los tratamientos de 0.1 g/L de bentonita sódica y ovoalbúmina producen una pérdida del color rojo del 8.9 y 35.55 % respectivamente.

La ovoalbúmina es el clarificante que produce mayor pérdida de color rojo y además, a partir de la concentración de 0.25 g/L ésta pérdida es de aproximadamente el 50 % hasta la concentración final.



Además, los tratamientos realizados a la concentración máxima de 2 g/L produce unas pérdidas del 60.4 % en la bentonita y del 63.31 % en el caso de la ovoalbúmina.

El test de ANOVA evidencia que existen diferencias significativas ($P < 0.05$; Test Fisher) entre las diferentes concentraciones de clarificantes utilizados.

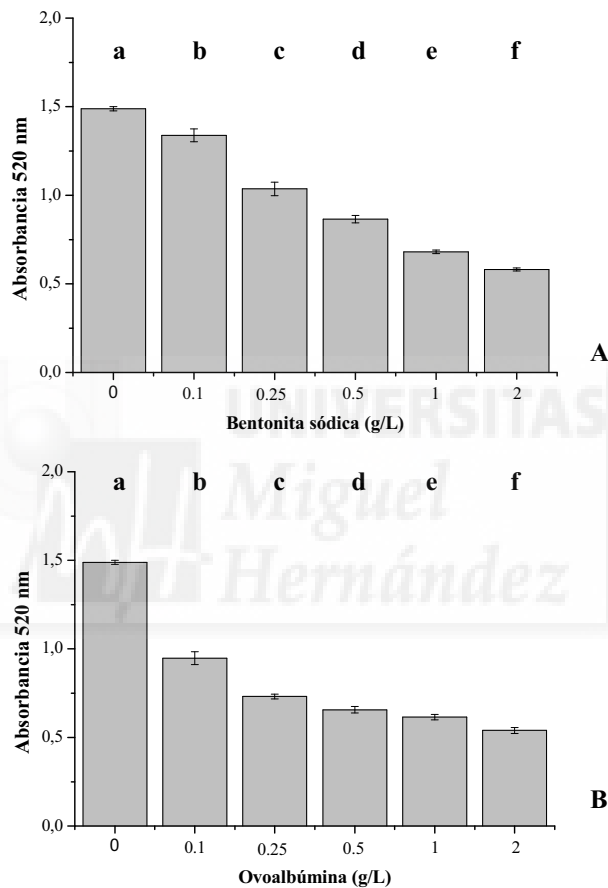


Figura 26. Efecto del tratamiento de clarificación en el color rojo de zumo de granada (A) Bentonita y (B) Ovoalbúmina

Efecto en la turbidez

La turbidez es una medida fácil y rápida de medida de la eficiencia de la clarificación y por ello, se determinó en los zumos de granada antes y después de clarificar mediante la medida de la absorbancia a 700 nm.



Como se muestra en la **Figura 27**, los resultados obtenidos de la determinación de la turbidez de los zumos clarificados, indicaron que la ovoalbúmina es el clarificante que más disminuye la turbidez del zumo de granada.

El tratamiento de clarificación de 0.1 g/L produce una disminución de la turbidez del 14.0 y 57.6 % cuando se utiliza bentonita sódica y ovoalbúmina. Además, la dosis de 2 g/L produce una disminución del 78.1 y 87.7 % respectivamente.

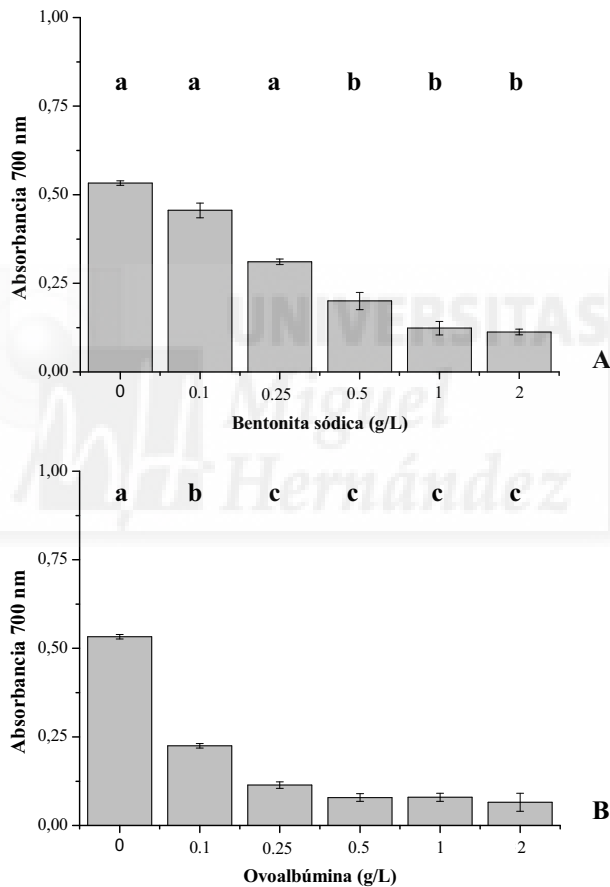


Figura 27. Efecto del tratamiento de clarificación en la turbidez de zumo de granada (A) Bentonita y (B) Ovoalbúmina

En un estudio realizado por [Alper et al., 2011](#), se llevó a cabo la clarificación de zumo de granada mediante la utilización conjunta de gelatina y bentonita a



concentraciones de 300 mg/L. Según los resultados obtenidos, el tratamiento utilizado puede producir una disminución de la turbidez de los zumos en un 95.50 %. En nuestro caso, la disminución es menor ya que posiblemente con la utilización de dos clarificantes conjuntamente se puedan obtener mejores resultados.

El análisis estadístico de los resultados indicó que en el caso de la utilización de bentonita como clarificante, existen diferencias significativas ($P < 0.05$; Test Fisher) con respecto al zumo inicial en dosis superiores a 0.5 g/L. En el caso de la albúmina, también existen diferencias significativas entre la turbidez del zumo inicial y la menor dosis utilizada y además, a partir de 0.25 g/L no se observan diferencias en la turbidez ($P < 0.05$; Test Fisher).

Efecto en el índice de pardeamiento

El efecto de la clarificación convencional en el pardeamiento de los zumos antes y después de clarificar se determinó mediante el protocolo descrito en el apartado de metodología y los resultados se muestran en la **Figura 28**.

La clarificación produce un ligero incremento del pardeamiento en el caso de la bentonita a la mayor concentración (22 %). Además, el análisis estadístico de los datos determinó que sólo existen diferencias significativas en las concentraciones de 1 y 2 g/L con respecto al valor inicial ($P < 0.05$ Test Fisher).

El análisis ANOVA realizado a los datos obtenidos con la ovoalbúmina indicó que existen diferencias significativas entre las muestras tratadas a baja dosis de clarificante y las tratadas a alta, observándose cómo a partir de 0.5 g/L no se observan diferencias significativas entre las muestras.

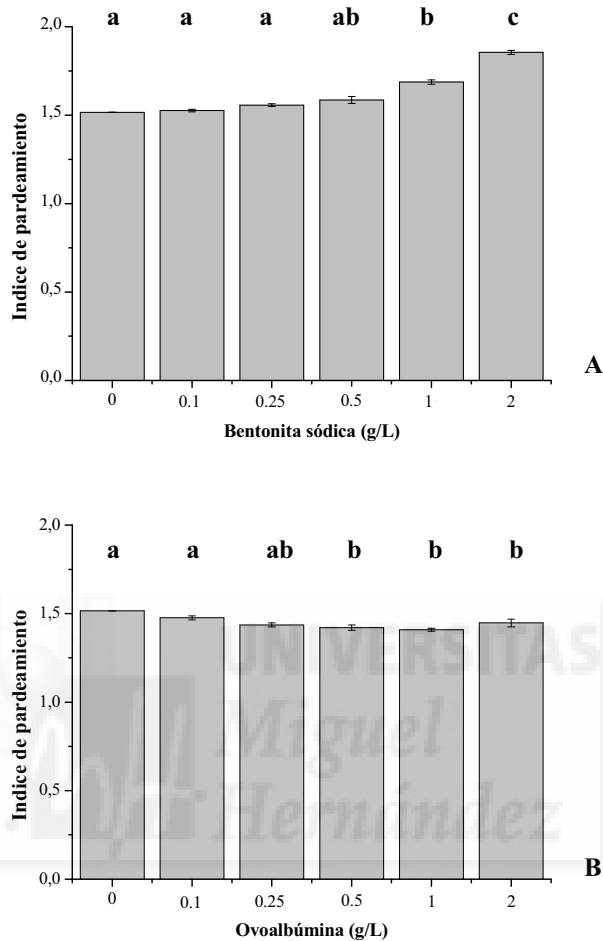


Figura 28. Efecto del tratamiento de clarificación en el pardeamiento de zumo de granada (A) Bentonita, (B) Ovoalbúmina

Podría decirse que, en nuestro estudio, la clarificación convencional influye mínimamente en el pardeamiento del zumo cuando se utiliza bentonita pero no cuando se utiliza ovoalbúmina.

Sin embargo, otros autores determinan el índice de pardeamiento tanto en zumo de granada como en otros tipos de zumos simplemente como medida de la absorbancia a 420 nm y obtienen resultados de una disminución de este parámetro con la utilización de clarificantes (Alper et al., 2011; Lee et al., 2007). Esto puede ser debido a que, en los



zumos de granada, además de los compuestos marrones, existe una gran influencia de otros compuestos que pueden distorsionar la medida, obteniendo resultados erróneos. Al tener en cuenta tanto los compuestos marrones como los rojos (mayoritarios del zumo), la medida del índice de pardeamiento puede ser más fiable.

Efecto en la densidad de color total

La densidad de color total de los zumos de granada antes y después de clarificar se realizó mediante el protocolo descrito en el capítulo de metodología. Los resultados obtenidos de la clarificación con bentonita y ovoalbúmina se muestran en la **Figura 29**.

Como puede observarse, el tratamiento que menor efecto produce en la densidad de color total del zumo de granada es el realizado con bentonita sódica a la concentración de 0.1 g/L, que produce una pérdida del 8.8 %, mientras que la ovoalbúmina produce una disminución del color total del 29.3 %.

Además, la concentración máxima de clarificante utilizada de 2 g/L produce una disminución de la densidad de color total similar en los dos clarificantes, produciéndose una pérdida de 56.9 y 53.2 % en el caso de la bentonita sódica y ovoalbúmina.

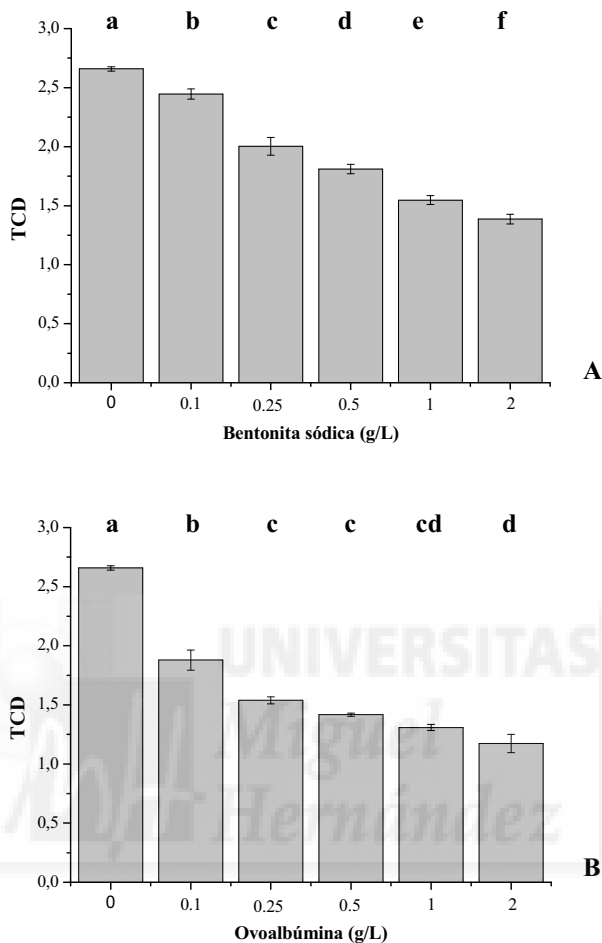


Figura 29. Efecto del tratamiento de clarificación en la densidad de color total de zumo de granada (A) Bentonita y (B) Ovoalbúmina

El análisis estadístico de los datos evidenció que la utilización de distintas concentraciones de bentonita y albúmina para la clarificación del zumo de granada produce diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$; Test Fisher), observándose cómo en el caso de la albúmina, no existen diferencias significativas entre las dos dosis utilizadas más altas.



Efecto en el contenido de polifenoles totales

La determinación del contenido en polifenoles totales se realizó mediante el método Folin-Ciocalteu, comparando el zumo sin clarificar y el clarificado mediante la utilización de los dos clarificantes ensayados a distintas dosis.

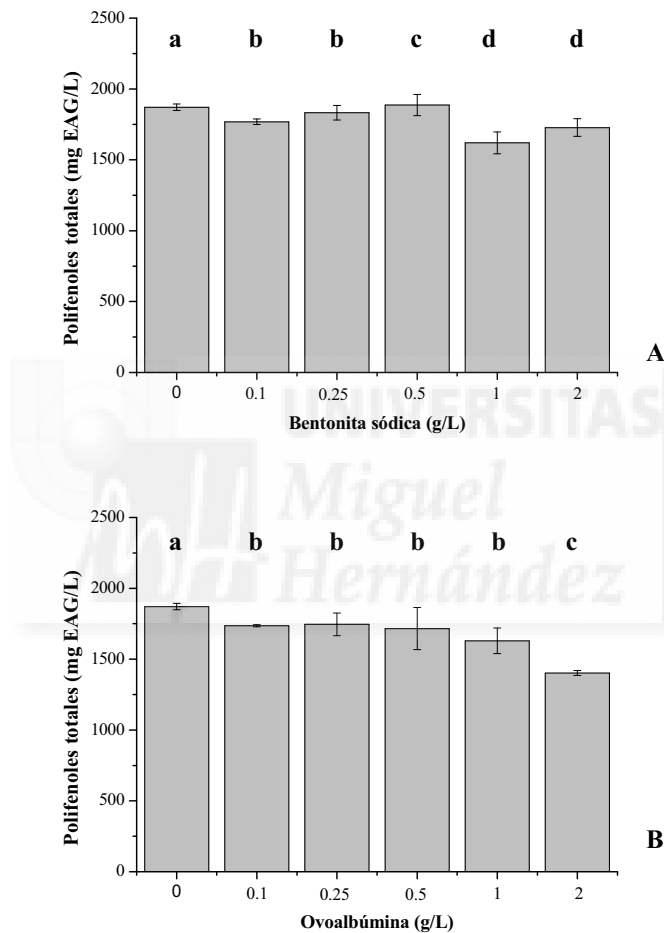


Figura 30. Efecto del tratamiento de clarificación en el contenido de polifenoles totales de zumo de granada (A) Bentonita y (B) Ovoalbúmina

Como se puede observar en los resultados de la **Figura 30A**, el contenido en polifenoles totales se ve afectado cuando se utiliza como clarificante bentonita sódica perdiéndose entre un 4 y un 7 % del contenido. Sin embargo, en el caso de la



ovoalbúmina (**Figura 30B**), las concentraciones de 0.1 - 1 g/L producen una pérdida de 6.7 - 12.9 %. La concentración de 2 g/L es la que mayor pérdida de polifenoles totales produce, con un 25.1 %.

Según los datos obtenidos del análisis ANOVA de los resultados, las mayores diferencias se observan a las dosis de 1 y 2 g/L en el caso de la bentonita. Sin embargo, en el caso de la albúmina existen diferencias entre el zumo de granada antes de clarificar y las dosis intermedias, encontrándose la mayor diferencia con la mayor dosis utilizada ($P < 0.05$; Test Fisher).

La utilización conjunta de gelatina y bentonita utilizada en otros ensayos ([Alper et al., 2011](#)), indicó una pérdida del 21 % en el contenido en polifenoles totales de las muestras comparando el zumo sin clarificar y el zumo clarificado. En nuestro caso, la pérdida de polifenoles totales en los zumos de granada clarificados con bentonitas es prácticamente mínima comparado con este resultado. Sin embargo, los resultados obtenidos de la utilización de ovoalbúmina a la concentración mayor son similares a los descritos en el ensayo combinado.

Efecto en la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los zumos de granada antes y después de clarificar se realizó mediante el método ABTS descrito en el capítulo de metodología.

Los resultados mostrados en la **Figura 31**, indican que la capacidad antioxidante de los zumos sin clarificar fue de 15.27 mM ET. Además, los resultados obtenidos de los zumos clarificados presentan incluso valores superiores a los iniciales, existiendo diferencias entre el zumo sin tratar y los tratados a distintas concentraciones ensayadas ($P < 0.05$; Test Fisher).

Esto puede ser debido a que durante la clarificación, la cantidad de compuestos que influyen en la capacidad antioxidante de los zumos no se ve prácticamente disminuida durante el proceso, por lo que los valores de capacidad antioxidante no varían de forma significativa.

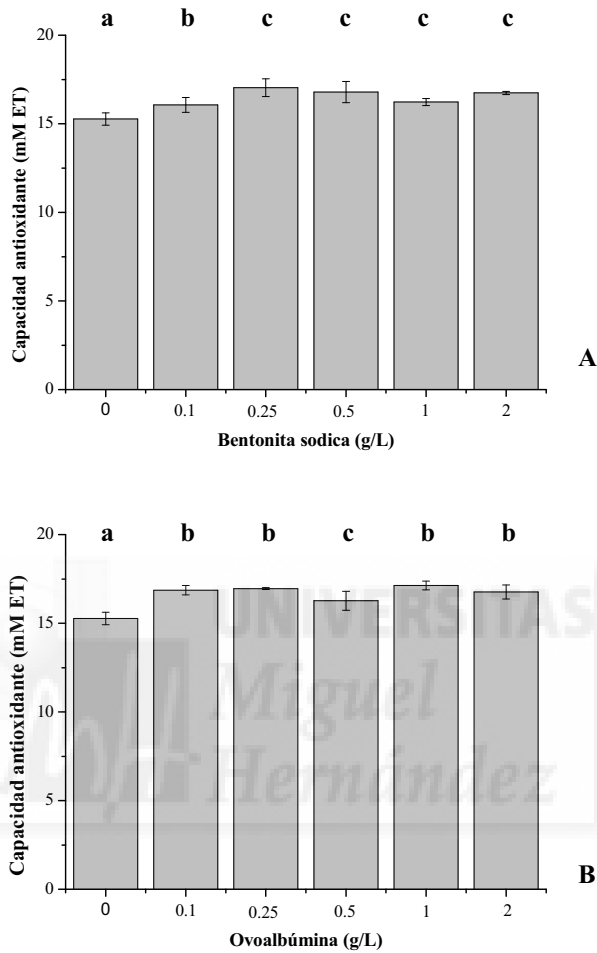


Figura 31. Efecto del tratamiento de clarificación en la capacidad antioxidante de zumo de granada (A) Bentonita y (B) Ovoalbúmina

Por tanto, observando la **Figura 31** podemos decir que la clarificación convencional del zumo de granada con bentonita y ovoalbúmina a las concentraciones ensayadas no produce grandes cambios en la capacidad antioxidante del zumo de granada.



5.1.1.1 Fotografías de los zumos clarificados

A continuación se muestran unas fotografías de los zumos de granada clarificados con bentonita y albúmina a distintas concentraciones crecientes.

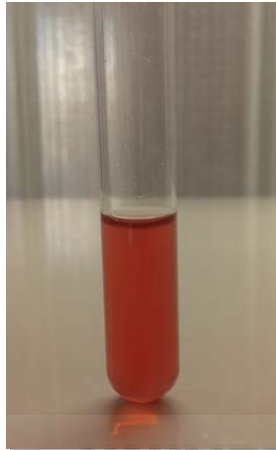


Imagen 9. Zumo de granada control (sin tratamiento de clarificación)

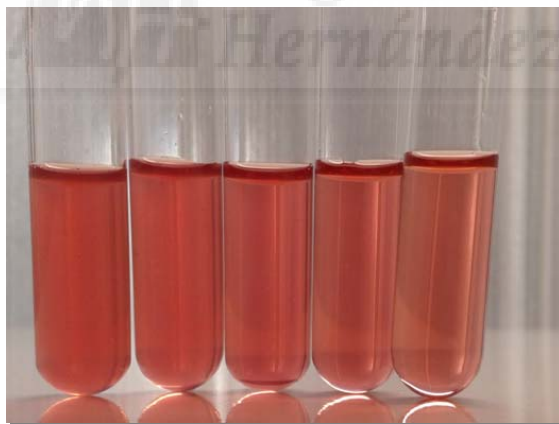


Imagen 10. Zumos clarificados con bentonita sódica (0.1 → 2 g/L)

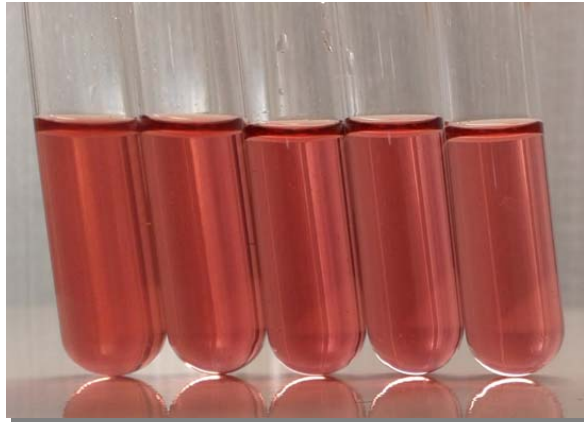


Imagen 11. Zumos clarificados con ovoalbúmina (0.1 → 2 g/L)





5.1.2 Efecto de la pasteurización en zumo de granada clarificado

Una vez el zumo fue clarificado con los agentes clarificantes (bentonita sódica y ovoalbúmina) a distintas concentraciones, los zumos fueron pasteurizados a dos temperaturas distintas de 65 °C 30 s y 90 °C 5 s.

Al igual que para los zumos de granada clarificados anteriormente, se determinó el efecto del tratamiento térmico en el color (color rojo, turbidez, índice de pardeamiento y densidad de color total), el contenido en polifenoles y la capacidad antioxidante en los mismos.

Efecto de la pasteurización en el color rojo

La determinación del color rojo de los zumos de granada clarificados antes y después de pasteurizar a dos temperaturas, se realizó mediante la medida de la absorbancia a 520 nm.

Los resultados indicaron que no existen diferencias significativas entre el tratamiento térmico a baja y alta temperatura (**Figura 32**), independientemente del clarificante utilizado. Podemos observar como en algunos casos, los valores obtenidos de la absorbancia a 520 nm en los zumos pasteurizados a 90 °C 5 s es ligeramente superior a los pasteurizados a 65 °C 30 s, sin embargo, estos valores no son significativos.

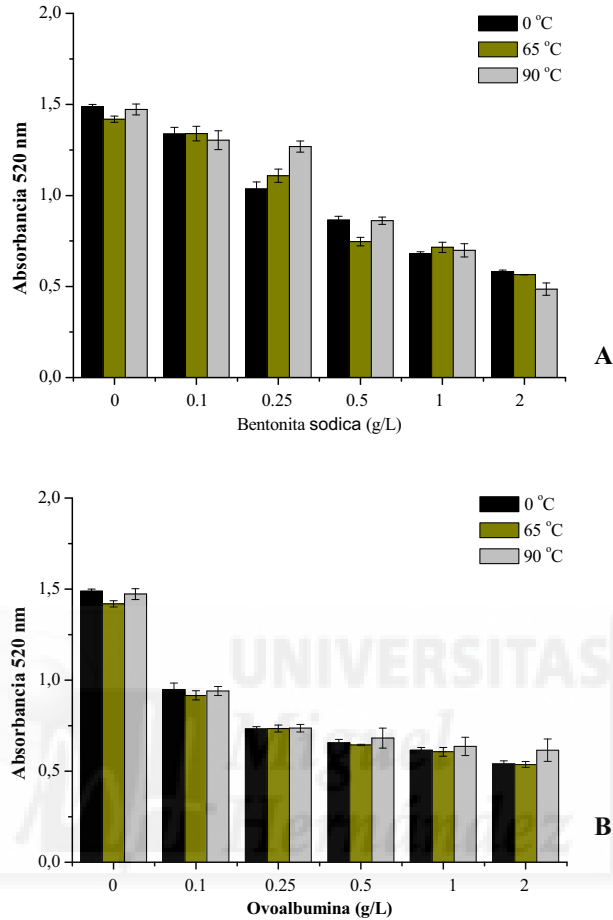


Figura 32. Efecto de la pasteurización en el color rojo de zumo de granada clarificado (A) Bentonita y (B) Ovoalbúmina

Los resultados del análisis estadístico de los resultados obtenidos en la determinación del color rojo mediante la medida espectrofotométrica a 520 nm indicaron que no existen diferencias significativas entre los dos tratamientos térmicos aplicados tanto con la utilización de bentonita como con ovoalbúmina ($P > 0.2$; Test Fisher).



Efecto de la pasteurización en la turbidez

Los resultados obtenidos de la determinación de la turbidez en zumos sin clarificar, clarificados y pasteurizados a dos temperaturas determinados como medida de la absorbancia a 700 nm se muestran en la **Figura 33**.

Como se puede observar, el tratamiento de pasteurización a alta temperatura produce un incremento en la absorbancia a 700 nm en todos los zumos pasteurizados.

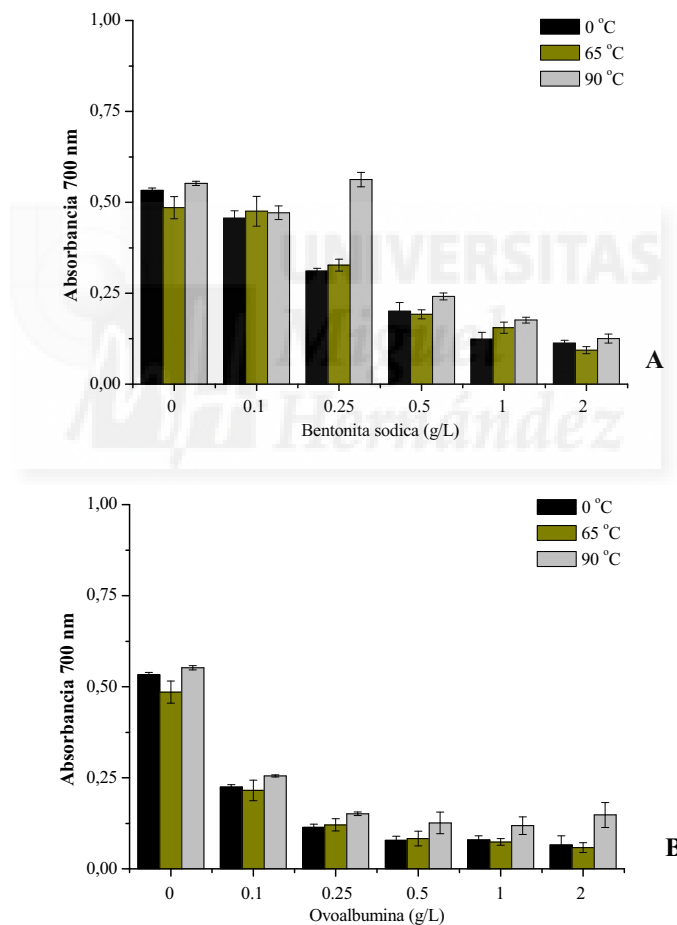


Figura 33. Efecto de la pasteurización en la turbidez de zumo de granada clarificado (A) Bentonita y (B) Ovoalbúmina



El tratamiento de pasteurización a 90 °C 5 s es el tratamiento que más incrementa los valores de la absorbancia a 700 nm tanto en los zumos clarificados como en los zumos no clarificados, sin embargo, estadísticamente no es significativo en comparación con el tratamiento a 65 °C 30 s. Además, las menores variaciones se producen en los zumos clarificados con ovoalbúmina.

El incremento en los valores de la turbidez de los zumos clarificados sin clarificar puede ser debido a que no se han eliminado todos los compuestos responsables de la turbidez y el tratamiento térmico ha provocado la formación de coloides. El tratamiento con ovoalbúmina sería el que mayor eliminación de compuestos responsables de la turbidez experimenta ya que es en el que menos variación se observa.

Según los resultados estadísticos obtenidos, se observan diferencias estadísticas entre el tratamiento a baja temperatura y el tratamiento a alta temperatura ($P < 0.01$; Test Fisher), no observándose diferencias entre el zumo inicial y el pasteurizado a baja ($P > 0.98$; Test Fisher).

Efecto de la pasteurización en el índice de pardeamiento

En la **Figura 34** se muestran los resultados para la determinación de pardeamiento.

Al igual que en el caso anterior, se determinó el efecto del tratamiento térmico de pasteurización en el pardeamiento del zumo de granada determinado como la relación entre los compuestos marrones y los compuestos rojos presentes en el zumo de granada clarificado y sin clarificar con los distintos agentes clarificantes.

Como se puede observar en la **Figura 34**, el tratamiento de pasteurización no produce diferencias significativas en el pardeamiento del zumo clarificado con los distintos clarificantes y las distintas dosis utilizadas. La clarificación con bentonita sódica el tratamiento que menor pardeamiento produce.

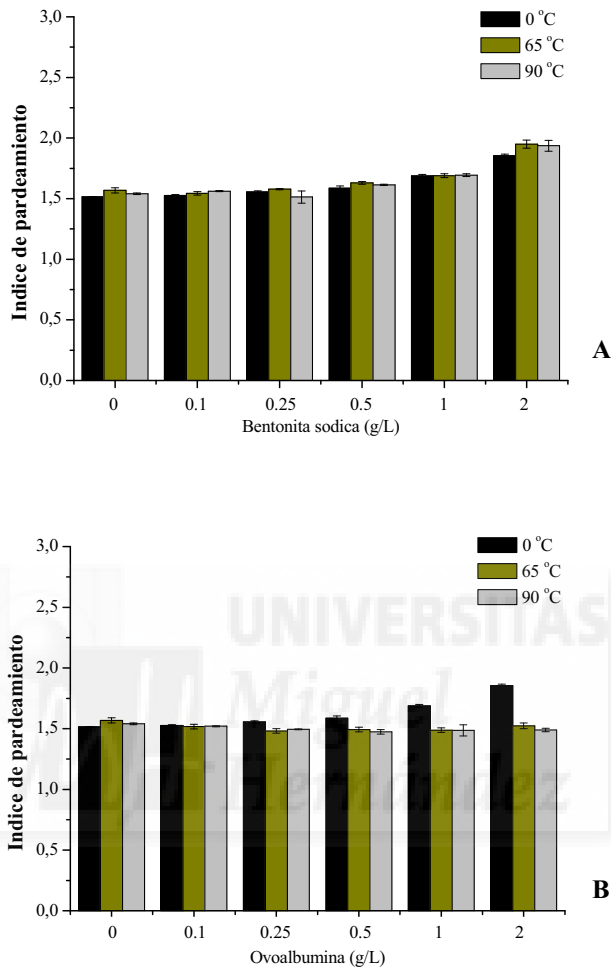


Figura 34. Efecto de la pasteurización en el pardeamiento de zumo de granada clarificado (A) Bentonita y (B) Ovoalbúmina

Efecto de la pasteurización en la densidad de color total

La determinación de la densidad de color total en los zumos de granada clarificados y sin clarificar y pasteurizados a alta y baja temperatura se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el capítulo de metodología.



En la **Figura 35** se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la densidad de color total en los zumos utilizando bentonita y ovoalbúmina como clarificantes a distintas concentraciones.

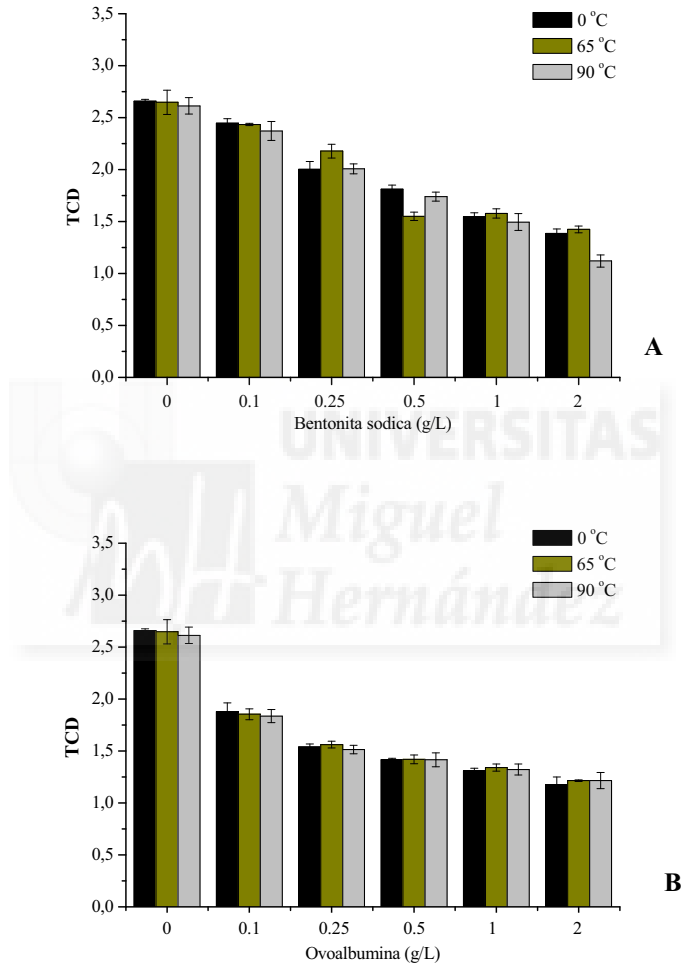


Figura 35. Efecto de la pasteurización en la densidad de color total de zumo de granada clarificado (A) Bentonita y (B) Ovoalbúmina

Como podemos observar, al igual que en las determinaciones anteriores del color rojo y el pardeamiento, el tratamiento de pasteurización no influye en la densidad



de color total de los zumos clarificados con distintos clarificantes a distintas dosis, observando que el aumento de la concentración de los mismos no influye en este parámetro.

El análisis ANOVA de los datos indicó que no existen diferencias significativas entre los dos tratamientos de pasteurización aplicados al zumo de granada y tampoco existen diferencias entre los zumos pasteurizados y sin pasteurizar.

Efecto de la pasteurización en el contenido en polifenoles totales

En la **Figura 36** se muestran los resultados del contenido en polifenoles totales en zumos de granada sin clarificar y clarificados con bentonita (**A**) y ovoalbúmina (**B**), pasteurizados y sin pasteurizar.

La determinación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu de los zumos de granada sin clarificar y clarificados con distintos clarificantes y pasteurizados indicó que no se producen diferencias significativas en el contenido en polifenoles totales en los zumos de granada clarificados con bentonita sódica y ovoalbúmina pasteurizados a 65 °C 30 s y 90 °C 5 s ($P < 0.05$; Test Fisher).

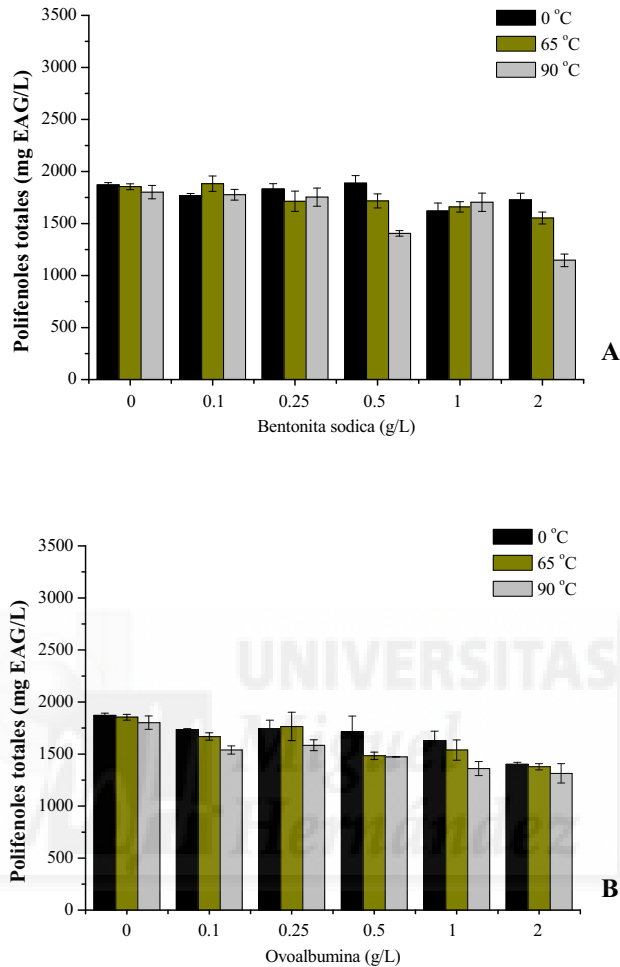


Figura 36. Efecto de la pasteurización en el contenido en polifenoles totales de zumo de granada clarificado (A) Bentonita y (B) Ovoalbúmina

Efecto de la pasteurización en la capacidad antioxidante

Además de todos los análisis realizados a las muestras de zumo antes y después de clarificar con distintos clarificantes y a distintas concentraciones, se determinó la capacidad antioxidante de los mismos mediante el método ABTS descrito en el capítulo de metodología (**Figura 37**).

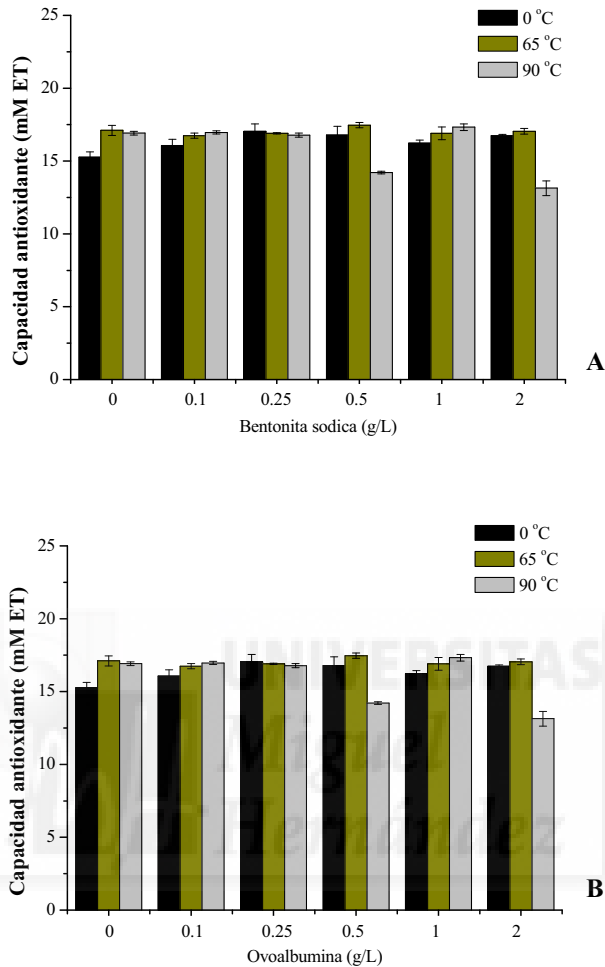


Figura 37. Efecto de la pasteurización en la capacidad antioxidante de zumo de granada clarificado (A) Bentonita y (B) Ovoalbúmina

En los resultados de dichas determinaciones representados en la **Figura 37**, podemos observar cómo prácticamente en todos los ensayos los tratamientos de pasteurización a 65 °C 30 s y 90 °C 5 s no se observan diferencias significativas ($P < 0.05$; Test Fisher).



Podemos decir que el tratamiento de pasteurización no influye en los compuestos presentes en el zumo de granada después de clarificar y con lo cual, la degradación de los mismos a estas temperaturas y estos tiempos es mínima.

5.1.2.1 Fotografías de los zumos clarificados y pasteurizados

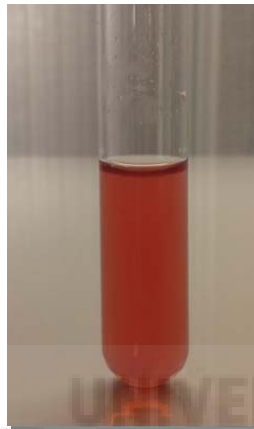


Imagen 12. Zumo de granada control. Pasteurización 65 °C 30 s



Imagen 13. Zumo de granada clarificado con bentonita sódica (0.1 → 2 g/L) y pasteurizado a 65 °C 30 s

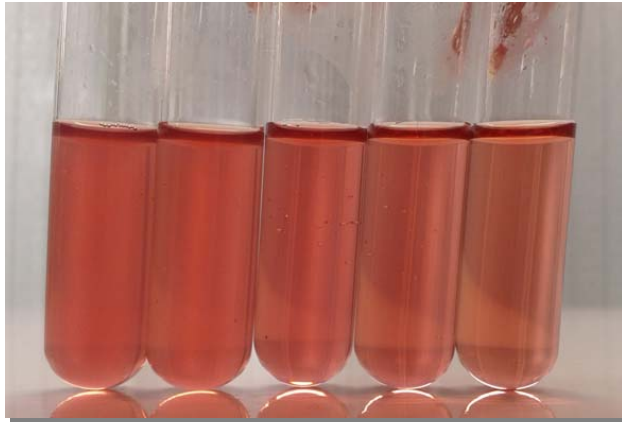


Imagen 14. Zumo de granada clarificado con bentonita calco-sódica (0.1 → 2 g/L) y pasteurizado a 65 °C 30 s

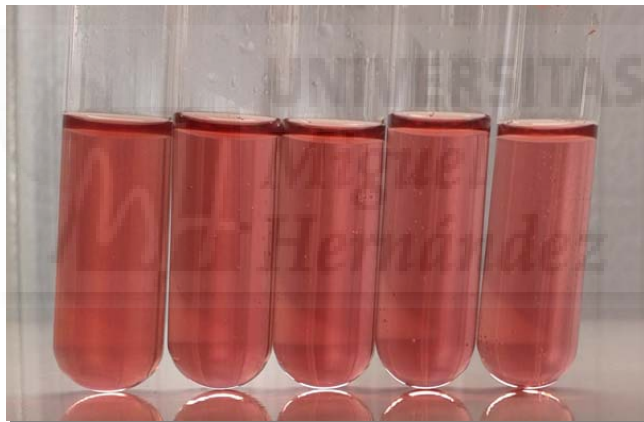


Imagen 15. Zumo de granada clarificado con ovoalbúmina (0.1 → 2 g/L) y pasteurizado a 65 °C 30 s

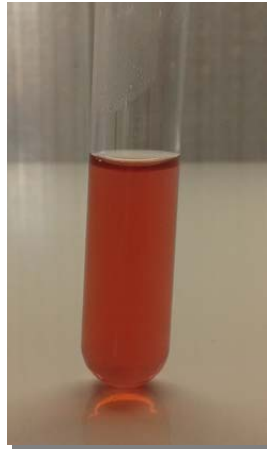


Imagen 16. Zumo de granada control. Pasteurización 90 °C 5 s



**Imagen 17. Zumo de granada clarificado con bentonita sódica (0.1 → 2 g/L) y
pasteurizado a 90 °C 5 s**

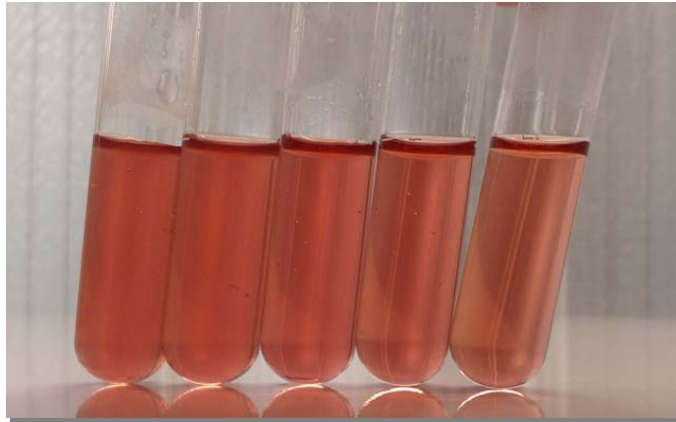


Imagen 18. Zumo de granada clarificado con bentonita calco-sódica (0.1 → 2 g/L) y pasteurizado a 90 °C 5 s



Imagen 19. Zumo de granada clarificado con ovoalbúmina (0.1 → 2 g/L) y pasteurizado a 90 °C 5 s



5.1.3 Conclusiones

Proceso de clarificación

- El clarificante que mayor pérdida produce en el color rojo es la ovoalbúmina.
- La turbidez disminuye con ambos clarificantes, siendo el más eficaz la ovoalbúmina a dosis a partir de 0.25 g/L que ya se mantiene estable. La bentonita produce la disminución de la turbidez a partir de los 0.5 g/L.
- La bentonita produce un incremento en el índice de pardeamiento a medida que se aumenta su concentración, sin embargo, la ovoalbúmina no produce variaciones significativas.
- La densidad total de los zumos experimenta una disminución con los dos clarificantes a medida que aumenta la concentración de los mismos.
- La mayor pérdida en el contenido en polifenoles totales se produce en los zumos clarificados con ovoalbúmina a 2 g/L. La bentonita no produce disminuciones significativas comparadas con los zumos sin clarificar.
- La capacidad antioxidante de los zumos clarificados experimenta un aumento en la misma con respecto al zumo inicial, pero no se observaron diferencias entre los tratamientos.

Proceso de clarificación y pasteurización

- Las determinaciones de color rojo, pardeamiento, densidad de color total, contenido en polifenoles totales y capacidad antioxidante realizadas a los zumos clarificados y pasteurizados a 65 °C 30 segundos y 90 °C 5 segundos no indicaron diferencias significativas entre ambas temperaturas.



- Únicamente se observaron diferencias en cuanto a la turbidez, donde el tratamiento a alta temperatura incrementó la turbidez con respecto al tratamiento de baja temperatura.





5.2 Clarificación de zumo de granada por filtración tangencial

El zumo de granada en su estado original presenta una alta turbidez que hace que sea complicado de conservar. La aplicación de procesos de clarificación por membranas puede reducir la turbidez; sin embargo, este proceso puede producir cambios en las propiedades fisicoquímicas del zumo.

Los polifenoles, responsables de la formación de la turbidez y de un color poco deseable en el zumo de granada, son uno de los componentes desfavorables desde el punto de vista comercial. Como se ha comentado previamente, estos pueden ser eliminados con agentes clarificantes pero el tiempo necesario para ello y el coste económico pueden ser muy altos.

Los objetivos fijados en este ensayo fueron incrementar el rendimiento del proceso industrial de clarificación de zumo de granada mediante filtración tangencial, con una afectación mínima de sus propiedades organolépticas y funcionales, comparar los procesos de microfiltración y ultrafiltración en cuanto a caudal y propiedades fisicoquímicas finales del zumo de granada clarificado y evaluar la influencia de un tratamiento enzimático previo a la filtración en el caudal de permeado del zumo.

5.2.1 Test de agua

Previamente a los ensayos de filtración, se realizaron los test de agua de las membranas para comprobar el correcto funcionamiento de las mismas, cuyos resultados medios obtenidos de todos ellos se muestran en la tabla siguiente:



Tabla 11. Test de agua

	Presión (bares)	Caudal (L/h.m²) ± SD
Membrana 0.2 μm	0	54.00 ± 17.92
	2	79.5 ± 24.75
Membrana 0.1 μm	0	35.38 ± 6.68
	2	50.46 ± 7.26

Como se observa en la **Tabla 11**, el test de agua de la membrana de 0.2 μm indica un mayor caudal que la membrana de 0.1 μm y además como era de esperar, el caudal de filtración aumenta cuando se aumenta la presión.

5.2.2 Estudio de microfiltración y ultrafiltración

Para la realización de todos los ensayos de filtración se utilizó zumo de granada variedad Mollar de Elche filtrado por una malla de 200 μm.

En este primer ensayo de filtración tangencial, se depositaron 50 L de zumo en un tanque y se incrementó su temperatura a lo largo del ensayo intentando mantener su temperatura constante entre 25 - 30 °C. El zumo se filtró a través de una **membrana con un tamaño de poro de 0.2 μm** y se midió el caudal de salida del permeado a lo largo de 90 minutos a una **presión de 2 bares**. Una vez finalizado este ensayo, se cambió la membrana por la de tamaño de poro de **0.1 μm** y se procedió a realizar el mismo procedimiento.

En cada uno de los ensayos, se tomó una muestra inicial del zumo de granada utilizado en cada uno, así como una muestra de permeado al finalizar para determinar la influencia del proceso en parámetros de color, ° Brix y compuestos bioactivos.



5.2.2.1 Resultados del caudal de filtración

Al principio del proceso de filtración tangencial se produce una caída rápida del caudal de permeado (**Figura 38**), manteniéndose este valor más o menos constante hasta el final del ensayo.

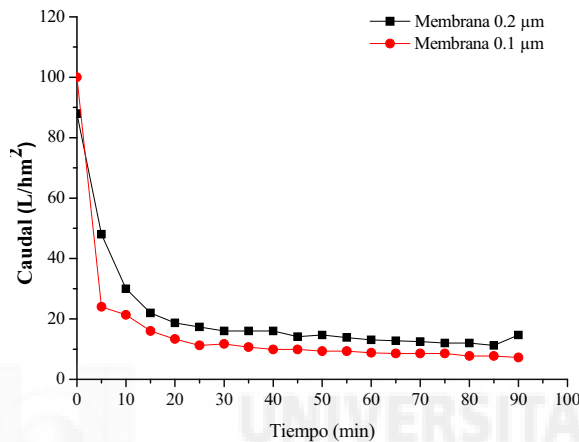


Figura 38. Caída de caudal durante filtración tangencial

Como se puede observar, el caudal inicial de la membrana de 0.1 µm fue mayor que el de la de 0.2 µm. Esto puede ser debido a que las membranas eran nuevas y no presentaban en su interior ninguna partícula obstruyendo los poros. Sin embargo, una vez comenzado el proceso de filtración, la membrana de 0.2 µm presenta mayor caudal que la de 0.1 µm y se mantiene constante a lo largo del todo el ensayo de filtración. Al final del proceso de filtración, el caudal mayor obtenido fue con la membrana de microfiltración y el caudal con la membrana de ultrafiltración sigue disminuyendo. Esto puede ser debido a una colmatación de la membrana por depósito de compuestos en su superficie, obturando los poros y provocando la bajada de este caudal. Los resultados de caudal obtenido son similares a los obtenidos en otros estudios con las mismas membranas, que obtienen unos caudales de 10-17 L/h.m² (Mirsaeedghazi et al., 2010).

El pH del zumo se mantiene estable a lo largo del proceso de filtración (3.8-3.9) y la temperatura del tanque de recirculación aumenta hasta el doble con respecto a la temperatura inicial (12.5 ± 0.1 °C) ya que se intentan mejorar las condiciones de



filtración del zumo mediante este aumento de temperatura pero sin degradar los compuestos del zumo (25 ± 0.1 °C).

5.2.2.2 Resultados de las propiedades fisicoquímicas

En la **Tabla 12**, se muestran los resultados de los análisis realizados al zumo de granada inicial y a los zumos clarificados (Permeado) después de la filtración tangencial con distintas membranas.

Los resultados obtenidos sobre la influencia en el color del zumo de granada durante el proceso de filtración tangencial indican que, en el caso del color rojo (parámetro a^*) se produce una disminución en ambas membranas, siendo esta caída más acusada en el caso de la membrana de $0.2 \mu\text{m}$. Los porcentajes de pérdida de este parámetro son de 84.86 % en el caso de la membrana de $0.2 \mu\text{m}$ y de 81.40 % en la membrana de $0.1 \mu\text{m}$.

Además, la turbidez determinada como la medida espectrofotométrica a 700 nm indicó que los valores obtenidos son inferiores en el caso de la ultrafiltración, ya que con este proceso se retienen mayor número de partículas y por lo tanto se obtienen zumos más clarificados. La filtración tangencial con la membrana de $0.2 \mu\text{m}$ disminuye la turbidez en un 12.78 % con respecto al valor inicial y la membrana de $0.1 \mu\text{m}$ un 36.84 %. Por tanto, con este resultado podemos confirmar que para la obtención de un zumo más clarificado (menor turbidez) la mejor membrana sería la de $0.1 \mu\text{m}$.

En cuanto al contenido en sólidos solubles de los zumos, el proceso de ultrafiltración es el que mayor pérdida ocasiona, con una pérdida del 9.73 % vs 2.35 % en el caso de la microfiltración.

La absorbancia a 420 nm nos indica el pardeamiento (o color amarillo) en el zumo de granada. Los procesos de ultrafiltración y microfiltración producen una disminución del pardeamiento como determinado mediante medida espectrofotométrica ya que el valor del zumo inicial es mayor que el de los zumos clarificados. Además, el



color rojo (Abs 520 nm) indica lo contrario que la determinación con el colorímetro ya que la membrana que mayor pérdida de color rojo produce es la de 0.1 μm .

Tabla 12. Resultados fisicoquímicos de zumos de granada clarificados por microfiltración y ultrafiltración

Parámetro	Inicial		Microfiltración		Ultrafiltración	
	Media	\pm SD	Media	\pm SD	Media	\pm SD
L*	16.56	0.10	14.54	0.01	14.34	0.03
a*	2.03	0.15	0.31	0.04	0.38	0.04
b*	1.16	0.05	-0.03	0.04	0.03	0.04
C*	4.11	0.15	0.57	0.06	0.70	0.08
Hue	32.14	2.99	34.27	1.10	33.00	0.00
° Brix	15.36	0.30	15.00	0.00	13.87	0.12
Abs 420 nm	6.27	0.58	5.72	0.13	4.93	0.11
Abs 520 nm	1.34	0.17	1.38	0.04	1.08	0.03
Abs 700 nm	0.22	0.04	0.19	0.02	0.14	0.04
Polifenoles totales (mg/L)	2615.83	67.15	2569.43	209.90	2370.85	47.39
Dp-3,5 (mg/L)	0.99	0.17	1.42	0.02	1.18	0.01
Cy-3,5 (mg/L)	16.89	1.38	18.92	0.06	17.53	0.51
Pg-3,5 (mg/L)	1.64	0.26	1.93	0.05	1.71	0.02
Dp-3 (mg/L)	0.95	0.16	1.21	0.02	0.91	0.02
Cy-3 (mg/L)	6.40	0.84	8.30	0.01	7.30	0.03
Pg-3 (mg/L)	0.85	0.29	1.20	0.01	0.93	0.02
Antocianos totales (mg/L)	27.73	2.55	32.97	0.13	29.56	0.46
Punicalina α (mg/L)	394.77	42.27	428.90	0.10	402.89	1.83
Punicalina β (mg/L)	255.29	27.84	280.78	0.72	260.08	0.88
Punicalagina α (mg/L)	221.18	17.88	104.62	0.54	101.38	1.51
Punicalagina β (mg/L)	328.14	29.27	258.28	2.84	214.09	0.36
Punicalaginas totales (mg/L)	549.32	28.93	362.91	3.39	315.48	1.21
Punicalinas totales (mg/L)	650.06	70.03	709.67	0.71	662.97	2.67
Ácido Elágico (mg/L)	465.88	165.57	111.47	1.38	19.16	0.05



Si nos centramos en la concentración de compuestos bioactivos, el zumo de granada experimenta una pequeña disminución de los polifenoles totales después de la filtración tangencial, siendo ésta pérdida mayor en el caso de la membrana de menor tamaño. Sin embargo, estos resultados no son significativos.

Al finalizar la clarificación del zumo de granada tanto por microfiltración como por ultrafiltración, el contenido en antocianos individuales y totales del zumo permeado es prácticamente igual al zumo inicial, observándose un ligero incremento en la filtración con la membrana de 0.2 μm debido posiblemente a la rotura celular durante el proceso y la liberación al zumo de los antocianos, así como un pequeño efecto de concentración que tiene lugar durante el proceso. Según otros estudios, el proceso de clarificación mediante ultrafiltración puede disminuir la concentración de antocianos totales en el zumo entorno a un 12 % (Cassano et al., 2011). Sin embargo, en nuestro caso se produce un incremento de un 18.92 % y 6.61 % en el caso de la microfiltración y ultrafiltración respectivamente. El antociano que mayor concentración se encuentra en el zumo de granada es la cianidina 3,5-diglucósido. Según Cassano et al., 2011, los antocianos monoglucosilados son los que presentan mayor pérdida durante la ultrafiltración y en nuestro caso, esto no es confirmado.

En cuanto al contenido en punicalinas, el zumo de granada presenta una concentración mayor de punicalina α que de punicalina β y además, esta concentración se ve aumentada con ambos procesos de filtración, incrementándose en un 8.65 y 9.98 % en el caso de la microfiltración y 2.06 y 1.88 % en la ultrafiltración.

Al contrario que en el caso de las punicalinas, la concentración de punicalaginas β es muy superior a la α y además, ésta concentración se ve disminuida por ambos procesos de filtración. El proceso de microfiltración produce una disminución de un 52.70 y 21.29 % de punicalagina α y β y el de ultrafiltración de 53.16 y 34.75 % respectivamente. Por tanto, podemos decir que el contenido en punicalaginas se ve más afectado por el tratamiento con la membrana de 0.1 μm viéndose este parámetro muy influido por el tamaño de poro.

La filtración tangencial produce una gran disminución de la concentración de ácido elágico, siendo mayor esta pérdida cuanto menor es el poro de la membrana. En el



caso de la utilización de la membrana de 0.2 μm se produce una pérdida del 76.07 % y con la membrana de 0.1 μm del 95.89 %.

En un estudio realizado por [Mirsaeedghazi et al., 2012](#), se evaluó la influencia de la filtración tangencial para la clarificación de zumo de granada. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que los parámetros fisicoquímicos del zumo como pH, acidez, sólidos solubles, polifenoles totales, antocianos y la capacidad antioxidante no variaron comparando microfiltración y ultrafiltración. Sin embargo, en nuestro estudio se puede comprobar cómo el tamaño de poro de la membrana utilizada para la clarificación del zumo de granada es factor muy importante en las características fisicoquímicas del zumo obtenido.

Conclusión

- La membrana de 0.2 μm parece ser que es la membrana con la que mayor caudal de filtración se obtiene y la que menos influye en las propiedades fisicoquímicas del zumo de granada.

5.2.3 Estudio de la influencia de hidrólisis enzimática en los parámetros fisicoquímicos del zumo de granada previo a la filtración tangencial

El zumo de granada contiene en su matriz una alta concentración de moléculas que pueden influir de forma negativa en el caudal de filtración mediante tecnología de membranas. Por ello, se planteó un estudio para determinar el efecto en el caudal de filtración de un pretratamiento enzimático del zumo.

Para evaluar la influencia de la hidrólisis enzimática en los compuestos del zumo de granada y el rendimiento de clarificación por filtración tangencial, se realizaron dos ensayos distintos con enzimas comerciales y se determinó si había algún cambio en las propiedades fisicoquímicas del zumo. La hidrólisis enzimática del zumo puede influir de forma positiva en el caudal de filtración durante los procesos de microfiltración y ultrafiltración al degradar compuestos de gran tamaño que pueden quedar colmatando la



membrana de filtración, como sugieren varios autores (Barros et al., 2004; Pinelo et al., 2010; Santón et al., 2008).

Para ello, el zumo de granada depositado en el tanque de alimentación se sometió a un tratamiento previo a la filtración tangencial con dos enzimas comerciales distintas. Estas dos enzimas utilizadas fueron Viscozyme® L (Novozymes) con actividad celulasa y hemicelulasa y Fructozym® color (Erbslöh) con actividad pectinasa.

Se prepararon dos cócteles enzimáticos que contenían **350 ppm de Viscozyme L y 150 ppm de Fructozym color (Tratamiento 1)** y otro con **150 ppm de Viscozyme L y 350 ppm de Fructozym color (Tratamiento 2)**. El zumo de granada se colocó en un tanque y se calentó hasta 25 °C. Una vez alcanzada la temperatura se les añadió los cócteles enzimáticos y se mantuvo en recirculación durante 30 minutos a una temperatura entre 27 - 30 °C.

Una vez finalizado el tratamiento enzimático del zumo se procedió al análisis de estos zumos y se compararon con los valores del zumo inicial, para determinar la influencia del proceso en parámetros de color, ° Brix y compuestos bioactivos.

5.2.3.1 Resultados fisicoquímicos

El zumo de granada utilizado en los ensayos y el zumo de granada hidrolizado enzimáticamente se sometió a un análisis de todos los parámetros fisicoquímicos comentados anteriormente para evaluar la influencia del tratamiento. En la **tabla 13** se muestran los resultados obtenidos.



Tabla 13. Resultados fisicoquímicos de zumos de granada hidrolizados enzimáticamente

Parámetro	Inicial		350 ppm Viscozym +150 ppm Fructozym		150 ppm Viscozym +350 ppm Fructozym	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
L*	16.56	0.10	17.89	0.01	16.68	0.02
a*	2.03	0.15	2.87	0.03	1.91	0.02
b*	1.16	0.05	1.86	0.02	1.09	0.02
C*	4.11	0.15	5.90	0.06	3.88	0.03
Hue	32.14	2.99	35.87	0.13	31.84	0.56
° Brix	15.36	0.30	14.07	0.12	14.93	0.12
Abs 420 nm	6.27	0.58	5.63	0.03	5.57	0.14
Abs 520 nm	1.34	0.17	0.93	0.01	1.26	0.07
Abs 700 nm	0.22	0.04	0.11	0.00	0.24	0.06
Polifenoles totales (mg/L)	2615.83	67.15	2340.51	16.60	2847.45	75.64
Dp-3,5 (mg/L)	0.99	0.17	1.21	0.10	1.07	0.06
Cy-3,5 (mg/L)	16.89	1.38	15.11	0.27	16.01	0.91
Pg-3,5 (mg/L)	1.64	0.26	1.48	0.07	1.45	0.11
Dp-3 (mg/L)	0.95	0.16	0.91	0.06	0.98	0.16
Cy-3 (mg/L)	6.40	0.84	5.22	0.59	6.29	0.45
Pg-3 (mg/L)	0.85	0.29	0.64	0.08	0.86	0.15
Antocianos totales (mg/L)	27.73	2.55	24.57	1.16	26.67	1.82
Punicalina α (mg/L)	394.77	42.27	336.53	15.72	373.99	28.58
Punicalina β (mg/L)	255.29	27.84	214.07	11.50	243.00	17.48
Punicalagina α (mg/L)	221.18	17.88	202.63	8.01	191.57	2.13
Punicalagina β (mg/L)	328.14	29.27	336.00	9.03	313.87	6.20
Punicalinas totales (mg/L)	650.06	70.03	550.61	27.20	616.99	45.76
Punicalaginas totales (mg/L)	549.32	28.93	538.62	2.04	505.44	8.22
Ácido Elálgico (mg/L)	465.88	165.57	453.37	135.20	556.28	2.32



El tratamiento enzimático del zumo de granada no parece influir de forma negativa en la mayoría de los parámetros determinados.

En cuanto al color del zumo de granada, el tratamiento 1 parece ser que ejerce un efecto bastante positivo sobre todo en el color rojo, ya que llega a incrementarlo (1.16 vs 1.86) (Parámetro a*). Sin embargo, el color rojo determinado mediante espectrofotometría a 520 nm indicó que se produce una pérdida de éste en un 30.44 % en el tratamiento 1 y de un 6.01 % en el tratamiento 2.

El pardeamiento del zumo determinado espectrofotométricamente (Abs 420 nm) indicó que el tratamiento 2 disminuye este parámetro más que el tratamiento 1. Además, la determinación de la turbidez indicó que el tratamiento 1 consigue disminuirla en un 52.48 % y, el tratamiento 2 llega a incrementarla ligeramente, aunque este resultado no es significativo.

El contenido en sólidos solubles experimenta una pérdida del 8.43 % en el tratamiento 1 y un 2.78 % en el tratamiento 2.

En el caso del contenido en polifenoles totales, el tratamiento 2 consigue liberar más polifenoles al zumo a pesar de que la pérdida del otro tratamiento es mínima (10.53 %). El contenido en antocianos totales se ve afectado mínimamente observándose unos % de pérdida de 11.38 y 3.83 en los tratamientos 1 y 2 respectivamente. De igual modo, el contenido en punicalaginas totales y punicalinas experimentan una ligera disminución de un 1.95 y 15.30 % en el caso del tratamiento 1 y un 5.09 y 7.99 % en el tratamiento 2. En el caso del ácido elágico se observó un comportamiento distinto en ambos tratamientos ya que el tratamiento 1 produce una pérdida de un 2.69 % y el tratamiento 2 produce un incremento de un 19.41 %.



Conclusión

- El tratamiento realizado al zumo de granada consistente en 150 ppm de Viscozyme L y 350 ppm de Fructozym color parece ser el que mejor preserva los compuestos y el color del zumo y además, con la degradación que produce, se logra incrementar algunos de los parámetros.

5.2.4 Estudio de filtración tangencial de zumo pretratado enzimáticamente

Una vez evaluada la influencia del pretratamiento enzimático realizado al zumo de granada sobre las propiedades fisicoquímicas del mismo, se plantearon dos ensayos de filtración tangencial de estos zumos para evaluar el efecto en el caudal de filtración por membranas.

Para ello, los zumos tratados enzimáticamente se depositaron en el tanque de alimentación y se pasaron por las membranas de 0.1 μm y 0.2 μm durante 90 minutos a una presión de 4 bares y a una temperatura de entre 27 - 30 °C, obteniéndose datos de caudal, temperatura y pH a lo largo del proceso.

Se tomaron muestras de zumo inicial y permeado al final del proceso para realizar las determinaciones analíticas ya mencionadas previamente.

5.2.4.1 Resultados del caudal de filtración

En la siguiente figura (**Figura 39**) se muestran los resultados del caudal de filtración de los distintos zumos tratados enzimáticamente y filtrados mediante microfiltración (**A**) y ultrafiltración (**B**).

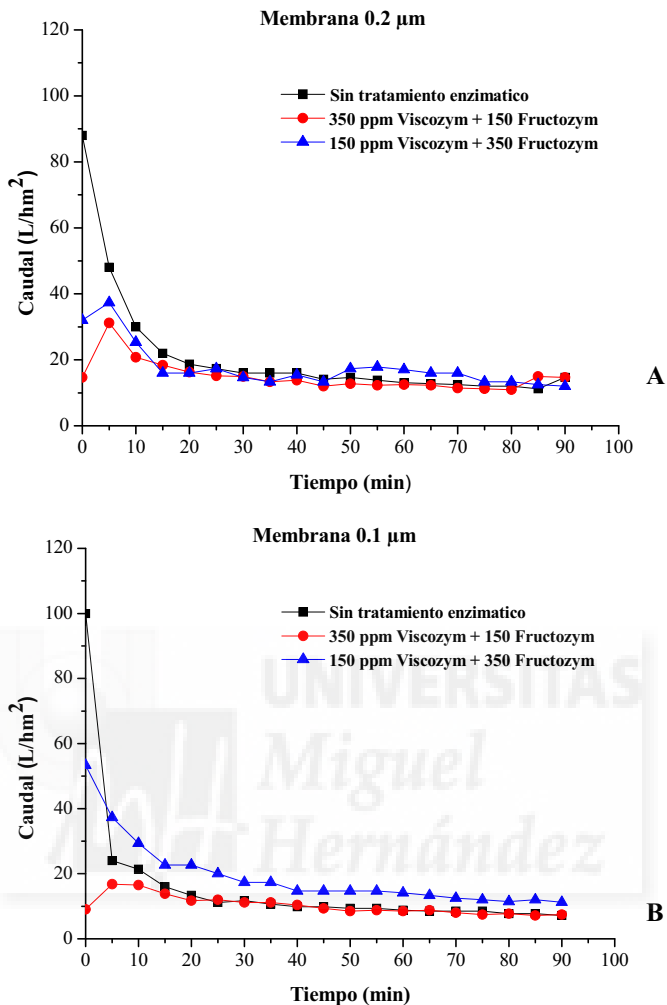


Figura 39. Caída del caudal de filtración con membrana de 0.2 μm (A) y 0.1 μm (B) en zumos de granada sin y con pretratamiento enzimático con 350 ppm de Viscozyme L y 150 ppm de Fructozym color y 150 ppm de Viscozyme L y 350 ppm de Fructozym color

Los resultados del caudal de filtración del zumo de granada pretratado enzimáticamente indicaron que, en el caso de la membrana de 0.2 μm (Figura 39A) no existen grandes diferencias de caudal entre los dos tratamientos enzimáticos utilizados, observándose un ligero incremento cuando el zumo ha sido tratado con 150 ppm de Viscozyme L y 350 ppm de Fructozym color. Los caudales obtenidos al final del proceso de filtración fueron de 14.67 y 12 en el caso de los tratamientos 1 y 2



respectivamente. Si los comparamos con el valor del caudal del zumo sin pretratamiento (14.67 L/hm^2), observamos que el pretratamiento enzimático no produce un incremento en el caudal.

En el caso del zumo pretratado y filtrado con la membrana de $0.1 \mu\text{m}$ (**Figura 39B**), se observa una diferencia entre caudal obtenido con el zumo tratado con el tratamiento 2 (150 ppm de Viscozyme L y 350 ppm de Fructozym color) y el caudal del zumo sin tratamiento enzimático. Al final de la filtración tangencial en este caso se obtuvieron caudales de filtración de 7.47 y 11.25 L/hm^2 que al ser comparados con el valor del zumo sin pretratar (7.20 L/hm^2) puede observarse un incremento.

Al comparar los resultados de las dos membranas podemos confirmar que, el pretratamiento enzimático puede aumentar el rendimiento de filtración con la membrana de ultrafiltración y que no produce diferencias en el proceso de microfiltración. Además, puede observarse como el caudal se estabiliza a los 40 minutos de filtración en ambas membranas y que la caída de caudal de filtración es más lenta en el caso de la membrana de $0.1 \mu\text{m}$.

5.2.4.2 Resultados de las propiedades fisicoquímicas

En la **Tabla 14**, se muestran los resultados de los análisis realizados a los zumos de granada iniciales y a los zumos clarificados (Permeado) después del pretratamiento enzimático con 350 ppm de Viscozyme L (V) y 150 ppm de Fructozym color (F) y 150 ppm de Viscozyme L y 350 ppm de Fructozym color y la filtración tangencial con distintas membranas.

Tabla 14. Resultados fisicoquímicos de zumos de granada pretratados enzimáticamente y clarificados por microfiltración y ultrafiltración

Parámetro	350 ppm V+150 F ppm		150 ppm V+350 F ppm					
	Membrana 0.2 µm		Membrana 0.1µm		Membrana 0.2 µm		Membrana 0.1 µm	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
L*	14.93	0.02	14.58	0.02	14.80	0.01	14.62	0.02
a*	0.73	0.06	0.51	0.08	0.46	0.01	0.35	0.08
b*	0.16	0.04	0.17	0.06	0.05	0.04	0.04	0.04
C*	1.36	0.12	1.00	0.13	0.85	0.02	0.66	0.13
Hue	13.12	2.83	15.76	1.65	8.78	2.57	11.51	3.99
° Brix	14.07	0.12	13.07	0.12	13.20	0.20	12.80	0.20
Abs 420 nm	4.13	0.13	2.25	0.07	2.41	0.17	3.11	0.20
Abs 520 nm	0.81	0.07	0.42	0.01	0.50	0.04	0.66	0.07
Abs 700 nm	0.12	0.05	0.04	0.00	0.05	0.02	0.13	0.06
Polifenoles totales (mg/L)	2003.44	59.03	1588.74	38.29	1771.56	99.17	1834.68	16.06
Dp-3.5 (mg/L)	1.07	0.04	1.21	0.02	1.02	0.01	1.13	0.01
Cy-3.5 (mg/L)	13.32	0.41	11.51	0.04	11.62	0.04	12.03	0.06
Pg-3.5 (mg/L)	1.15	0.01	0.80	0.01	0.84	0.01	0.93	0.02
Dp-3 (mg/L)	0.25	0.05	0.19	0.01	0.22	0.01	0.20	0.01
Cy-3 (mg/L)	5.06	0.04	4.97	0.04	5.19	0.03	5.12	0.01
Pg-3 (mg/L)	0.66	0.10	0.51	0.01	0.53	0.02	0.56	0.03
Antocianos totales (mg/L)	21.50	0.22	19.19	0.04	19.42	0.08	19.96	0.07

Tabla 14 (Continuación). Resultados fisicoquímicos de zumos de granada pretratados enzimáticamente y clarificados por microfiltración y ultrafiltración

Parámetro	350 ppm V+150 F ppm			150 ppm V+350 F ppm		
	Membrana 0.2 µm		Membrana 0.1 µm	Membrana 0.2 µm		Membrana 0.1 µm
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
Punicalina α (mg/L)	295.42	1.16	277.18	0.95	278.61	0.52
Punicalina β (mg/L)	190.62	0.57	177.74	1.48	178.30	0.87
Punicalagina α (mg/L)	175.43	0.57	43.08	0.49	68.65	0.42
Punicalagina β (mg/L)	223.45	0.50	71.35	0.99	83.72	0.47
Punicalinas totales (mg/L)	486.04	1.58	531.23	66.05	558.43	88.92
Punicalaginas totales (mg/L)	398.88	0.95	114.42	0.63	152.38	0.17
Ácido Elálgico (mg/L)	128.29	0.61	14.95	0.37	32.30	0.83



En cuanto al color del zumo de granada tratado enzimáticamente y sometidos procesos de microfiltración y ultrafiltración podemos decir que, los dos tratamientos enzimáticos ensayados producen el mismo en el color rojo, pudiéndose observar que el tratamiento con 150 ppm Viscozym y 350 ppm Fructozym produce una ligera disminución mayor que el tratamiento contrario.

Además, el pardeamiento sigue siendo inferior al valor obtenido para el zumo inicial y la turbidez es mucho mayor que cuando sólo se utiliza la filtración por membranas. El valor obtenido de la turbidez determinada por absorbancia a 700 nm fue de 0.19 y 0.14 en el caso de la microfiltración y la ultrafiltración respectivamente. Sin embargo, el zumo pretratado y filtrado presenta unos valores de entre 0.04 y 0.13 ua.

El contenido en polifenoles totales determinados por el método Folin-Ciocalteu indicó que, el pretratamiento previo del zumo y posterior filtración reducen en gran medida su concentración en el zumo. Puesto que el tratamiento enzimático no modificó la concentración de polifenoles totales, esto puede indicar que los compuestos resultantes de la hidrólisis son más pequeños y por tanto pueden ser eliminados en el proceso de filtración.

El contenido en antocianos totales del zumo se ve afectado por el proceso de filtración ya que el tratamiento enzimático no influyó. Inicialmente, los zumos clarificados por microfiltración y ultrafiltración presentaron un contenido en antocianos totales de 32.97 y 29.52 mg/L respectivamente. Sin embargo, después de la hidrólisis enzimática con 350 ppm V + 150 ppm F se reducen hasta un 21.50 y 19.19 mg/L y con el tratamiento con 150 ppm V + 350 ppm F también se reducen, obteniéndose un contenido de 19.42 y 19.96 mg/L.

El contenido en punicalinas y punicalaginas totales no experimenta variación con respecto al zumo pretratado enzimáticamente pero sin embargo, el contenido en ácido elágico experimenta una gran pérdida, pasando de estar presente en el zumo tratado enzimáticamente a una concentración de 453.37 y 556.28 mg/L (tratamiento 1 y 2 respectivamente) a concentraciones de 128.29 y 14.95 mg/L en el zumo con tratamiento 1 y filtrado con membrana de 0.2 μm y 0.1 μm respectivamente y 32.30 y



35.29 mg/L en el zumo con tratamiento 2 y filtrado con membrana de 0.2 μm y 0.1 μm respectivamente.

Con estos resultados podemos decir que el pretratamiento enzimático del zumo de granada puede producir una degradación de determinados compuestos presentes en el mismo produciendo que durante la filtración tangencial estos compuestos puedan ser eliminados.

Para concluir este apartado, se presentarán los porcentajes de pérdida de todos los parámetros fisicoquímicos de ensayos realizados para poder comparar y elegir el tratamiento ideal para la clarificación del zumo de granada mediante tecnología de membranas (**Tabla 15**).





Tabla 15. Porcentajes de pérdida en los parámetros de zumo de granada clarificado por filtración tangencial

Parámetro	Sin tratamiento enzimático						350 ppm V +150 ppm F		150 ppm V +350 ppm F		350 ppm V +150 ppm F		150 ppm V +350 ppm F	
	Membrana 0.2 µm		Membrana 0.1 µm		Sin Filtración tangencial		Sin Filtración tangencial		Sin Filtración tangencial		Membrana 0.2 µm		Membrana 0.1 µm	
	0.2 µm	0.1 µm	0.2 µm	0.1 µm	0.2 µm	0.1 µm	0.2 µm	0.1 µm	0.2 µm	0.1 µm	0.2 µm	0.1 µm	0.2 µm	0.1 µm
L*	12.20	13.42	-8.01	-41.56	-0.68	5.51	9.84	63.95	11.99	10.63	11.75	77.45	82.55	
A*	84.86	81.40	-59.60	-43.41	6.02	5.72	85.96	67.00	85.10	95.99	96.28	79.41	84.03	
B*	102.58	83.06	-11.59	8.43	2.78	0.93	59.17	8.43	14.94	72.70	64.19	14.07	16.67	
C*	86.22	-2.67	10.23	30.44	6.01	11.15	39.77	34.14	64.19	61.61	50.34	62.41	50.74	
Hue	-6.61	9.37	52.48	10.53	-6.77	-8.85	44.96	23.41	81.65	78.95	40.75	32.28	29.86	
° Brix	2.35	-19.40	-22.43	-7.61	-7.61	-7.45	-22.16	-7.45	-22.16	-2.75	-13.87	-2.75	-13.87	
Abs 420 nm	8.79	-3.82	10.55	5.18	5.18	21.14	30.07	21.14	31.86	31.20	28.77	31.20	28.77	
Abs 520 nm	-2.48	-3.98	10.08	18.49	11.50	1.84	73.88	21.05	51.07	48.58	43.53	48.58	43.53	
Abs 700 nm	12.78	4.45	4.13	18.49	-3.26	1.84	80.18	21.05	80.18	77.30	79.13	77.30	79.13	
Polifenoles totales (mg/L)	1.77	-9.21	24.33	-1.52	-1.52	3.83	22.25	22.25	40.61	37.78	34.65	37.78	34.65	
Dp-3,5 (mg/L)	-42.73	-6.61	11.38	3.83	3.83	22.46	22.46	22.46	30.79	29.95	28.02	29.95	28.02	
Cy-3,5 (mg/L)	-12.05	-13.96	18.49	1.84	1.84	22.46	22.46	22.46	30.79	29.95	28.02	29.95	28.02	
Pg-3,5 (mg/L)	-17.73	-9.21	24.33	-1.52	-1.52	3.83	22.25	22.25	40.61	37.78	34.65	37.78	34.65	
Dp-3 (mg/L)	-26.69	4.45	4.13	18.49	-3.26	1.84	80.18	21.05	80.18	77.30	79.13	77.30	79.13	
Cy-3 (mg/L)	-29.58	-13.96	18.49	1.84	1.84	22.46	22.46	22.46	30.79	29.95	28.02	29.95	28.02	
Pg-3 (mg/L)	-40.80	-9.21	24.33	-1.52	-1.52	3.83	22.25	22.25	40.61	37.78	34.65	37.78	34.65	
Antocianos totales (mg/L)	-18.92	-6.61	11.38	3.83	3.83	22.46	22.46	22.46	30.79	29.95	28.02	29.95	28.02	



Tabla 15 (Continuación). Porcentajes de pérdida en los parámetros de zumo de granada clarificado por filtración tangencial

Parámetro	Sin tratamiento enzimático		350 ppm V +150 ppm F		150 ppm V +350 ppm F		350 ppm V +150 ppm F		150 ppm V +350 ppm F	
	Membrana 0,2 µm	Membrana 0,1 µm	Sin Filtración tangencial	Sin Filtración tangencial	Sin Filtración tangencial	Sin Filtración tangencial	Membrana 0,2 µm	Membrana 0,1 µm	Membrana 0,2 µm	Membrana 0,1 µm
Punicalina α (mg/L)	-8.65	-2.06	14.75	5.26	25.16	29.79	29.43	22.86	22.86	22.86
Punicalina β (mg/L)	-9.98	-1.88	16.15	4.81	25.33	30.38	30.16	22.98	22.98	22.98
Punicalagina α (mg/L)	52.70	54.16	8.39	13.39	20.69	80.52	68.96	79.35	79.35	79.35
Punicalagina β (mg/L)	21.29	34.75	-2.40	4.35	31.90	78.26	74.49	77.38	77.38	77.38
Punicalinas totales (mg/L)	33.94	42.57	15.30	5.09	25.23	18.28	14.10	10.58	10.58	10.58
Punicalaginas totales (mg/L)	-9.17	-1.99	1.95	7.99	27.39	79.17	72.26	78.17	78.17	78.17
Ácido Elágico (mg/L)	76.07	95.89	2.69	-19.41	72.46	96.79	93.07	92.42	92.42	92.42

*Valores negativos indica ganancia



5.2.5 Análisis estadístico

El análisis ANOVA de los resultados obtenidos del análisis físico-químico de los zumos filtrados mediante filtración tangencial, con y sin pretratamiento enzimático indicaron que, en el caso del color rojo (parámetro a^*) no se observan diferencias significativas ($P > 0.05$; Test Fisher) entre la filtración por membrana de $0.2 \mu\text{m}$ y $0.1 \mu\text{m}$, el tratamiento del zumo con 150 ppm Viscozym + 350 ppm Fructozym filtrado por $0.2 \mu\text{m}$ y el mismo tratamiento seguido de filtración por $0.1 \mu\text{m}$, así como estos dos tratamientos y el zumo filtrado por $0.1 \mu\text{m}$. Además tampoco se observan diferencias entre el tratamiento del zumo con 150 ppm Viscozym + 350 ppm Fructozym seguido de ultrafiltración y la filtración con membranas 0.1 y $0.2 \mu\text{m}$.

Si nos centramos en la turbidez mediante la medida de la absorbancia a 700 nm , no existen diferencias significativas entre el zumo inicial y la filtración por membrana de $0.2 \mu\text{m}$ y entre la microfiltración y ultrafiltración. Además, en el caso del pretratamiento con 350 ppm Viscozym + 150 ppm Fructozym, la filtración posterior por microfiltración no produce diferencias en el zumo.

En el caso del contenido en polifenoles totales, no se observan diferencias significativas entre el zumo inicial y la microfiltración, así como entre la ultrafiltración y el pretratamiento con 350 ppm Viscozym + 150 ppm Fructozym, y el tratamiento del zumo con 150 ppm Viscozym + 350 ppm Fructozym y posterior ultrafiltración y microfiltración.

El contenido en antocianos totales no presenta diferencias significativas entre el zumo inicial y la ultrafiltración. Además, en los zumos con pretratamiento enzimático y posterior microfiltración y ultrafiltración no se observan diferencias ($P > 0.05$; Test Fisher).

El contenido en punicalinas es el parámetro en el que menos diferencias se observan entre los tratamientos de clarificación realizados al zumo de granada. Los tratamientos enzimáticos realizados, así como la posterior filtración tangencial influyen de manera decisiva en el contenido de este compuesto.



Sólo se observan diferencias significativas en el contenido en punicalaginas entre el tratamiento del zumo con 350 ppm Viscozym + 150 ppm Fructozym filtrado por 0.1 μm y el tratamiento con 150 ppm Viscozym + 350 ppm Fructozym también utilizando ultrafiltración. Este compuesto se ve muy influenciado por el proceso de clarificación.

El análisis estadístico del contenido en ácido elágico en los zumos clarificados comparados con el zumo inicial indicó que, en el caso del zumo tratado con 350 ppm Viscozym + 150 ppm Fructozym no se observan diferencias cuando posteriormente se somete a ultrafiltración y microfiltración, de igual modo que el tratamiento con Zumo 150 ppm Viscozym + 350 ppm Fructozym.

5.2.6 Conclusiones

- El caudal de filtración es mayor cuanto mayor es el tamaño del poro de la membrana y cuando el zumo es sometido a hidrólisis enzimática como pretratamiento.
- El zumo de granada clarificado únicamente por filtración tangencial experimenta una menor pérdida de las propiedades fisicoquímicas que el pretratado enzimáticamente. A mayor tamaño de poro menor pérdida de éstas propiedades.
- El pretratamiento enzimático del zumo de granada no produce grandes pérdidas en los compuestos bioactivos y los parámetros de color no se ven muy influidos.
- La realización de un pretratamiento enzimático al zumo y una posterior filtración tangencial contribuye a la estabilización del zumo y su clarificación con una pérdida de los compuestos pequeña.
- El cóctel enzimático de 350 ppm de Viscozym L y 150 ppm de Fructozym Color seguido de una microfiltración es la combinación que menor influye en el color y en la pérdida de compuestos bioactivos del zumo de granada.



- Como conclusión final, podemos decir que es posible aumentar el rendimiento de clarificación del zumo de granada mediante tecnología de membranas obteniendo un producto estable, agradable visualmente y que mantiene gran parte de sus compuestos bioactivos presentes en el zumo inicial.
- La clarificación convencional produce una mayor degradación del color rojo como medida de la absorbancia a 520 nm que la filtración tangencial.
- Ambos tratamientos son eficaces para disminuir la turbidez de los zumos.
- La degradación de los polifenoles totales del zumo de granada es similar en ambos tratamientos de clarificación (entre 25 y 30 %).



CAPÍTULO 6. Pasteurización de zumo de granada





CAPÍTULO 6. PASTEURIZACIÓN DE ZUMO DE GRANADA

La pasteurización es un tratamiento térmico suave, ya que emplea temperaturas y tiempos de contacto relativamente bajos ($T^a < 100\text{ }^{\circ}\text{C}$). Es muy efectiva en los zumos debido a que son medios ácidos y esta combinación evita la proliferación de microorganismos esporulados. Actualmente y con el almacenamiento a temperaturas de refrigeración es posible reducir la intensidad de los tratamientos térmicos a temperaturas cercanas a los $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Una vez obtenido el zumo, el mismo se somete a diferentes tratamientos de temperatura y tiempo con el objetivo de establecer las condiciones óptimas de pasteurización. En este caso, el zumo de granada tiene un pH ácido, inferior a 4. Por tanto, un tratamiento térmico adecuado nos permitiría obtener un producto microbiológicamente estable con propiedades organolépticas y nutricionales similares a los de la fruta de partida.

6.1 Pasteurización de zumo de granada en capilares de vidrio

Con el objetivo de determinar la relación de tiempo y temperatura adecuados para asegurar la calidad microbiológica del zumo de granada, se realizaron ensayos de pasteurización en capilares de vidrio.

El zumo utilizado para realizar los ensayos fue zumo de granada de la variedad Mollar turbio obtenido por presión de mitades de granada en una prensa hidráulica industrial, ya que es a priori el que mayor carga microbiana presenta y en el que la conductividad térmica estará más dificultada.

Para ello, se llenaron capilares de vidrio con $100\text{ }\mu\text{L}$ de zumo de granada y se sometió a un tratamiento térmico en un baño de aceite a distintas temperaturas y distintos tiempos. Una vez pasteurizados, se enfriaron con hielo y se procedió a realizar las analíticas correspondientes.



6.1.1 Determinación de la carga microbiana inicial del zumo

La carga microbiana inicial del zumo de granada turbio se cuantificó mediante el método descrito en el apartado de microbiología del capítulo metodología. Según esta determinación, la carga microbiana inicial del zumo fue de 51000 ufc/mL.

6.1.2 Determinación de la relación tiempo/temperatura óptima de pasteurización

Para la elección de la temperatura y el tiempo necesario de tratamiento adecuado para reducir la carga microbiológica el zumo de granada turbio en capilares de vidrio se sometió a temperaturas de 65, 75 y 90 °C durante distintos tiempos y se sembraron los 100 µL en placas con agar de recuento en placa (PCA) para su posterior incubación y recuento. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Los resultados obtenidos del recuento de microorganismos aerobios totales se muestran en la **tabla 16**.

Tabla 16. Recuento total y reducciones logarítmicas (Red Log) de zumo de granada turbio pasteurizado

Temperatura	Tiempo (s)	ufc/mL	Log ufc/mL	Red Log
65 °C	20	Ic	-	0.00
	30	320	2.51	2.20
	40	0	0.00	4.71
75 °C	10	0	0.00	4.71
	15	0	0.00	4.71
	20	0	0.00	4.71
90 °C	5	0	0.00	4.71
	10	0	0.00	4.71
	15	0	0.00	4.71

Según los resultados obtenidos (**Tabla X**) las temperaturas de pasterización idóneas para la reducción total de la carga microbiana inicial del zumo son: 75 °C y 90



°C. El zumo pasteurizado a 65 °C ha logrado reducir la carga microbiana inicial a los 40 segundos de tratamiento. Sin embargo, con 30 segundos de tratamiento se puede reducir la carga hasta los límites estipulados por la legislación. Con el tratamiento de 20 segundos no se observa ninguna reducción.

6.2 Pasteurización de zumo de granada semiindustrial

Los zumos de granada utilizados fueron zumos de granada de la variedad Mollar turbio y clarificado mediante centrifugación. Estos zumos se sometieron a pasteurización en un pasteurizador semiindustrial y a distintos análisis para determinar el efecto de la temperatura en los parámetros de calidad del zumo de granada.

6.2.1 Efecto del tratamiento de pasteurización sobre la microbiología del zumo

Al igual que en ensayos anteriores se determinó la microbiología inicial de los zumos turbio y clarificado. En este caso, se utilizaron distintos medios de cultivos selectivos y diferenciales para el crecimiento de hongos, levaduras, bacterias lácticas y microorganismos totales tal y como se describe en el apartado de microbiología del capítulo de metodología.

En la siguiente tabla (**Tabla 17**) se muestran los recuentos de microorganismos aerobios totales iniciales de los zumos de granada turbio y clarificado. Además, cabe destacar que tanto en el zumo turbio como clarificado, los microorganismos mayoritarios encontrados fueron levaduras, con unas concentraciones de 170000 y 65000 ufc/mL respectivamente, así como destacar la presencia de bacterias lácticas en el zumo turbio con una concentración de 100000 ufc/mL y en zumo clarificado de 40000 ufc/mL.



Tabla 17. Efecto del tratamiento térmico en la reducción microbiológica de zumos de Granada pasteurizados (Media \pm SD)

Tratamiento/Tipo de zumo	Recuento total (log ufc/mL)	Reducción microbiana (log ufc/mL)
Ninguno		
Turbio	5.59 \pm 0.13 a *	0.00 \pm 0.00
Clarificado	5.23 \pm 0.04 b	0.00 \pm 0.00
LTP 65 °C, 30 s		
Turbio	1.00 \pm 0.00 c	4.59 \pm 0.13
Clarificado	0.00 \pm 0.00 [#] d	5.23 \pm 0.04
HTP 90 °C, 5 s		
Turbio	0.00 \pm 0.00 d	5.59 \pm 0.13
Clarificado	0.00 \pm 0.00 d	5.23 \pm 0.04

*Valores en la misma columna seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

[#]No se observaron ufc. LTP, HTP: Baja y alta temperatura de pasteurización.

Las muestras de zumo de granada mostraron una población microbiana inicial de 5.2-5.6 ufc/mL aproximadamente (**Tabla 17**). Esta carga microbiana inicial tan alta puede ser debida al largo almacenamiento de la fruta en las cámaras de refrigeración. Sin embargo, los tratamientos térmicos realizados a las muestras logran reducir los recuentos microbianos por debajo de 1 ufc. Este resultado evidencia la eficacia del tratamiento térmico, independientemente de la temperatura y del tiempo de pasteurización. Pudimos observar que el recuento microbiológico fue superior a los rangos establecidos por otros autores de 3.0 - 4.0 log ufc/mL ([Alighourchi et al., 2008](#); [Ferrari et al., 2010](#)).

Naturalmente, los microorganismos encontrados en los zumos de granada sin pasteurizar son generalmente mohos y levaduras ya que pueden sobrevivir y tienen capacidad de crecimiento en condiciones de pH bajos ([Deak y Beuchat, 1996](#); [Tournas et al., 2006](#)), pueden limitar el crecimiento de otros grupos de microorganismos ([Suárez-Jacobo et al., 2010](#)) y además, pueden mantener un crecimiento bajo en temperaturas de refrigeración (5 °C), causando deterioro en el zumo. La inactivación de



los microorganismos fue significativa en ambos tratamientos de pasteurización, pero sólo el tratamiento a alta temperatura resultó eficaz para reducir el recuento microbiano a 0 en ambos zumos.

6.2.2 Efecto del tratamiento de pasteurización sobre el color del zumo

Para observar el efecto del tratamiento de pasteurización realizado al zumo de granada turbio y clarificado, se determinó la absorbancia a 520 nm, la densidad de color total y el índice de pardeamiento de acuerdo a los procedimientos descritos en el capítulo de metodología.

En la **figura 40** se muestran los resultados del color rojo del zumo de granada turbio y clarificado antes y después de pasteurizar cuantificado como la medida de la absorbancia a 520 nm.

Como se observa en la **Figura 40A**, la menor pérdida de color rojo se produce en el tratamiento de pasteurización a 65 °C 30 s, con un 3 % con respecto al valor del color rojo inicial del zumo. En el caso del tratamiento de pasteurización a 90 °C 5 s se produce una mayor pérdida (22 %). El análisis ANOVA de los datos indicó que existen diferencias significativas en cuanto al color rojo del zumo de granada pasteurizado y sin pasteurizar, y además, el efecto de la temperatura de pasteurización también presenta diferencias significativas ($P < 0.01$).

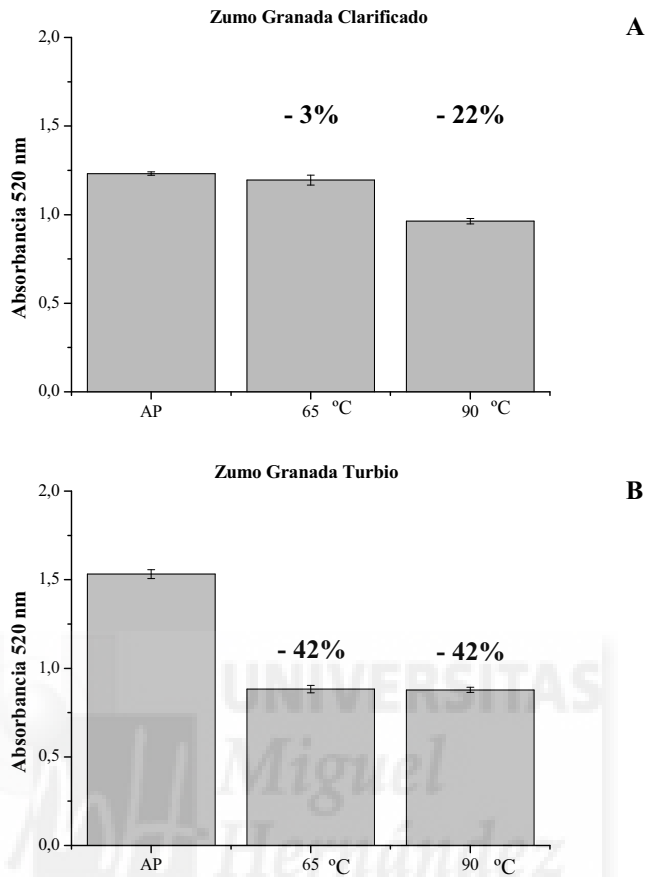


Figura 40. Efecto del tratamiento de pasteurización en el color rojo de zumo de granada clarificado (A) y turbio (B) (AP = antes de pasteurizar)

El zumo de granada turbio (**Figura 40B**) presenta una mayor pérdida de color rojo que el clarificado (42 %), observándose diferencias significativas entre los zumos pasteurizados y los no pasteurizados ($P < 0.01$) pero no observándose diferencia in cuanto al tratamiento realizado.

Los resultados de la densidad de color total del zumo de granada se muestran en la **figura 41**.

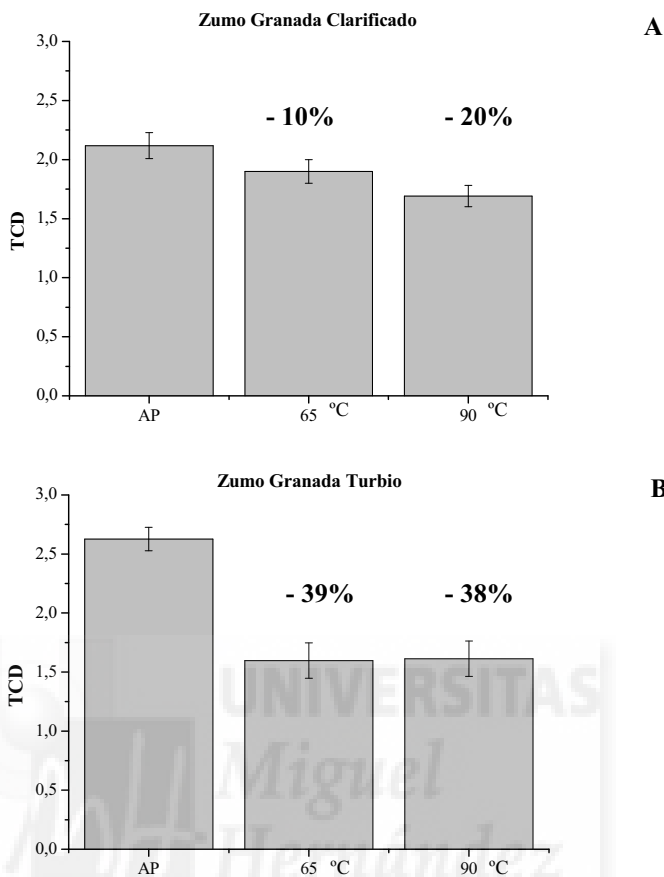


Figura 41. Efecto del tratamiento de pasteurización en la densidad de color total de zumo de granada clarificado (A) y turbio (B)

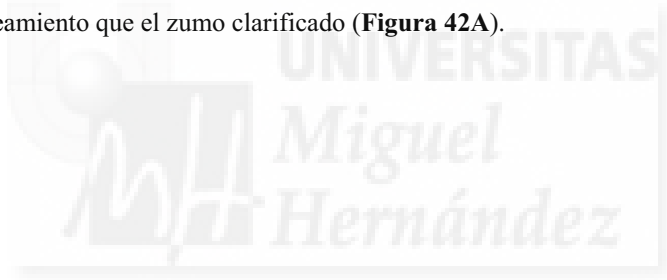
Al igual que en el caso del color rojo del zumo de granada, el efecto del tratamiento de pasteurización es diferente en el zumo de granada turbio y clarificado. El tratamiento de pasteurización a 65 °C 30 s produce una menor pérdida de la densidad de color total en el zumo clarificado (**Figura 41A**). El análisis estadístico de los datos indicó el tratamiento de pasteurización produce diferencias significativas entre los zumos pasteurizados y no pasteurizados y entre las dos temperaturas de pasteurización ($P < 0.01$).



Sin embargo, en el caso del zumo turbio (**Figura 41B**), los tratamientos de pasteurización producen un efecto en la densidad de color total significativo ($P < 0.01$), pero la disminución de la densidad de color es independiente del tratamiento realizado.

Según [Alper et al., 2005](#), el tratamiento de pasteurización afecta de forma positiva en la densidad de color total del zumo, aumentando el valor después del tratamiento en dos unidades. Esto puede ser debido a que en el cálculo, se tiene en cuenta la absorbancia a 420 nm responsable del color marrón del zumo y en este estudio, el zumo se mantuvo durante 20 minutos en agua a 100 °C, provocando un alto pardeamiento del zumo.

Por último, se determinó el índice de pardeamiento producido por el tratamiento de pasteurización en ambos zumos. Los resultados se muestran en la **Figura 42** y podemos observar como el zumo de granada turbio (**Figura 42B**) experimenta un mayor pardeamiento que el zumo clarificado (**Figura 42A**).



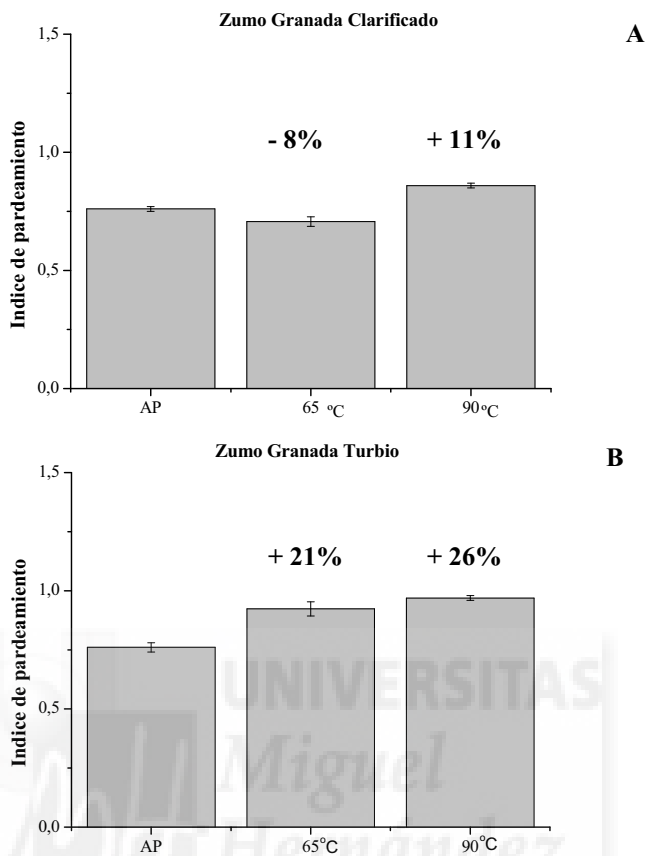


Figura 42. Efecto del tratamiento de pasteurización en el índice de pardeamiento de zumo de granada clarificado (A) y turbio (B)

Al igual que para el color rojo y la densidad de color, el zumo de granada turbio no presenta diferencias significativas entre los dos tratamientos de pasteurización a alta y baja temperatura. Sin embargo, el zumo clarificado pasteurizado a 65 °C 30 s experimenta una mejora del color rojo ya que el valor obtenido es negativo y significa que la componente roja es mayor a la amarilla-marrón. Además, el análisis estadístico indicó que ambos tratamientos de pasteurización producen diferencias significativas con respecto al zumo sin pasteurizar y además, el efecto de la temperatura de pasteurización también es diferente ($P < 0.01$).



Los resultados obtenidos en la determinación del pardeamiento del zumo de granada son inferiores a los descritos por otros autores, ya que en los estudios realizados por [Alper et al., 2005](#), la pasteurización provocó un aumento del pardeamiento del 40 %, valor razonable ya que mantuvieron el zumo de granada en agua caliente durante 20 minutos.

6.2.3 Efecto del tratamiento de pasteurización sobre el pH del zumo

La determinación del efecto del tratamiento de pasteurización en el pH del zumo de granada turbio y clarificado (**Figura 43**) indicó que no existen diferencias significativas entre las dos temperaturas de tratamiento y el zumo sin pasteurizar.

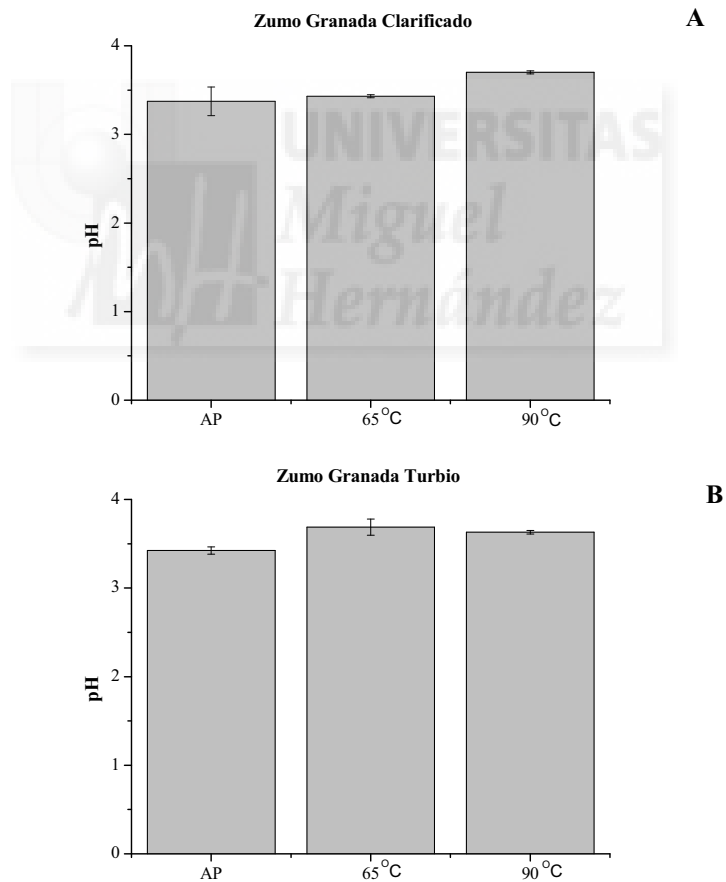


Figura 43. Efecto del tratamiento de pasteurización en el pH zumo de granada clarificado (A) y turbio (B)



Parece ser que el tratamiento térmico produce un ligero incremento del pH de los zumos posiblemente como consecuencia de la liberación al medio del contenido celular.

Según los datos publicados por [Uzuner et al., 2011](#), al igual que en nuestro caso, el tratamiento de pasteurización de zumo de granada a 85 °C 25 minutos provoca un aumento del pH.

6.2.4 Efecto del tratamiento de pasteurización sobre los polifenoles totales del zumo

El contenido en polifenoles totales del zumo turbio y clarificado sin pasteurizar y pasteurizado a alta y baja temperatura se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados se muestran en la **Figura 44**.

El contenido en polifenoles totales en ambos zumos es similar antes de la pasteurización. Sin embargo, el zumo de granada clarificado experimenta una pérdida de polifenoles totales después de la pasteurización a baja (6 %) y alta temperatura (9 %).

En el caso del zumo turbio, el contenido en polifenoles aumenta en ambos tratamientos (3 y 4 %), no observándose diferencias significativas entre ambos tratamientos.

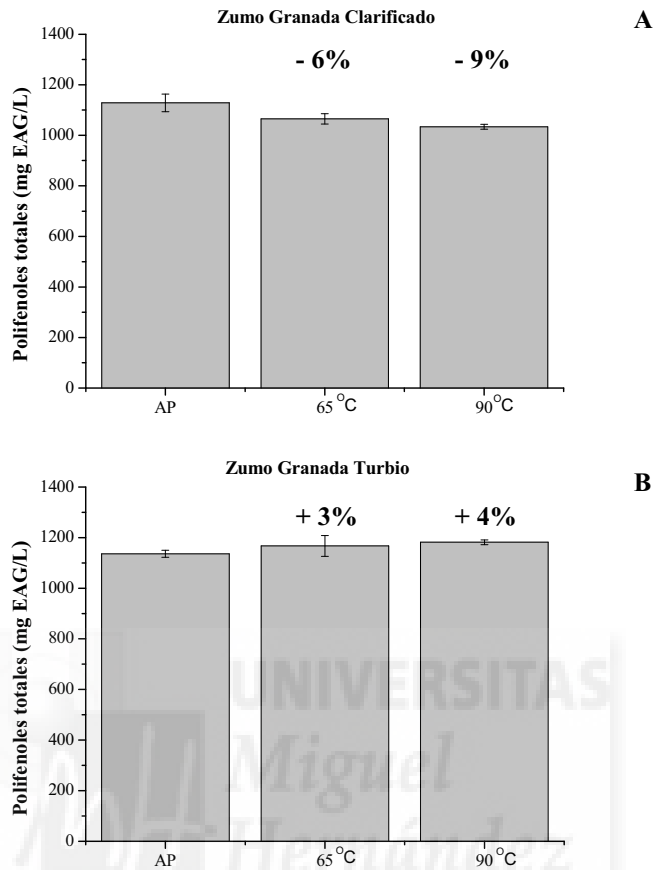


Figura 44. Efecto del tratamiento de pasteurización en el contenido en polifenoles totales de zumo de granada clarificado (A) y turbio (B)

Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios de pasteurización, donde la pérdida de polifenoles totales en zumo de granada fue del 7 % (Alper et al., 2005).

6.2.5 Efecto del tratamiento de pasteurización sobre la capacidad antioxidante

Los zumos de granada turbio y clarificado se sometieron también al análisis de la capacidad antioxidante por los métodos ABTS, FRAP y ORAC según se describe en el apartado de metodología.



En la **Figura 45** se muestran los datos obtenidos para cada zumo. Como se puede observar, el zumo de granada clarificado presenta valores superiores de capacidad antioxidante que el zumo turbio y además, estos resultados varían dependiendo del método de capacidad antioxidante empleado. El método FRAP no presenta variaciones significativas en ambos zumos, por lo que podríamos decir que, en el caso del zumo de granada, este método no sería efectivo para monitorizar pequeñas variaciones.

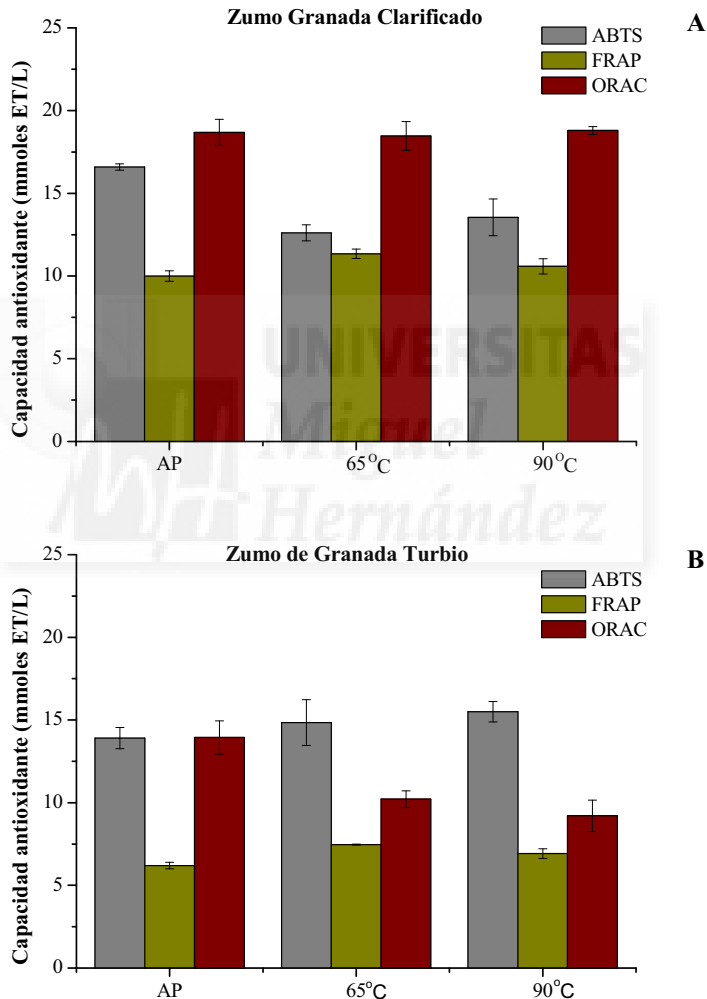


Figura 45. Efecto del tratamiento de pasteurización en la capacidad antioxidante de zumo de granada clarificado (A) y turbio (B)



En el caso del zumo clarificado (**Figura 45A**), la determinación de la capacidad antioxidante con el método ABTS indica unas pérdidas significativas del 24 % y 18 % en la pasteurización a baja y alta temperatura respectivamente ($P < 0.01$; Test Fisher). El método ORAC, al igual que el FRAP, muestra en este caso una ligera variación de la capacidad antioxidante, pudiendo esta incrementar en un 0.6 %. El análisis estadístico indicó que en la determinación de la capacidad antioxidante por los métodos FRAP y ORAC no se observan diferencias significativas de los tratamientos de pasteurización.

El zumo de granada turbio (**Figura 45B**), muestra pérdidas significativas con el método ORAC, con unas pérdidas del 27 % y 34 % en la pasteurización a baja y alta temperatura respectivamente. Sin embargo, con el método ABTS se experimenta un aumento de la capacidad antioxidante de un 6 y 11 % en ambos tratamientos.

El análisis estadístico de los datos indicó que el zumo de granada pasteurizado a baja temperatura no presenta diferencias significativas en la capacidad antioxidante comparado con los resultados obtenidos por el método ABTS, con el zumo sin pasteurizar. Sin embargo, el tratamiento de pasteurización a alta temperatura produce diferencias significativas tanto comparando con el zumo sin pasteurizar como el pasteurizado a baja temperatura ($P < 0.02$). La determinación por el método FRAP, indicó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos de pasteurización. Sin embargo, el método ORAC indicó que ambos tratamientos de pasteurización producen diferencias significativas comparando el zumo sin pasteurización y los pasteurizados a baja y alta temperatura ($P < 0.02$ y $P < 0.01$; Test Fisher) y además, entre ambos tratamientos no existen diferencias significativas.



6.3 Conclusiones

- Los tratamientos de pasteurización de 65 °C 30 y 40 segundos, 75 °C 10 - 20 segundos y 90 °C 5 - 15 son efectivos para reducir la carga microbiológica del zumo de granada prácticamente hasta límites indetectables.
- El tratamiento de pasteurización de 90 °C 5 segundos provoca mayores cambios en el zumo que el de 65 °C 30 segundos.
- El zumo de granada turbio presenta ganancia en el contenido en polifenoles. Sin embargo, presenta mayor pérdida de color y mayor pardeamiento que el zumo clarificado.
- En cuanto a la capacidad antioxidante, el zumo de granada clarificado es el que presenta mayor capacidad independientemente del tipo de método utilizado. El tratamiento de pasteurización a alta y baja temperatura no produce cambios significativos en la capacidad antioxidante de los zumos turbio y clarificado.

CAPÍTULO 7. Estudio de vida útil





CAPÍTULO 7. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL

El almacenamiento de los alimentos es un factor muy importante en la calidad de los productos alimenticios, ya que con el transcurso del tiempo, muchos de los compuestos o características de los mismos se pierden o cambian, modificando el producto y o bien, ya no es apetecible para el consumidor o no cumple los parámetros mínimos establecidos para ser un producto seguro y estándar.

Por ello, este estudio se planteó con el objetivo de observar las variaciones producidas en zumo de granada de la variedad Mollar turbio y clarificado a lo largo del tiempo de almacenamiento a temperaturas de refrigeración y ambiente y determinar el momento a partir del cual el zumo pierde sus propiedades beneficiosas y cambian sus características de forma desfavorable.

7.1 Estudio de vida útil de zumo de granada

A los zumos de granada turbio y clarificado pasteurizados y almacenados a temperatura de refrigeración y ambiente se realizaron tomas de muestras a lo largo del periodo de almacenamiento (45 días para las almacenadas a 25 °C y 120 días para las almacenadas a 5 °C).

Todas estas muestras recogidas a lo largo del estudio se sometieron a distintos análisis para observar la evolución del color, pH, microbiología, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante del zumo.

7.2 Influencia del almacenamiento en la calidad microbiológica de zumo de granada

Después de 7 días de almacenamiento, los zumos de granada no pasteurizados y almacenados a 25 °C presentaron un alto crecimiento de microorganismos (≥ 7.64 log ufc/mL) (**Tabla 18**).



Tabla 18. Incremento en la población microbiana (log ufc/mL \pm SD) con el tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C) en zumos de granada pasteurizados y no pasteurizados

Tratamiento/ Tipo de zumo	Almacenamiento (días)					
	0	7	14	21	28	45
Sin pasteurizar						
Turbio	5.59 \pm 0.13b*	7.99 \pm 0.08a	ND	ND	ND	ND
Clarificado	5.23 \pm 0.04b	7.69 \pm 0.05a	ND	ND	ND	ND
LTP 65 °C 30 s						
Turbio	1.00 \pm 0.00	1.15 \pm 0.21	2.06 \pm 0.56	2.22 \pm 0.37	2.87 \pm 0.61	3.01 \pm 0.41
Clarificado	0.00 \pm 0.00 [#]	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
HTP 90 °C 5 s						
Turbio	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.28 \pm 0.27
Clarificado	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

*Medias en la misma fila seguida de letras diferentes indican diferencias significativas

($P \leq 0.05$)

[#]No se observó crecimiento. ND, no determinado. LTP, HTP: Baja y alta temperatura de pasteurización

Según los resultados microbiológicos obtenidos en los zumos almacenados a 25 °C, tanto el tratamiento de 65 °C 30 s como el de 90 °C 5 s consiguen mantener los zumos microbiológicamente estables a lo largo de 45 días que duró el periodo de almacenamiento, excepto el zumo turbio pasteurizado a 65 °C 30 s que presentó recuentos superiores (3.0 log ufc/mL) a los límites establecidos por la legislación para definir al producto como seguro para el consumo.

El incremento en la población microbiana en zumos de granada bajo condiciones de refrigeración se muestra en la **Tabla 19**. El recuento de microorganismos en zumos turbio y clarificado sin pasteurización incrementa hasta 6.65 log ufc/mL después de 21 días almacenados a 5 °C. Por el contrario, los zumos pasteurizados a 65 °C y 90 °C no muestran crecimiento microbiano a lo largo de los 120 días de almacenamiento.



Tabla 19. Incremento de la población microbiana (log ufc/mL \pm SD) durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración (5 °C) en zumo de granada turbio y clarificado pasteurizados y sin pasteurizar

Tratamiento/ Tipo de zumo	Almacenamiento (días)										
	0	7	14	21	28	45	60	75	90	120	
Sin pasteurizar											
Turbio	5.59 \pm 0.13c*	6.19 \pm 0.01b	6.56 \pm 0.04a	6.60 \pm 0.08a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clarificado	5.23 \pm 0.04c	6.12 \pm 0.03b	6.34 \pm 0.11a	6.42 \pm 0.06a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LTP 65 °C 30 s											
Turbio	1.00 \pm 0.00	1.24 \pm 0.34	1.26 \pm 0.24	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.24 \pm 0.34	1.26 \pm 0.24	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
Clarificado	0.00 \pm 0.00 [#]	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
HTP 90 °C 5 s											
Turbio	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.20 \pm 0.17	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.15 \pm 0.21
Clarificado	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

*Medias en la misma fila seguida de letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

[#]No se observó crecimiento. ND, no determinado. LTP, HTP: Baja y alta temperatura de pasteurización



Ambos tratamientos de pasteurización previenen el crecimiento de los microorganismos en los zumos almacenados a 5 °C durante 120 días (recuentos $<10^3$ ufc/mL). Sin embargo, la vida útil del zumo pasteurizado a baja temperatura y almacenado a 25 °C presentó una carga alta a los 21 días de almacenamiento e incluso incrementó hasta el final del almacenamiento (45 días).

La temperatura de almacenamiento ejerce por ello un efecto de control sobre el crecimiento de los microorganismos supervivientes al tratamiento térmico y puede extender la vida útil de los zumos tratados a baja temperatura. La combinación entre pasteurización a baja temperatura y almacenamiento en refrigeración (5 °C) pueden ejercer una inhibición eficiente para mantener los zumos microbiológicamente seguros.

Para el sistema convencional de conservación de los alimentos, el control microbiano óptimo se logra a través del concepto de barrera (Leistner, 1999). Este estudio ofrece otras estrategias de conservación del zumo de granada, donde un tratamiento térmico es combinado con una temperatura de almacenamiento baja. Almacenamiento en frío (4 °C durante 10 semanas) y tratamientos de pasteurización convencionales (85 °C durante 5 minutos) han sido utilizados para la conservación de zumos de granada (Alighourchi y Barzegar, 2009). De forma parecida, un método de obtención, pasteurización y almacenamiento refrigerado ha sido patentado para zumos cítricos (Izquierdo et al., 2007).

7.3 Influencia del almacenamiento en el pH de zumo de granada

La determinación de pH de las muestras de zumos almacenadas a lo largo de 45 y 120 días a 25° y 5 °C respectivamente se llevó a cabo mediante la medida con un pHmetro.

Inicialmente, el zumo clarificado (**Figura 46A**) tiene un pH de 3.3 y el zumo turbio (**Figura 46B**) de 3.4. El pH de los zumos es importante relacionarlo con la estabilidad microbiológica ya que, a menor pH, menor probabilidad de crecimiento de microorganismos existe.

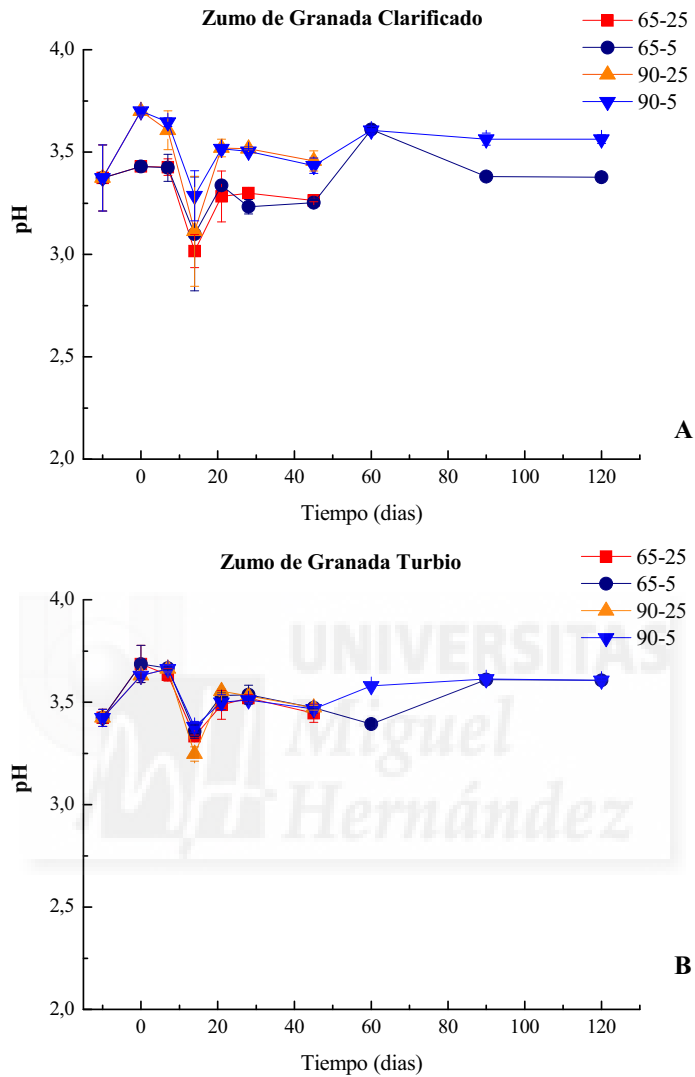


Figura 46. Efecto del almacenamiento en el pH de zumos de granada clarificado (A) y turbio (B)

Además, en la **Figura 46** se representan los resultados del pH a lo largo del tiempo de almacenamiento, observando que no se produce una variación significativa a lo largo del almacenamiento a 25 °C ni a 5 °C. La ausencia de variación puede ser debida a la no presencia de microorganismos que produzcan fermentaciones en los



zumos y provoquen alteraciones graves tanto en el color como en los parámetros de calidad del zumo.

7.4 Efecto del almacenamiento en el color rojo de zumo de granada

El color rojo característico de la granada así como de su zumo es un criterio de calidad importante, siendo los principales responsables del mismo los antocianos (colores rojo, naranja y azul), pigmentos solubles que se localizan en vacuolas. El deterioro de los colores primarios en los zumos de frutas que contienen antocianos se produce como consecuencia de la degradación de antocianos monoméricos, la polimerización de antocianos y la subsiguiente formación de color marrón.

Según [Sepúlveda et al., 2010](#), estos compuestos presentan un máximo de absorción a 520 nm pudiendo extrapolar la medición obtenida a la intensidad de coloración rojiza del zumo. Por lo expuesto anteriormente se procedió a la determinación de la absorbancia a 520 nm en las diferentes muestras de zumo de granada almacenados durante 45 y 120 días.

En la **Figura 47** se muestran los resultados de la determinación de la absorbancia a 520 nm de zumos de granada turbio y clarificado pasteurizados y almacenados a 25 y 5 °C.

Si se observa la pérdida de coloración roja de las muestras debida al almacenamiento en la **Figura 47**, se aprecia que sigue la misma tendencia en todos los zumos. Se debe destacar que los zumos almacenados a 5 °C presentan menor pérdida de coloración roja con respecto a los almacenados a 25 °C.

Si se observa la pérdida de color rojo por zumos a lo largo del tiempo de almacenamiento y teniendo en cuenta la temperatura de almacenamiento, en el zumo turbio pasteurizado a 65 °C 30 s y almacenado a 25 °C se observa un porcentaje de pérdida de un 74% en comparación con el almacenado a 5 °C que perdió el 55 %. El zumo turbio pasteurizado a 90 °C 5 s y almacenado a 25 °C perdió el 85 % de la coloración rojiza y el almacenado a 5 °C del 70 %.

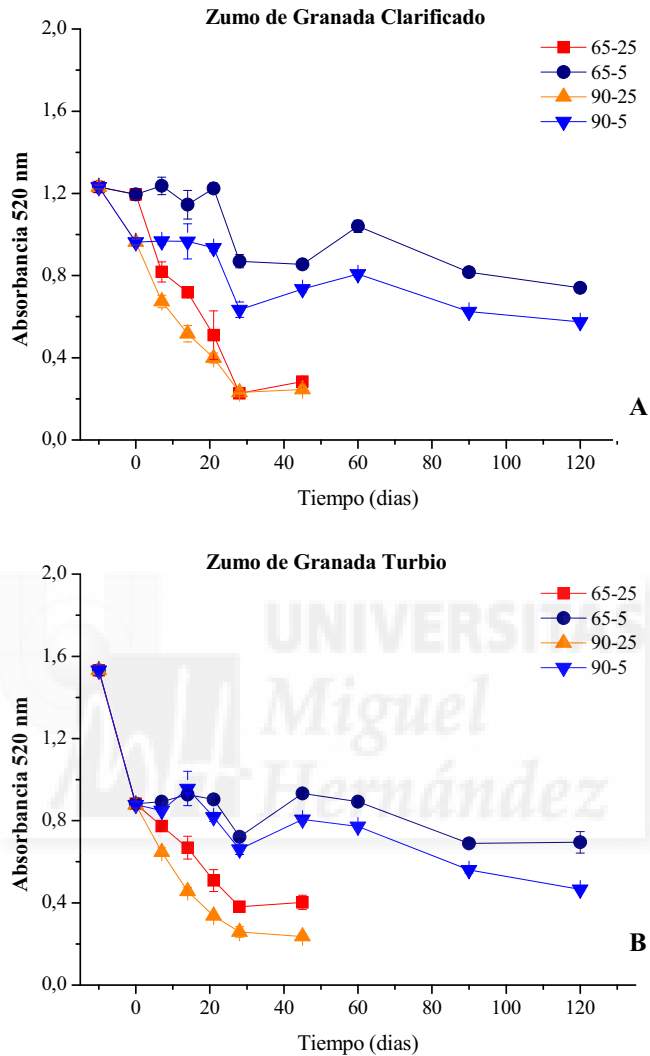


Figura 47. Efecto del almacenamiento en el color rojo de zumos de granada clarificado (A) y turbio (B)

En el caso del zumo clarificado, pasteurizado a 65 °C 30 s y almacenado a 25 °C perdió un 77 % en comparación con el almacenado a 5 °C que perdió el 40 %. El zumo clarificado pasteurizado a 90 °C 5 s y almacenado a 25 °C perdió el 80 % de la coloración rojiza y el almacenado a 5 °C del 53 %.



Los resultados obtenidos en este estudio indican que la pérdida de color rojo de los zumos de granada dependen del tipo de zumo ($P = 0.0002$), del tratamiento de pasteurización aplicado y de la temperatura y el tiempo de almacenamiento ($P = 0.0000$). A pesar de todo esto, la temperatura de almacenamiento fue el factor que más afecta a la pérdida de color rojo en zumos de granada pasteurizados. Las muestras almacenadas a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ presentan menor pérdida ($54.35 \pm 12.15\%$) y más lenta (75 días más) que cuando se almacenan a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($78.79 \pm 4.65\%$), con una diferencia de alrededor del 24 %. Ya que la luz no es un factor significativo en la degradación del color (Pérez-Vicente et al., 2004), nuestros resultados son consecuentes con lo publicado por Alighourchi y Barzegar, 2009 y Pérez-Vicente et al., 2004, y evidencian la importancia de la temperatura de almacenamiento en el proceso de degradación de los antocianos, la mayor fuente de pigmentos del zumo de granada. Previamente, Gil et al., 2000 ya publicó sus estudios en donde comparó las temperaturas de almacenamiento de 5 y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y evidenció la importancia de este factor en la degradación de los antocianos.

7.5 Efecto del almacenamiento en la densidad de color total de zumo de granada

La determinación de la densidad de color total de los zumos de granada turbio y clarificado se realizaron mediante la medida de las absorbancias y posterior cálculo como se establece en el protocolo del capítulo de metodología.

Al igual que los datos obtenidos para la determinación del color rojo del zumo de granada mediante la medida de la absorbancia a 520 nm, la densidad de color total del zumo depende estrechamente de la temperatura de almacenamiento (**Figura 48**).

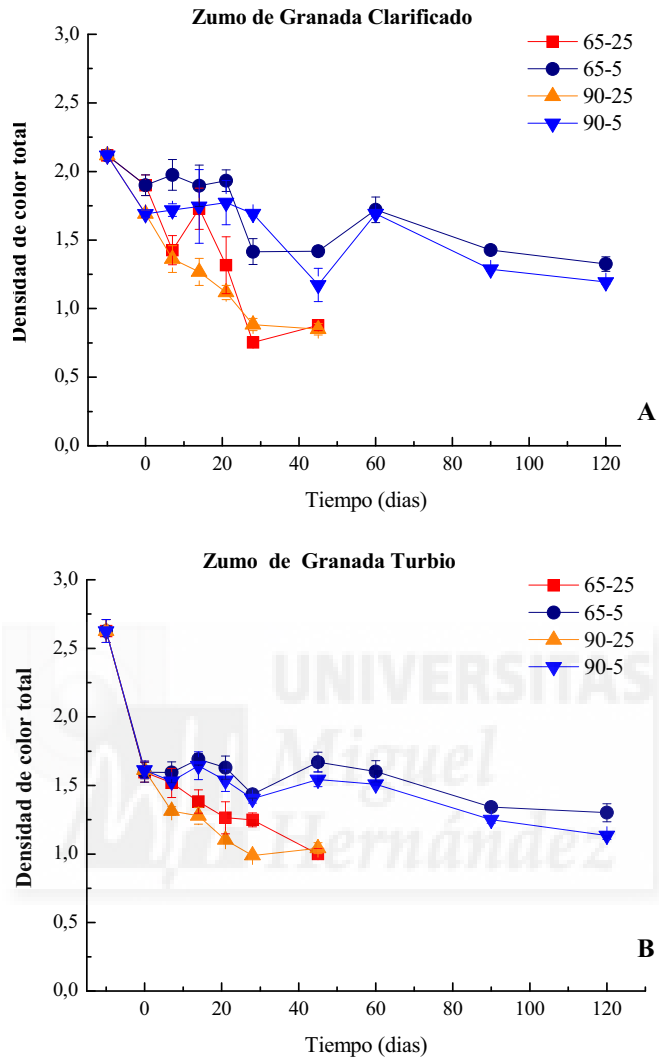


Figura 48. Efecto del almacenamiento en la densidad de color de zumos de granada clarificado (A) y turbio (B)

El zumo de granada turbio pasteurizado a baja temperatura y almacenado a 25 °C durante 45 días muestra una decoloración del 42 % comparado con su color inicial, mientras que el almacenado a 5 °C durante 120 días pierde el 50 %. El tratamiento de pasteurización a alta temperatura y el almacenamiento a 25 °C produce una pérdida del 60 % mientras que el almacenado a 5 °C el 57 % (**Figura 48B**).



En el caso del zumo de granada clarificado, el tratamiento de pasteurización a baja temperatura y almacenamiento a 25 °C produce una pérdida del 58 % con respecto al inicial, mientras que a 5 °C pierde solamente un 37 %. La pasteurización a alta temperatura y almacenamiento a temperatura ambiente produce una pérdida del 60 %, pero cuando es almacenado en refrigeración el 43 % (**Figura 48A**).

Los zumos almacenados a temperatura ambiente presentan mayor pérdida de color total que los almacenados en refrigeración.

Correlación entre densidad de color total y absorbancia a 520 nm

Ya que el zumo de granada es predominantemente de color rojo y como se ha demostrado puede ser monitorizado mediante la absorbancia a 520 nm, cabe la posibilidad de además de éste parámetro, tener en cuenta la medida de la densidad total que da importancia al efecto del pardeamiento en los zumos para establecer la degradación del color durante un almacenamiento prolongado y decidir en qué punto el zumo ya no es visualmente aceptable por el consumidor.

Por ello, se realizó un estudio estadístico correlacionando las medias de la longitud de onda a 520 nm y los valores de la densidad de color total de las muestras almacenadas a lo largo del estudio. Los resultados se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Correlación entre densidad de color total y Absorbancia a 520 nm

	65 °C 30 s				90 °C 5 s			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	Pearson Corr	Sig	Pearson Corr	Sig	Pearson Corr	Sig	Pearson Corr	Sig
Clarificado	0.95302	8.96E-04	0.98147	5.04E-07	0.99447	4.35E-06	0.8342	0.00269
Turbio	0.93405	0.00207	0.99629	8.26E-10	0.98557	4.76E-05	0.98805	8.79E-08

Como puede observarse en la tabla, existe una alta correlación entre la absorbancia a 520 nm y la densidad de color total, por lo que, podría establecerse que, cuando los valores de densidad de color total sean superiores a 1 los zumos ya no son



visualmente aceptables por el consumidor y el color rojo se degrada con la misma dinámica que la densidad de color.

7.6 Efecto del almacenamiento en el pardeamiento de zumo de granada

En las **Figuras 49A** y **49B**, se representa el índice de pardeamiento de los zumos de granada turbio y clarificado pasteurizados y almacenados a 25 °C y 5 °C en función del tiempo de almacenamiento.

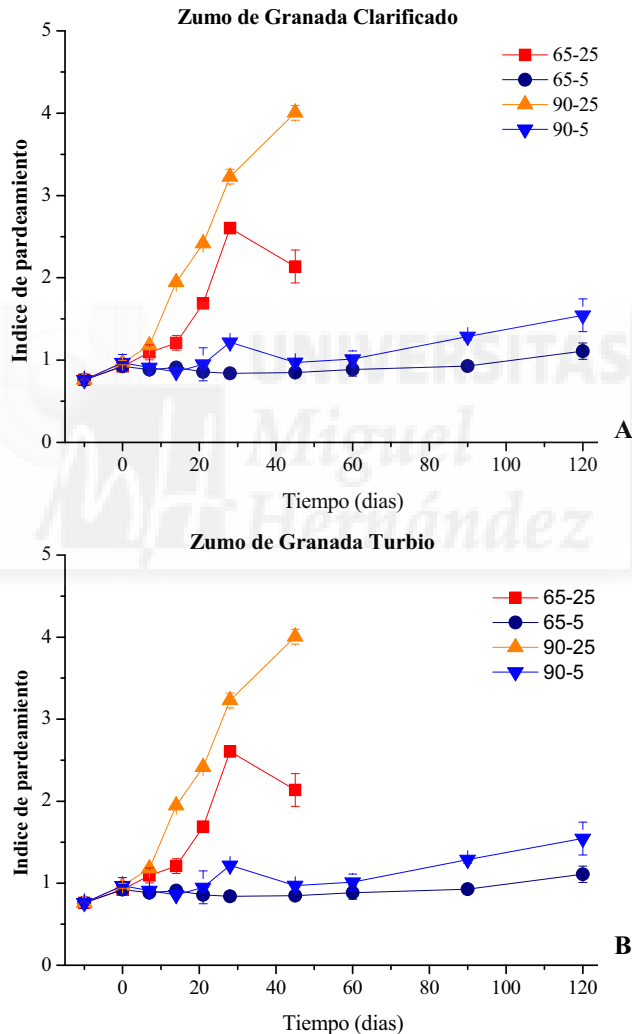


Figura 49. Efecto del almacenamiento en el pardeamiento de zumos de granada clarificado (A) y turbio (B)



Los resultados muestran que el índice de pardeamiento incrementan rápidamente con el tiempo en los zumos almacenados a 25 °C, convirtiéndose en poco o nada aceptables (Índices de pardeamiento > 1.00, representan tonalidades amarillentas) después de 7 días. Los zumos turbio y clarificado pasteurizados a alta temperatura y almacenados a 25 °C presentan los mayores valores de pardeamiento (4.00 ± 0.32 y 3.30 ± 0.76) al final del almacenamiento (45 días). Sin embargo, los zumos almacenados a 5 °C muestran un menor pardeamiento.

Los zumos turbio y clarificado pasteurizados a baja temperatura y almacenados a 5 °C durante 90 días muestran índices de pardeamiento de 0.93 ± 0.01 y 0.85 ± 0.01 . Cuando estos zumos se pasteurizan a alta temperatura el índice de pardeamiento aumenta, (1.29 ± 0.04 y 1.14 ± 0.01 , respectivamente).

El análisis ANOVA del índice de pardeamiento mostró que el efecto del tratamiento de pasteurización, la temperatura de almacenamiento y el tiempo fueron significativos (P valor = 0.0000). El tipo de zumo no mostró ser un factor importante en la degradación de los antocianos (P = 0.8321). El índice de pardeamiento incrementa progresivamente con el tiempo de almacenamiento e incluso puede duplicarse (1.75 vs 0.86) cuando el zumo de granada fue almacenado durante 45 días a 25 °C y 5 °C.

7.7 Efecto del almacenamiento en el contenido en polifenoles totales de zumo de granada

Como es sabido, el contenido en compuestos fenólicos en plantas y zumos puede ser determinado por varios métodos de separación (HPLC, Cromatografía de gases (GC), electroforesis capilar, etc...), como un conjunto de sustancias individuales o por una reacción química específica como un grupo de compuestos que reaccionan químicamente de manera similar.

Actualmente, existe una gran información sobre la evaluación del contenido en compuestos fenólicos totales de manera rápida, obtenidos mediante medidas espectrofotométricas y utilizando reactivos analíticos.



Aproximadamente existen 20 métodos analíticos que emplean diferentes reactivos, tiempos de incubación, estándares, evaluaciones analíticas, etc... La comparación exacta entre los resultados obtenidos de los métodos y su interpretación general son prácticamente imposibles debido a la variabilidad de las condiciones experimentales y las diferencias de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias oxidables.

En el caso de los zumos, el método más comúnmente utilizado para la determinación del contenido en polifenoles totales es el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Sin embargo, este método parece ser que en matrices complejas como puede ser el zumo de granada puede llevar a errores en la cuantificación (Lester et al., 2012; Ma y Cheung, 2007; Medina, 2011a).

Además, por ello, se decidió realizar un análisis espectrofotométrico y el análisis de las muestras por el método Folin-Ciocalteu con el objetivo de determinar si existen variaciones o interferencias entre ambos.

7.7.1 Absorbancia 280 nm

La determinación de los polifenoles totales presentes en las muestras de zumos de granada pasteurizados y almacenados a distintas temperaturas se realizó mediante el análisis espectrofotométrico a 280 nm DO.

Si se observa el comportamiento de la absorbancia a 280 nm de los zumos debida al almacenamiento en la **Figura 50**, se aprecia que independientemente del tratamiento de pasteurización y del tipo de zumo, se produce una disminución de ésta hasta el día 45 en zumos almacenados a 25°C. Los zumos almacenados a 5°C experimentan un aumento de la absorbancia hasta el día 60 y posteriormente comienza de nuevo a disminuir hasta el día 120.

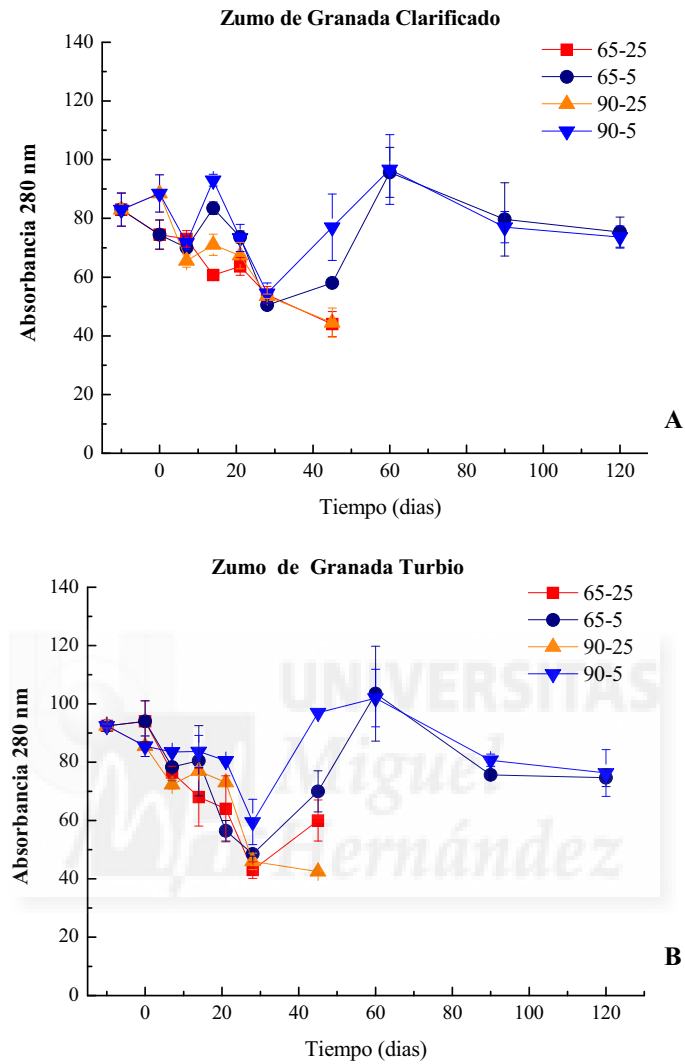


Figura 50. Efecto del almacenamiento en la absorbancia a 280 nm de zumos de granada clarificado (A) y turbio (B)

7.7.2 Método Folin-Ciocalteu

La concentración del contenido en polifenoles totales fue determinada en zumos pasteurizados y almacenados mediante el método de Folin-Ciocalteu y se comparó con el valor del zumo fresco. Estos resultados se muestran en la **Figura 51**.



En el caso de los zumos de granada frescos, el contenido en polifenoles totales fue de 1134.14 y 1153.64 mg EAG/L en zumo clarificado y turbio respectivamente.

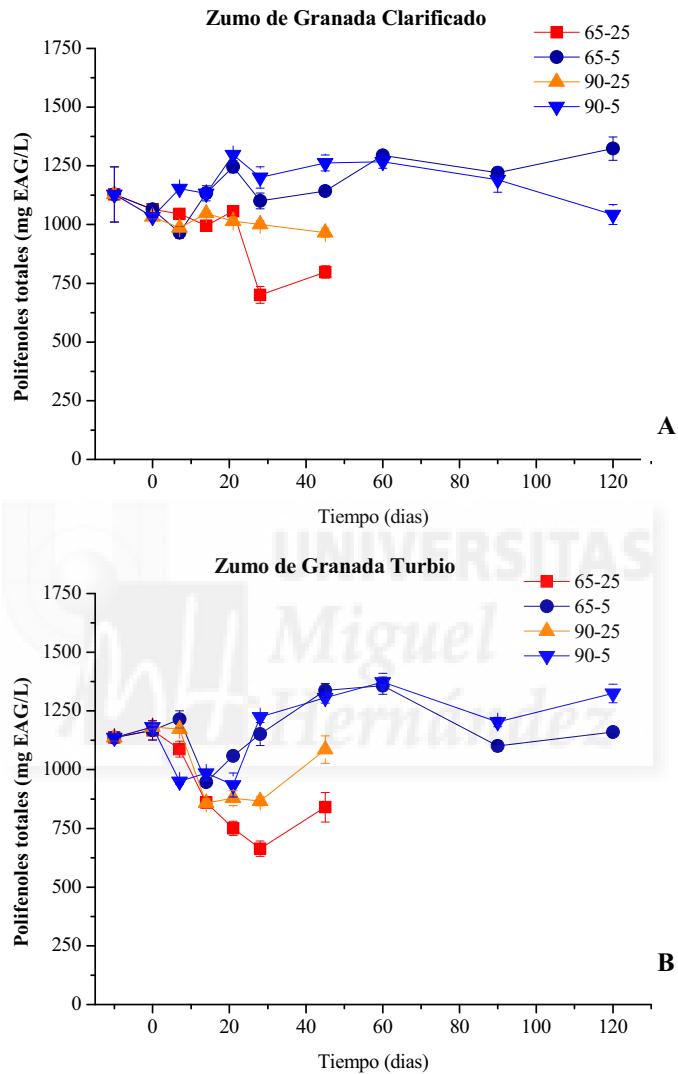


Figura 51. Efecto del almacenamiento en el contenido en polifenoles totales de zumos de granada clarificado (A) y turbio (B)



El análisis ANOVA del contenido en polifenoles totales indicó que no existen diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre los dos tratamientos de pasteurización estudiados.

La temperatura de almacenamiento también es un factor importante en la degradación de los polifenoles. En la **Figura 51** puede observarse como la concentración de compuestos fenólicos fue menor en las muestras almacenadas a temperatura ambiente que en refrigeración. El contenido en polifenoles totales de zumo clarificado (**Figura 51A**) almacenado a 25 °C durante 45 días muestra una reducción del 30,82 % en el tratamiento de pasteurización a 65 °C 30 s y 14 % a 90 °C 5 s. Sin embargo, el zumo pasteurizado a baja temperatura y alta temperatura y almacenados a 5 °C 120 días presentan un incremento del 17 % y un descenso del 7 % respectivamente.

En el caso del zumo de granada turbio (**Figura 51B**) almacenado a 25 °C 45 días, mostró una reducción del 26 % en el tratamiento de pasteurización a baja temperatura y del 4 % a alta temperatura. Sin embargo, el zumo turbio almacenado a 5 °C 120 días presentó un incremento en el contenido de polifenoles totales en ambos tratamientos (2 % y 17 % respectivamente).

El análisis estadístico evidenció que existen diferencias estadísticas significativas entre las medias del contenido en polifenoles totales y el tiempo de almacenamiento con un nivel de confianza del 95 %.

Correlación entre la absorbancia a 280 nm y polifenoles totales por Folin-Ciocalteu

Para poder comparar los resultados obtenidos de ambos métodos de cuantificación de polifenoles totales se realizó un análisis de correlación entre los resultados del análisis de correlación de las medias de los resultados obtenidos de la medida espectrofotométrica de las muestras a 280 nm y la determinación del contenido en polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu. Los resultados se muestran en la **Tabla 21**.

**Tabla 21. Correlación entre absorbancia a 280 nm y método Folin-Ciocalteu**

	65 °C 30 s				90 °C 5 s			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	Pearson Corr	Sig	Pearson Corr	Sig	Pearson Corr	Sig	Pearson Corr	Sig
Clarificado	0.84923	1.56E-02	0.41593	2.32E-01	0.74311	5.56E-02	-0.11624	0.74912
Turbio	0.94753	0.00118	0.29736	4.04E-01	0.33959	4.56E-01	0.21033	5.60E-01

Como se puede observar en la tabla, no parece existir correlación entre la medida del contenido en polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu y la medida de la absorbancia a 280 nm.

Esto puede ser debido a como se ha comentado anteriormente existan posibles interferencias entre los reactivos utilizados en la cuantificación de los polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu y la composición de la muestra de análisis. Según varios autores ([Lester et al., 2012](#); [Ma y Cheung, 2007](#); [Medina, 2011a](#); [Prior et al., 2005](#); [Stratil et al., 2006](#)), las sustancias que pueden interferir durante el ensayo son el ácido ascórbico, azúcares (fructosa y sacarosa), aminoácidos (tirosina y triptófano), dióxido de azufre, ácidos orgánicos y hierro II, y es necesario la corrección de estas interferencias para la realización válida del ensayo. En ensayos realizados por [Medina, 2011a, b](#), se comparó el contenido en polifenoles totales en granadas y zumo de granada por el método Folin-Ciocalteu y por un método desarrollado por la autora en el cual no parece existir interferencia entre los compuestos y el reactivo de Folin-Ciocalteu, utilizando en este método Fast Blue BB sal de diazonio (FBBB), donde el grupo diazonio ($-N=N-$) se acopla específicamente con los grupos hidroxilos reactivos de los polifenoles bajo condiciones alcalinas, formando complejos estables que pueden ser medidos a 420 nm. Según los resultados obtenidos, la cantidad de polifenoles totales expresados en mg de ácido gálico/ L en granadas determinados por el método FBBB fue de 1350 y en el caso del FC de 507.6 y en el caso de zumo 2400 y 850 respectivamente.

En otro estudio, se llevó a cabo la demostración del efecto del ácido ascórbico como compuesto de interferencia con el reactivo de Folin-Ciocalteu ([Lester et al., 2012](#)).



Por esta razón, nos planteamos la validez del método en muestras tan complejas como es el zumo de granada ya que se ha observado la gran interferencia de la matriz en la cuantificación de los polifenoles.

7.8 Efecto del almacenamiento en la capacidad antioxidante de zumo de granada

7.8.1 Método ABTS

La capacidad antioxidante de los zumos de granada almacenados a lo largo del tiempo se determinó mediante el método de equivalentes Trolox (ABTS) y se muestran en la **Figura 52**.

Ambos zumos muestran un incremento de la capacidad antioxidante hasta el día 14, momento a partir del cual comenzó a descender hasta el día 28. Este comportamiento fue independiente del tratamiento de pasteurización y del tipo de zumo. Desde el día 28, la capacidad antioxidante comienza a aumentar hasta el final del almacenamiento en las muestras almacenadas a 25 °C y hasta los 120 días en las almacenadas a 5 °C.

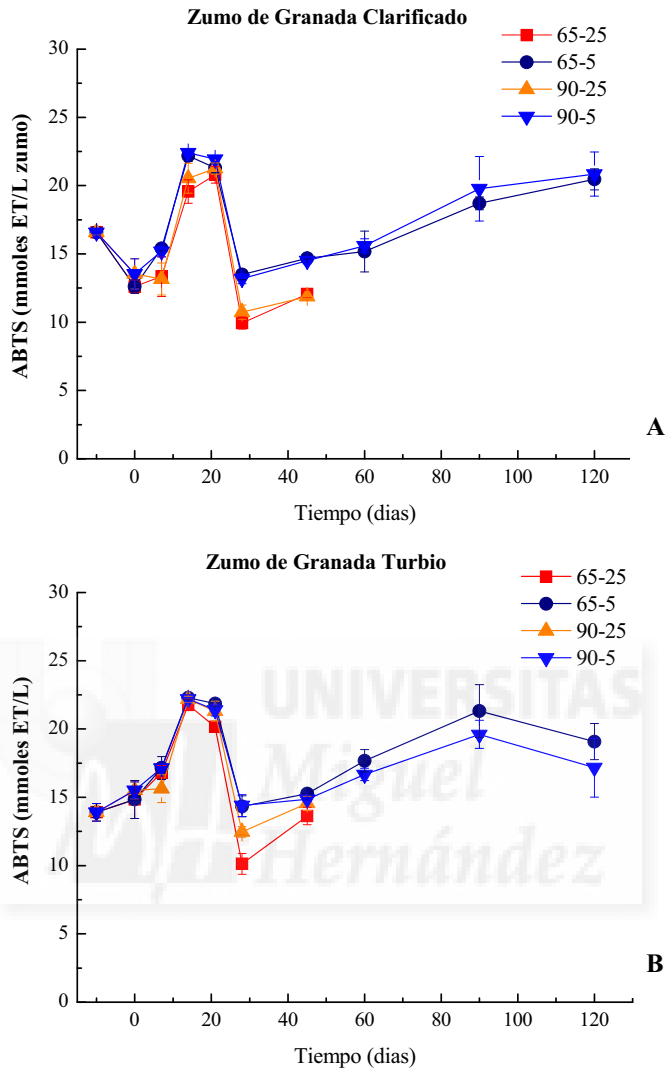


Figura 52. Efecto del almacenamiento en la capacidad antioxidante por el método ABTS de zumos de granada clarificado (A) y turbio (B)

Por lo tanto, los zumos no mostraron pérdida de capacidad antioxidante a lo largo del tiempo de almacenamiento mediante la determinación con el método ABTS, independientemente del tipo de zumo y tratamiento de pasteurización.



7.8.2 Método FRAP

La **Figura 53** muestra los resultados de la capacidad antioxidante de los zumos de granada turbio y clarificado antes de pasteurizar, pasteurizados y almacenados durante 45 y 120 días por el método FRAP.

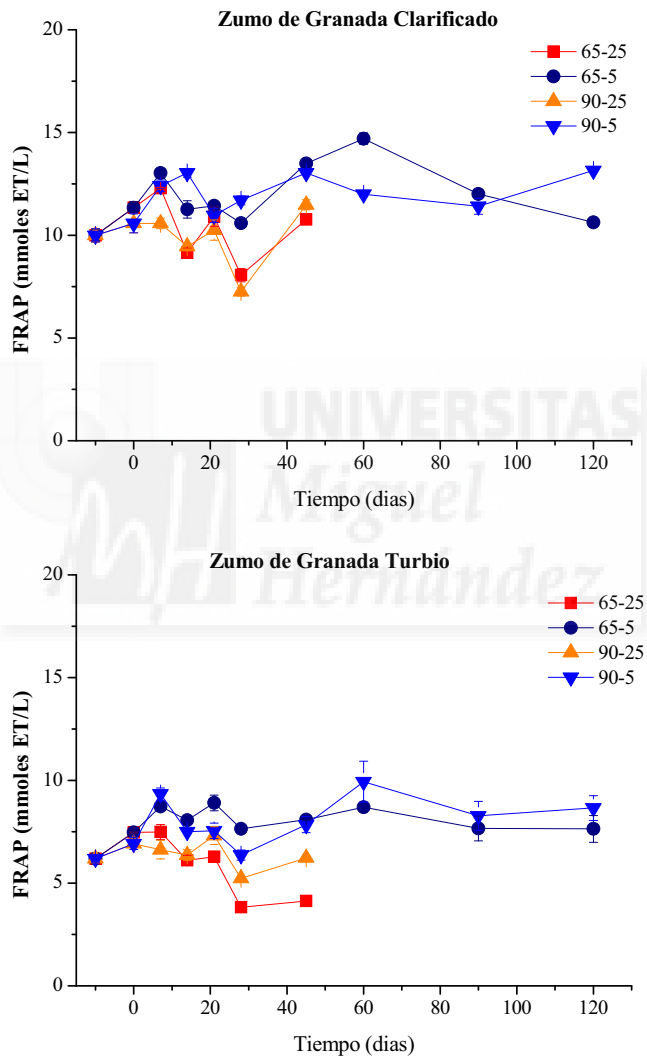


Figura 53. Efecto del almacenamiento en la capacidad antioxidante por el método FRAP de zumos de granada clarificado (A) y turbio (B)



Como puede observarse, los zumos turbio y clarificado muestran un ligero incremento de la capacidad antioxidante en los tratamientos de pasteurización a alta y baja temperatura.

Después del tratamiento térmico, los zumos mantienen su capacidad antioxidante hasta el día 28, momento a partir del cual comienza a aumentar hasta el final del periodo de almacenamiento (45 días en las muestras almacenadas a 25 °C y 120 días a 5 °C).

En ambos zumos almacenados a 5 °C los valores de capacidad antioxidante determinados por FRAP al final del periodo de almacenamiento fue significativamente mayores comparados con los valores iniciales del zumo, con la excepción del zumo turbio pasteurizado a 65 °C 30 s que mostró una capacidad antioxidante inferior al final del almacenamiento.

7.8.3 Método ORAC

En la **Figura 54**, se presentan los resultados de la capacidad antioxidante de los zumos de granada determinados por el método ORAC antes y después del tratamiento de pasteurización y de las muestras almacenadas a 25 °C y 5 °C durante 45 y 120 días respectivamente.

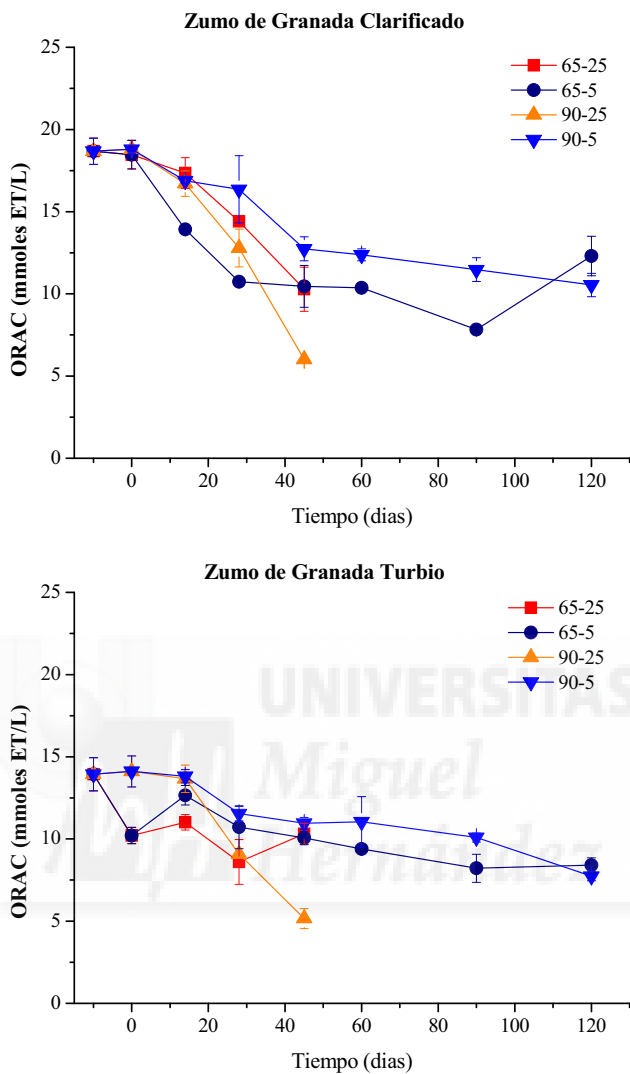


Figura 54. Efecto del almacenamiento en la capacidad antioxidante por el método ORAC de zumos de granada clarificado (A) y turbio (B)

En ambos zumos, al almacenamiento provoca una pérdida de la capacidad antioxidante, siendo más rápida y acusada en las muestras almacenadas a 25 °C que las almacenadas a 5 °C.



A diferencia de lo establecido en las determinaciones de la capacidad antioxidante anteriores, con el método ORAC las determinaciones no oscilan, sino que se puede observar una pérdida constante.

En el caso del zumo clarificado (**Figura 54A**), el tratamiento de pasteurización ejerce un efecto importante en la capacidad antioxidante ya que, los zumos pasteurizados a baja temperatura y alta temperatura almacenados a 25 °C presentan unos porcentajes de pérdida del 44 y 67 % respectivamente. De igual modo, los almacenados a 5 °C presentan una pérdida del 33.3 y 43 %. El tratamiento de pasteurización a baja temperatura produce una menor pérdida de la capacidad antioxidante determinada por ORAC.

El zumo turbio presenta menor pérdida de la capacidad antioxidante al final del almacenamiento. Los zumos pasteurizados a 65 °C 30 s y almacenados a 25 °C presentan un incremento de la capacidad antioxidante al final + 0.9% y el zumo almacenado a 5 °C presenta la menor pérdida, con un 17.7 %. En el caso de la pasteurización a 90 °C 5 s, los porcentajes de pérdida de capacidad antioxidante fueron de 51 y 24 % en las muestras almacenadas a 25 y 5 °C respectivamente. Éstos resultados muestran que el zumo de granada turbio presenta mayor capacidad antioxidante que el clarificado cuando se utiliza como método de cuantificación el método ORAC.

7.9 Efecto del almacenamiento en antocianos copigmentados, poliméricos y monoméricos de zumo de granada

Los resultados obtenidos para el contenido en antocianos copigmentados, poliméricos y monoméricos se muestran en las **Tablas 22 y 23** expresados en porcentaje.



Tabla 22. % Antocianos copigmentados, monoméricos y poliméricos (Media \pm SD) en zumo de granada clarificado

Tratamiento	Almacenamiento (días)	% Copigmentados	% Monoméricos	% Poliméricos
Ninguno	0	65.59 \pm 0.75	23.33 \pm 1.40	11.08 \pm 1.03
LTP 65 °C 30 s	0	59.04 \pm 1.33	38.86 \pm 0.61	2.10 \pm 0.42
25 °C	45	31.59 \pm 2.04	27.94 \pm 0.51	40.46 \pm 1.36
5 °C	120	51.37 \pm 0.99	41.43 \pm 2.11	7.21 \pm 0.39
HTP 90 °C 5 s	0	62.23 \pm 1.15	34.80 \pm 0.88	2.96 \pm 0.12
25 °C	45	39.97 \pm 3.02	14.04 \pm 2.43	45.99 \pm 1.37
5 °C	120	46.60 \pm 1.20	42.23 \pm 1.05	11.17 \pm 2.11

En el caso del zumo de granada clarificado (**Tabla 22**), el mayor porcentaje de antocianos se debe a los copigmentados con un 65.59 %, seguido de los monoméricos, con un 23.33 % y los poliméricos con un 11.08 %. El tratamiento de pasteurización de 65 °C 30 s produce una disminución en el porcentaje de antocianos copigmentados (59.04 %) y sobre todo de los poliméricos (2.10 %), aumentándose hasta un 38.86 % los monoméricos. El efecto producido por el tratamiento de pasteurización a 90 °C 5 s es similar al anterior, disminuyendo los antocianos copigmentados (62.23 %) y poliméricos (2.96 %) y aumentándose los monoméricos (34.80 %).

En cuanto al efecto de la temperatura de almacenamiento, el zumo clarificado pasteurizado y almacenado durante 45 días a 25 °C experimenta un aumento en el porcentaje de antocianos poliméricos hasta alcanzar unos porcentajes de 40.46 % y 45.99 % en los tratamientos de pasteurización LTP y HTP respectivamente al final del almacenamiento. Al final del almacenamiento a 25 °C, el porcentaje de antocianos copigmentados es de 31.59 y 39.97 % en los tratamientos de alta y baja temperatura.

El zumo pasteurizado a 65 °C 30 s y almacenado a 5 °C experimenta una disminución del contenido en antocianos copigmentados hasta un 51.37 % y un aumento en el contenido en antocianos poliméricos hasta un 7.21 % con respecto al valor después del tratamiento de pasteurización. Sin embargo, los antocianos



monoméricos se mantienen estables a lo largo del tiempo de almacenamiento alcanzando valores del 41.43 %.

El zumo pasteurizado a 90 °C 5 s y almacenado a 5 °C experimenta una disminución del contenido en antocianos copigmentados hasta un 46.60 % y un aumento en el contenido en antocianos poliméricos hasta un 11.17 % con respecto al valor después del tratamiento de pasteurización. Sin embargo, los antocianos monoméricos se mantienen estables a lo largo del tiempo de almacenamiento alcanzando valores del 42.23 %.

Tabla 23. % Antocianos copigmentados, monoméricos y poliméricos (Media ± SD) en zumo de granada turbio

Tratamiento	Almacenamiento (días)	% Copigmentados	% Monoméricos	% Poliméricos
Ninguno	0	33.33 ± 0.11	32.28 ± 0.33	34.38 ± 0.40
LTP 65 °C 30 s	0	48.34 ± 0.39	42.34 ± 0.57	9.32 ± 0.63
25 °C	45	37.75 ± 0.62	12.93 ± 0.18	49.32 ± 0.62
5 °C	120	56.18 ± 1.02	29.66 ± 0.06	14.17 ± 1.07
HTP 90 °C 5 s	0	57.33 ± 0.12	33.30 ± 0.28	9.37 ± 0.39
25 °C	45	36.88 ± 0.10	7.43 ± 0.32	55.69 ± 0.10
5 °C	120	53.35 ± 0.06	25.05 ± 0.19	21.60 ± 0.20

En el caso del zumo de granada turbio (**Tabla 23**), el porcentaje de antocianos presentes en él se mantiene dividido en partes iguales, siendo la contribución de los antocianos copigmentados, monoméricos y poliméricos de 33.33 %, 32.28 % y 34.38 % respectivamente. El tratamiento de pasteurización de 65 °C 30 s produce un aumento del porcentaje de los antocianos copigmentados (48.34 %) y monoméricos (42.34 %) y una disminución de los antocianos poliméricos (9.32 %). El efecto producido por el tratamiento de pasteurización a 90 °C 5 s es similar al anterior, aumentando los antocianos copigmentados (57.33 %) y monoméricos (33.30 %) y disminuyendo los poliméricos (9.37 %).



En cuanto al efecto de la temperatura de almacenamiento, el zumo turbio pasteurizado y almacenado a 25 °C experimenta un aumento en el porcentaje de antocianos poliméricos hasta alcanzar unos porcentajes de 49.32 % y 55.69 % en los tratamientos de pasteurización LTP y HTP respectivamente al final del almacenamiento. Al final del almacenamiento a 25 °C, el porcentaje de antocianos copigmentados es de 37.75 y 36.88 % en los tratamientos de alta y baja temperatura.

El zumo turbio pasteurizado a 65 °C 30 s y almacenado durante 120 días a 5 °C experimenta un aumento del contenido en antocianos copigmentados hasta un 56.18 % y un aumento en el contenido en antocianos poliméricos hasta un 14.17 % con respecto al valor después del tratamiento de pasteurización. Sin embargo, los antocianos monoméricos disminuyen a lo largo del tiempo de almacenamiento alcanzando valores del 29.66 %.

El zumo pasteurizado a 90 °C 5 s y almacenado 120 días a 5 °C experimenta una disminución del contenido en antocianos monoméricos hasta un 25.05 % y un aumento en el contenido en antocianos poliméricos hasta un 21.60 % con respecto al valor después del tratamiento de pasteurización. Sin embargo, los antocianos copigmentados se mantienen estables a lo largo del tiempo de almacenamiento.

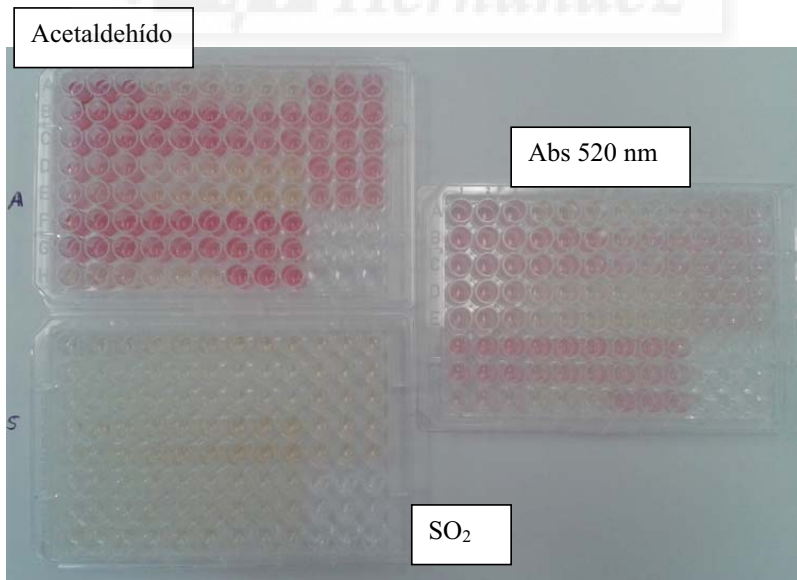


Imagen 20. Placas del análisis de antocianos copigmentados, monoméricos y poliméricos



7.10 Efecto del almacenamiento en antocianos totales de zumo de granada

Según algunos investigadores, el zumo de granada es una de las fuentes más importantes de compuestos bioactivos, siendo los antocianos los más importantes, especialmente la delfinidina, cianidina y pelargonidina 3 y 3,5-diglucósidos (Du et al., 1975). Estos antocianos son los responsables de la coloración del zumo (Gil et al., 2000; Miguel et al., 2004). Dependiendo de la variedad de granada utilizada en la producción del zumo, el contenido en antocianos puede variar entre 20 y 700 mg/L (Gil et al., 2000; Martí et al., 2002; Miguel et al., 2004; Pérez-Vicente et al., 2004) y este contenido puede verse disminuido por la degradación durante el procesado.

En las siguientes tablas se muestran los resultados de la determinación del contenido en antocianos totales por HPLC de las muestras sin pasteurizar, pasteurizadas y almacenadas a 25 °C y 5 °C de zumo de granada turbio y clarificado.

Tabla 24A. Contenido en antocianos totales en zumo de granada clarificado sin pasteurizar y pasteurizado (mg/L)

Almacenamiento (días)	65 °C 30 s				90 °C 5 s			
	25°C		5°C		25°C		5°C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
Ap	173.5	9.2	173.5	9.2	173.5	0.3	173.5	0.3
0	172.0	5.5	172.0	5.5	171.4	5.5	171.4	5.5
14	97.1	4.56	162.8	1.1	98.8	19.7	164.7	6.2
28	16.7	0.7	156.1	1.7	30.8	5.6	176.5	10.8
45	11.7	6.9	146.5	5.7	21.7	8.9	140.2	13.9
60			149.6	13.8			139.9	1.2
90			119.1	2.6			128.9	10.3
120			109.0	4.7			90.0	9.2

El proceso de clarificación tuvo un efecto importante sobre el contenido de antocianos totales en el zumo de granada. Este pretratamiento reduce aproximadamente



un 37% el contenido en antocianos totales, debido a la retención en la matriz vegetal de antocianos altamente polimerizados con otros componentes. Inesperadamente, la degradación térmica de los antocianos (35.6 – 40.8%) se revela sólo en los zumos turbios independientemente del tratamiento térmico (65 °C 30 s o 90 °C 5 s) al que fueron sometidos.

Después de la pasteurización, ambos zumos clarificado y turbio mostraron contenidos similares antocianos. Esta diferencia entre zumos representa que la estabilidad de las antocianos depende de la matriz, las características estructurales y las condiciones de procesado (Alighourchi y Barzegar, 2009).

La temperatura de almacenamiento representa un notable efecto en la estabilidad de los antocianos en zumo de granada pasteurizados. En general, las muestras almacenadas a 5 °C presentaron una pérdida de antocianos más baja y lenta (75 días más) que los almacenados a 25 °C (Tabla 24A vs 24B). A temperatura ambiente (25 °C), los zumos pasteurizados presentaron una pérdida el 76% y el 93% de los antocianos durante 45 días de almacenamiento, mientras que la pérdida de las almacenadas en refrigeración fue de 37 - 48% después de 120 días, observándose cómo la degradación producida en el zumo turbio pasteurizado a 65 °C 30 s y almacenado a 5 °C fue sorprendentemente baja (14,1%).

Los resultados obtenidos son similares a los presentados en otros estudios de almacenamiento tanto en zumos de granada (Alighourchi y Barzegar, 2009; Pérez-Vicente et al., 2004), frambuesa (Hager et al., 2008), y puré de arándanos (Brownmiller et al., 2008). Anteriormente, Gil et al., 2000 informaron de una reducción de la degradación de antocianos en zumos de granada refrigerados (5 °C) en comparación con zumos almacenados a 25 °C.



Tabla 24B. Contenido en antocianos totales en zumo de granada turbio sin pasteurizar y pasteurizado (mg/L)

Tiempo	65 °C 30 s				90 °C 5 s			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
Ap	275.1	1.2	275.1	1.2	275.1	1.2	275.1	1.2
0	177.1	6.1	177.1	6.1	162.8	3.3	162.8	3.3
14	135.1	1.0	169.9	1.0	77.6	1.8	153.7	1.8
28	69.0	4.4	179.5	9.9	42.7	4.6	162.2	3.5
45	42.4	3.2	178.7	15.7	21.6	2.6	135.0	6.5
60			161.3	15.6			130.8	3.5
90			153.5	26.0			89.4	5.3
120			152.1	7.8			91.3	18.2

De acuerdo con los resultados obtenidos por [Alighourchi y Barzegar, 2009](#), la pasteurización del zumo a 85 °C durante 5 minutos reduce el contenido en antocianos entre 18-22 % y si el zumo se almacena a 4 °C durante 10 semanas, la pérdida de antocianos varía entre 34 y 57 %, dependiendo de la variedad utilizada. Zumos de granada de la variedad Mollar de Elche pasteurizados a 95 °C durante 30 s perdieron un 14 % de antocianos, mientras que la pérdida fue del 70 % a los 180 días de almacenamiento a temperaturas entre 24/18 °C, una humedad relativa del 40-50 % y 16 h de fotoperiodo ([Pérez-Vicente et al., 2004](#)).

Correlación entre antocianos y absorbancia a 520 nm

Con el objetivo de comprobar si es cierta la relación entre la medida de la absorbancia a 520 nm y la concentración de antocianos de las muestras y poder así realizar una determinación sencilla de los antocianos únicamente por espectrofotometría se decidió realizar un análisis estadístico de los datos. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 25. Correlación entre Antocianos totales por HPLC y Absorbancia a 520 nm**

	65 °C 30 s				90 °C 5 s			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	Pearson Corr	Sig	Pearson Corr	Sig	Pearson Corr	Sig	Pearson Corr	Sig
Clarificado	0.99707	1.90E-04	0.66703	0.07078	0.96634	0.00738	0.63948	0.08776
Turbio	0.98055	0.00325	0.91723	0.00133	0.99718	1.80E-04	0.90491	0.0020

Como se puede observar en la **tabla 25**, existe una alta correlación en el caso del zumo turbio pasteurizado a las dos temperaturas y almacenado a 25 °C y 5 °C. Sin embargo, el zumo clarificado pasteurizado y almacenado a 5 °C no tiene una correlación tan alta como el turbio.

Por tanto, podemos decir que la medida de la absorbancia a 520 nm del zumo de granada puede ser un procedimiento rápido y fácil para monitorizar a lo largo del tiempo el estado de los zumos, aunque pueden existir factores que influyan en esta determinación y que hagan que el resultado no sea concluyente.

7.11 Efecto del almacenamiento en antocianos individuales de zumo de granada

Como ya se ha comentado anteriormente, el perfil de antocianos típicos en los zumos de granada se caracteriza por delphinidina, cianidina y pelargonidina 3-glucósidos y 3,5- diglucósidos, siendo Cy3G la antocianina monomérica más abundante en los zumos de la granada variedad "Mollar" (Mena et al., 2011).

En términos de cantidad, el antociano principal en el zumo de granada Mollar turbio es Cy3G ($81 \pm 0,7$ mg / L), seguido por DP3,5DG ($71 \pm 5,3$ mg / L), Cy3,5DG ($67 \pm 3,1$ mg / L), Dp3G ($46 \pm 3,0$ mg / L), Pg3G ($6 \pm 2,2$ mg / L), y Pg3G ($5 \pm 3,0$ mg / L). A pesar de que el proceso de clarificación redujo significativamente ($P < 0,05$) la concentración de antocianos individuales, el orden descrito anteriormente se mantuvo.



Los cambios producidos en el contenido de antocianos individuales en zumos pasteurizados se muestran en las **Figura 55 (A→H)**. Como se puede observar, el zumo turbio se vio afectado por el tratamiento térmico mientras que el zumo clarificado no mostró cambios.

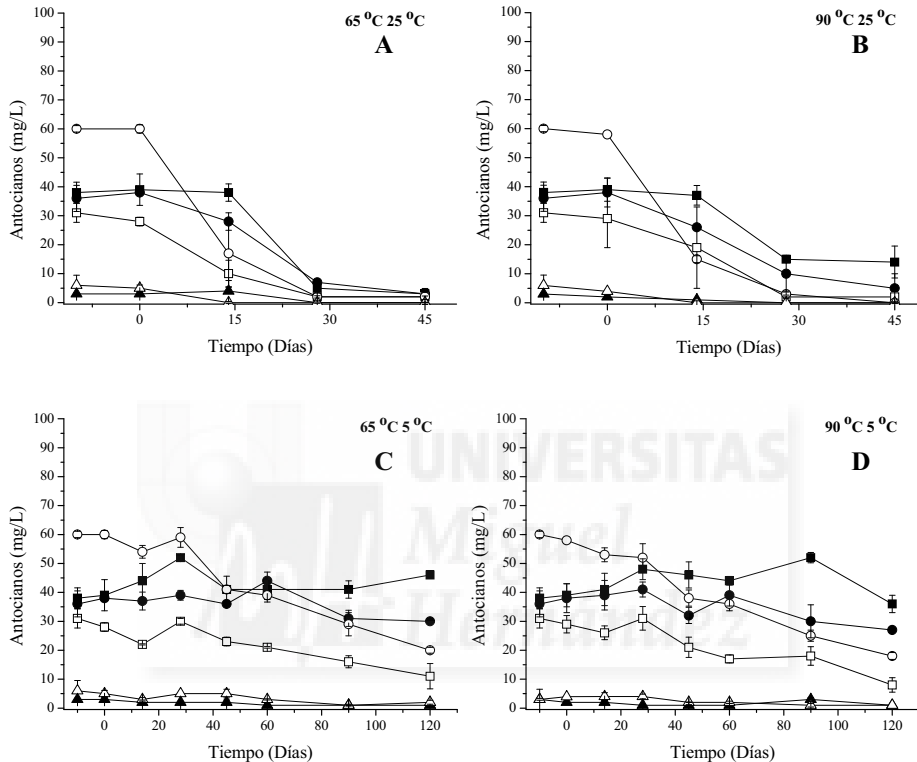


Figura 55A. Efecto del almacenamiento en la evolución del contenido en antocianos individuales en zumo de granada clarificado (A→ D) ■ Dp 3,5dG • Cy 3,5dG ▲ Pg 3,5dG □ Dp 3G ○ Cy 3G △ Pg 3G

La tendencia de la degradación de los antocianos individuales fue igual en ambos tipos de zumo, tratamiento térmico aplicado y temperaturas de almacenamiento. Sin embargo, la degradación de antocianos individuales disminuyó significativamente a 5 °C ($P < 0,05$). En cualquier caso, Cy3G era más inestable que DP3, 5DG y Cy3, 5DG durante el período de almacenamiento, se



observaron diferencias significativas entre los antocianos individuales, siendo DP3, 5DG el más abundante, seguido por Cy3, 5DG y Cy3G.

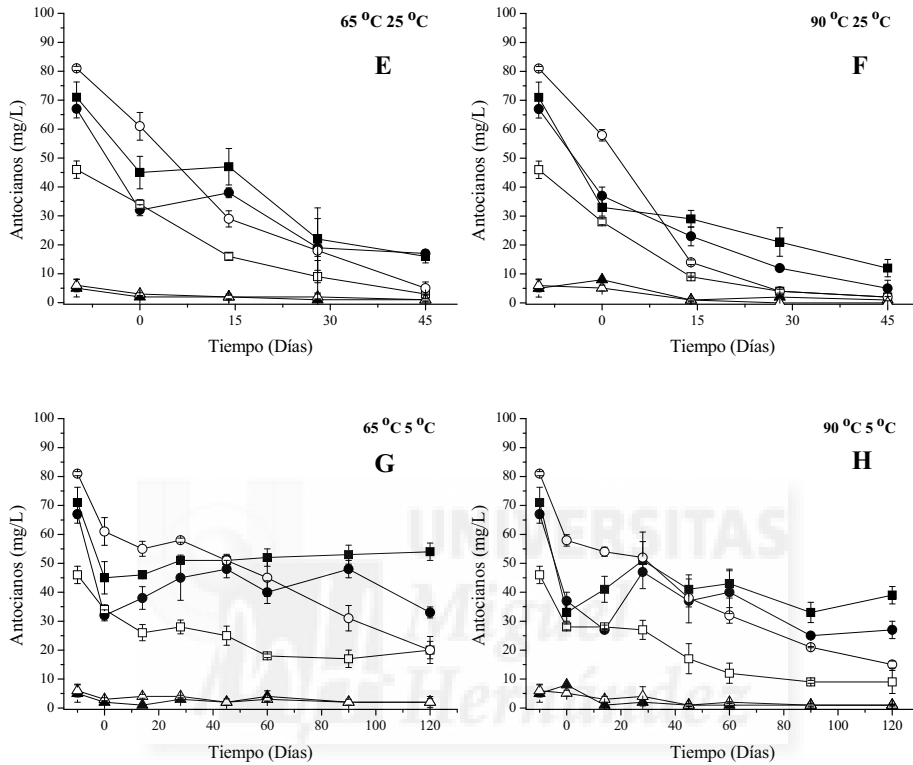


Figura 55B. Efecto del almacenamiento en la evolución del contenido en antocianos individuales en zumo de granada turbio (E→ H) ■ Dp 3,5dG ● Cy 3,5dG ▲ Pg 3,5dG □ Dp 3G ○ Cy 3G △ Pg 3G

De acuerdo con estos resultados, [Alighourchi y Barzegar, 2009](#) mostraron una mayor estabilidad de DP3, 5DG y Cy3, 5DG (antocianos diglucósidos) que Cy3G (antociano monoglucósido) en zumo de granada pasteurizado durante período de almacenamiento a 4 ° C.



7.12 Fotografías de los zumos a lo largo del almacenamiento

En el siguiente apartado se observan las imágenes de zumos de granada tomadas durante los ensayos de pasteurización y almacenamiento a largo plazo.

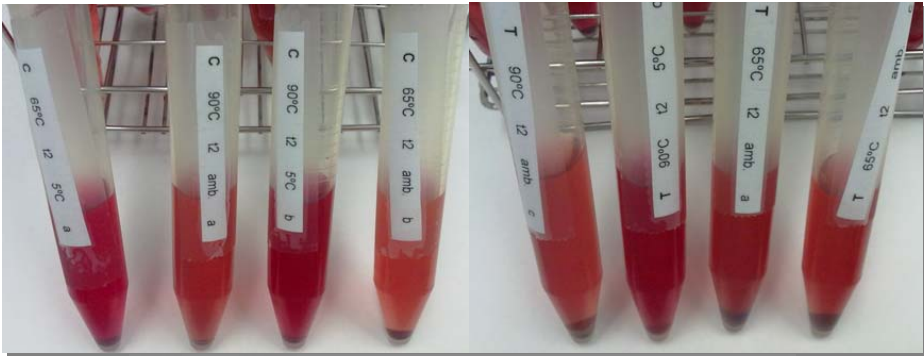


Imagen 21. Zumos Almacenamiento: 14 días

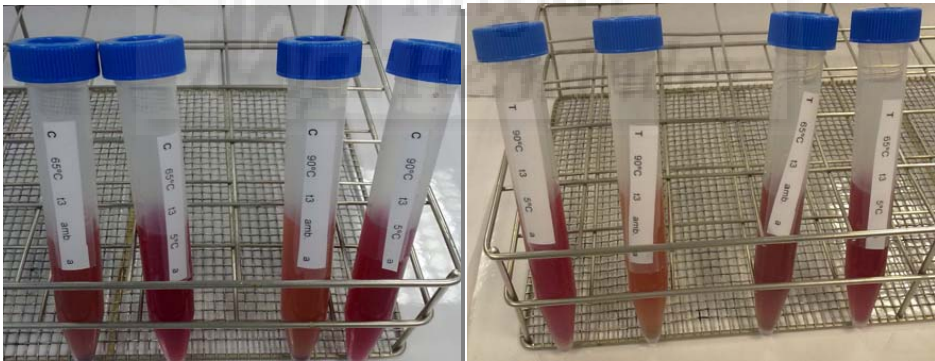


Imagen 22. Zumos Almacenamiento: 21 días



Imagen 23. Zumos Almacenamiento: 28 días



Imagen 24. Zumos Almacenamiento: 45 días



Imagen 25. Zumos Almacenamiento: 60 días



Imagen 26. Zumos Almacenamiento: 90 días



Imagen 27. Zumos Almacenamiento: 120 días



7.13 Conclusiones

Las conclusiones obtenidas del almacenamiento de los zumos de granada turbio y clarificado pasteurizados son las siguientes:

- Los zumos pasteurizados tanto a 65 °C 30 s como a 90 °C 5 s son microbiológicamente seguros y se mantienen así hasta los 45 días en las muestras almacenadas a 25 °C como hasta 120 días en las muestras almacenadas a 5 °C, excepto el zumo turbio pasteurizado a 65 °C 30 s almacenado a 25 °C.
- La pérdida de coloración roja de los zumos de granada es mayor tras el tratamiento de 90 °C 5 s. Además, el almacenamiento a 25 °C influye de forma negativa, observando visualmente a los 21 días que los zumos ya están marrones. Sin embargo, la temperatura de almacenamiento a 5 °C mantiene los zumos rojos hasta los 120 días.
- La capacidad antioxidante de los zumos no varía independientemente del tratamiento de pasteurización y la temperatura de almacenamiento incluso puede aumentar al final del almacenamiento.
- Los resultados de las determinaciones de pH indican que no hay variación a lo largo del tiempo de almacenamiento independientemente del tratamiento de pasteurización y la temperatura de almacenamiento.
- El tratamiento de pasteurización no influye en la cantidad de polifenoles totales de los zumos, pero sí el almacenamiento, observando una disminución tanto en las muestras almacenadas a 25 °C hasta los 45 días y las almacenadas a 5 °C hasta los 28 días. Sin embargo, las muestras almacenadas a 5 °C a los 120 días presentan un contenido en polifenoles totales prácticamente igual que el inicial.
- La temperatura de almacenamiento influye de forma importante en el índice de pardeamiento de los zumos, ya que, a temperatura ambiente el pardeamiento llega a triplicarse comparado con la temperatura de refrigeración.



- La evolución de los antocianos a lo largo del tiempo de pasteurización indicó que la temperatura de almacenamiento influye de forma drástica en el contenido de los mismos.



CAPÍTULO 8. Conclusiones





CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

- El **número de cortes** a los que se somete la fruta y el **tipo de maquinaria** utilizada en el procesado para la extracción de zumo, **tiene una alta importancia en los rendimientos de extracción así como en los compuestos bioactivos** que presenta el zumo extraído. Cabe destacar la influencia de la presencia de corteza durante la extracción del zumo en la cantidad de compuestos bioactivos presentes al final del tratamiento. Además, la fruta sometida a mayor número de cortes presenta mayores rendimientos de extracción de zumo.
- La utilización de **clarificantes** produce una modificación en el color rojo del zumo de granada así como en los compuestos bioactivos. La **ovoalbúmina** es el clarificante que mayor pérdida de color y polifenoles produce. La utilización de **bentonita** a concentraciones a partir de 0.5 g/L consigue reducir la turbidez y afecta mínimamente al color rojo.
- La **filtración tangencial** es una tecnología muy útil para la obtención de un zumo de granada clarificado, modificando mínimamente sus propiedades y composición, siendo el proceso rentable y rápido. La microfiltración produce una menor afectación en las propiedades físico-químicas del zumo de granada que la ultrafiltración, comparando los parámetros analizados con el zumo inicial. Además, es posible la optimización del proceso de filtración mediante un tratamiento enzimático previo al zumo, incrementando el caudal y sin provocar cambios en el zumo.
- El proceso de **pasteurización** del zumo de granada turbio y clarificado provoca unas modificaciones mínimas, siendo el tratamiento de 65 °C 30 s el que menos modificaciones provoca en el zumo.
- La temperatura de **almacenamiento** del zumo de granada es un factor muy importante para la vida útil del mismo, ya que, cuanto mayor es la temperatura de almacenamiento mayor degradación se produce del mismo, tanto en sus características organolépticas como químicas.

CAPÍTULO 9. Bibliografía





CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

- Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D., Mukhtar, H., 2005. Anthocyanin and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International Journal of Cancer* 113, 423-433.
- AIJN, 2008. Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community (AIJN). Reference Guideline for Pomegranate Juice, Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juices
- Akbarpour, V., Milani, J., Hemmati, K., 2009. Mechanical property of pomegranate seed aspect by moisture content. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science* 6(4), 447-453.
- Al-Maiman, S. A., Ahmad, D., 2002. Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chemistry* 76, 437-441.
- Alighourchi, H., Barzegar, M., 2009. Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Journal of Food Engineering* 90, 179-185.
- Alighourchi, H., Barzegar, M., Abbasi, S., 2008. Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum*, L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *European Food Research and Technology* 227(3), 881-887.
- Alper, N., Bahçeci, K. S., Acar, J., 2005. Influence of processing and pasteurization on color values and total phenolic compounds of pomegranate juice. *Journal of Food Processing and Preservation* 29(5-6), 357-368.



- Alper, N., Onsekizoglu, P., Acar, J., 2011. Effects of various clarification treatments on phenolic compounds and organic acid compositions of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Journal of Food Processing and Preservation* 35(3), 313-319.
- Artik, N., Cemeroglu, B., Aydar, G., 1994. Use of activated carbon for color control in the apple juice concentrate (AJC) production. *Fruit Processing* 2, 34-39.
- Azadzoï, K. M., Schulman, R. N., Aviram, M., Siroky, M. B., 2005. Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *Journal of Urology* 174(1), 386-393.
- Bagger-Jørgensen, R., Meyer, A. S., 2004. Effects of different enzymatic pre-press maceration treatments on the release of phenols into blackcurrant juice. *European Food Research and Technology* 219(6), 620-629.
- Balik, J., 2003. Effect of bentonite clarification on concentration of anthocyanins and colour intensity of red and rose wines. *Horticultural Science* 30(4), 135-141.
- Barros, S., Mendes, E., Peres, L., 2004. Influence of depectinization in the ultrafiltration of West Indian cherry (*Malpighia glabra* L.) and pineapple (*Ananas comosus*) juices. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 24(2), 194-201.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical biochemistry* 239, 70-76.
- Borges, G., Crozier, A., 2012. HPLC-PDA-MS fingerprinting to assess the authenticity of pomegranate beverages. *Food Chemistry* 135, 1863-1867.
- Borges, G., Mullen, W., Crozier, A., 2010. Comparison of the polyphenolic composition and antioxidant activity of European commercial fruit juices. *Food and Function* 1(1), 73-83.



- Boulton, R., 2001. The Copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A Critical Review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52(2).
- Bozkurt, H., Gögüs, F., Eren, S., 1999. Nonenzymic browning reactions in boiled grape juice and its models during storage. *Food Chemistry* 64(1), 89-93.
- Brouillard, R., 1982. Chemical structure of anthocyanins. In *Anthocyanins as food colors*. P. Markakis, Ed, Academic Press, New York, 1-40.
- Brownmiller, C., Howard, L.R., Prior, R.L., 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science* 73, 72–79.
- Cabrita, L., Fossen, T., Andersen, O.M., 2000. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry* 68, 101-107.
- Çam, M., Hisil, Y., Durmaz, G., 2009. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry* 112(3), 721-726.
- Casp, A., Abril, J., 2003. *Procesos de conservación de alimentos*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid
- Cassano, A., Conidi, C., Drioli, E., 2011. Clarification and concentration of pomegranate juice (*Punica granatum* L.) using membrane processes. *Journal of Food Engineering* In Press, Corrected Proof.
- Celik, I., Temur, A., Isik, I., 2009. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed rats. *Food Chemical and Toxicology* 47(1), 145-149.
- Cerdá, B., Espin, J.C., Parra, S., Martínez, P., Tomás-Barberán, F.A., 2004. The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolized into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives



- by the colonic microflora of healthy humans. *European Journal of Nutrition* 43, 205-220.
- Cerdá, B., Llorach, R., Cerón, J.J., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., 2003. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *European Journal of Nutrition* 42(1), 18-28.
- Clifford, M.N., Scalbert, A., 2000. Review: ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 118-1125.
- Cheryan, M., 1998. *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. Technomic Publishing.
- Dallas, C., Ricardo-da-Silva, J.M., Laureano, O., 1996. Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2 and acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2402-2407.
- Davidson, M.H., Maki, K.C., Dicklin, M.R., Feinstein, S.B., Witchger, M.S., Bell, M., McGuire, D.K., Provos, J.C., Liker, H., Aviram, M., 2009. Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *American Journal of Cardiology* 104(7), 936-942.
- De Nigris, F., Balestrieri, M.L., Williams-Ignarro, S., D'Armiento, F.P., Fiorito, C., Ignarro, L., Napoli, C., 2007. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric Oxide- Biology and Chemistry* 17, 50-54.
- De Pascual-Teresa, S., Sánchez-Ballesta, M.T., 2008. Anthocyanins: From plant to health. *Phytochemistry Reviews* 7(2), 281-299.



- De Simon, B.F., Perez-Illzarbe, J., Hernández, T., Gomezcordoves, C., Estrella, I., 1992. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1565-1571.
- Deak, T., Beuchat, L.R., 1996. Yeasts in specific types of foods. In T. Deak and L.R. Beuchat (Eds.) *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. pp.61-96. CRS Press: New York.
- Díaz-García, M.C., Obón, J.M., Castellar, M.R., Collado, J., Alacid, M., 2013. Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food Chemistry* 138(2-3), 938-949.
- Du, C.T., Wang, P.L., Francis, F.J., 1975. Anthocyanins of pomegranate, *Punica granatum*. *Journal of Food Science* 40(2), 417-418.
- Echavarria, A., Pagán, J., Ibarz, A., 2011. Effect of previous enzymatic recirculation treatment through a tubular ceramic membrane on ultrafiltration of model solution and apple juice. *Journal of Food Process Engineering* 102(4), 334-339.
- Eiro, M.J., Heinonen, M., 2002. Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7461-7466.
- Eksi, A., Özhamamci, I., 2009. Chemical composition and guide values of pomegranate juice. *GIDA* 34(5), 265-270.
- Espín, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J., García-Viguera, C., 2000. Anthocyanin-Based Natural Colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(5), 1588-1592.
- Fadavi, A., Barzegar, M., Azizi, M.H., Bayat, M., 2005. Physicochemical Composition of Ten Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) Grown in Iran. *Food Science and Technology International* 11(2), 113-119.



- Fadavi, A., Barzegar, M., Hossein Azizi, M., 2006. Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis* 19(6-7), 676-680.
- Fang, Z., Zhang, M., Sun, Y., Sun, J., 2006. How To Improve Bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) Juice Color Quality: Effect of Juice Processing on Bayberry Anthocyanins and Polyphenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(1), 99-106.
- Faria, A., Monteiro, R., Mateus, N., Azevedo, I., Calhau, C., 2007. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice intake on hepatic oxidative stress. *European Journal of Nutrition* 46(5), 271-278.
- Fazaeli, M., Yousefi, S., Emam-Djomeh, Z., 2011. Investigation on the effects of microwave and conventional heating methods on the phytochemicals of pomegranate (*Punica granatum* L.) and black mulberry juices. *Food Research International* In Press, Corrected Proof.
- FDA, U S Food and Drug Administration. www.fda.gov/
- Ferrari, G., Maresca, P., Ciccarone, R., 2010. The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. *Journal of Food Engineering* 100, 245–253.
- Fischer-Zorn, M., Ara, V., 2007. Pomegranate juices: chemical compositions and adulteration potential. *Flüss. Obst* 74, 386-393.
- Fischer, U.A., Dettmann, J.S., Carle, R., Kammerer, D.R., 2011. Impact of processing and storage on the phenolic profiles and contents of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. *European Food Research and Technology* 233, 797-816.
- Forest, C.P., Padma-Nathan, H., Liker, H.R., 2007. Efficacy and safety of pomegranate juice on improvement of erectile dysfunction in male patients with mild to



- moderate erectile dysfunction: a randomized, placebo-controlled, double-blind crossover study. *International Journal of Impotential Research* 19(6), 564-567.
- García-Viguera, C., Bridle, P., 1999. Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. *Food Chemistry* 64(1), 21-26.
- Gil, M.I., García-Viguera, C., Artés, F., Tomás-Barberán, F.A., 1995. Changes in pomegranate juice pigmentation during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 68(1), 77-81.
- Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(10), 4581-4589.
- Girard, B., Fukumoto, L.R., Koseoglu, S.S., 2000. Membrane processing of fruit juices and beverages: A review. *Critical Reviews in Biotechnology* 20(2), 109-175.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R. E., 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; Wrolstad, R.E., Acree, T.E.,
- An, H., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Sporns, P., Eds.; John Wiley & Sons: New York, USA, 2001, F1.2.1–F1.2.13
- Goiffon, J.-P., Mouly, P.P., Gaydou, E.M., 1999. Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 382, 39-50.
- Gökmen, V., Artik, N., Acar, J., Kahraman, N., Poyrazoglu, E., 2001. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid



- compositions of apple juice. *European Food Research and Technology* 213, 194-199.
- González-Molina, E., Moreno, D.A., García-Viguera, C., 2009. A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chemistry* 115(4), 1364-1372.
- González-Sarriás, A., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., García-Conesa, M.T., 2009. Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signaling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Molecular Nutrition and Food Research* 53(6), 686-698.
- Guzman, M., 2010. *Manual de espectrofotometría en enología*. AMV Ediciones. Madrid.
- Hager, A., Howard, L.R., Prior, R.L., Brownmiller, C., 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed black raspberry products. *Journal of Food Science* 73(134-140).
- Häkkinen, S.H., Kärenlampi, S. O., Mykkänen, H.M., Heinonen, I.M., Törrönen, A.R., 2000. Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *European Food Research and Technology* 212, 75-80.
- Hamad, A. W., Al-Momene, W., 2009. Separation and purification of crude ellagic acid from white flesh of pomegranate fruits as a potent anti-carcinogenic. *New Biotechnology* 25(1), 286.
- Hea, Y., Zhijuan, J., Shunxin, L., 2007. Effective clarification of apple juice using membrane filtration without enzyme and pasteurization pretreatment. *Separation and Purification Technology* 57(2), 366-373.
- Hidalgo, J., 2003. *Tratado de enología II*. Mundi-Prensa Libros, Madrid.



- Husson, E., Araya-Farias, M., Desjardins, Y., Bazinet, L., 2013. Selective anthocyanins enrichment of cranberry juice by electro dialysis with ultrafiltration membranes stacked. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 17, 153-162.
- Izquierdo, L., Carbonell, J.V., Navarro, J.L., Sendra, J.M., 2007. Method of obtaining refrigerated pasteurised citrus juices. Patent WO/2007/042593.
- Katasonova, O., Fedotov, P., 2009. Methods for continuous flow fractionation of microparticles: Outlooks and fields of application. *Journal of Analytical Chemistry* 64(3), 212-225.
- Khanbabaee, K.V.R., 2001. Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports* 18, 641-649.
- Kirimura, J., Shimizu, A., Kimizuka, A., Ninomiya, T., Katsuya, N., 1969. The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17, 689-695.
- Koyama, S., Cobb, L.J., Mehta, H.H., Seeram, N.P., Heber, D., Pantuck, A.J., Cohen, P., 2010. Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF-IGFBP axis. *Growth Hormone & IGF Research* 20(1), 55-62.
- Kulkarni, A.P., Aradhya, S.M., Divakar, S., 2004. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chemistry* 87, 551-557.
- Lansky, E.P., Jiang, W., Mo, H., Bravo, L., Froom, P., Yu, W., Harris, N.M., Neeman, I., Campbell, M.J., 2005. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Investigational New Drugs* 23, 11-20.



- Lansky, E.P., Newman, R.A., 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 109(2), 177-206.
- Larrosa, M., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2006. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 17(9), 611-625.
- Lee, C.J., Chen, L.G., Liang, W.L., Wanga, C.C., 2010. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food Chemistry* 118, 315-322.
- Lee, W.C., Yusof, S., Hamid, N.S.A., Baharin, B.S., 2007. Effects of fining treatment and storage temperature on the quality of clarified banana juice. *LWT - Food Science and Technology* 40, 1755-1764.
- Leistner, L., 1999. Combined methods for food preservation. In Shafiurr Rahman, M. *Handbook of Food Preservation*. 457-485.
- Lester, G.E., Lewers, K.S., Medina, M.B., Saftner, R.A., 2012. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis* 27, 102–107.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S., 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry* 96(2), 254-260.
- Ma, Y., Cheung, P.C.K., 2007. Spectrophotometric determination of phenolic compounds by enzymatic and chemical methods. A comparison of structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4222-4228.



- Macheix, J.J., Fleuriot, A., Billot, J., 1990. Fruit Phenolics. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Madrigal-Carballo, S., Rodriguez, G., Krueger, C.G., Dreher, M., Reed, J.D., 2009. Pomegranate (*Punica granatum* L.) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *Journal of functional foods* 1, 324-329.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O., Amiot, M. J., 2000. Color Stability of Commercial Anthocyanin-Based Extracts in Relation to the Phenolic Composition. Protective Effects by Intra- and Intermolecular Copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(1), 170-176.
- MARM, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente. Anuario de Estadística 2011.
<http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/introduccion.htm> [21
Noviembre 2013].
- Martí, N., Pérez-Vicente, A., García-Viguera, C., 2002. Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(2), 217-221.
- Maskan, M., 2006. Production of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice concentrate by various heating methods: colour degradation and kinetics. *Journal of Food Engineering* 72(3), 218-224.
- Matsufuji, H., Otsuki, T., Takeda, T., Chino, M., Takeda, M., 2003. Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(10), 3157-3161.
- Mazza, G., Brouillard, R., 1987. Color stability and structural transformations of Cyanidin 3,5-Diglucoside and Four 3-Deoxyanthocyanins in aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35, 422-426.



- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B., 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4009-4017.
- McLaren, K., 1980. Food colorimetry. *Dev Food Colours* 1, 27-45.
- Medina, M.B., 2011a. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *Journal of functional foods* 3, 79-87.
- Medina, M.B., 2011b. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(5), 1565-1571.
- Melgarejo, P., Salazar, D.M., 2003. *Tratado de Fruticultura para zonas áridas y semiáridas*. Mundi-Prensa, Madrid.
- Melgarejo, P., Salazar, D.M., Artes, F., 2000. Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *European Food Research and Technology* 211(3), 185-190.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D.A., Bartual, J., Saura, D., Martí, N., 2011. Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(10), 1893-1906.
- Miguel, G., Dandlen, S., Antunes, D., Neves, A., Martins, D., 2004. The Effect of Two Methods of Pomegranate (*Punica granatum* L) Juice Extraction on Quality During Storage at 4 °C. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2004(5), 332-337.
- Min, S., Evrendilek, G.A., Zhang, H.Q., 2007. Pulsed electric fields: Processing system, microbial and enzyme inhibition, and shelf life extension of foods. *IEEE Transactions on Plasma Science* 35(1), 59-73.



- Mirdehghan, S.H., Rahemi, M., 2007. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae* 111(2), 120-127.
- Mirsaeedghazi, H., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, S.M., Ahmadvani, R., Shafiee, A., 2010. Effect of membrane clarification on the physicochemical properties of pomegranate juice. *International Journal of Food Science & Technology* 45(7), 1457-1463.
- Mirsaeedghazi, H., Mousavi, S.M., Seyyed, M., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., Aroujalian, A., Navidbakhsh, M., 2012. Comparison between ultrafiltration and microfiltration in the clarification of pomegranate juice. *Journal of Food Process Engineering* 35(3), 424-436.
- Molina, R., 1994. Clarificación de mostos y vinos. Vicente Ediciones. Madrid, España., 195.
- Molina, R., 2000. Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas. AMV Ediciones. Mundi-Prensa. Madrid, España, 317.
- Mori-Okamoto, J., Otawara-Hamamoto, Y., Yamato, H., Yoshimura, H., 2004. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 93-101.
- Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., Khodaparast, M.H.H., 2009. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity of pomegranate juice of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry* 115(4), 1274-1278.
- Mulder, M., 1996. Basic principles of membrane technology. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands



- Mullen, W., Marks, S.C., Crozier, A., 2007. Evaluation of Phenolic Compounds in Commercial Fruit Juices and Fruit Drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(8), 3148-3157.
- Nagy, S., Arraway, J.A., Rhodes, M.E., 1988. *Adulteration of Fruit Juice Beverages*. Marcel Dekker, New York, NY, 21-48.
- Narayanan, B.A., Re, G.G., 2001. IGF-II down regulation associated cell cycle arrest in colon cancer cells exposed to phenolic antioxidant ellagic acid. *Anticancer Research* 21, 359-364.
- Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., 2003. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel Extracts. *Journal of Food Science* 68(4), 1473-1477.
- Neurath, A.R., Strick, N., Li, Y.-Y., Debnath, A.K., 2005. *Punica granatum* (Pomegranate) Juice Provides an HIV-1 Entry Inhibitor and Candidate Topical Microbicide. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1056(1), 311-327.
- Niva, M., 2007. "All foods affect health": Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite* 48, 384-393.
- Obón, J.M., García-Díaz, M.C., Castellar, M.R., 2011. Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 760-771.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., 1992. Pharmacologically active tannins isolated from medicinal plants. *Basic life sciences* 59, 539-569.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10), 4619-4626.



- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3122-3128.
- Palou, L., Guardo, A., Montesinos-Herrero, C., 2010. First report of *Penicillium* spp. and *Pilidiella granati* causing postharvest fruit rot of pomegranate in Spain. *New Disease Reports* 22, 21.
- Parashar, A., Gupta, C., Gupta, S.K., Kumar, A., 2009. Antimicrobial ellagitannin from pomegranate (*Punica granatum*) fruits. *International Journal of Fruit Science* 9(3), 226-231.
- Pérez-Vicente, A., Serrano, P., Abellán, P., García-Viguera, C., 2004. Influence of packaging material on pomegranate juice colour and bioactive compounds, during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(7), 639-644.
- Pinelo, M., Zeuner, B., Meyer, A., 2010. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *FBP* 88, 259-265.
- Poyrazoglu, E., Gökmen, V., Artik, N., 2002. Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* 15(5), 567-575.
- Prashanth, D.J., Asha, M.K., Amit, A., 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia* 72, 171-173.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4290-4302.



- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.M., 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* 90, 494-507.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10), 1231-1237.
- Rein, M., 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Helsinki: University of Helsinki, 10-14.
- Riyahi, R., Rafiee, S., Dalvand, M.J., Keyhani, A., 2011. Some physical characteristics of pomegranate, seeds and arils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 7(6), 1523-1537.
- Rosenblat, M., Hayek, T., Aviram, M., 2006. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis* 187(2), 363-371.
- Rouseff, R. L., 1990. Bitterness in foods and beverage. In *Developments in Food Science*. Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands(R.L. Rouseff, ed.) 25, 1-12.
- Saleem, A., Husheem, M., Härkönen, P., Pihlaja, K., 2002. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 327-336.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., De Ancos, B., Martín, B.O., Cano, M.P., 2005. Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4403-4409.



- Santón, M., Treiche, H., Valduga, E., Cabra, L., Di Luccio, M., 2008. Evaluation of enzymatic treatment of peach juice using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 507-512.
- Sartippour, M., Seeram, N., Heber, D., Pantuck, A., 2008. Ellagitannin-rich pomegranate extract inhibits angiogenesis in prostate cancer in vitro and in vivo. *International Journal Oncology* 32, 475-480.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in Food Science and Nutrition* 45, 287-306.
- Seeram, N.P., Lee, R., Hardy, M., Heber, D., 2005. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology* 41(1), 49-55.
- Seeram, N.P., Henning, S.M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., Heber, D., 2006. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 h. *Journal of Nutrition* 136, 2481-2485.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G., Heber, D., 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16(6), 360-367.
- Seeram, N.P., Lee, R., Heber, D., 2004. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinica Chimica Acta* 348(1-2), 63-68.
- Seeram, N.P., Zhang, Y., McKeever, R., Henning, S.M., Lee, R.P., Suchard, M.A., Li, Z., Chen, S., Thames, G., Zerlin, A., Nguyen, M., Wang, D., Dreher, M., Heber,



- D., 2008. Pomegranate juice and extracts provide similar levels of plasma and urinary ellagitannin metabolites in human subjects. *Journal of Medicinal Food* 11(2), 390-394.
- Sepúlveda, E., Sáenz, C., Peña, A., Robert, P., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., 2010. Influence of the genotype on the anthocyanin composition, antioxidant capacity and color of Chilean pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. *Chilean Journal of Agricultural Research* 70(1), 50-57.
- Singh, R.P., Murthy, K.N. C., Jayaprakasha, G.K., 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using in vitro models. *Food Chemistry* 50, 81-86.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Singleton, V.L., Rossi, J.L., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Skrede, G., Wrolstad, R.E., Durst, R.W., 2000. Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science* 65(2), 357-364.
- Somers, T.C., Evans, M.E., 1986. Evolution of red wines I. Ambient influences on colour composition during early maturation. *Vitis* 25, 31-39.
- Song, J.M., Lee, K.H., Seong, B.L., 2005. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research* 68(2), 66-74.



- Spanos, G.A., Wrolstad, R.E., Heatherbell, D.A., 1990. Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1572-1579.
- Srimanta, P., Bharihoke, R., Chakraborty, S., Kumar, S., Sirshendu, D., Sunando, D., 2008. An experimental and theoretical analysis of turbulence promoter assisted ultrafiltration of synthetic fruit juice. *Separation and Purification Technology* 62, 659-667.
- Stankovi, S., Jovi, S., Jelena, I., 2004. Bentonite and gelatine impact on the young red wine coloured matter. *Food Technology and Biotechnology* 42(3), 183-188.
- Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V., 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables- Evaluation of spectrophotometric methods. *Food Chemistry* 54, 607-616.
- Stutz, C., 1993. The use of enzymes in ultrafiltration. *Fruit Processing* 7, 248-252.
- Suárez-Jacobo, A., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A.X., Saldo, J., 2010. Effect of UHPH on indigenous microbiota of apple juice: A preliminary study of microbial shelf-life. *International Journal of Food Microbiology* 136(3), 261-267.
- Swart, G.J., Blignaut, C.M., Jooste, P.J., 2003. Other Pasteurization Processes. *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*, Academic Press.
- Syed, D.N., Afaq, F., Mukhtar, H., 2007. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminars in Cancer Biology* 17, 377-385.
- Talcott, S.T., Krennek, K.A. 2012. Analysis Methods of Ellagitannins. *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals* pp. 181-205. Wiley-Blackwell.



- Tezcan, F., Gültekin-Özgüven, M., Diken, T., Özçelik, B., Erim, F.B., 2009. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chemistry* 115(3), 873-877.
- Thiem, B., Golinska, O., 2004. Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. *Fitoterapia* 75(93-95).
- Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J., 2009. Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science and Technology* 20, 137-145.
- Tournas, V.H., Heeres, J., Burgess, L., 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology* 23(7), 684-688.
- Tsai, P., Huang, H., 2004. Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. *Food Research International* 37, 313-318.
- Tükyılmaz, M., Yemis, O., Ökan, M., 2012. Clarification and pasteurisation effects on monomeric anthocyanins and percent polymeric colour of black carrot (*Daucus carota* L.) juice. *Food Chemistry* 134(2), 1052-1058.
- Türk, G., Sönmez, M., Aydın, M., Yüce, A., Gür, S., Yüksel, M., Aksu, E.H., Aksoy, H., 2008. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clinical Nutrition* 27(2), 289-296.
- Türk, G., Sönmez, M., Çeribasi, A.O., Yüce, A., Atessahin, A., 2010. Attenuation of cyclosporine A-induced testicular and spermatozoal damages associated with oxidative stress by ellagic acid. *International Immunopharmacology* 10(2), 177-182.



- Turfan, Ö., Türkyılmaz, M., Yemis, O., Özkan, M., 2011. Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juice from sacs and whole fruit. *Food Chemistry* 129(4), 1644-1651.
- Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M., Amir, R., 2007. Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(23), 9559-9570.
- Uzuner, S., Onsekizoglu, P., Acar, J., 2011. Effects of processing techniques and cold storage on ellagic acid and concentration and some quality parameters of pomegranate juice. *GIDA* 36(5), 263-269.
- van Boekel, M.A.J.S., 2009. *Kinetic Modeling of Reactions in Foods*. CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton.
- Varasteh, F., Arzani, K., Barzegar, M., Zamani, Z., 2012. Changes in anthocyanins in arils of chitosan-coated pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Rabbab-e-Neyriz) fruit during cold storage. *Food Chemistry* 130(2), 267-272.
- Vardin, H., Fenercioğlu, H., 2003. Study on the development of pomegranate juice processing technology: clarification of pomegranate juice. *Nharung/Food* 47(5), 300-303.
- Vaskonen, T., Mervaala, D., Krogerus, L., Karppanen, H., 2007. Supplementation of plant sterols and minerals benefits obese zucker rats fed an antherogenic diet. *Journal of Nutrition* 132, 231-237.
- Wrolstad, R.E., Durst, W., Lee, J., 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology* 16, 423-428.



- Yazdanshenas, M., Reza Tabatabaee-Nezhad, S.A., Soltanieh, M., Roostaazad, R., Khoshfetrat, A.B., 2010. Contribution of fouling and gel polarization during ultrafiltration of raw apple juice at industrial scale. *Desalination* 258, 194-200.
- Yu, J., Lencki, R.W., 2004. Effect of enzyme treatments on the fouling behavior of apple juice during microfiltration. *Journal of Food Engineering* 63, 413-423.
- Zafrilla, P., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., 2001. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8), 3651-3655.
- Zhang, Y., Krueger, D., Durst, R., Lee, R., Wang, D., Seeram, N., Heber, D., 2009. International Multidimensional Authenticity Specification (IMAS) Algorithm for detection of commercial pomegranate juice adulteration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(6), 2550-2557.



CAPÍTULO 10. Anexos



CAPÍTULO 10. ANEXOS

ANEXOS CAPÍTULO 3

Tabla 1. Influencia tipo de corte en el rendimiento de extracción de arilos (%)

Tipo de corte	Media	± SD
Sin cortar	78.00	1.00
Mitad	85.33	2.08
Cuartos	92.66	2.31

Tabla 2. Influencia del prensado en el rendimiento de zumo (%)

Tipo de prensado	Media	± SD
Prensa neumática arilo	35.40	1.20
Prensa neumática arilo+corteza	26.51	1.68
Licadora casera	31.33	0.58
Licadora industrial arilo	32.33	4.04
Licadora industrial arilo+corteza	24.66	1.53
Licadora industrial fruta entera	40.30	2.34



Tabla 3. Influencia del prensado en la composición de compuestos bioactivos en zumo de granada (mg/L)

	SIN CORTEZA		CON CORTEZA	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
Ácido elágico	14.00	1.00	75.37	4.15
Punicalaginas	15.00	1.00	404.00	1.73
Antocianos totales	147.00	7.21	120.67	10.06





ANEXOS CAPÍTULO 5

Tabla 4. Absorbancia 520 nm Clarificación Convencional con Albúmina

Albúmina (g/L)	AP		65 °C 30 s		90 °C 5 s	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
0	1.49	0.01	1.42	0.02	1.47	0.03
0.1	0.95	0.04	0.92	0.02	0.94	0.02
0.25	0.73	0.01	0.73	0.02	0.74	0.02
0.5	0.66	0.02	0.64	0.00	0.68	0.05
1	0.61	0.02	0.61	0.02	0.64	0.05
2	0.54	0.02	0.54	0.02	0.62	0.06

Tabla 5. Absorbancia 700 nm Clarificación Convencional con Albúmina

Albúmina (g/L)	AP		65 °C 30 s		90 °C 5 s	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
0	0.53	0.01	0.49	0.03	0.55	0.01
0.1	0.22	0.01	0.22	0.03	0.26	0.00
0.25	0.11	0.01	0.12	0.02	0.15	0.01
0.5	0.08	0.01	0.08	0.02	0.13	0.03
1	0.08	0.01	0.07	0.01	0.12	0.02
2	0.07	0.03	0.06	0.01	0.15	0.03



Tabla 6. Índice de Pardeamiento Clarificación Convencional con Albúmina

Albúmina (g/L)	AP		65 °C 30 s		90 °C 5 s	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
0	1.52	0.00	1.57	0.02	1.54	0.01
0.1	1.53	0.01	1.52	0.02	1.52	0.00
0.25	1.56	0.01	1.48	0.02	1.49	0.00
0.5	1.59	0.02	1.49	0.02	1.47	0.02
1	1.69	0.01	1.49	0.02	1.49	0.05
2	1.86	0.01	1.52	0.02	1.49	0.01

Tabla 7. Densidad de Color total Clarificación Convencional con Albúmina

Albúmina (g/L)	AP		65 °C 30 s		90 °C 5 s	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
0	2.66	0.02	2.65	0.12	2.61	0.08
0.1	1.88	0.09	1.85	0.05	1.84	0.06
0.25	1.54	0.03	1.56	0.03	1.51	0.04
0.5	1.42	0.01	1.42	0.04	1.42	0.07
1	1.31	0.02	1.34	0.03	1.32	0.05
2	1.17	0.08	1.21	0.01	1.22	0.08



Tabla 8. Polifenoles totales (mg/L) Clarificación Convencional con Albúmina

Albúmina (g/L)	AP		65 °C 30 s		90 °C 5 s	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
0	1870.98	22.96	1854.02	27.78	1802.23	65.34
0.1	1736.46	7.27	1668.90	36.53	1538.84	38.02
0.25	1745.68	79.51	1765.33	136.38	1584.82	52.40
0.5	1716.07	148.37	1482.89	35.73	1473.66	2.53
1	1629.32	90.11	1537.95	96.36	1359.97	67.49
2	1402.23	17.24	1378.13	30.30	1314.29	92.81

Tabla 9. Capacidad Antioxidante (mM ET) Clarificación Convencional con Albúmina

Albúmina (g/L)	AP		65 °C 30 s		90 °C 5 s	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
0	15.27	0.35	17.10	0.34	16.92	0.13
0.1	16.87	0.27	17.22	0.13	17.06	0.30
0.25	16.96	0.05	17.58	0.24	16.78	0.40
0.5	13.27	0.53	16.73	0.20	17.20	0.15
1	17.13	0.24	17.22	0.13	17.28	0.00
2	16.77	0.40	15.16	0.09	16.94	0.04



Tabla 10. Absorbancia 520 nm Clarificación Convencional con Bentonita

Bentonita (g/L)	AP		65 °C 30 s		90 °C 5 s	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
0	1.49	0.01	1.42	0.02	1.47	0.03
0.1	1.34	0.04	1.34	0.04	1.30	0.05
0.25	1.04	0.04	1.11	0.04	1.27	0.03
0.5	0.87	0.02	0.75	0.02	0.86	0.02
1	0.68	0.01	0.72	0.03	0.70	0.04
2	0.58	0.01	0.57	0.00	0.49	0.03

Tabla 11. Absorbancia 700 nm Clarificación Convencional con Bentonita

Bentonita (g/L)	AP		65 °C 30 s		90 °C 5 s	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
0	0.53	0.01	0.49	0.03	0.55	0.01
0.1	0.46	0.02	0.48	0.04	0.47	0.02
0.25	0.31	0.01	0.33	0.02	0.56	0.02
0.5	0.20	0.02	0.19	0.01	0.24	0.01
1	0.12	0.02	0.16	0.02	0.18	0.01
2	0.11	0.01	0.09	0.01	0.13	0.01



Tabla 12. Índice de Pardeamiento Clarificación Convencional con Bentonita

Bentonita (g/L)	AP		65 °C 30 s		90 °C 5 s	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
0	1.52	0.00	1.57	0.02	1.54	0.01
0.1	1.53	0.01	1.54	0.01	1.56	0.00
0.25	1.56	0.01	1.58	0.00	1.51	0.05
0.5	1.59	0.02	1.63	0.01	1.61	0.01
1	1.69	0.01	1.69	0.02	1.69	0.01
2	1.86	0.01	1.95	0.03	1.94	0.04

Tabla 13. Densidad de Color total Clarificación Convencional con Bentonita

Bentonita (g/L)	AP		65 °C 30 s		90 °C 5 s	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
0	2.66	0.02	2.65	0.12	2.61	0.08
0.1	2.45	0.04	2.43	0.01	2.37	0.09
0.25	2.00	0.08	2.18	0.07	2.01	0.05
0.5	1.81	0.04	1.55	0.04	1.74	0.04
1	1.55	0.04	1.58	0.04	1.49	0.08
2	1.39	0.04	1.42	0.03	1.12	0.06



Tabla 14. Polifenoles totales (mg/L) Clarificación Convencional con Bentonita

Bentonita (g/L)	AP		65 °C 30 s		90 °C 5 s	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
0	1870.98	22.96	1854.02	27.78	1802.23	65.34
0.1	1768.75	19.57	1883.04	73.87	1776.64	50.77
0.25	1832.29	50.79	1713.84	97.40	1753.42	87.57
0.5	1886.61	74.07	1717.71	68.01	1405.36	27.15
1	1620.09	77.02	1659.67	49.59	1705.36	87.76
2	1727.83	62.60	1553.57	57.45	1147.17	60.47

Tabla 15. Capacidad Antioxidante (mM ET) Clarificación Convencional con Bentonita

Bentonita (g/L)	AP		65 °C 30 s		90 °C 5 s	
	Media	± SD	Media	± SD	Media	± SD
0	15.27	0.35	17.10	0.34	16.92	0.13
0.1	16.07	0.42	16.75	0.18	16.97	0.11
0.25	17.04	0.51	16.91	0.04	16.78	0.13
0.5	16.79	0.60	17.47	0.18	14.22	0.09
1	16.23	0.20	16.91	0.44	17.32	0.23
2	16.74	0.09	17.04	0.20	13.14	0.51



Tabla 16. Caudal de Filtración (L/hm²) Membrana 0.2 µm

Tiempo (min)	Sin tratamiento enzimático	350 ppm Viscozym +150 ppm Fructozym	150 ppm Viscozym +350 ppm Fructozym
0	88.00	14.67	32.00
5	48.00	31.20	37.33
10	30.00	20.80	25.33
15	22.00	18.40	16.00
20	18.67	16.27	16.00
25	17.33	15.20	17.33
30	16.00	14.93	14.67
35	16.00	13.33	13.33
40	16.00	13.87	15.47
45	14.13	12.00	13.33
50	14.67	12.80	17.33
55	13.87	12.27	17.87
60	13.07	12.53	17.07
65	12.80	12.27	16.00
70	12.53	11.47	16.00
75	12.00	11.20	13.33
80	12.00	10.93	13.33
85	11.20	14.93	12.53
90	14.67	14.67	12.00



Tabla 17. Caudal de Filtración (L/hm²) Membrana 0.1 μm

Tiempo (min)	Sin tratamiento enzimático	350 ppm Viscozym +150 ppm Fructozym	150 ppm Viscozym +350 ppm Fructozym
0	100.00	9.07	53.33
5	24.00	16.80	37.33
10	21.33	16.53	29.33
15	16.00	13.87	22.67
20	13.33	11.73	22.67
25	11.20	12.00	20.00
30	11.73	11.20	17.33
35	10.67	11.20	17.33
40	9.87	10.40	14.67
45	9.87	9.33	14.67
50	9.33	8.53	14.67
55	9.33	8.80	14.67
60	8.80	8.53	14.13
65	8.53	8.80	13.33
70	8.53	8.00	12.53
75	8.53	7.47	12.00
80	7.73	7.73	11.47
85	7.73	7.20	12.00
90	7.20	7.47	11.25



ANEXOS CAPÍTULO 6

Tabla 18. pH de zumo de granada antes y después de pasteurizar

	CLARIFICADO		TURBIO	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	3.37	0.16	3.42	0.04
65 °C 30 s	3.43	0.02	3.69	0.09
90 °C 5 s	3.70	0.02	3.63	0.02

Tabla 19. Absorbancia 520 nm de zumo de granada antes y después de pasteurizar

	CLARIFICADO		TURBIO	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	1.23	0.01	1.53	0.03
65 °C 30 s	1.19	0.03	0.88	0.02
90 °C 5 s	0.96	0.02	0.88	0.01

Tabla 20. Índice de pardeamiento de zumo de granada antes y después de pasteurizar

	CLARIFICADO		TURBIO	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	0.76	0.11	0.76	0.10
65 °C 30 s	0.92	0.10	0.71	0.15
90 °C 5 s	0.97	0.09	0.86	0.15



Tabla 21. Densidad de color total de zumo de granada antes y después de pasteurizar

	CLARIFICADO		TURBIO	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	2.12	0.11	2.63	0.10
65 °C 30 s	1.90	0.10	1.60	0.15
90 °C 5 s	1.69	0.09	1.61	0.15

Tabla 22. Contenido en polifenoles totales de zumo de granada antes y después de pasteurizar

	CLARIFICADO		TURBIO	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	1128.45	35.00	1136.21	14.20
65 °C 30 s	1065.23	20.50	1167.24	41.04
90 °C 5 s	1033.62	9.75	1181.61	9.24

Tabla 23. Capacidad antioxidante de zumo de granada Clarificado antes y después de pasteurizar

	ABTS		FRAP		ORAC	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	16.59	0.20	10.00	0.31	18.68	0.79
65 °C 30 s	12.61	0.48	11.34	0.29	18.47	0.87
90 °C 5 s	13.55	1.11	10.58	0.46	18.79	0.24



Tabla 24. Capacidad antioxidante de zumo de granada Turbio antes y después de pasteurizar

	ABTS		FRAP		ORAC	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	13.91	0.64	6.19	0.20	13.94	1.01
65 °C 30 s	14.85	1.39	7.47	0.03	10.21	0.50
90 °C 5 s	15.50	0.61	6.92	0.29	9.20	0.95





ANEXOS CAPÍTULO 7

Tabla 25. pH de Zumo de Granada Clarificado

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	3.3	0.16	3.3	0.16	3.3	0.16	3.3	0.16
0	3.4	0.00	3.4	0.00	3.7	0.01	3.7	0.01
7	3.4	0.04	3.4	0.06	3.6	0.09	3.6	0.02
14	3.0	0.08	3.1	0.27	3.1	0.26	3.2	0.12
21	3.2	0.12	3.3	0.01	3.5	0.04	3.5	0.01
28	3.3	0.01	3.2	0.03	3.5	0.00	3.5	0.00
45	3.2	0.00	3.2	0.01	3.4	0.04	3.4	0.03
60			3.6	0.01			3.6	0.00
90			3.3	0.01			3.5	0.02
120			3.3	0.01			3.5	0.02

Tabla 26. pH de Zumo de Granada Turbio

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	3.4	0.04	3.4	0.04	3.4	0.04	3.4	0.04
0	3.6	0.09	3.6	0.09	3.6	0.02	3.6	0.02
7	3.6	0.03	3.6	0.00	3.6	0.01	3.6	0.01
14	3.3	0.00	3.3	0.03	3.2	0.03	3.3	0.02
21	3.4	0.07	3.5	0.01	3.5	0.01	3.5	0.03
28	3.5	0.01	3.5	0.04	3.5	0.00	3.5	0.01
45	3.4	0.04	3.4	0.00	3.4	0.01	3.4	0.01
60			3.3	0.01			3.5	0.01
90			3.6	0.00			3.6	0.00
120			3.6	0.00			3.6	0.00



Tabla 27. Absorbancia a 520 nm de Zumo de Granada Clarificado

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	1.23	0.01	1.23	0.01	1.23	0.01	1.23	0.01
0	1.19	0.03	1.19	0.03	0.96	0.02	0.96	0.02
7	0.82	0.05	1.24	0.04	0.67	0.03	0.97	0.02
14	0.72	0.00	1.15	0.07	0.52	0.04	0.97	0.09
21	0.51	0.12	1.22	0.02	0.40	0.02	0.94	0.02
28	0.23	0.01	0.87	0.03	0.23	0.01	0.63	0.04
45	0.28	0.01	0.85	0.02	0.25	0.01	0.74	0.02
60			1.04	0.03			0.81	0.01
90			0.82	0.00			0.63	0.00
120			0.74	0.01			0.57	0.00

Tabla 28. Absorbancia a 520 nm de Zumo de Granada Turbio

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	1.53	0.03	1.53	0.03	1.53	0.03	1.53	0.03
0	0.88	0.02	0.88	0.02	0.88	0.01	0.88	0.01
7	0.77	0.01	0.89	0.02	0.65	0.02	0.85	0.00
14	0.67	0.06	0.93	0.02	0.46	0.02	0.96	0.08
21	0.51	0.05	0.90	0.02	0.34	0.00	0.82	0.02
28	0.38	0.01	0.72	0.01	0.26	0.03	0.66	0.03
45	0.40	0.03	0.93	0.02	0.24	0.01	0.81	0.02
60			0.89	0.02			0.77	0.01
90			0.69	0.02			0.56	0.02
120			0.69	0.05			0.47	0.01



Tabla 29. TCD de Zumo de Granada Clarificado

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	2.1	0.03	2.1	0.03	2.1	0.03	2.1	0.03
0	1.8	0.07	1.8	0.07	1.6	0.02	1.6	0.02
7	1.4	0.10	1.9	0.11	1.3	0.09	1.7	0.04
14	1.7	0.15	1.8	0.15	1.2	0.09	1.7	0.04
21	1.3	0.20	1.9	0.07	1.1	0.05	1.7	0.16
28	0.7	0.01	1.4	0.09	0.8	0.04	1.6	0.02
45	0.8	0.03	1.4	0.03	0.8	0.04	1.1	0.12
60			1.7	0.09			1.6	0.02
90			1.4	0.02			1.2	0.01
120			1.3	0.05			1.1	0.01

Tabla 30. TCD de Zumo de Granada Turbio

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	2.6	0.08	2.6	0.08	2.6	0.08	2.6	0.08
0	1.5	0.07	1.5	0.07	1.6	0.06	1.6	0.06
7	1.5	0.10	1.5	0.07	1.3	0.03	1.5	0.01
14	1.3	0.08	1.6	0.04	1.2	0.06	1.6	0.10
21	1.2	0.11	1.6	0.08	1.1	0	1.5	0.08
28	1.2	0.05	1.4	0.02	0.9	0	1.4	0.03
45	1.0	0.04	1.6	0.07	1.0	0.03	1.5	0.05
60			1.6	0.07			1.5	0.01
90			1.3	0.02			1.2	0.02
120			1.3	0.06			1.1	0.02



Tabla 31. Índice de pardeamiento de Zumo de Granada Clarificado

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	0.76	0.00	0.76	0.00	0.76	0.00	0.76	0.00
0	0.71	0.09	0.71	0.01	0.86	0.09	0.86	0.01
7	0.90	0.04	0.70	0.02	1.14	0.01	0.86	0.15
14	0.80	0.09	0.76	0.02	1.61	0.02	0.89	0.05
21	1.96	0.15	0.66	0.02	2.00	0.15	0.94	0.02
28	2.80	0.05	0.74	0.20	3.15	0.10	0.94	0.04
45	2.49	0.15	0.76	0.04	4.00	0.15	0.90	0.05
60			0.74	0.10			0.99	0.15
90			0.85	0.01			1.14	0.01
120			1.02	0.15			1.27	0.20

Tabla 32. Índice de pardeamiento de Zumo de Granada Turbio

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	0.76	0.01	0.76	0.01	0.76	0.01	0.76	0.01
0	0.92	0.01	0.92	0.01	0.97	0.03	0.97	0.10
7	1.10	0.09	0.88	0.01	1.18	0.02	0.91	0.01
14	1.21	0.09	0.91	0.03	1.95	0.01	0.86	0.02
21	1.69	0.01	0.86	0.01	2.42	0.02	0.95	0.20
28	2.60	0.02	0.84	0.06	3.23	0.09	1.22	0.01
45	2.14	0.20	0.85	0.01	4.00	0.09	0.97	0.01
60			0.89	0.08			1.01	0.10
90			0.93	0.01			1.29	0.04
120			1.11	0.10			1.54	0.20



Tabla 33. Absorbancia 280 nm de Zumo de Granada Clarificado

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	83.00	5.66	83.00	5.66	83.00	5.66	83.00	5.66
0	74.50	4.95	74.50	4.95	88.50	6.36	88.50	6.36
7	73.00	2.83	70.00	0.00	65.50	2.12	71.67	2.31
14	60.67	0.58	83.50	2.12	71.00	3.61	93.00	2.00
21	63.67	3.06	73.67	2.08	67.33	4.51	73.33	4.62
28	54.00	2.83	50.50	0.71	53.50	0.71	54.50	3.54
45	44.00	4.24	58.00	1.41	44.50	4.95	77.00	11.31
60			95.67	8.50			96.67	11.85
90			79.67	12.50			77.00	5.29
120			75.33	5.13			73.67	3.79

Tabla 34. Absorbancia 280 nm de Zumo de Granada Turbio

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	92.50	0.71	92.50	0.71	92.50	0.71	92.50	0.71
0	94.00	7.07	94.00	7.07	85.50	3.54	85.50	3.54
7	76.50	2.12	78.33	4.62	72.33	1.53	83.50	0.71
14	68.00	9.90	80.50	12.02	77.00	1.41	83.67	5.51
21	64.00	11.31	56.50	3.54	73.00	0.00	80.50	0.71
28	43.00	2.83	48.50	0.71	46.00	2.83	59.50	7.78
45	60.00	7.07	70.00	7.07	42.50	0.71	97.00	0.00
60			103.50	16.26			102.00	9.85
90			75.67	1.53			80.67	2.08
120			74.67	3.06			76.33	8.02



Tabla 35. Polifenoles totales de Zumo de Granada Clarificado (mg/L)

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	1128.45	117.28	1128.45	117.28	1128.45	117.28	1128.45	117.28
0	1065.23	20.51	1065.23	20.51	1033.62	9.75	1033.62	9.75
7	1045.11	4.91	965.23	23.57	986.49	0.81	1153.16	5.69
14	994.83	14.22	1133.05	32.51	1047.56	11.18	1132.18	21.05
21	1056.32	16.66	1246.26	25.20	1014.94	12.60	1297.13	2.03
28	700.77	35.76	1100.80	33.47	1000.62	15.74	1200.77	45.92
45	798.08	26.50	1142.67	17.68	965.23	19.57	1262.50	33.53
60			1294.54	16.12			1268.10	28.41
90			1220.98	13.82			1190.80	53.24
120			1323.85	49.50			1042.82	42.24

Tabla 36. Polifenoles totales de Zumo de Granada Turbio (mg/L)

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
AP	1136.21	14.22	1136.21	14.22	1136.21	14.22	1136.21	14.22
0	1167.24	41.04	1167.24	41.04	1181.61	9.35	1181.61	9.35
7	1087.64	34.14	1214.08	36.59	1172.41	5.28	950.14	11.99
14	859.96	23.19	947.41	16.26	857.95	18.01	985.34	5.69
21	750.29	30.07	1058.81	20.42	878.45	31.46	935.34	51.20
28	663.51	32.51	1151.72	49.23	866.00	20.39	1224.43	4.06
45	840.23	62.99	1337.36	29.67	1085.54	58.27	1306.61	23.61
60			1357.76	36.52			1373.08	36.93
90			1100.77	22.54			1203.02	20.12
120			1159.91	5.49			1324.57	39.62



Tabla 37. Antocianos copigmentados, monoméricos y poliméricos de Zumo de Granada Clarificado

Tiempo	65 °C 25 °C			65 °C 5 °C		
	% Copigmentados	% Monoméricos	% Poliméricos	% Copigmentados	% Monoméricos	% Poliméricos
Ap	65.59	22.33	12.08	65.59	22.33	12.08
0	59.04	38.86	2.10	59.04	38.86	2.10
7	19.74	72.87	7.39	48.08	49.20	2.72
14	50.42	35.02	14.56	53.98	43.12	2.90
21	19.52	56.84	23.65	45.69	50.51	3.80
28	49.79	13.28	36.93	53.53	42.40	4.07
45	31.59	27.94	40.46	46.76	49.35	3.88
60				52.52	43.72	3.76
90				51.63	41.99	6.38
120				51.37	41.43	7.21

Tiempo	90°C 25°C			90°C 5°C		
	% Copigmentados	% Monoméricos	% Poliméricos	% Copigmentados	% Monoméricos	% Poliméricos
Ap	65.59	22.33	12.08	65.59	22.33	12.08
0	62.23	34.80	2.97	62.23	34.80	2.97
7	50.94	39.12	9.94	44.85	51.17	3.98
14	52.92	34.03	13.04	52.67	42.96	4.36
21	49.72	30.24	20.04	52.85	37.67	9.48
28	50.17	12.41	37.42	60.64	35.44	3.92
45	39.97	19.04	40.99	55.59	40.17	4.24
60				60.20	33.52	6.28
90				52.10	37.00	10.90
120				46.60	42.23	11.17



Tabla 38. Antocianos copigmentados, monoméricos y poliméricos de Zumo de Granada Turbio

Tiempo	65 °C 25 °C			65 °C 5 °C		
	% Copigmentados	% Monoméricos	% Poliméricos	% Copigmentados	% Monoméricos	% Poliméricos
Ap	33.33	32.28	34.38	33.33	32.28	34.38
0	48.34	42.34	9.32	48.34	42.34	9.32
7	59.05	32.85	8.10	59.52	36.16	4.32
14	68.02	13.81	18.16	55.37	40.10	4.54
21	57.75	0.68	41.57	56.51	33.29	10.21
28	58.03	8.66	33.30	46.20	47.62	6.18
45	50.68	0.33	48.99	60.28	32.02	7.70
60				48.04	44.47	7.49
90				63.38	24.27	12.35
120				56.18	29.66	14.16

Tiempo	90 °C 25 °C			90 °C 5 °C		
	% Copigmentados	% Monoméricos	% Poliméricos	% Copigmentados	% Monoméricos	% Poliméricos
Ap	33.33	32.28	34.38	33.33	32.28	34.38
0	57.33	33.30	9.37	57.33	33.30	9.37
7	58.29	26.86	14.85	57.55	36.59	5.85
14	56.03	10.69	33.28	58.11	33.95	7.95
21	56.31	0.00	53.55	57.09	30.97	11.94
28	52.80	0.00	56.13	54.38	36.45	9.16
45	44.31	0.00	69.38	57.44	30.35	12.21
60				59.17	29.23	11.59
90				54.70	24.32	20.98
120				53.35	25.05	21.60



Tabla 39. Antocianos individuales en Zumo de Granada Clarificado (mg/L)

Tiempo	Dp3,5DG		Cy3,5DG		Pg3,5DG		Dp3G		Cy3G		Pg3G	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
Ap	38	3.6	36	4.5	3	0.3	31	3.3	60	1.1	3	3.5
0	39	4.0	38	5.0	2	0.0	29	3.0	58	0.0	4	0.0
14	41	5.6	39	5.1	2	0.6	26	2.4	53	2.4	4	1.3
28	48	3.6	41	2.6	1	0.1	31	4.1	52	4.8	4	0.8
45	46	4.5	32	2.8	1	0.2	21	3.5	38	2.8	2	0.1
60	44	1.5	39	3.7	1	0.6	17	1.4	36	2.4	2	0.4
90	52	1.8	30	5.7	3	0.7	18	3.2	25	1.9	1	0.6
120	36	3.0	27	0.1	1	0.0	8	2.5	18	1.2	1	0.0



Tabla 40. Antocianos individuales en Zumo de Granada Turbio (mg/L)

Tiempo	Dp3,5DG		Cy3,5DG		Pg3,5DG		Dp3G		Cy3G		Pg3G	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
Ap	71	5.3	67	3.1	5	3.0	46	3.0	81	0.7	6	2.2
0	33	3.0	37	3.0	8	0.0	28	1.0	58	2.0	5	1.0
14	41	4.5	27	0.1	1	0.3	28	0.6	54	1.6	3	1.0
28	51	9.8	47	1.2	2	0.4	27	3.3	52	5.5	4	3.3
45	41	5.0	37	7.6	1	0.5	17	5.2	38	3.1	1	0.3
60	43	5.0	40	7.4	1	0.5	12	3.5	32	2.7	2	0.2
90	33	3.5	25	0.8	1	0.3	9	0.5	21	0.2	1	0.6
120	39	3.0	27	3.0	1	0.4	9	4.0	15	1.2	1	0.2



Tabla 41. ABTS de Zumo de Granada Clarificado (mM ET)

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
0	12.6	0.48	12.6	0.48	13.5	1.10	13.5	1.10
7	13.3	1.45	15.4	0.16	13.1	1.16	15.1	0.39
14	19.5	0.86	22.1	0.41	20.5	1.09	22.4	0.17
21	20.7	0.60	21.3	0.36	21.2	0.41	21.9	0.17
28	9.9	0.44	13.4	0.36	10.7	0.51	13.1	0.36
45	12.0	0.27	14.6	0.04	11.8	0.13	14.5	0.23
60			15.1	1.49			15.5	0.50
90			16.2	0.72			15.9	0.32
120			15.1	1.11			16.7	0.33

Tabla 42. ABTS de Zumo de Granada Turbio (mM ET)

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
0	14.8	1.38	14.8	1.38	15.5	0.61	15.5	0.61
7	16.8	0.52	17.1	0.83	15.6	1.01	17.1	0.06
14	21.7	0.41	22.2	0.13	22.1	0.23	22.1	0.29
21	20.1	0	21.8	0.19	21.3	0.72	21.3	0.43
28	10.1	0.76	14.3	0.76	12.4	0.38	14.3	0.80
45	13.6	0.62	15.2	0.19	14.5	0.51	14.8	0.14
60			17.6	0.82			16.6	0.44
90			15.4	0.56			15.2	0.40
120			16.6	0.83			16.4	0.64



Tabla 43. FRAP de Zumo de Granada Clarificado (mM ET)

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
0	11.34	0.29	11.34	0.29	10.58	0.46	10.58	0.46
7	12.29	0.05	13.02	0.23	10.58	0.26	12.41	0.28
14	9.15	0.22	11.26	0.42	9.45	0.12	13.04	0.21
21	10.91	0.46	11.44	0.08	10.25	0.49	10.96	0.35
28	8.06	0.32	10.60	0.08	7.26	0.22	11.70	0.21
45	10.77	0.17	13.49	0.03	11.48	0.24	13.04	0.03
60			14.70	0.28			12.00	0.13
90			12.01	0.15			11.41	0.39
120			10.63	0.22			13.16	0.05

Tabla 44. FRAP de Zumo de Granada Turbio (mM ET)

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
0	7.47	0.03	7.47	0.03	6.92	0.29	6.92	0.29
7	7.49	0.37	8.73	0.18	6.63	0.45	9.34	0.30
14	6.11	0.25	8.06	0.16	6.36	0.27	7.51	0.11
21	6.28	0.07	8.90	0.38	7.32	0.43	7.55	0.38
28	3.82	0.24	7.65	0.03	5.23	0.06	6.37	0.25
45	4.13	0.05	8.09	0.05	6.22	0.06	7.84	0.39
60			8.70	0.16			9.94	0.99
90			7.66	0.61			8.28	0.70
120			7.64	0.65			8.66	0.60



Tabla 45. ORAC de Zumo de Granada Clarificado (mM ET)

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
0	18.47	0.87	18.47	0.87	18.79	0.24	18.79	0.24
14	17.35	0.94	13.92	0.00	16.71	0.78	16.89	0.15
28	14.41	0.31	10.73	0.09	12.79	1.15	16.36	2.04
45	10.28	1.35	10.46	1.27	6.01	0.01	12.74	0.73
60			10.36	0.13			12.38	0.37
90			7.82	0.01			11.47	0.72
120			12.30	1.20			10.54	0.71

Tabla 46. ORAC de Zumo de Granada Turbio (mM ET)

Tiempo	65 °C				90 °C			
	25 °C		5 °C		25 °C		5 °C	
	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD	MEDIA	± SD
0	10.21	0.50	10.21	0.50	14.11	0.95	14.11	0.95
14	11.01	0.47	12.66	0.59	13.66	0.84	13.82	0.40
28	8.60	1.36	10.72	1.31	9.08	0.00	11.54	0.44
45	10.32	0.64	10.06	0.40	5.16	0.61	10.95	0.35
60			9.39	0.03			11.05	1.52
90			8.21	0.85			10.09	0.27
120			8.40	0.45			7.74	0.28

**ARTÍCULOS DERIVADOS
DE ESTA TESIS**



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Changes on indigenous microbiota, colour, bioactive compounds and antioxidant activity of pasteurised pomegranate juice

Pedro Mena^a, Salud Vegara^b, Nuria Martí^b, Cristina García-Viguera^a, Domingo Saura^b, Manuel Valero^{c,*}^a Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, E-30100, Espinardo, Murcia, Spain^b IBMC.-JBT Corp., FoodTech R&D Alliance, Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández (UMH)-Campus de Orihuela, Carretera de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain^c Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO), Universidad Miguel Hernández (UMH)-Campus de Orihuela, Carretera de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2012

Received in revised form 16 April 2013

Accepted 25 April 2013

Available online 9 May 2013

Keywords:

Pomegranate juice
Microorganisms
Thermal pasteurisation
Colour parameters
Anthocyanins
Antioxidant capacity

ABSTRACT

Juices prepared from arils of 'Mollar' pomegranates were analysed for naturally occurring microorganisms, CIE *Lab* colour parameters, total phenols, anthocyanins and punicalagins, ellagic acid content and antioxidant capacity before and after low-, mild- and high-temperature pasteurisations (LTPs, MTPs and HTPs): 65, 80 and 90 °C for 30 or 60 s. Mean aerobic plate count (APC), yeast and mold count (YMC), and lactic acid bacteria (LAB) for fresh juices were 5.7, 5.36 and 4.0 log CFU/mL, respectively. MTPs and HTPs were sufficiently effective to decrease APCs to nil or negligible levels. An increase in CIE *a* values and decrease in CIE *b* values were the characteristic colour changes in heat-treated juices. The effect of pasteurisations showed that total phenols, punicalagins and ellagic acid were not much affected by thermal processing. Total anthocyanin content and antioxidant capacity were substantially and significantly influenced by the heat treatment applied. A linear relationship was observed between Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values and total anthocyanins, suggesting that they contributed strongly to the antioxidant capacity of pomegranate juice.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The pomegranate (*Punica granatum* L.) belongs to the family Punicaceae which includes one genus and two species, the other one being *P. protopunica* Balf. peculiar to the island of Socotra. It is native from Iran to the Himalayas in Northern India (Meerts et al., 2009). Today, the pomegranate is widely cultivated throughout Turkey, Iran, Syria, Azerbaijan, Armenia, Afghanistan, India, Pakistan, Bangladesh, Iraq, Lebanon, Egypt, China, Myanmar (Burma), Saudi Arabia, Israel, Jordan, the drier parts of Southeast Asia, the Mediterranean region of Southern Europe, and tropical Africa. It is also cultivated in subtropical areas of South America [from the Southern United States (US) to Chile and Argentina], the drier parts of California and Arizona in the US and Mexico (Çam, Hisil, & Durmaz, 2009; Sepúlveda et al., 2010). Over 1000 cultivars of *P. granatum* exist (Levin, 1994).

Spain is the major European producer of pomegranates and its production exceeded 22,000 tons in 2009 (MARM, 2010). Most of this production takes place in the Southeast of Spain, where the pomegranate tree is adapted to poor and saline soils of this semi-arid area, contributing to the reduction in the risk of

desertification (Melgarejo, Salazar, & Artés, 2000). 'Mollar' and 'Valenciana' as the most widely spread cultivars in the local area, display very attractive sensorial characteristics for Spanish consumers (Mena, García-Viguera, et al., 2011).

Due to the specific and health-related properties of the pomegranate's phytochemicals (Mena, Gironés-Vilaplana, Moreno, & García-Viguera, 2011; Viuda-Martos, Fernández-López, & Pérez-Álvarez, 2010), this fruit which is traditionally used for production of grenadine syrup or consumed as fresh fruit, has gained increasing popularity in recent years. Pomegranates are delicious and fun to eat, but the fruit is difficult to peel and, therefore, a drawback exists to eating it more regularly. Accordingly, minimally fresh processed 'ready-to-eat' pomegranate arils (Ayhan & Estürk, 2009; Ergun & Ergun, 2009; López-Rubira, Conesa, Allende, & Artés, 2005) and, above all, processed products, such as canned beverages, jellies, jams and especially pomegranate juices, are preferred. Pomegranate juice is an important source of anthocyanins, ellagitannins and ellagic acid derivatives (Borges, Mullen, & Crozier, 2010; Mahdavi, Nikniaz, Rafraf, & Jouyban, 2010). The levels vary in juices prepared from different pomegranate cultivars, maturity stage, growing region, cultural practice, storage conditions of fruits and extraction procedure (Gil, Tomás-Barberán, Hess-Pierce, Holcroft, & Kader, 2000; Tzulker et al., 2007).

* Corresponding author. Tel.: +34 96 674 96 83; fax: +34 96 674 96 19.

E-mail address: m.valero@umh.es (M. Valero).

The beneficial health effects of the pomegranate juice consumption are related, at least in part, to its high level of polyphenols showing antioxidant activity (Rosenblat, Hayek, & Aviram, 2006; Vaya & Aviram, 2001). Moreover, several studies have highlighted the wide-spectrum antibacterial activity (Fazeli, Bahmani, Jamalifar, & Samadi, 2011; Saeed & Tariq, 2006) of pomegranate juice which can be attributed to polyphenol fractions of ellagic acid, gallagic acid, punicalins and punicalagins (Reddy, Gupta, Jacob, Khan, & Ferreira, 2007). Unfortunately, the bioactive compounds are quickly affected by extrinsic factors such as oxygen, light and especially temperature. Thus, there is a real need to minimize the degradation of the active compounds during the pasteurisation process and storage time of the pomegranate juice. The optimisation of both time/temperature heat treatment and storage temperature represent still great challenges for the processing industry of pomegranate juice.

The present paper aims at analysing the effects of temperatures and processing times on the main parameters related to the quality of pomegranate juice, namely, the microbial load (sanitation), the colour, the antioxidant (AOX) activity, the total phenolic content (TPC), as well as the particular contents of ellagic acid, punicalagins and anthocyanins.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) diammonium salt, ellagic acid and Folin–Ciocalteu reagent were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany); sodium acetate trihydrate, FeCl₃·6H₂O and 2,4,6-tripyridyl-S-triacine (TPTZ) from Merck (Darmstadt, Germany); formic acid, methanol, glacial acetic acid and HCl from Scharlau (Scharlab, S.L., Sentmenat, Barcelona, Spain); 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) from Fluka Chemika (Neu-Ulm, Germany); anthocyanin monoglucosides from Polyphenols Laboratories AS (Sandnes, Norway); anthocyanin diglucosides from Extrasynthese (Genay Cedex, France); punicalagins A&B from LGC Standards (Teddington, Middlesex, UK); sodium carbonate anhydrous from Panreac Química, S.A. (Barcelona, Spain). Milli-Q water was produced using an Elix[®] Millipore water purification system (Molsheim, France).

2.2. Juice extraction

Pomegranate 'Mollar' fruits were obtained from the Parc Natural Agrari Els Carrizals (Elche, Alicante, Southeast Spain) under a semi-arid Mediterranean climate. They were harvested in the autumn of 2009 when fully ripened, to ensure their best flavour and colour, and transported under ventilated conditions to the laboratory. Fruits were washed in cold tap water and drained. Then pomegranates were cut in halves and the outer leathery skin was removed. The arils were manually separated from the pith, placed inside a nylon mesh and pressed with a laboratory pilot press (Zumonat C-40; Somatic AMD, Valencia, Spain). The extracted cloudy juice contained 20 g/L pulp.

2.3. Juice pasteurisation

Cloudy juice was subjected to heat treatments at 65, 80 and 95 °C for 30 and 60 s in a semi-tubular pasteuriser 25 L/h (Mipaser Prototype). Fresh and pasteurised juice samples contained in screw cap 20 mL polypropylene containers were stored frozen at –20 °C until analysis.

2.4. Microbiological analysis

Colony forming units (CFU) were determined by standard spread-plate methodologies. Decimal dilutions from untreated pomegranate juice were made in buffered peptone water (PW; Scharlau Chemie, S.A., Barcelona, Spain) and then 0.1 mL volumes of appropriate dilutions were plated in duplicate for total aerobic counts (APCs) on standard plate count agar (PCA; Scharlau Chemie, S.A.). For yeast and mold counts (YMCs), 0.1 mL volumes were plated on Sabouraud dextrose chloramphenicol agar (Laboratorios Microkit S.L., Valdemorillo, Madrid, Spain). Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS; Scharlau Chemie, S.A.) containing 50 mg/L nystatin (Acofarma Distribución S.A., Terrassa, Spain) to inhibit the growth of yeasts and incubate anaerobically was used to determine lactic acid bacteria (LAB). Finally, GYC medium (50 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 20 g/L calcium carbonate, and 15 g/L bacteriological agar) supplemented with 50 mg/L nystatin and 25 mg/L streptomycin sulphate (Calbiochem[®]) to suppress the growth of LAB was used as selective medium for acetic acid bacteria (AAB). Plates were incubated at 30 °C for 24–96 h. Enumerations were made with a F37862-0000 Scienceware[®] colony counter (Bel-Art Products, Pequannock, New Jersey, NJ, USA).

Inactivation of microorganisms by thermal treatments was determined by total APCs of the heated samples.

2.5. Colour measurement

Colour measurement was determined as in Pérez-Vicente, Serano, Abellán, and García-Viguera (2004). Briefly, solutions were measured in glass cells of 2 mm path length (CT-A22) at 520 nm using a Minolta CM-508i[®] tristimulus colour spectrophotometer (Minolta Co., Ltd., Chuo-Ku, Osaka, Japan) coupled with a CM-A760 transmittance adaptor, illuminant D65 and 10° observer according to the CIELAB 76 convention (McLaren, 1980). Data (CIE Lab values), were recorded and processed using the Minolta Software Chromacontrol S, PC-based colorimetric data system. Hue angle (*h*) was calculated from $\tan^{-1}(b/a)$ and chroma, colour intensity or saturation (*C*) was calculated as $(a^2 + b^2)^{1/2}$.

The colour changes of heat-treated juices were also expressed as a single numerical value that defines the magnitude of the total colour difference, according to the following equation:

$$\text{TCD} = [(a - a_0)^2 + (b - b_0)^2 + (L - L_0)^2]^{1/2} \quad (1)$$

where *a*₀, *b*₀ and *L*₀ are the CIE Lab values of the fresh sample.

2.6. AOX capacity

The AOX activity of fresh and heat-treated pomegranate juices was evaluated by three different methods. All samples were centrifuged in a Hettich EBA 21 centrifuge (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Germany) at 10,480g during 5 min at room temperature. The FRAP (ferric reducing antioxidative power), ABTS scavenging, and DPPH radical scavenging assay were the methods used to study the AOX capacities of pomegranate juices. The free radical scavenging activity of juices was evaluated by measuring the variation in absorbance at 515 nm after 50 min of reaction for DPPH assay, at 414 nm after 50 min for ABTS assay, and finally at 593 nm after 40 min for FRAP assay (Llorach, Tomás-Barberán, & Ferreres, 2004). The absorbance was measured on an Infinite[®] M200 multimode microplate reader (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) using 96-well microplates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark). All reactions started by adding 2 μL of the corresponding diluted sample (1:50 v/v in water) to the well containing 250 μL of one of the solutions radical generating or the ferric-TPTZ complex. The final volume of the assay was 252 μL. The AOX capacity (DPPH,

ABTS and FRAP assays) was expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) (mmol Trolox/L).

2.7. Folin–Ciocalteu assay

Total phenolic content (TPC) was determined by the Folin–Ciocalteu method, adapted to a micro-scale by González-Molina, Moreno, and García-Viguera (2009). In a 1.5 mL Eppendorf micro-tube, 790 μ L of Milli-Q water, 10 μ L of sample appropriately diluted with methanol (1:10 v/v), and 50 μ L of Folin–Ciocalteu reagent were added and vortexed. After 1 min, 150 μ L of 200 g/L sodium carbonate were added, vortexed again and allowed to stand at room temperature in the dark, for 120 min. The absorbance was recorded at 750 nm and quantified using gallic acid as standard. Results were expressed as gallic acid equivalents (mg GAE/L).

2.8. HPLC analysis: identification and quantification of phenolic compounds

Samples were centrifuged in a Hettich EBA 21 centrifuge at 10,480g during 5 min at room temperature. Then the supernatants were filtered through a 0.45 μ m nylon membrane (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) before HPLC analysis on a Model L6200 liquid chromatograph (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) equipped with a SPD-M6A UV–VIS photodiode array detector (Shimadzu, Kyoto, Japan) and a Model 234 automatic sample injector (Gilson International Bv, Barcelona, Spain). Chromatograms were recorded and processed on a LC Workstation Class M10A Shimadzu PC-based chromatography data system.

A 20 μ L sample was analysed on a Luna[®] 5 μ m C₁₈ column (25 \times 0.46 cm) (Phenomenex Ltd., Macclesfield, UK) with a security guard cartridge system C₁₈ ODS (4 \times 3 mm), using a mobile phase of water/formic acid (95:5 v/v) (solvent A) and HPLC grade methanol (solvent B). Elution was performed at a flow rate of 1 mL/min. The linear gradient started with 1% B, keeping isocratic conditions during 5 min, reaching 20% B at 20 min, 40% B at 30 min, 95% B at 35 min and 1% B after 41 min. UV chromatograms were recorded at 280, 360 and 520 nm. The different phenols were characterised by chromatographic comparison with analytical standards, accordingly to previous reports (Pérez-Vicente et al., 2004), and quantified by the absorbance of their corresponding peaks. Anthocyanins were quantified as cyanidin-3-glucoside at 520 nm, while the gallagic-derived tannins were did as punicalagin isomers at 360 nm and the ellagic acid as free ellagic acid at 280 nm (González-Molina et al., 2009).

2.9. Statistical analysis

All measurements were done in triplicate and results expressed as the mean value \pm standard deviation (SD). Statgraphics[®] Plus for Windows 3.0 (Statistical Graphic Corp. and Graphic Software Systems Inc., Rockville, Maryland, USA) was used for Statistical Analysis, including Analysis of Variance (ANOVA), Fisher's least significant difference (LSD) procedure to discriminate among the means, and Regression Analysis to describe the relationship between variables.

3. Results

3.1. Microbiological analysis

The results obtained in this study (Table 1) showed high concentrations of total mesophilic (strict and facultative) aerobes, ranging from 5.49 to 5.81 log CFU/mL among the four juice samples

Table 1
Microbiological characteristics [log CFU/mL, mean and standard deviation (SD) are given] of fresh pomegranate juice.

Sample/date	Microbial counts		
	APC	YMC	LAB
A 27/04/2010	5.63 \pm 0.07	5.15 \pm 0.10	4.01 \pm 0.05
B 28/04/2010	5.80 \pm 0.01	5.43 \pm 0.03	3.93 \pm 0.08
C 9/11/2010	5.77 \pm 0.06	5.50 \pm 0.03	4.09 \pm 0.19
D 1/12/2010	5.59 \pm 0.13	5.35 \pm 0.07	3.96 \pm 0.17
Total	5.70 \pm 0.11 a*	5.36 \pm 0.15 b	4.00 \pm 0.12 c

APC, Aerobic plate counts; YMC, Yeast and mold counts; LAB, Lactic acid bacteria.

* Means followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

analysed. A similar count was obtained for yeasts and molds (5.08–5.52 log CFU/mL). Also the pomegranate juices contained noticeable amounts of LAB (3.84–4.23 log CFU/mL), but the level of AAB was below the detection limit (100 CFU/mL) and no CFU was observed.

3.2. Microbial inactivation

The effect of thermal processing on microbial inactivation are compared to untreated pomegranate juice and shown in Table 2. Just after mild-temperature pasteurisation (MTP) processes significant inactivation (4.5-log, approximately) was found, but only the high-temperature pasteurisation (HTP) treatments resulted in a nil microbial count. Between the low-temperature pasteurisations (LTPs) at 65 °C, the more prolonged (60 s) reduced the naturally occurring microorganisms in pomegranate juice by at least 4.1 log units while the shorter one (30 s) did in 3.9 log.

3.3. Colour analysis

CIE Lab parameters of pomegranate juice before and after heat treatment are shown in Fig. 1a–c. CIE L value ranged from 71.58 \pm 0.15 to 75.98 \pm 1.21, but no statistically significant difference ($P = 0.0851$) between thermally processed and untreated pomegranate juices were estimated. Although no significant differences between LTP and control samples on CIE a value were determined at the 95% LSD method, the increase in CIE a value ($P = 0.0005$; Fig. 1b) and decrease in CIE b value ($P = 0.0000$; Fig. 1c) were the characteristic changes in heat-treated pomegranate juices. In addition, fresh juice showed significantly higher average values of C (29.58 \pm 1.99) ($P = 0.0002$; Fig. 1e) and h (65.19 \pm 3.10) ($P = 0.0000$; Fig. 1d) than the thermally treated. The kind of heat treatment applied led also to differences on TCD values of pomegranate juices ($P = 0.0000$). Lower TCD values were obtained in samples treated by LTP (13.54 \pm 1.10) compared to

Table 2
Effects of thermal treatments on microbial reduction in processed pomegranate juices [mean and standard deviation (SD) are given].

Treatment	APC (log CFU/mL)	Microbial Reduction (log CFU/mL)
None	–	5.63 \pm 0.07 a [†]
LTP	65 °C, 30 s	1.54 \pm 0.34 b
	65 °C, 60 s	1.24 \pm 0.34 bc
MTP	80 °C, 30 s	1.15 \pm 0.21 bc
	80 °C, 60 s	1.00 \pm 0.0 c
HTP	95 °C, 30 s	0.00 \pm 0.00 d [#]
	95 °C, 60 s	0.00 \pm 0.00 d

APC: Aerobic plate counts; LTP, MTP, HTP: Low, mild and high temperature pasteurisations.

[†] Means followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

[#] No CFU was observed just after treatment.

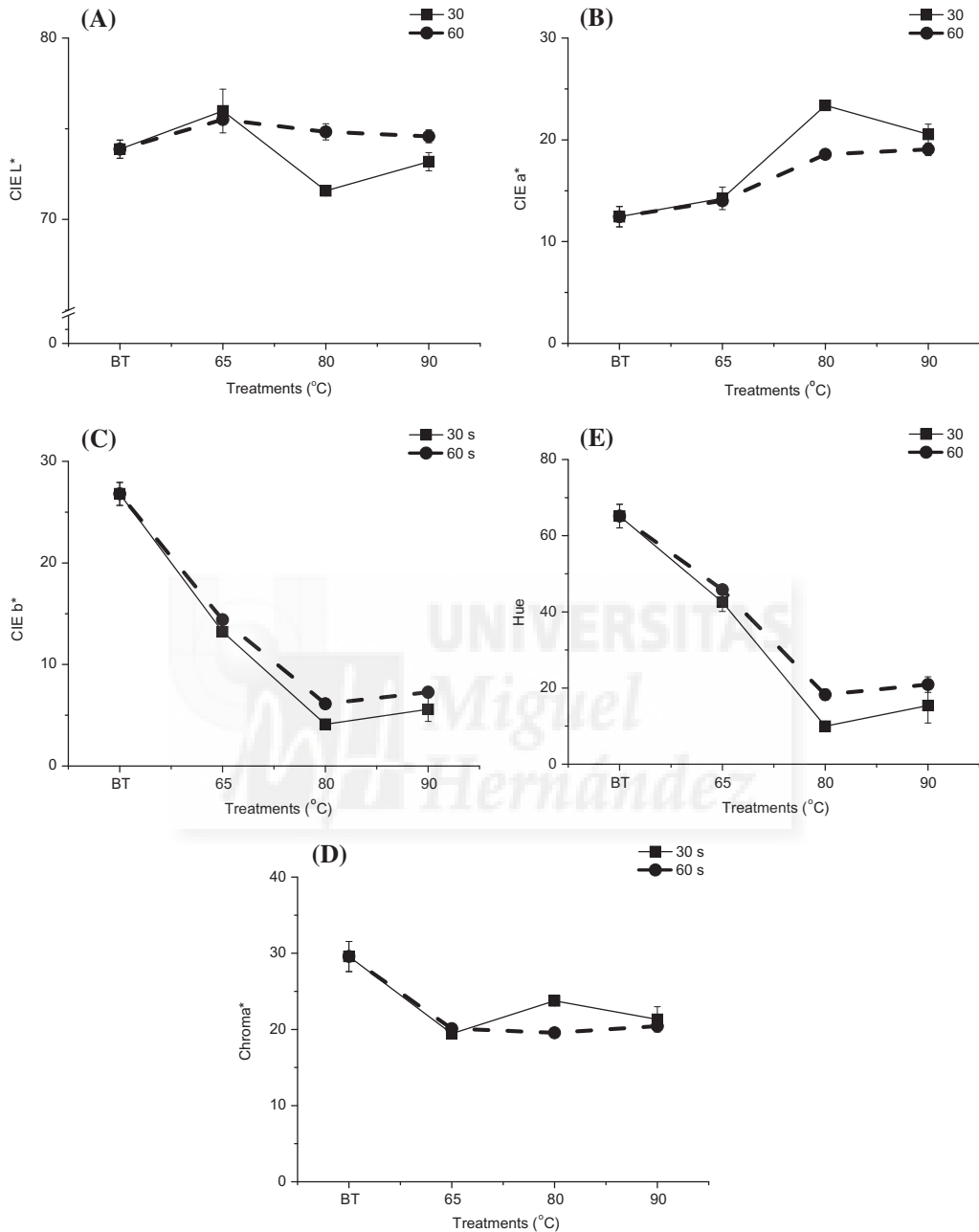


Fig. 1. Color changes associated with different thermal treatments for 30 (■) or 60 s (●): (A) CIE L, (B) CIE a, (C) CIE b, (D) Chroma, and (E) Hue angle.

those MTP and HTP-treated which exhibited TCD values from 20.61 to 25.77.

3.4. Anthocyanins, punicalagins and ellagic acid of pomegranate juices

The typical anthocyanin profile of pomegranate juices is characterised by delphinidin, cyanidin and pelargonidin 3-glucosides and 3,5-diglucosides. From these individual anthocyanins,

cyanidin-3-glucoside was related to 'Mollar' variety, representing a 44% of the total antocyanin content (Mena, García-Viguera, et al., 2011). Mean concentrations of individual anthocyanins are presented in Table 3. The values for cyanidin-3-glucoside here recorded were smaller than those previously reported and very similar to those obtained for cyanidin-3,5-diglucoside. The predominance of cyanidin mono- and diglucosides were followed by

Table 3
Effects of thermal treatments on the anthocyanin profile (mg/L) of pomegranate juices.

Treatment	Dp3,5dG	Cy3,5dG	Pg3,5dG	Dp3G	Cy3G	Pg3G	Total anthocyanins
None	12.3 ± 10.4 (11)	42.9 ± 1.9 (39)	3.3 ± 0.5 (3)	8.4 ± 1.5 (8)	34.7 ± 3.0 (32)	7.5 ± 3.8 (7)	109.3 ± 20.2 c [*]
LTP	65 °C 30 s	14.8 ± 1.5 (12)	48.6 ± 1.8 (39)	3.1 ± 0.3 (2)	11.8 ± 0.9 (10)	39.3 ± 0.4 (32)	123.2 ± 4.7 c
	65 °C 60 s	12.9 ± 0.1 (11)	52.8 ± 1.2 (45)	2.0 ± 0.2 (2)	9.1 ± 0.3 (8)	35.2 ± 0.6 (30)	117.2 ± 2.2 c
MTP	80 °C 30 s	34.9 ± 0.6 (20)	51.1 ± 0.8 (30)	0.8 ± 1.2 (0)	23.9 ± 6.8 (14)	56.3 ± 0.9 (33)	172.5 ± 9.6 ab
	80 °C 60 s	32.8 ± 0.6 (20)	51.3 ± 0.8 (31)	1.8 ± 0.0 (1)	24.5 ± 1.0 (15)	49.5 ± 0.6 (30)	167.1 ± 3.6 ab
HTP	95 °C 30 s	33.3 ± 4.3 (18)	55.6 ± 11.7 (30)	2.3 ± 3.2 (1)	28.0 ± 2.2 (15)	54.0 ± 1.4 (30)	182.9 ± 3.3 a
	95 °C 60 s	30.3 ± 1.4 (19)	47.7 ± 2.2 (30)	1.6 ± 2.3 (1)	23.9 ± 2.1 (15)	49.1 ± 1.1 (31)	159.8 ± 1.6 b

Dp3,5dG, delphinidin 3,5-diglucoside; Cy3,5dG, cyanidin 3,5-diglucoside; Pg3,5dG, pelargonidin 3,5-diglucoside; Dp3G, delphinidin 3-glucoside; Cy3G, cyanidin 3-glucoside; Pg3G, pelargonidin 3-glucoside.

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).

Numbers in parentheses indicate percentage of individual anthocyanin with respect to the total anthocyanin content.

^{*} Means followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

the corresponding amounts of delphinidin glucosides and in the distance by the pelargonidin glucosides, with values varying among samples subjected to different treatments.

The results obtained for total anthocyanin content displayed statistically significant differences ($P = 0.0003$) between thermally processed and untreated pomegranate juices, with values ranging from 109.3 to 182.9 mg/L (Table 3). The lowest value was recorded for the control, while the largest amount of these pigments was in a HTP-treated juice. Statistically significant differences were also estimated between the mean punicalagin ($P = 0.0002$) and ellagic acid contents ($P = 0.0002$) from one level of treatment to another at the 95% confidence level (Table 4). In general, small concentrations of punicalagins were determined, with values varying significantly from 1.9 to 5.7 mg/L. The ellagic acid content ranged from 66.4 to 125.6 mg/L.

3.5. TPC

ANOVA for TPC showed that the effects of pasteurisation treatments were no significant ($P = 0.1428$). However, minor variations of TPC among pomegranate juices were observed (Fig. 2), with values ranging from 3004.7 to 4070.0 mg GAE/L.

3.6. AOX capacity of pomegranate juices

Data of in vitro AOX activity of pomegranate juices measured by different analytical methods such as ABTS, DPPH and FRAP are shown in Table 5. The AOX capacity was significantly influenced by the heat treatment applied to the pomegranate juices. ABTS values varied from 27.29 to 34.80 mmol Trolox/L. The highest values were found in MTP- and HTP-treated juices, whereas the lowest ones were recorded both in LTP-treated juices and untreated samples ($P = 0.0028$). In contrast, DPPH and FRAP values obtained for untreated samples were significantly smaller than those obtained for all the heat-treated juices ($P < 0.001$).

When the different methods were compared among them, DPPH assay showed smaller values than both FRAP and ABTS assays (Table 5). FRAP results were strongly correlated with those ob-

Table 4
Effects of thermal treatments on punicalagin and ellagic acid contents (mg/L) of pomegranate juices [mean and standard deviation (SD) are given].

Treatment	Punicalagins	Ellagic acid	
None	3.4 ± 0.3 b [*]	76.7 ± 11.3 cd	
LTP	65 °C 30 s	1.9 ± 0.2 c	83.5 ± 0.7 bc
	65 °C 60 s	4.0 ± 0.2 b	73.4 ± 0.1 cd
MTP	80 °C 30 s	5.7 ± 0.3 a	94.7 ± 6.1 b
	80 °C 60 s	4.0 ± 0.5 b	66.4 ± 6.5 d
HTP	95 °C 30 s	3.4 ± 0.5 b	125.6 ± 2.4 a
	95 °C 60 s	4.0 ± 0.1 b	81.3 ± 1.4 c

^{*} Means followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

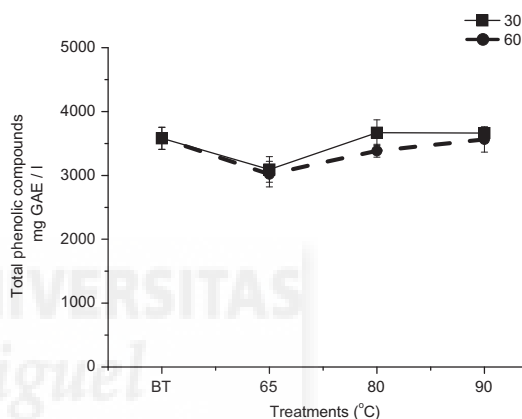


Fig. 2. Effect of different heat treatments for 30 (■) or 60 s (●) on total phenolic content of pomegranate aril juice.

Table 5
Effects of thermal treatments on antioxidant capacity of pomegranate juices measured by different methods [mmol Trolox/L, mean and standard deviation (SD) are given].

Treatment	ABTS	DPPH	FRAP	
None	30.22 ± 1.10 bA	14.79 ± 0.97 dC	17.90 ± 0.13 dB	
LTP	65 °C 30 s	28.73 ± 1.97 bA	18.80 ± 0.14 bcB	19.68 ± 0.11 cB
	65 °C 60 s	28.33 ± 1.46 bA	17.97 ± 0.01 cB	20.68 ± 1.54 cB
MTP	80 °C 30 s	34.58 ± 0.20 aA	21.58 ± 0.36 aC	24.83 ± 0.03 aB
	80 °C 60 s	33.44 ± 1.55 aA	19.16 ± 0.23 bcC	22.79 ± 0.33 bB
HTP	95 °C 30 s	34.01 ± 0.13 aA	19.86 ± 1.69 abC	24.86 ± 0.05 aB
	95 °C 60 s	34.57 ± 0.33 aA	20.51 ± 0.21 abC	23.02 ± 0.22 bB

a–d: Means within same column followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

A–C: Means within same row followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

tained by other assays ($P < 0.01$; 99% confidence level) (Table 6), while a moderately strong relationship between DPPH and ABTS values was found at the 95% confidence level ($P < 0.05$). In addition, although ABTS and TPC values were strongly correlated ($P < 0.01$) (Table 6) there was not a statistically significant relationship between DPPH and FRAP values with TPC ($P > 0.10$).

A point worth mentioning is the contribution of each group of bioactive compounds detected by HPLC (anthocyanins, punicalagins and ellagic acid) to the AOX capacity assays (Table 7). Total anthocyanin content was strongly correlated with ABTS, DPPH and FRAP assays ($P < 0.01$), while moderately strong relationships were found between FRAP values and punicalagins or ellagic acid content

Table 6

Correlation coefficients (r) between the total phenolic content (TPC) and the in vitro antioxidant capacity of the juices measured by different assays.

	TPC	ABTS	DPPH	FRAP
TPC	1			
ABTS	0.6617***	1		
DPPH	0.2044	0.5977**	1	
FRAP	0.4068	0.7594***	0.8367***	1

No asterisk means that no statistically significant relationship was found.

** The significance of the r value is identified by two ($P < 0.05$) asterisks.

*** The significance of the r value is identified by three ($P < 0.01$) asterisks.

established at the 95% confidence level ($P < 0.05$). A significant correlation between ABTS and punicalagin content was also found at the 90% confidence level ($P < 0.10$).

4. Discussion

Reported initial microbial levels of fresh pomegranate juice from arils vary from 3.0–4.0 log CFU/mL (Alighourchi, Barzegar, & Abbasi, 2008a; Ferrari, Maresca, & Ciccarone, 2010). Very similar APCs (from below 3.0–3.9 log CFU/g) were reported for minimally fresh processed arils (Ergun & Ergun, 2009; López-Rubira et al., 2005). However, the values obtained in this study were higher to this range, with values varying from 5.49 to 5.81 log CFU/mL (Table 1). To produce high quality fresh juice, the emphases on careful fruit handling and strict processing sanitation is essential. Extremely high initial microbial levels (>6 -log CFU/mL) may result from the use of deteriorated fruits, insufficient fruit cleaning and sanitation, or poor equipment sanitation. Most microbial contaminants of fruit surface can be eliminated by applying good practices.

The initial mean populations of YM and LAB for fresh juices were 5.36 and 4.0 log CFU/mL, respectively (Table 1). Yeasts were the predominant fungi, and its numbers were higher than those (2.16–3.30 mean log CFU/g) reported for minimally fresh processed arils (López-Rubira et al., 2005). On the other hand, LAB counts of 3.84–4.23 log CFU/mL were within the high end of the range reported for pomegranate arils (López-Rubira et al., 2005). AAB contaminants were under the limit of detection. This is in disagreement with the findings reported by Juven, Gagel, Saguy, and Weisslowicz (1984), who found AAB numbers of approximately 3.3 log CFU/g of arils with capacity to grow in pomegranate juice. However, these high colony counts could be an indication of spoilage.

The microbiological analysis of heat-treated juices indicated that all MTP and HTP treatments were sufficiently effective to decrease APCs to nil or negligible levels after pasteurisation processes (Table 2). LTP treatments resulted in a microbial count below 1.78 log CFU/mL that could be unable to grow in refrigerated pomegranate juice, according with the hurdle concept (Leistner,

1999) for food preservation. The combination of cool storage and conventional heating has been used as preservation strategy of pomegranate juices by Alighourchi, Barzegar, and Abbasi (2008b). A typical pasteurisation process that meets FDA's Juice HACCP Regulation is 90 °C for 2 s, followed by filling at 85 °C and holding at that temperature for 1 min, then juice is cooled as quickly as possible (Paul, 2009). Nevertheless, a milder treatment (3 s at 71.1 °C) that could inactivate 5.0 log CFU/mL of vegetative pathogenic bacteria such as *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in fruit juices has been calculated by Mazzotta (2001). Therefore, the normal processing conditions of hot-filled shelf-stable juices cause often microbial lethality in excess, flavor loss, browning and nutritional degradation.

Fruit juice colour is a primary factor considered by the consumer in assessing juice quality and sensory acceptance. High CIE a values correspond with more reddish tonalities of juices. As can be seen in Fig. 1b, the pasteurised pomegranate juice at 80 °C for 30 s presented the highest values and, in general, MTP and HTP-treated juices revealed increasing CIE a values after pasteurisation. Slightly increasing CIE a values were also measured (Fischer, Dettmann, Carle, & Kammerer, 2011) in pomegranate juice variants V1 and V4 from steamed and non-steamed whole fruits subjected to a high temperature short time (HTST) process. In contrast, Turfan, Türkyilmaz, Yemis, and Özkan (2011) observed decreasing values as a result of the thermal treatment of pomegranate juices from arils and whole fruit at 95 °C for 10 min. It is often assumed that any change in CIE a value is associated with a simultaneous change in CIE L value. In this case, however, statistically significant differences were not found between the mean CIE L values from one level of treatment to another at the 95% confidence level. The high CIE L values of untreated and heat-treated pomegranate juices remained more or less constant. However, pasteurisation resulted in substantial decreases in CIE b value and colour parameters C and h of pomegranate juices.

After pasteurisation, the amount of total anthocyanin content was increased to about 10% in the LTP-treated samples and 56% in the MTP- and HTP-treated ones. This is in accordance with a previous study that showed an increase (between 6.5% and 32.5%) in the anthocyanin content of pasteurised juices from Iranian pomegranate varieties such as Vahshe Kane Tehran and Malase Yazdi with pinkish arils (Alighourchi et al., 2008b). According to Mena, García-Viguera, et al. (2011), 'Mollar' does not exhibit an intense colour with levels of yellowness ranging from 21 to 42 for accessions M.León.1 and M.29, respectively. In addition, Lee, Durst, and Wrolstad (2002) reported that pasteurised blueberry juice had higher amount of anthocyanins than initial pressed juice. The effect of heat may be due to the conversion of colourless leucoanthocyanins into red anthocyanins, when heated under acid conditions (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009). CIE a values correlated well with anthocyanin contents ($r = 0.8509$; $P < 0.01$). The CIE a parameter increased when anthocyanin content did. Similarly, CIE b was negatively correlated with anthocyanin content ($r = -0.8680$; $P < 0.01$), confirming the hypothetical conversion of leucoanthocyanins into anthocyanins.

Although statistical differences between treatments were estimated, both ellagic acid content and punicalagins remained quite stable with heat pasteurisation, under the specific conditions used herein. Little effect of thermal treatments (90 °C for 30 or 60 s) on ellagic acid content in strawberry juice was also reported by Odrizola-Serrano, Soliva-Fortuny, and Martín-Belloso (2008). This phenomenon could be explained by the small concentrations of ellagic acid and punicalagins determined in juices prepared from arils alone in contrast to those reported for pomegranate juices extracted from whole fruits (Fischer et al., 2011; Gil et al., 2000; Tzulkar et al., 2007). As commented above, the anthocyanin content was substantially enhanced after thermal processing, which had

Table 7

Correlation matrix between the total anthocyanin, punicalagin and ellagic acid contents and the in vitro antioxidant capacity of the juices measured by different assays.

	Anthocyanins	Punicalagins	Ellagic acid
ABTS	0.8617***	0.5322*	0.3776
DPPH	0.7180***	0.4106	0.3717
FRAP	0.9187***	0.5363**	0.5544**

No asterisk means that no statistically significant relationship was found.

* The significance of the correlation coefficient (r) is identified by one ($P < 0.10$) asterisks.

** The significance of the correlation coefficient (r) is identified by two ($P < 0.05$) asterisks.

*** The significance of the correlation coefficient (r) is identified by three ($P < 0.01$) asterisks.

a positive effect on the attractive colour of pomegranate juices. Also anthocyanins are well known for their AOX activity (Ichikawa et al., 2001; Noda, Kaneyuki, Mori, & Packer, 2002). Examination of the total level of anthocyanins in the juices demonstrated that indeed the anthocyanins significantly correlated to the antioxidant activity with independence of the AOX assay used for determination (Table 7). Therefore, the AOX activity of pomegranate aril juice may be attributed, to a great extent, to the level of anthocyanins. In accordance with these data, anthocyanin contents have been reported as the main component of the AOX activity of different berries (Sellappan, Akoh, & Krewer, 2002), Figs. (Solomon et al., 2006), pomegranates (Mena, García-Viguera, et al., 2011) and red wines (Ghiselli, Nardini, Baldi, & Scaccini, 1998).

In pomegranate juices, the level of AOX activity had been attributed to the TPC (Gil et al., 2000; Rosenblat et al., 2006). In this study, the AOX level (according to ABTS method) and TPC were positively correlated (Table 6), suggesting that they contributed moderately to the AOX activity of pomegranate aril juice. All flavonoids, anthocyanins, and non-flavonoid phenolic compounds are determined in the TPC parameter. A linear relationship between total anthocyanins and TPC ($r = 0.4883$; $P < 0.10$) was observed at the 90% confidence level. Irrespective of the assay used, examination of the AOX capacity in the juices (Table 5) showed that it was positively and significantly affected by heat pasteurisation, probably due to the derived increase in anthocyanins which was commented above.

5. Conclusions

LTP treatment (65 °C, 30 s) of juice prepared from arils of 'Molar' pomegranates reduced the indigenous microbiota to levels that could be unable to grow in refrigerated conditions, according with the hurdle concept for food preservation. Also this process resulted in an increase of the CIE *a* value and a decrease of the CIE *b* parameter as characteristic colour changes. The anthocyanin content was substantially enhanced after thermal processing, which had a positive effect on the attractive colour and the AOX capacity of pomegranate juice. Additional research is needed to determine the shelf-life and evolution of colour parameters during cool storage in order to apply this combined process in the pomegranate juice industry.

Acknowledgements

This research was funded by AGROALIMED Foundation from Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació, Generalitat Valenciana (Spain), Project 'Producción de Zumo de Caqui (*Diospyros kaki* L.) y de Industrialización de la Granada (*Punica granatum* L.)'.

References

Alighourchi, H., Barzegar, M., & Abbasi, S. (2008a). Effect of gamma irradiation on the stability of anthocyanins and shelf-life of various pomegranate juices. *Food Chemistry*, *110*, 1036–1040.

Alighourchi, H., Barzegar, M., & Abbasi, S. (2008b). Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurisation. *European Food Research and Technology*, *227*, 881–887.

Ayhan, Z., & Estürk, O. (2009). Overall quality and shelf life of minimally processed and modified atmosphere packaged "ready-to-eat" pomegranate arils. *Journal of Food Science*, *74*, 399–405.

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 837.

Borges, G., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Comparison of the polyphenolic composition and antioxidant activity of European commercial fruit juices. *Food and Function*, *1*, 73–83.

Çam, M., Hisil, Y., & Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, *112*, 721–726.

Ergun, M., & Ergun, N. (2009). Maintaining quality of minimally processed pomegranate arils by honey treatments. *British Food Journal*, *111*, 396–406.

Fazeli, M. R., Bahmani, S., Jamalifar, H., & Samadi, N. (2011). Effect of probiotic on antioxidant and antibacterial activities of pomegranate juices from sour and sweet cultivars. *Natural Product Research*, *25*, 288–297.

Ferrari, G., Maresca, P., & Ciccarone, R. (2010). The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. *Journal of Food Engineering*, *100*, 245–253.

Fischer, U. A., Dettmann, J. S., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Impact of processing and storage on the phenolic profiles and contents of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. *European Food Research and Technology*, *233*, 797–816.

Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., & Scaccini, C. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 361–367.

Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 4581–4589.

González-Molina, E., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2009). A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chemistry*, *115*, 1364–1372.

Ichikawa, H., Ichianagi, T., Xu, B., Yoshii, Y., Nakajima, M., & Konishi, T. (2001). Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice. *Journal of Medicinal Food*, *4*, 211–218.

Juven, B. J., Gagel, S., Saguy, I., & Weisslowicz, H. (1984). Microbiology of spoilage of a perishable pomegranate product. *International Journal of Food Microbiology*, *1*, 135–139.

Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2002). Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: Comparison of two pretreatments. *Journal of Food Science*, *67*, 1660–1666.

Leistner, L. (1999). Combined methods for food preservation. In M. Shafiqi Rahman (Ed.), *Handbook of Food Preservation* (pp. 457–485). New York: Marcel Dekker.

Levin, G. M. (1994). Pomegranate (*Punica granatum*) plant genetic resources in Turkmenistan. *Plant Genetic Resources Newsletter*, *97*, 31–36.

Llorach, R., Tomás-Barberán, F. A., & Ferreres, F. (2004). Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 5109–5116.

López-Rubira, V., Conesa, A., Allende, A., & Artés, F. (2005). Shelf life and overall quality of minimally processed pomegranate arils modified atmosphere packaged and treated with UV-C. *Postharvest Biology and Technology*, *37*, 174–185.

Mahdavi, R., Nikniaz, Z., Rafraf, M., & Jouyban, A. (2010). Determination and comparison of total polyphenol and vitamin C contents of natural fresh and commercial fruit juices. *Pakistan Journal of Nutrition*, *9*, 968–972.

ANARM, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2010). *Anuario de Estadística*. Available from <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/>

Mazzotta, A. S. (2001). Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Food Protection*, *64*, 315–320.

McLaren, K. (1980). Food colorimetry. In J. Walford (Ed.), *Developments in food colors-1* (pp. 27–45). London: Applied Science Publishers.

Meerts, I. A. T. M., Verspeek-Rip, C. M., Buskens, C. A. F., Keizer, H. G., Bassaganya-Riera, J., Jouni, Z. E., et al. (2009). Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food and Chemical Toxicology*, *47*, 1085–1092.

Melgarejo, P., Salazar, D. M., & Artés, F. (2000). Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *European Food Research and Technology*, *211*, 185–190.

Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartual, J., Saura, D., et al. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*, 1893–1906.

Mena, P., Gironés-Vilaplana, A., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2011). Pomegranate fruit for health promotion: In A. Jiménez, C. García-Viguera (Eds.), *Antioxidant properties of crops III*. Functional Plant Science and Biotechnology, *5* (Special Issue 2), 33–42.

Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., & Packer, L. (2002). Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanins: Delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 166–171.

Odniozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *European Food Research and Technology*, *228*, 239–248.

Paul, M. (2009). *Effects of supercritical carbon dioxide and thermal processing on phenolics, antioxidant activity, and yeast inactivation in muscadine and pomegranate juice*. Thesis. Athens, Georgia: The University of Georgia.

Pérez-Vicente, A., Serrano, P., Abellán, P., & García-Viguera, C. (2004). Influence of packaging material on pomegranate juice colour and bioactive compounds, during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*, 639–644.

Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., & Ferreira, D. (2007). Antioxidant, antimicrobial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Medica*, *73*, 461–467.

Rosenblat, M., Hayek, T., & Aviram, M. (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*, *187*, 363–371.

- Saeed, S., & Tariq, P. (2006). Effects of some seasonal vegetables and fruits on the growth of bacteria. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9, 1547–1551.
- Sellappan, S., Akoh, C. C., & Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2432–2438.
- Sepúlveda, E., Sáenz, C., Peña, A., Robert, P., Bartolomé, B., & Cómez-Cordovés, C. (2010). Influence of the genotype on the anthocyanin composition, antioxidant capacity and color of Chilean pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70, 50–57.
- Solomon, A., Golubowicz, S., Yablownicz, Z., Grossman, S., Bergma, M., Gottlieb, H. E., et al. (2006). Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7717–7723.
- Turfan, Ö., Türkyilmaz, M., Yemis, O., & Özkan, M. (2011). Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juice from sacs and whole fruit. *Food Chemistry*, 129, 1644–1651.
- Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M., & Amir, R. (2007). Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9559–9570.
- Vaya, J., & Aviram, M. (2001). Nutritional antioxidants: Mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*, 1, 99–117.
- 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.





ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Approaches to understanding the contribution of anthocyanins to the antioxidant capacity of pasteurized pomegranate juices

Salud Vegara^a, Pedro Mena^b, Nuria Martí^a, Domingo Saura^a, Manuel Valero^{c,*}^a IBMC.-JBT Corp., FoodTech R&D Alliance, Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández (UMH)-Campus de Orihuela, Carretera de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain^b Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, E-30100 Espinardo, Murcia, Spain^c Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO), Universidad Miguel Hernández (UMH)-Campus de Orihuela, Carretera de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2013

Received in revised form 26 April 2013

Accepted 4 May 2013

Available online 14 May 2013

Keywords:

Pomegranate juice

Thermal pasteurization

Anthocyanins

Antioxidant capacity

Total phenolic compounds

ABSTRACT

Influence of processing and storage conditions on anthocyanin stability and antioxidant activity of clarified and cloudy juices from arils of the 'Mollar' pomegranate variety was studied. Clarification process reduced the content of total monomeric and individual anthocyanins, and increased the antioxidant activity of pomegranate juice. Thermal treatments (65 and 90 °C for 30 or 5 s) decreased the percentage of polymeric anthocyanin form, increasing on the contrary the monomeric one. In any case, storage temperature was the main factor affecting all the parameters tested. Cyanidin 3-*O*-glucoside (Cy3G) was more instable than delphinidin 3,5-di (Dp3,5dG) and cyaniding 3,5-diglucosides (Cy3,5dG). A linear relationship was observed between oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and total monomeric anthocyanins, suggesting that they contributed strongly to the antioxidant capacity. Results presented in this study show that hurdle technology (heating plus refrigeration) may help to reduce anthocyanin degradation in pasteurized pomegranate juice, avoiding a dramatic impact on its colour and preserving the beneficial effects of this specific bioactive compounds on human health.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Juices besides fruits are suitable food products in term of ingestion of health protective phytochemicals (Netzel et al., 2002). The distribution and composition of the phenolic compounds in juice products are dependent on the juice processing application which affects the rupture of the vacuoles and cell wall differently (Bengochea et al., 1997). The pomegranate is known to contain considerable amount of phenolic compounds, including anthocyanins, ellagic acid, punicalagin isomers, punicalins, granatins, and different flavanols as catechins and galocatechins (González-Molina, Moreno, & García-Viguera, 2009), and these constituents give the characteristic flavour and also play a large role in the acquisition of sensory properties (colour, bitterness, astringency, etc.) of the juice.

Pomegranate phenolic compounds exhibit a wide range of biological properties, such as antimicrobial, anti-inflammatory, anti-cancer, antiatherosclerotic, hepato- and neuro-protective (Faria, Monteiro, Mateus, Azevedo, & Calhau, 2007; Negi & Jayaprakasha, 2003; Reddy, Gupta, Jacob, Khan, & Ferreira, 2007; Sartippour, Seeram, Heber, & Pantuck, 2008; Seeram, Lee, & Heber, 2004), and

above are now gaining importance because of its potent antioxidant activity (Gil, Tomás-Barberán, Hess-Pierce, Holcroft, & Kader, 2000; Noda, Kaneyuki, Mori, & Packer, 2002). These health benefits are related to the high antioxidant activity of the pomegranate juice and can be correlated to its phenolic composition (Ferrari, Maresca, & Ciccarone, 2010), being the hydrolysable tannins which have higher antioxidant activity, although anthocyanins also contribute to the total antioxidant capacity of the juice (Gil et al., 2000).

Anthocyanins are the main pigments responsible for the red colour in pomegranates. The predominant anthocyanins present in pomegranates are delphinidin 3,5-di (Dp3,5dG) and 3-*O*-glucoside (Dp3G), cyanidin 3,5-di (Cy3,5dG) and 3-*O*-glucoside (Cy3G), and pelargonidin 3,5-di (Pg3,5dG) and 3-*O*-glucoside (Pg3G) (Miguel, Dandlen, Antunes, Neves, & Martins, 2004; Mousavinejad, Emam-Djomeh, Rezaei, & Khodaparast, 2009). Cy3G is the most abundant anthocyanin identified in the 'Mollar' pomegranate variety (Mena et al., 2011). Anthocyanins readily degrade during thermal processing which can have a dramatic impact on colour and nutritional properties of anthocyanin rich food products. Recent studies reveal that anthocyanin stability is not merely a function of the pasteurization temperature, but is in turn influenced by the intrinsic properties of the product (pH, chemical structure and concentration of anthocyanins, the presence of endogenous

* Corresponding author. Tel.: +34 96 674 96 83; fax: +34 96 674 96 19.

E-mail address: m.valero@umh.es (M. Valero).

enzymes and other natural compounds called co-pigments, metal-lic ions and sugars) and the processing (magnitude and duration of heating, storage temperature and time, the presence of oxygen and/or light) (Patras, Brunton, O'Donnell, & Tiwari, 2010). In addition, co-pigmentation reactions, especially inter- and intra-molecular ones, play a role in anthocyanin stability towards thermal treatment (Rein, 2005). There is hence a real need to minimize the degradation of anthocyanins present in the pomegranate juice during the pasteurization process and the further storage in order to secure its optimal sensorial and nutritional quality.

The Spanish southeast is one of the largest production areas of pomegranate variety 'Mollar'. It is a late-ripening cultivar with delicious and soft arils, being the harvest of fruits from the end of September to mid-November (Artés, Marín, & Martínez, 1996). Pomegranate transformation into juice is crucial for a profitable farming and solves common problems caused by large amounts of discarded fruits, encouraging the full use of the harvest and its introduction in the market of beneficial foods for health. The overall aim of this work was to examine effects of thermal processing and storage on anthocyanin stability and antioxidant activity of clarified and cloudy juices from arils of the 'Mollar' pomegranate variety. The aim was to gain knowledge of anthocyanin chemical behaviour before and after pasteurization and storage to better understand their contribution to the antioxidant capacity of pomegranate juices.

2. Materials and methods

2.1. Juice extraction

'Mollar' pomegranate is a late-ripening cultivar with sweet arils that have showed fewer anthocyanins and superior organoleptical properties than 'Wonderful' variety (Mena et al., 2011). Second quality pomegranate fruits from var. 'Mollar', harvested in autumn of 2010 were provided by Cambayas Coop. V. (Elche, Alicante, Spain). Pomegranates were cut in halves and arils were hand-separated from the pith. Juice was obtained by pressing pressure on arils inside a nylon mesh with a laboratory pilot press (Zumonat C-40; Somatic AMD, Valencia, Spain). The extracted cloudy juice contained 2% pulp. For obtaining clarified juice, the cloudy juice was centrifuged (Allegra™ 25R Centrifuge, Beckman Coulter Inc., Brea, California CA, USA) at 2700g for 10 min.

2.2. Juice pasteurization and storage

Both cloudy and clarified juices were subjected to heat treatments at 65 °C for 30 s (LTP, low temperature pasteurization) or 90 °C for 5 s (HTP, high temperature pasteurization) in a semi-tubular pasteurizer 25 L/h (Mipaser Prototype, Murcia Spain). The juices were stored in cooled incubators MIR-153 (Sanyo Electric Co., Ltd., Gunma, Japan) at room temperature (25 °C) and refrigeration (5 °C) for 45 and 120 days, respectively.

2.3. Co-pigmented, monomeric and polymeric anthocyanins

Co-pigmented, monomeric and polymeric anthocyanins were determined using a modified method of Mazza, Fukumoto, Delaquis, Girard, and Ewert (1999). Briefly, 10 µL of 1% (v/v) acetaldehyde was added to 100 µL of juice sample filtered through a 0.45 µm syringe filter. The mixture was allowed to sit for 45 min at room temperature before measuring absorbance at 520 nm (A^{acet}). To another 100 µL of juice sample, 13 µL of a 5% (w/v) SO₂ solution were added, and then A_{520} nm was measured (A^{SO_2}). The A_{520} nm was also measured directly from the juice sample. This reading was multiplied by 2 (dilution factor) to give the A^{juice} . From

these readings, the anthocyanin forms were expressed as: co-pigmented anthocyanins = $A^{acet} - A^{juice}$, monomeric anthocyanins = $A^{juice} - A^{SO_2}$ and polymeric anthocyanins = A^{SO_2} , being total anthocyanins = A^{acet} . The percent distribution of the different forms of anthocyanins was calculated as:

$$\% \text{co-pigmented} = [(A^{acet} - A^{juice}) / A^{acet}] * 100$$

$$\% \text{monomeric} = [(A^{juice} - A^{SO_2}) / A^{acet}] * 100$$

$$\% \text{polymeric} = [A^{SO_2} / A^{acet}] * 100$$

2.4. Determination of total monomeric anthocyanins

Replicate samples of raw and heat-treated pomegranate juice contained in screw cap 20 mL polypropylene containers were analyzed for total monomeric anthocyanin content, total phenols and antioxidant capacity after 0, 14, 28, 45, 60, 90 and 120 days of storage at different temperatures (5 and 25 °C). All samples were centrifuged in a Hettich EBA 21 centrifuge (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Germany) at 10,480g during 10 min at room temperature. The supernatant was filtered through a 0.45 µm nylon membrane (Waters Corporation, Milford, Massachusetts MA, USA).

Qualitative analysis of anthocyanins was performed by High-performance Liquid Chromatography (HPLC) on a Model L6200 liquid chromatograph (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) equipped with a SPD-M6A UV-VIS photodiode array detector (Shimadzu, Kyoto, Japan) and a Model 234 automatic sample injector (Gilson International Bv, Barcelona, Spain). Chromatograms were recorded and processed on a LC Workstation Class M10A Shimadzu PC-based chromatography data system.

A 20 µL sample was analyzed on a Luna® 5 µm C₁₈ column (25 × 0.46 cm) (Phenomenex Ltd., Macclesfield, UK) with a security guard cartridge system C₁₈ ODS (4 × 3 mm), using a mobile phase of water/formic acid (95:5 v/v) (solvent A) and HPLC grade methanol (solvent B). Elution was performed at a flow rate of 1 mL/min. The linear gradient started with 1% B, keeping isocratic conditions during 5 min, reaching 20% B at 20 min, 40% B at 30 min, 95% B at 35 min and 1% B after 41 min. UV chromatograms were recorded at 520 nm and compared with those obtained with analytical standards: anthocyanin monoglucosides (Polyphenols Laboratories AS, Sandnes, Norway) and diglucosides (Extrasynthese, Genay Cedex, France). Anthocyanins were quantified by the absorbance of their corresponding peaks as Cy3G at 520 nm.

2.5. Determination of total phenols

For total phenolic compounds determination, 1:10 dilutions of the juices were used. Total soluble phenolic compounds (TPC) were determined with Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich Corp., Saint Louis, Missouri MO, USA) in a SPECTROstar Omega UV/VIS absorbance microplate reader (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Germany) (Pérez-Vicente, Serrano, Abellán, & García-Viguera, 2004). 10 µL of sample dilution, 50 µL Folin-Ciocalteu reagent, 100 µL of aqueous 20% Na₂CO₃ (Panreac Química S.A., Barcelona, Spain) and 100 µL of distilled water were mixed. The mixture was allowed to stand for 30 min at room temperature before measuring absorbance at 750 nm. Gallic acid (Sigma-Aldrich Corp.) was used as standard. Results were expressed as gallic acid equivalents (mg GAE/L).

2.6. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) antioxidant assay

The ORAC test is currently the standardized method used by the USDA for testing foods and supplements antioxidant properties. To

assayed the capacity of the juices to scavenge peroxyl radicals a validated ORAC method which uses fluorescein (FL; Fluka Chemika, Neu-Ulm, Germany) as the fluorescent probe (ORAC_{FL}) was utilized with minor modifications (Laporta, Pérez-Fons, Mallavia, Caturla, & Micol, 2007). The automated ORAC assay was carried out on a FLU-Ostar Galaxy fluorescence microplate reader (BMG LABTECH GmbH). Several dilutions of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) from Fluka Chemika were used to construct the calibration curve. A freshly prepared 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (Sigma–Aldrich Corp.) water solution was used for each experiment. The temperature of the incubator was set at 37 °C and the FL fluorescence was recorded every minute after the addition of AAPH.

The ORAC values were calculated by using a regression equation between the Trolox concentration and the net area of the FL decay curve (area under curve, AUC) as previously described (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001). ORAC values were expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) (mmol Trolox/L).

2.7. Statistical analysis

Treatments were performed in triplicate, and all the parameters studied were also determined in triplicate for each storage temperature and time period. Statgraphics® Plus for Windows 3.0 (Statistical Graphic Corp. and Graphic Software Systems Inc., Rockville, Maryland, USA) was used for Statistical Analysis, including Analysis of Variance (ANOVA), Fisher's least significant difference (LSD) procedure to discriminate among the means, and Regression Analysis to describe the relationship between variables.

3. Results and discussion

3.1. Co-pigmented, monomeric and polymeric anthocyanins

Percentages of co-pigmented, monomeric and polymeric anthocyanins are shown in Table 1. The raw cloudy pomegranate juice showed very similar amounts of the three anthocyanin forms (33.33%, approximately), while the raw clarified one exhibited a considerably reduced content of anthocyanins in their polymeric form (between 9.04% and 13.18%). In other word, the clarification process had a significant lowering effect on total anthocyanin content, especially in its polymeric form.

In the case of clarified pomegranate juice, LTP treatment decreased the percentage of co-pigmented (6.55%) and especially

polymeric (8.98%) anthocyanin forms, increasing on the contrary the monomeric one (15.53%). The effect of HTP treatment was similar, a decrease of the co-pigmented (3.36%) and polymeric (8.12%) anthocyanins together with an increase of the monomeric forms (11.47%). When the juice samples were stored at 25 °C, an increase in the percentage of polymeric anthocyanins up to levels higher than 40.43% was observed at the end of storage period, irrespectively of the heat treatment applied. If juices were stored at 5 °C, then the levels of polymeric anthocyanins varied between 7.08% and 11.23%, minimizing changes on the percentages of the other forms.

In cloudy pomegranate juice, LTP treatment highly decreased the percentage of polymeric (25.07%) anthocyanin form, increasing on the contrary the co-pigmented (15.01%) and monomeric ones (10.6%). Similarly the HTP treatment resulted in an equal decrease of the polymeric anthocyanins (25.02%) together with increases of 24.0% and 1.02% for the co-pigmented and monomeric forms, respectively. When the juice samples were stored during 45 days at 25 °C, an increase in percentage of polymeric anthocyanins up to levels between 48.88% and 55.76% was observed, irrespectively of the heat treatment applied. Moreover, these samples showed a dramatic decline in percentage of monomeric anthocyanins (Table 1). If juices were stored at 5 °C, the levels of polymeric anthocyanins varied between 13.46% and 21.81%, while the percentages of the monomeric forms were reduced up to levels between 24.89% and 29.71%. It is clear that anthocyanins were extensively polymerized during storage (Ochoa, Kesseler, Vulliou, & Lozano, 1999), especially when the pomegranate juices were stored at room temperature. This large increase in polymeric forms may be due to factor such as residual enzyme activity or condensation reactions of anthocyanins with other phenolic compounds (Brownmiller, Howard, & Prior, 2008).

The decline in percent polymeric anthocyanins in response to pasteurization clearly contrasts with many studies (Brownmiller et al., 2008; Hager, Howard, Prior, & Brownmiller, 2008; Ochoa et al., 1999) on processed berries where polymeric anthocyanins increase following pasteurization coincident with losses of monomeric anthocyanins. On the contrary, our results are in accordance with a previous study that showed an increase (between 6.5% and 32.5%) in the monomeric anthocyanin content of pasteurized juices from Iranian pomegranate varieties with pinkish arils such as Vahshe Kane Tehran and Malase Yazdi (Alighourchi, Barzegar, & Abbasi, 2008). According to Mena et al. (2011), the arils from 'Mollar' variety do not exhibit intense red colour and could behave similarly, when pasteurized. The increase of total monomeric

Table 1
% Co-pigmented, monomeric and polymeric anthocyanins in natural and processed pomegranate juices [mean and standard deviation (SD) are given].

Juice	Treatment	Storage (°C/days)	Anthocyanins		
			% Co-pigmented	% Monomeric	% Polymeric
Clarified	None	0	65.59 ± 2.10 aA	23.33 ± 0.06 bB	11.08 ± 2.07 hC
		0	59.04 ± 0.43 cA	38.86 ± 0.10 cB	2.10 ± 0.34 kC
	LTP 65 °C, 30 s	25 °C/45 d	31.59 ± 0.04 mB	27.94 ± 0.05 hC	40.48 ± 0.06 dA
		5 °C/120 d	51.36 ± 0.06 gA	41.43 ± 0.06 bB	7.21 ± 0.12 jC
	HTP 90 °C 5 s	0	62.23 ± 0.03 bA	34.80 ± 0.38 dB	2.96 ± 0.40 kC
		25 °C/45 d	39.97 ± 0.27 jB	14.04 ± 0.14 kC	45.99 ± 0.36 cA
	5 °C/120 d	46.60 ± 0.03 iA	42.23 ± 0.03 aB	11.17 ± 0.06 hC	
Cloudy	None	0	33.33 ± 0.11 lB	32.28 ± 0.33 fC	34.39 ± 0.40 eA
		0	48.34 ± 0.39 hA	42.34 ± 0.57 aB	9.32 ± 0.63 iC
	LTP 65 °C 30 s	25 °C/45 d	37.75 ± 0.62 kB	12.93 ± 0.18 lC	49.32 ± 0.62 bA
		5 °C/120 d	56.18 ± 1.02 eA	29.66 ± 0.06 gB	14.17 ± 1.07 gC
	HTP 90 °C 5 s	0	57.33 ± 0.12 dA	33.30 ± 0.28 eB	9.37 ± 0.39 iC
		25 °C/45 d	36.88 ± 0.10 kB	7.43 ± 0.32 mC	55.69 ± 0.10 aA
	5 °C/120 d	53.35 ± 0.06 fA	25.05 ± 0.19 iB	21.60 ± 0.20 fC	

^{a-m}Means within same column followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

^{A-C}Means within same row followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

Table 2
Evolution of total monomeric anthocyanin content (mg/L) in heat treated, clarified and cloudy pomegranate juices during storage.

Storage time (days)	Type of juice, treatment and storage temperature							
	Clarified				Cloudy			
	65 °C, 30 s		90 °C, 5 s		65 °C, 30 s		90 °C, 5 s	
	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C
Before	173.5 ± 9.2 B ^a	173.5 ± 9.2 Bab	173.5 ± 9.2 Ba	173.5 ± 9.2 Ba	275.1 ± 1.2 Aa	275.1 ± 1.2 Aa	275.1 ± 1.2 Aa	275.1 ± 1.2 Aa
0	172.0 ± 5.5 Aa	172.0 ± 5.5 Aab	171.4 ± 0.3 Aa	171.4 ± 0.3 Aa	177.1 ± 6.1 Ab	177.1 ± 6.1 Abc	162.8 ± 3.3 Ab	162.8 ± 3.3 Ac
14	97.1 ± 45.6 BCb	162.8 ± 1.1 Abc	98.8 ± 19.7 BCb	164.7 ± 6.2 Aa	135.1 ± 1.0 Abc	169.9 ± 1.0 Abc	77.6 ± 1.8 Cc	153.7 ± 1.8 Ac
28	16.7 ± 0.7 Dc	186.1 ± 1.7 Aa	30.8 ± 5.6 Cc	176.5 ± 10.8 Aa	69.0 ± 4.4 Bd	189.5 ± 9.9 Ab	42.7 ± 4.6 Cd	182.2 ± 3.5 Ab
45	11.7 ± 6.9 Dc	146.5 ± 5.7 Bd	21.7 ± 8.9 CDc	140.2 ± 13.9 Bb	42.4 ± 3.2 Ce	178.7 ± 15.7 Abc	21.6 ± 2.6 CDE	135.0 ± 6.5 Bd
60		149.6 ± 13.8 Acd		139.9 ± 1.2 Ab		161.3 ± 15.6 Abc		130.8 ± 3.5 Ad
90		119.1 ± 2.6 ABe		128.9 ± 10.3 ABb		153.5 ± 26.0 Ac		89.4 ± 5.3 Be
120		109.0 ± 4.7 Be		90.0 ± 9.2 Bc		152.1 ± 7.8 Ac		91.3 ± 18.2 Be

^a Means within same row followed by different capital letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

^b Means within same column followed by different small letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

anthocyanin content could be due to the conversion of colourless leucoanthocyanin into red anthocyanins, when heated under acid conditions (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009). Co-pigmentation could also to play a role in anthocyanin stability of the juices (Table 1). Inter- and intramolecular complex formation, self-association and metal complexation are possible interactions through which co-pigmentation occurs (Rein, 2005).

3.2. Monomeric anthocyanin analysis

The changes in total monomeric anthocyanin content (expressed in Cy3G, as the sum of individual anthocyanin concentration measured at 520 nm) were closely monitored in pasteurized, clarified and cloudy pomegranate juices stored at 25 and 5 °C during 45 and 120 days (Table 2). Clarification process had an important effect on total monomeric anthocyanin content of pomegranate juice. This pretreatment reduced approximately 37% total monomeric anthocyanins probably due to its fast polymerization and the formation of complexes with other components in the juice matrix. Decline in monomeric anthocyanins (35.6–40.8%) was only revealed in cloudy juices in response to heat treatments (LTP or HTP). After pasteurizations both clarified and cloudy juices showed similar contents of total monomeric anthocyanins. This different behaviour of juices represents that the stability of anthocyanins is function of their matrices, structural features, and conditions of processing as reported by Alighourchi et al. (2008).

The storage temperature was the main factor affecting anthocyanin stability in pasteurized pomegranate juices. In general, samples stored at 5 °C had a lower and slower (75 days more) loss of anthocyanins than those stored at 25 °C (Table 2). At room temperature (25 °C), pasteurized juices lost between 76% and 93% of anthocyanins during 45 days of storage, while the loss in those stored under refrigeration was 37–48% after 120 days, although anthocyanin degradation observed in LTP-treated cloudy juice stored at 5 °C was surprisingly low (14.1%). Studies have shown degradation of anthocyanins during prolonged storage in pomegranate juice (Alighourchi et al., 2008; Pérez-Vicente et al., 2004), black raspberry juice (Hager et al., 2008), and blueberry puree (Brownmiller et al., 2008). Previously, Gil et al. (2000) reported a reduction of the anthocyanin degradation rate in refrigerated (5 °C) pomegranate juices compared with those stored at 25 °C.

3.3. Monomeric anthocyanin analysis

The typical anthocyanin profile of pomegranate juices is characterised by delphinidin, cyanidin and pelargonidin 3-glucosides and 3,5-diglucosides, being Cy3G the most abundant monomeric

anthocyanin in juices from the 'Mollar' variety (Mena et al., 2011). In terms of quantity, the main anthocyanins in raw and cloudy pomegranate juice were Cy3G (81 ± 0.7 mg/L), followed by Dp3,5dG (71 ± 5.3 mg/L), Cy3,5dG (67 ± 3.1 mg/L), Dp3G (46 ± 3.0 mg/L), Pg3G (6 ± 2.2 mg/L), and Pg3,5dG (5 ± 3.0 mg/L). Although the clarification process significantly reduced ($P < 0.05$) the individual anthocyanin concentrations, the sequence above indicated was maintained.

The changes in individual anthocyanins of heat-treated pomegranate juices are shown in Fig. 1A–H. Contents of individual anthocyanins in pasteurized cloudy juices were affected by heat processing, while they did not in clarified ones. The degradation trend of individual anthocyanins was same in both types of juice, heat treatments applied, and temperatures of storage. Nevertheless, degradation of individual anthocyanins significantly decreased at 5 °C ($P < 0.05$). In any case, Cy3G was more instable than Dp3,5dG and Cy3,5dG during storage period. At the end of storage, significant differences were observed between individual anthocyanins, being Dp3,5dG the most abundant, followed by Cy3,5dG and Cy3G. According to these results, (Alighourchi & Barzegar, 2009) reported higher stability of Dp3,5dG and Cy3,5dG (diglucoside anthocyanins) than Cy3G (monoglucoside anthocyanin) in pasteurized reconstituted pomegranate juice during storage period at 4 °C.

3.4. TPC

TPC were determined for pasteurized pomegranate juices throughout storage (0, 14, 28, 45, 60, 90 and 120 days) at 5 and 25 °C and compared with the mean values estimated for raw, cloudy and clarified juices (1134.14 and 1153.64 mg GAE/L, respectively). Results are shown in Fig. 2A and B. ANOVA for TPC showed that the effects of pasteurization treatments were no significant ($P \geq 0.05$). However, there was a statistically significant difference between the mean TPC from one time of storage to another at the 95% confidence level.

Storage temperature was the main factor affecting TPC content in pasteurized pomegranate juices. Generally, samples stored at 5 °C maintained the level of TPC after 120 days of the storage or even presented higher values than those determined in the beginning. At room temperature (25 °C), pasteurized juices lost between 16.33% and 30.82% of TPC after 45 days of storage.

3.5. Antioxidant capacity of pomegranate juice

Data of in vitro antioxidant activity of pomegranate juices measured by ORAC assay are shown in Fig. 3A and B. The antioxidant capacity was significantly influenced by the clarification process

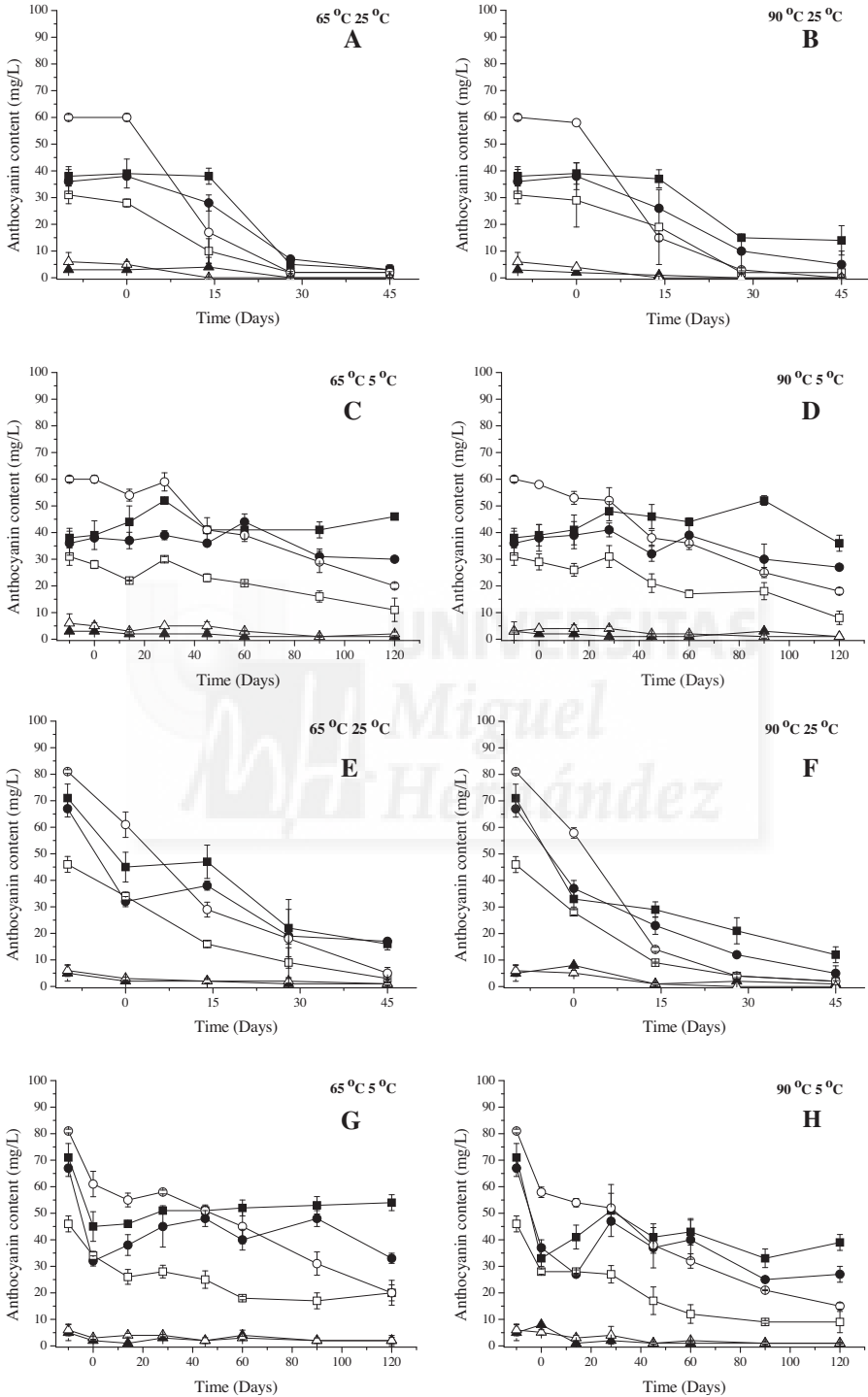


Fig. 1. Evolution of individual anthocyanins (■ Dp3,5dG, ● Cy3,5dG, ▲ Pg3,5dG, □ Dp3G, ○ Cy3G, and △ Pg3G) in pasteurized, clarified (A–D) and cloudy (E–H) pomegranate juices during storage at 25 and 5°C for 45 and 120 days, respectively.

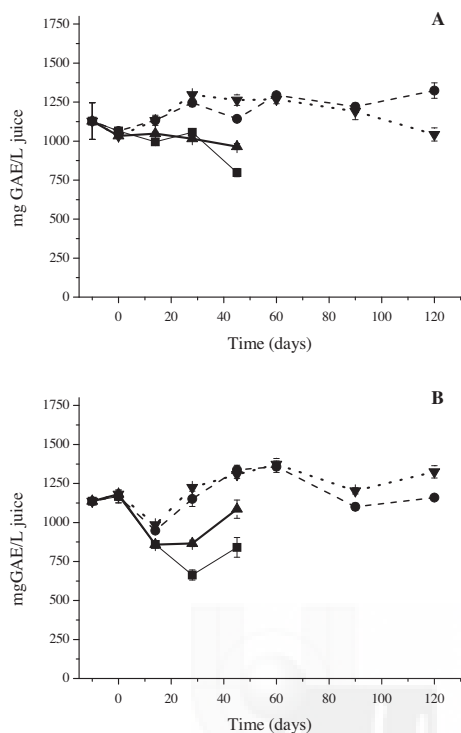


Fig. 2. Changes associated with processing and storage (■ 65 °C-30 s, 25 °C; ● 65 °C-30 s, 5 °C; ▲ 90 °C-5 s, 25 °C; ▼ 90 °C-5 s, 5 °C) on total phenolic content of pasteurized, clarified (A) and cloudy (B) pomegranate juices.

applied to the pomegranate juice ($P < 0.05$). It had a positive effect on the antioxidant capacity of juices (18.68 versus 13.94 mmol Trolox/L) despite inducing a reduction in the content of total monomeric and individual anthocyanins. This may be due to a simulated dilution effect of clarification process by centrifugation. Synergistic or antagonistic interactions of two or more antioxidants have been documented in biological and model systems (Chen, Milbury, Lapsley, & Blumberg, 2005; Freeman, Eggett, & Parker, 2010). The antioxidant capacity values obtained with a single dilution (Bolling, Chen, Kamil, & Chen, 2012) may not fully account the reducing effects on antagonistic interactions between antioxidant constituents, resulting from the clarification process.

On the other hand, the antioxidant capacity was not affected by pasteurization ($P \geq 0.05$); although among cloudy juices, that one subjected to LTP treatment showed significant differences. Changes in antioxidant capacity of pomegranate juices were also influenced by storage time. Average antioxidant activity decreased over the time in LTP- and HTP-treated juices stored at 5 and 25 °C, with significant differences between periods.

The storage temperature was the main factor affecting antioxidant capacity of pasteurized pomegranate juices. Samples stored at 5 °C had a slower loss of antioxidant activity than those stored at 25 °C. At room temperature, pasteurized juices lost between 43% and 68% of activity after 45 days of storage, while the loss in those stored under refrigeration was the same (44–66%) after 120 days; only the LTP-treated cloudy juice stored at 5 °C displayed low loss of antioxidant capacity (17.73%).

ORAC results were always strongly correlated with total monomeric anthocyanin content (Table 3), suggesting that the anthocyanins contribute greatly to the antioxidant activity of the

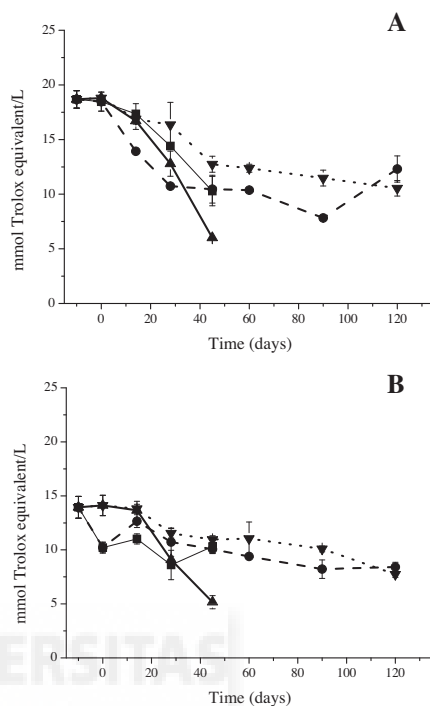


Fig. 3. Effects of thermal treatments and storage conditions (■ 65 °C-30 s, 25 °C; ● 65 °C-30 s, 5 °C; ▲ 90 °C-5 s, 25 °C; ▼ 90 °C-5 s, 5 °C) on antioxidant capacity of pasteurized, clarified (A) and cloudy (B) pomegranate juices.

Table 3

Correlation coefficients (r) between anthocyanins, total soluble phenolic compounds (TPC) and the in vitro antioxidant capacity of the juices measured by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay.

Juice	Treatment-storage temperature	Activity	Anthocyanins	TPC
Clarified	LTP-25 °C	ORAC	0.892893**	0.873178*
	LTP-5 °C	ORAC	0.745265**	-0.788836**
	HTP-25 °C	ORAC	0.885680**	0.760696
	HTP-5 °C	ORAC	0.898200***	-0.189747
Cloudy	LTP-25 °C	ORAC	0.922568**	0.563405
	LTP-5 °C	ORAC	0.813432**	-0.387739
	HTP-25 °C	ORAC	0.864025*	0.862786*
	HTP-5 °C	ORAC	0.725752**	-0.699477

The significance of the correlation coefficient (r) is identified by asterisks. No asterisk means that no statistically significant relationship was found.

* $P < 0.10$.

** $P < 0.05$.

*** $P < 0.01$.

pomegranate aril juices. In contrast, there was not a statistically significant relationship between ORAC values and TPC at the 90% confidence level ($P > 0.10$) in at least four of the tested juices. Before, antioxidant activity of pomegranate juices had been mainly correlated to their TPC values (Ferrari et al., 2010; Gil et al., 2000; Rosenblat, Hayek, & Aviram, 2006).

4. Conclusions

Clarification process gave as result an increase of antioxidant activity of pomegranate juice as consequence of reducing the

antagonistic interactions between different antioxidant constituents. Thermal treatments here used (LTP and HTP) decreased the percentage of polymeric anthocyanin form, increasing on the contrary the monomeric one in pomegranate juice. Additionally, pasteurizations had not influence on the TPC and antioxidant capacity of juices. Storage temperature was, however, the main factor affecting all the parameters tested (total monomeric and individual anthocyanins, TPC, and antioxidant activity). Fast degradation of anthocyanins was observed in juices stored at 25 °C, while refrigerated storage (5 °C) resulted in much lower degradation rate. Cy3G was more instable than Dp3,5dG and Cy3,5dG, and consequently its normal dominance in juice from arils of 'Mollar' pomegranates was altered in favour of diglucoside anthocyanins. A linear relationship was observed between ORAC values and total monomeric anthocyanins, suggesting that they contributed strongly to the antioxidant capacity of juice. Results presented in this study show that hurdle technology (heat treatment plus refrigeration) may help to reduce anthocyanin degradation in pasteurized pomegranate juice, avoiding a dramatic impact on its colour and preserving the antioxidant capacity and beneficial effects of this specific bioactive compounds on human health.

Acknowledgements

This research was funded by AGROALIMED Foundation from Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació, Generalitat Valenciana (Spain), Project 'Producción de Zumo de Caqui (*Diospyros kaki* L.) y de Industrialización de la Granada (*Punica granatum* L.)'.

References

- Alighourchi, H., & Barzegar, M. (2009). Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Journal of Food Engineering*, *90*, 179–185.
- Alighourchi, H., Barzegar, M., & Abbasi, S. (2008). Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *European Food Research and Technology*, *227*(3), 881–887.
- Artés, F., Marín, J. G., & Martínez, J. A. (1996). Controlled atmosphere storage of pomegranate. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung*, *203*, 33–37.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag (pp. 837).
- Bengochea, M., Sancho, A., Bartolomé, B., Estrella, I., Gómez-Cordovés, C., & Hernández, M. (1997). Phenolic composition of industrially manufactured purees and concentrates from peach and apple fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(10), 4071–4075.
- Bolling, B. W., Chen, Y.-Y., Kamil, A. G., & Chen, C.-Y. O. (2012). Assay dilution factors confound measures of total antioxidant capacity in polyphenol-rich juices. *Journal of Food Science*, *77*(2), H69–H75.
- Brownmiller, C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science*, *73*, 72–79.
- Chen, C.-Y. O., Milbury, P. E., Lapsley, K., & Blumberg, J. B. (2005). Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *Journal of Nutrition*, *135*, 1366–1373.
- Faria, A., Monteiro, R., Mateus, N., Azevedo, I., & Calhau, C. (2007). Effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice intake on hepatic oxidative stress. *European Journal of Nutrition*, *46*(5), 271–278.
- Ferrari, G., Maresca, P., & Ciccarone, R. (2010). The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. *Journal of Food Engineering*, *100*, 245–253.
- Freeman, B. L., Eggett, D. L., & Parker, T. L. (2010). Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. *Journal of Food Science*, *75*, C570–6.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(10), 4581–4589.
- González-Molina, E., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2009). A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chemistry*, *115*(4), 1364–1372.
- Hager, A., Howard, L. R., Prior, R. L., & Brownmiller, C. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed black raspberry products. *Journal of Food Science*, *73*, 134–140.
- Laporta, O., Pérez-Fons, L., Mallavia, R., Caturla, N., & Micol, V. (2007). Isolation, characterization and antioxidant assessment of the bioactive compounds derived from *Hyposiphon rooperi* corm extract (African potato). *Food Chemistry*, *101*(4), 1425–1437.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 4009–4017.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartual, J., Saura, D., et al. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(10), 1893–1906.
- Miguel, G., Dandlen, S., Antunes, D., Neves, A., & Martins, D. (2004). The effect of two methods of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice extraction on quality during storage at 4 °C. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2004*(5), 332–337.
- Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., & Khodaparast, M. H. H. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity of pomegranate juice of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry*, *115*(4), 1274–1278.
- Negi, P. S., & Jayaprakasha, G. K. (2003). Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. *Journal of Food Science*, *68*(4), 1473–1477.
- Netzel, M., Strass, G., Kaul, C., Bitsch, L., Dietrich, H., & Bitsch, R. (2002). In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice. *Food Research International*, *35*, 213–216.
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., & Packer, L. (2002). Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: Delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 166–171.
- Ochoa, M. R., Kessler, A. G., Vulllioud, M. B., & Lozano, J. E. (1999). Physical and chemical characteristics of raspberry pulp: Storage effect on composition and color. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, *32*, 149–153.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4619–4626.
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science and Technology*, *21*(1), 3–11.
- Pérez-Vicente, A., Serrano, P., Abellán, P., & García-Viguera, C. (2004). Influence of packaging material on pomegranate juice colour and bioactive compounds, during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*(7), 639–644.
- Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., & Ferreira, D. (2007). Antioxidant, antimicrobial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Medica*, *73*(5), 461–467.
- Rein, M. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. Helsinki: University of Helsinki (pp. 10–14).
- Rosenblat, M., Hayek, T., & Aviram, M. (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*, *187*(2), 363–371.
- Sartippour, M., Seeram, N., Heber, D., & Pantuck, A. (2008). Ellagitannin-rich pomegranate extract inhibits angiogenesis in prostate cancer in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology*, *32*, 475–480.
- Seeram, N. P., Lee, R., & Heber, D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinica Chimica Acta*, *348*(1–2), 63–68.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Research note

Effect of pasteurization process and storage on color and shelf-life of pomegranate juices

Salud Vegara^a, Nuria Martí^a, Pedro Mena^b, Domingo Saura^a, Manuel Valero^{c,*}^a IBMC.-JBT Corp., FoodTech R&D Alliance, Institute of Molecular and Cell Biology, University Miguel Hernández of Elche (UMH)-Campus de Orihuela, Carretera de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain^b Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, E-30100, Espinardo, Murcia, Spain^c Plant Science and Microbiology Department, School of Engineering of Orihuela, University Miguel Hernández of Elche (UMH)-Campus de Orihuela, Carretera de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 February 2013

Received in revised form

14 June 2013

Accepted 25 June 2013

Keywords:

Pomegranate juice

Heat pasteurization

Hurdle technology

Browning index

Total color density

ABSTRACT

The effects of two heat processes LTP (low-temperature pasteurization: 65 °C, 30 s) and HTP (high-temperature pasteurization: 90 °C, 5 s) on color quality of pasteurized cloudy and clarified or centrifuged pomegranate juices were evaluated during prolonged storage at room temperature (25 °C) and under refrigeration (5 °C). Both heat treatments combined with refrigeration prevented microbial growth for 120 days. Although processing and storage of pomegranate juice had a decisive impact on the degradation of anthocyanin compounds and the consequent formation of brown pigments, storage temperature was the main factor affecting both browning index (BI) and red color loss in pasteurized pomegranate juices. Samples stored at 5 °C had a lower and slower loss of red color than those stored at 25 °C. Results showed that BIs increased rapidly with time in juices stored at 25 °C, being not acceptable (>1.00) after 7 days. The juices stored at 5 °C showed less browning regardless of pasteurization treatment they were subjected. In particular LTP-treated cloudy and clarified juices stored at 5 °C for 90 days exhibited BI values of 0.93 and 0.85, respectively.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Interest in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice and its products has increased markedly in recent years with a growing number of reports on their potential health benefits, which has placed them in the first line of functional juice market. Pomegranate juice consumption has been associated with inhibition of prostate cancer in men (Pantuck et al., 2006), reduction in serum oxidative stress in plasma of type-2 diabetes mellitus patients (Rosenblat, Hayek, & Aviram, 2006), a reduced atherosclerosis in diabetic patients (Rock et al., 2008), reduction in blood pressure and low density lipoprotein (LDL) oxidation (Aviram et al., 2004), anti-HIV-1 activity (Neurath, Strick, Li, & Debnath, 2005), and potential protection against colon cancer (Kasimsetty et al., 2010). These beneficial effects of the pomegranate juices were attributed to the antioxidative properties of pomegranate polyphenols anthocyanins and hydrolyzable tannins (such as punicalagins, punicalin, pedunculagin, gallagic and ellagic acid esters of glucose) (Mena, Gironés-Vilaplana, Moreno, & García-Viguera, 2011).

Processing and pasteurization conditions play an important role in the color, flavor, texture and antioxidant capacity of juice (Hernández, Melgarejo, Tomás-Barberán, & Artés, 1999).

Color is one of the most important attributes of food and beverages. It is the first thing that consumers notice on the shelves and it may invite or dissuade them in their choice of products (Nachay, 2009). In recent years there has been an increase in the consumption of red beverages, such as red orange, grape, berry and pomegranate juices, due to the healthy properties of the natural pigments present in these fruits, such as anthocyanins (Konczak & Zhang, 2004). Unfortunately, anthocyanins are unstable and susceptible to degradation, leading to a brownish color during processing and storage. The primary color deterioration in fruit juices containing anthocyanins occurs as a result of the degradation of monomeric anthocyanins, polymerization and the subsequent formation of brown pigments (Somers & Evans, 1986). These color changes strongly affect consumer behavior and result in a loss of marketability of processed pomegranate products.

Thermal processing is the most common method to extend shelf life of fruit juices by inactivating microorganisms and enzymes. Heating right after pressing inhibits native polyphenol oxidase (PPO) enzymes that cause brown color formation by oxidizing polyphenols (Skrede, Wrolstad, & Durst, 2000). However,

* Corresponding author. Tel.: +34 96 674 96 83; fax: +34 96 674 96 19.
E-mail address: m.valero@umh.es (M. Valero).

conventional heat treatments often lead to detrimental changes in sensory and nutritive properties of juices. Although researchers have optimized time/temperature profiles to minimize the effects derived from the exposure of some foods to heat, the optimization of time/temperature pasteurization treatment is still a great challenge for the incipient processing industry of pomegranate juice.

The aim of the present work was to evaluate and compare the effects of two heat pasteurization processes on inactivation of naturally occurring microorganisms and color deterioration in pomegranate juices during prolonged storage at different temperatures.

2. Materials and methods

2.1. Juice extraction

Second quality pomegranate 'Mollar' fruits, harvested in autumn of 2010 when fully ripened, were provided by Cambayas Coop. V. (Elche, Alicante, Spain). Pomegranates were cut in halves and arils were hand-separated from the pith. Juice was immediately obtained by applying pressure on arils inside a nylon mesh with a laboratory pilot press (Zumonat C-40; Somatic AMD, Valencia, Spain). The extracted cloudy juice contained 2% pulp. For obtaining clarified juice, the cloudy juice was centrifuged at 2700g for 10 min using an Allegra™ 25R Centrifuge (Beckman Coulter Inc., Brea, California, USA).

2.2. Juice pasteurization and storage

Both cloudy and clarified juices were subjected to heat treatments at 65 °C for 30 s (LTP, low-temperature pasteurization) or 90 °C for 5 s (HTP, high-temperature pasteurization) in a semi-tubular pasteurizer 25 L/h (Mipaser Prototype, Murcia, Spain). Replicate samples of raw and heat-treated juice contained in screw cap 20 mL polypropylene containers were stored in cooled incubators MIR-153 (Sanyo Electric Co., Ltd., Gunma, Japan) at 25 and 5 °C for 45 and 120 days, respectively.

2.3. Microbiological analysis

Initial microbial levels of cloudy and clarified pomegranate juices before heat treatment were determined by total aerobic plate counts (APCs), using the spread-plate technique. Samples (1 mL) were serially diluted in buffered peptone water (PW; Scharlau Chemie, S.A., Barcelona, Spain) and then 0.1 mL volumes of appropriate dilutions were spread-plated onto duplicate plates of plate count agar (PCA; Scharlau Chemie, S.A.), using a sterile bent glass rod. Plates were incubated at 30 °C for 24–96 h.

2.4. Shelf-life study

Replicate samples of raw and heat-treated pomegranate juice were analyzed for number of microorganisms after 0, 7, 14, 21, 28, 45, 60, 75, 90 and 120 days of storage. From each agitated processed sample, 0.1 mL volumes were taken at each time period and total APCs were performed as previously described. For thermally untreated samples, serial PW dilutions were necessarily made.

2.5. Color measurement

Color intensity of pomegranate juices can be determined by taking into consideration its absorbance values at 520 nm (A_{520}), the wavelength of maximum absorbance of the present monomeric anthocyanins, which give the juice the characteristic red color. Hence, the color of pomegranate juices was determined by reading the A_{520} parameter, using a microplate reader Spectrostar Omega

(BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Germany). The pomegranate juices were previously diluted (1:2) with distilled water and then filtered through a 0.45 µm nylon filter.

Total color density (TCD) was expressed as total absorbance values of the brown compounds, which show maximum absorbance at 420 nm and absorbance of juice that gives its maximum at 533 nm (Alper, Bahçeci, & Acar, 2005). The pomegranate juices were diluted with distilled water for each test in order to obtain an absorbance below 1.0 measured at 533 nm. TCD was estimated by Eq. (1), where DF was the dilution factor.

$$\text{TCD} = [(A_{420} + A_{533}) - 2(A_{700})] \cdot \text{DF} \quad (1)$$

2.6. Browning index

Browning index (BI) [expressed as the absorbance ratio at 430 nm by that at 520 nm, according to Malien-Aubert, Dangles, and Amiot (2001)] of water diluted (1:2) pomegranate juices was determined using a microplate reader Spectrostar Omega.

2.7. Determination of pH

The pH of the pomegranate juices samples was measured with a pH-meter GLP 21 (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain).

2.8. Statistical analysis

Treatments were performed in triplicate, and all the parameters studied were also determined in triplicate for each storage temperature and time period. Statgraphics® Plus for Windows 3.0 (Statistical Graphic Corp. and Graphic Software Systems Inc., Rockville, Maryland, USA) was used for Statistical Analysis.

3. Results

3.1. Microbial inactivation

APCs of cloudy and clarified pomegranate juices before and after pasteurization treatments were 5.59 ± 0.13 and 5.23 ± 0.04 log colony forming units (CFU)/mL, respectively. The reduction in number of endogenous microorganisms in the clarified pomegranate juice obtained by centrifugation was not statistically significant. Microbiological analysis of the heat-treated clarified juices indicated that both pasteurization treatments were sufficiently effective to decrease the APCs to a level below the detection limit, i.e. no CFU was observed just after treatment. For the heat-treated cloudy juices, microbial counts were almost nil or negligible ($\leq 1.00 \pm 0.00$ log CFU/mL) after pasteurization processes.

3.2. Shelf-life study and pH analysis

After 7 days storage of untreated pomegranate juice samples at 25 °C, very high levels (≥ 7.65 log CFU/mL) of microbial growth were observed (Table 1). Microbial count in LTP-treated cloudy pomegranate juice increased up to 3.0 log CFU/mL after 45 days storage at 25 °C. In contrast, microbial growth was negligible in HTP-treated cloudy juice under the same storage conditions. Also, negligible or nil counts were obtained in both LTP- and HTP-treated clarified pomegranate juices.

The increase of microbial populations in pomegranate juices under refrigeration conditions is shown in Table 2. Microbial counts in untreated cloudy and clarified pomegranate juices increased up to 6.65 log CFU/mL after 21 days storage at 5 °C. On the contrary, microbial growth in heat-treated juice was almost nil

Table 1
Increase in microbial population (log CFU/mL \pm SD) with storage time at room temperature (25 °C) in thermally processed and untreated pomegranate juices.

Treatment/Juice type	Storage days					
	0	7	14	21	28	45
Untreated						
Cloudy	5.59 \pm 0.13 ^b	7.99 \pm 0.08 ^a	ND	ND	ND	ND
Clarified	5.23 \pm 0.04 ^b	7.69 \pm 0.05 ^a	ND	ND	ND	ND
LTP 65 °C, 30 s						
Cloudy	1.00 \pm 0.00 ^c	1.15 \pm 0.21 ^{bc}	2.06 \pm 0.56 ^{ab}	2.22 \pm 0.37 ^a	2.87 \pm 0.61 ^a	3.01 \pm 0.41 ^a
Clarified	0.00 \pm 0.00 [#]	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
HTP 90 °C, 5 s						
Cloudy	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.28 \pm 0.27
Clarified	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

^{a,b,c}Means in the same row followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

[#]No CFU was observed. ND, not determined.

or negligible up to 120 days. No significant changes in pH were observed during storage, being pH values of all pasteurized samples between 3.3 and 3.6.

3.3. Color measurement

The evolution of red color loss in the pasteurized pomegranate juice samples during storage is shown in Fig. 1. Just after heat treatments, the measuring of A_{520} indicated that in clarified juice (Fig. 1A) the loss of red color due to the LTP treatment was 3% while that produced by HTP treatment reached values of 22%. However, in cloudy juice (Fig. 1B) the loss of red color due to pasteurization treatments was similar in both conditions reaching values of 42%.

The losses of red color followed a similar pattern in both types of juice (Fig. 1A and B), but the juices that were stored at 5 °C had a lower and slower loss of red color than those stored at 25 °C. The cloudy juice LTP-treated and stored at 25 °C for 45 days lost 74% of red color with respect to the starting point (Fig. 1B). The same heat-treated juice stored at 5 °C for 120 days lost 55%. The cloudy juice HTP-treated and stored at 25 °C lost 85% of red color, while at 5 °C lost 70%. Similarly, the clarified juice LTP-processed and stored at 25 °C lost 77% of initial red color (Fig. 1A), while when it was stored at 5 °C, lost 40% only. The clarified juice HTP-treated and stored at 25 °C lost 80% of red color, but when it was stored at 5 °C, the loss was 53%.

As the A_{520} values, the TCDs of the juice depended largely on the storage temperature (Fig. 2). LTP-treated cloudy juice stored at 25 °C for 45 days showed a discoloration of approximately 61% compared to its original color, while that stored at 5 °C for 120 days lost 50%. HTP-treated cloudy juice stored at 25 °C lost 60% of TCD,

while at 5 °C lost 57%. Similarly, the LTP-treated clarified juice stored at 25 °C lost 58% of initial color, while when it was stored at 5 °C, lost 37% only. The HTP-treated clarified juice stored at 25 °C lost 60% of TCD, but when it was stored at 5 °C, the loss was 43%.

3.4. BI analysis

In Fig. 3, the behavior of the BIs for cloudy and clarified pomegranate juices is plotted as a function of the storage time, varying either the processing conditions or the storage temperature. Results showed that BIs increased rapidly with the time in juices stored at 25 °C, being not acceptable (BIs > 1.00, representing yellowish shades) after 7 days. HTP-treated cloudy and clarified juices stored at 25 °C presented the highest BI values (4.00 ± 0.32 and 3.30 ± 0.76) at the end of the storage period (45 days). However, the juices stored at 5 °C showed less browning regardless of the pasteurization treatment they were subjected. LTP-treated cloudy and clarified juices stored at 5 °C for 90 days exhibited BI values of 0.93 ± 0.01 and 0.85 ± 0.01 . When these juices were HTP-treated, BI values slightly higher than the unit were obtained (1.29 ± 0.04 and 1.14 ± 0.01 , respectively).

4. Discussion

The samples of pomegranate juice, characterized by an initial microbial population of approximately 5.2–5.6 CFU/mL, were conventionally heat treated. Microbial counts after treatment were always ≤ 1 CFU, with a reduction similar to that reported by Mena, Martí, Saura, Valero, and García-Viguera (2011). This result

Table 2
Increase in microbial population (log CFU/mL \pm SD) with storage time under refrigeration conditions (5 °C) in thermally processed and untreated pomegranate juices.

Treatment/Juice type	Storage days										
	0	7	14	21	28	45	60	75	90	120	
Untreated											
Cloudy	5.59 \pm 0.13 ^c	6.19 \pm 0.01 ^b	6.56 \pm 0.04 ^a	6.60 \pm 0.08 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clarified	5.23 \pm 0.04 ^c	6.12 \pm 0.03 ^b	6.34 \pm 0.11 ^a	6.42 \pm 0.06 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LTP 65 °C, 30 s											
Cloudy	1.00 \pm 0.00	1.24 \pm 0.34	1.26 \pm 0.24	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.24 \pm 0.34	1.26 \pm 0.24	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	
Clarified	0.00 \pm 0.00 [#]	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	
HTP 90 °C, 5 s											
Cloudy	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.20 \pm 0.17	1.00 \pm 0.00	1.15 \pm 0.21	
Clarified	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	

^{a,b,c}Means in the same row followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

[#]No CFU was observed. ND, not determined.

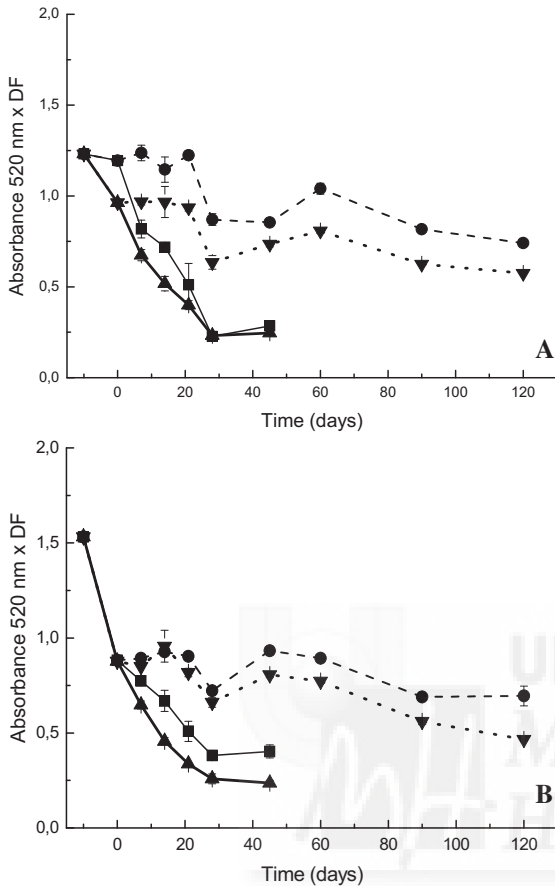


Fig. 1. Changes in the absorbance at 520 nm of clarified (A) and cloudy (B) pomegranate juices after pasteurization treatment (0 days) and its evolution throughout storage. Symbols include pasteurization at 65 °C for 30 s followed by storage at 25 °C (■) and 5 °C (●), and pasteurization at 90 °C for 5 s followed by storage at 25 °C (▲) and 5 °C (▼).

highlights the efficacy of the heat process, whatever temperature and holding time are set for the pasteurization process. APCs determined in this study for fresh pomegranate juices were superior to the range (3.0–4.0 log CFU/mL) reported by Alighourchi, Barzegar, and Abbasi (2008a).

Naturally occurring microorganisms in untreated pomegranate juice are mostly yeasts and molds due to their survival and growth capacity in low-pH environments (Tournas, Heeres, & Burgess, 2006). In addition, these microorganisms could grow under refrigeration (5 °C), causing the spoilage of juice samples during storage. Significant inactivation was found just after LTP and HTP processing, but only the HTP-treatment resulted in a nil microbial count for the two types of juices used. Both thermal treatments prevented microbial growth in pasteurized pomegranate juices stored at 5 °C for 120 days (counts $<10^3$ CFU/mL) (Table 2). However, the shelf-life regarding acceptable microbial load of the LTP-treated juices and stored at 25 °C was at least of 21 and 45 days for the cloudy and clarified samples of pomegranate juice (Table 1). The storage temperature had, hence, a significant effect in controlling the growth of survivors (uninjured and sublethally injured cells) and extending the shelf-life of LTP-treated pomegranate juice.

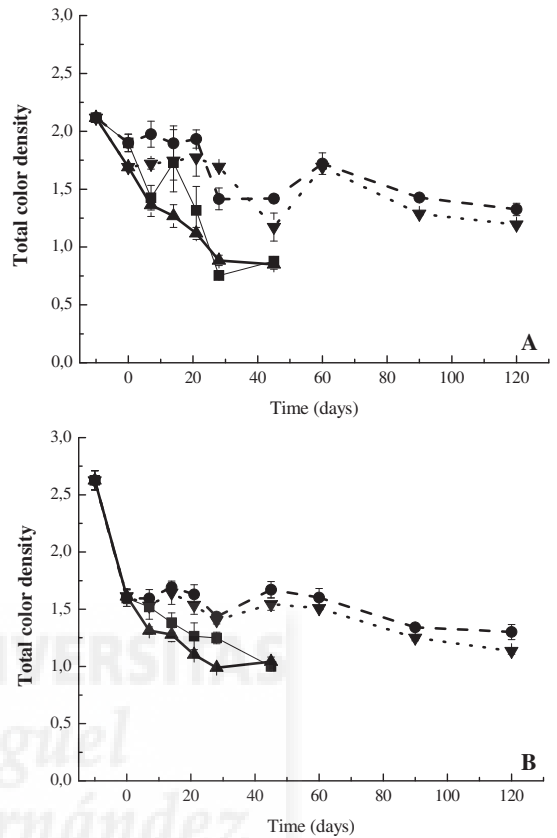


Fig. 2. Total color density (TCD) values of heat-treated samples of clarified (A) and cloudy (B) pomegranate juices as a function of the storage time. Symbols include pasteurization at 65 °C for 30 s followed by storage at 25 °C (■) and 5 °C (●), and pasteurization at 90 °C for 5 s followed by storage at 25 °C (▲) and 5 °C (▼).

For conventional food preservation systems, optimal microbial control is achieved through the hurdle concept (Leistner, 1999). This paper provides an overall preservation strategy for pomegranate juice, where a thermal technology has been combined with low-temperature storage. Cool storage (4 °C for 10 weeks) and conventional heat pasteurization (85 °C for 5 min) were also used as preservation strategy of pomegranate juices by Alighourchi, Barzegar, and Abbasi (2008b).

Results obtained in this study indicate that the loss of red color on pomegranate juices depends on the type of juice ($P = 0.0002$), pasteurization treatment applied ($P = 0.0000$), and temperature and time of storage (P values = 0.0000). Despite everything else, the storage temperature was the main factor affecting red color loss in pasteurized pomegranate juices. Samples stored at 5 °C had a lower ($54.35 \pm 12.15\%$) and slower (75 days more) loss of red color than those stored at 25 °C ($78.79 \pm 4.65\%$), with a difference of about 24%. Our results are consistent with those published by Alighourchi et al. (2008b) and Pérez-Vicente, Serrano, Abellán, and García-Viguera (2004), and highlight the importance of storage temperature on the degradative process of anthocyanins, the main source of pigmentation of pomegranate juice.

TCD takes into account the contribution of the compounds capable of determining the color of pomegranate juice, such as tannins (brown) and anthocyanins (red). Hence the color density

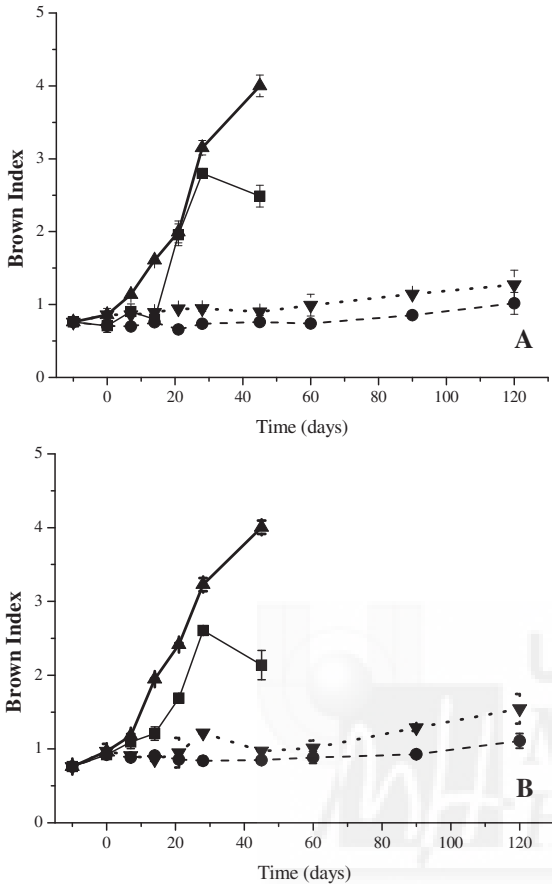


Fig. 3. Influence of heat treatment and storage on the browning index (BI) of clarified (A) and cloudy (B) pomegranate juices. Symbols include pasteurization at 65 °C for 30 s followed by storage at 25 °C (■) and 5 °C (●), and pasteurization at 90 °C for 5 s followed by storage at 25 °C (▲) and 5 °C (▼).

due to anthocyanins for the raw and heat-treated samples of pomegranate juice should be related with the intensity of red color determined by measuring the A_{520} parameter. As expected, a significant positive correlation was found in all cases between TCD and A_{520} parameters at the 99% confidence level (correlation coefficients $0.8342 \leq r \leq 0.9963$; $P < 0.01$).

ANOVA for BIs showed that the effects of pasteurization treatment, storage temperature and time were significant (P values = 0.0000). Juice type had not a vital role in the anthocyanin degradation ($P = 0.8321$). The BIs progressively increased with storage time and almost doubled (1.75 vs 0.86) when the pomegranate juices were stored during 45 days at 25 °C instead of 5 °C. Thus, storage temperature was the main factor affecting both browning index and loss of red color in pasteurized pomegranate juices.

5. Conclusions

Magnitude and duration of heat treatment had a strong influence on anthocyanin stability in pomegranate juices. However, storage temperature was the main factor affecting both BI and red color loss in pasteurized pomegranate juices. Results presented in

this study show that the combination of a LTP treatment (65 °C, 30 s) plus refrigeration (5 °C) may help to ensure the microbiological safety of pasteurized pomegranate juices, avoiding a dramatic impact on its color quality and negative effects on its nutritional properties. This hurdle technology may also preserve the health benefits of anthocyanin consumption and stimulate their use as alternative to artificial colorants in foods.

Acknowledgments

The authors wish to thank AGROALIMED Foundation from Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació, Generalitat Valenciana (Spain), for the financial support of this work.

References

- Alighourchi, H., Barzegar, M., & Abbasi, S. (2008a). Effect of gamma irradiation on the stability of anthocyanins and shelf-life of various pomegranate juices. *Food Chemistry*, *110*, 1036–1040.
- Alighourchi, H., Barzegar, M., & Abbasi, S. (2008b). Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *European Food Research and Technology*, *227*, 881–887.
- Alper, N., Bahçeci, K. S., & Acar, J. (2005). Influence of processing and pasteurization on color values and total phenolic compounds of pomegranate juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, *29*, 357–368.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., et al. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*, *23*, 423–433.
- Hernández, F., Melgarejo, P., Tomás-Barberán, F. A., & Artés, F. (1999). Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *European Food Research and Technology*, *210*, 39–42.
- Kasimsetty, S. G., Bialonska, D., Reddy, M. K., Ma, G., Khan, S. I., & Ferreira, D. (2010). Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and urolithins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 2180–2187.
- Konczak, I., & Zhang, W. (2004). Anthocyanins – more than nature's colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *5*, 239–240.
- Leistner, L. (1999). Combined methods for food preservation. In M. Shafiqi Rahman (Ed.), *Handbook of food preservation* (pp. 457–485). New York: Marcel Dekker.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O., & Amiot, M. J. (2001). Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 170–176.
- Mena, P., Gironés-Vilaplana, A., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2011). Pomegranate fruit for health promotion: myths and realities. In A. Jiménez, & C. García-Viguera (Eds.), *Functional Plant Science and Biotechnology: 5. Antioxidant properties of Crops III* (pp. 33–42). Special Issue 2.
- Mena, P., Martí, N., Saura, D., Valero, M., & García-Viguera, C. (2011). Combinatory effect of thermal treatment and blending on the quality of pomegranate juices. *Food and Bioprocess Technology*, <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-012-0961-z>.
- Nachay, K. (2009). A new color palette emerges. *Food Technology* 50–62, 04.09 www.ift.org.
- Neurath, A. R., Strick, N., Li, Y.-Y., & Debnath, A. K. (2005). *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1056*, 311–327.
- Pantuck, A. J., Leppert, J. T., Zomorodian, N., Aronson, W., Hong, J., Barnard, R. J., et al. (2006). Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, *12*, 4018–4026.
- Pérez-Vicente, A., Serrano, P., Abellán, P., & García-Viguera, C. (2004). Influence of packaging material on pomegranate juice colour and bioactive compounds, during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*, 639–644.
- Rock, W., Rosenblat, M., Miller-Lotan, R., Levy, A. P., Elias, M., & Aviram, M. (2008). Consumption of Wonderful variety pomegranate juice and extract by diabetic patients increases Paraoxonase 1 association with high-density lipoprotein and stimulates its catalytic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 8704–8713.
- Rosenblat, M., Hayek, T., & Aviram, M. (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*, *187*, 363–371.
- Skrede, G., Wrolstad, R. E., & Durst, R. W. (2000). Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, *65*, 357–364.
- Somers, T. C., & Evans, M. E. (1986). Evolution of red wines I. Ambient influences on colour composition during early maturation. *Vitis*, *25*, 31–39.
- Tournas, V. H., Heeres, J., & Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, *23*, 684–688.



Chemical guide parameters for *Punica granatum* cv. 'Mollar' fruit juices processed at industrial scale



Salud Vegara^a, Nuria Martí^a, José Lorente^a, Luís Coll^b, Sergio Streitenberger^c, Manuel Valero^{a,*}, Domingo Saura^a

^a IBMC-JBT Corp., FoodTech R&D Alliance, Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández (UMH) Campus de Orihuela, Carretera de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

^b Laboratorios ECOSUR S.A. Calle Castillo de Aledo s/n, Polígono Industrial Base 2000 San Martín, 30564 Lorquí, Murcia, Spain

^c Probeltebio, Probelte S.A. Calle Antonio Belmonte Abellán 3-7, 30100 Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 May 2013

Received in revised form 18 September 2013

Accepted 23 September 2013

Available online 1 October 2013

Keywords:

Pomegranate juice

Reference guideline

Chemical composition

Sugar profile

Pomegranate polyphenols

Amino acids

ABSTRACT

To contribute for setting reference guideline for commercial juice from the pomegranate variety 'Mollar', chemical composition of eighteen samples directly obtained and commercialised in 2012 from three different fruit juice factories was investigated. According to the findings, the relative density of direct pomegranate juices varied between 1.061 and 1.064, which correspond to 15.15 and 15.71 °Brix; titratable acidity changed between 2.6 and 2.8 g/L, citric acid between 2.3 and 2.8 g/L, L-malic acid in a range of 1.3–1.4 g/L, and D-isocitric acid at levels less than 20 mg/L. Glucose values ranged from 61.4 to 65.0 g/L, whereas fructose displayed values between 65.3 and 68.0 g/L. The predominant mineral was potassium (2400–2900 mg/L), followed by phosphorous, magnesium, calcium and sodium at levels of 81–89 mg/L, 17.6–28.5 mg/L, 5.8–7.5 mg/L and 4.3–5.3 mg/L, respectively. Chemical determinations of anthocyanin and ellagitannin profiles and amino acids contents were also carry out. Concentrations of anthocyanins in commercialised samples were Cy3,5dG (19.30 ± 3.47 mg/L), followed by Dp3,5dG (17.87 ± 6.74 mg/L) and Cy3G (12.91 ± 6.32 mg/L). Punicalagin levels ranged between 503.70 and 762.85 mg/L, punicalins between 239.9 and 364.5 mg/L, and free ellagic acid level was typically between 268.67 and 389.64 mg/L. The juice samples exhibited high amount of total phenolics (1136–3581 mg/L) as well as high ABTS radical scavenging activity (18–31 mmol Trolox/L).

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Interest in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice has increased markedly in recent years as result of a growing number of reports on its potential health benefits, placing it in the first line of functional juice market. Pomegranate juice consumption has been associated with inhibition of prostrate cancer in men (Pantuck et al., 2006), reduction in serum oxidative stress in plasma of type-2 diabetes mellitus patients (Rosenblat, Hayek, & Aviram, 2006), a reduced atherosclerosis in diabetic patients (Rock et al., 2008), antimicrobial (Braga et al., 2005; Vasconcelos et al., 2006) and antiviral (Neurath, Strick, Li, & Debnath, 2005; Vidal et al., 2003) activities, reduction in blood pressure and low density lipoprotein (LDL) oxidation (Aviram et al., 2004; Kaplan et al., 2001), and potential protection against colon cancer (Kasimsetty et al., 2010). These beneficial effects of the pomegranate juices were attributed to the antioxidative properties of pomegranate polyphenols

anthocyanins [delphinidin 3,5-di (Dp3,5dG) and 3-O-glucoside (Dp3G), cyanidin 3,5-di (Cy3,5dG) and 3-O-glucoside (Cy3G), and pelargonidin 3,5-di (Pg3,5dG) and 3-O-glucoside (Pg3G)] and hydrolysable tannins (punicalagins, punicalin, pedunculagin, gallagic and ellagic acid esters of glucose) (Gil, Tomás-Barberán, Hess-Pierce, Holcroft, & Kader, 2000; Lansky & Newman, 2007).

Other studies have established that pomegranate juice has superior antioxidant activity compared to some popular juices (Guo et al., 2008; Seeram et al., 2008). Overall medical and nutritional research has catapulted pomegranate juice to a prominent position in commerce with an increased value compared to other cheaper juices. This provides, however, an economical incentive for the adulteration of pomegranate juice. For this reason, it was necessary to establish the criteria for authenticity and identity control of pomegranate juice (Eksi & Özhamamci, 2009). After a prolonged preparation stage, in 2008, the Association of the Industry of Juices and Nectars (AIJN) of the European Union (EU) established the reference guideline for pomegranate juice. The values in this guideline are based on pure, authentic pomegranate juices obtained from mature and sound fruits of different varieties and geographical origins by mechanical processes.

* Corresponding author. Tel.: +34 96 674 96 83; fax: +34 96 674 96 19.
E-mail address: m.valero@umh.es (M. Valero).

The aim of this study was to contribute to the knowledge on chemical characteristics of commercial pomegranate juice obtained from whole fruits of the Spanish variety 'Mollar'. According to the IFU (International Federation of Fruit Juice Producers, Paris, France) Methods, a panel of different analytical techniques was employed to study antioxidant activities, total phenolics (TPC), along with complete chemical profiles including anthocyanins, ellagitannins, sugars, organic acids, amino acids, and minerals in samples either taken from several fruit juice factories or purchased in local markets. Organic acid and sugar profiles give important information on the purity and adulteration of juices (AIJN, 2012; Tezcan, Gültekin-Özgüven, Diken, Özçelik, & Erim, 2009). Potassium is the main mineral in pomegranate juice and its adulteration with other juices can result in dilution of this component (Zhang et al., 2009). The characteristic anthocyanin profile determined by six anthocyanin pigments should be present and a typical anthocyanins cannot be found. Influence of storage on antioxidant activity, TPC, individual anthocyanins and ellagitannins was also analysed.

2. Material and methods

2.1. Materials

Nine samples of pomegranate juice were obtained from three different fruit juice factories in 2012. Other nine commercialised samples from the same factories were purchased in local markets. All samples were analysed in duplicate following the methods described below.

2.2. Analytical reference methods

A panel of different analytical techniques established by IFU was used for determination of physicochemical parameters, organic and mineral contents in pomegranate juices. It is shown in Table 1.

2.3. Identification and quantification of phenolic compounds

Qualitative analysis of anthocyanins was performed by High-performance Liquid Chromatography (HPLC) on a Model L6200 liquid chromatograph (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) equipped with a SPD-M6A UV-VIS photodiode array detector (Shimadzu, Kyoto, Japan) and a Model 234 automatic sample injector (Gilson International Bv, Barcelona, Spain). Chromatograms were recorded and processed on a LC Workstation Class M10A Shimadzu PC-based chromatography data system. All samples were centrifuged at 10,480g for 10 min at room temperature. The supernatant was filtered through a 0.45 µm nylon membrane (Waters Corporation, Milford, Massachusetts MA, USA).

A 20 µL sample was analysed on a Luna[®] 5 µm C₁₈ column (25 × 0.46 cm) (Phenomenex Ltd., Macclesfield, UK) with a security guard cartridge system C₁₈ ODS (4 × 3 mm), using a mobile phase of water/formic acid (95:5 v/v) (solvent A) and HPLC grade methanol (solvent B). Elution was performed at a flow rate of 1 mL/min. The linear gradient started with 1% B, keeping isocratic conditions during 5 min, reaching 20% B at 20 min, 40% B at 30 min, 95% B at 35 min and 1% B after 41 min. UV chromatograms were recorded at 520, 360 and 280 nm. The different phenols were characterised by chromatographic comparison with analytical standards (Polyphenols Laboratories AS, Sandnes, Norway) and quantified by the absorbance of their corresponding peaks according to previous reports (Pérez-Vicente, Serrano, Abellán, & García-Viguera, 2004). Anthocyanins were quantified as Cy3G at 520 nm, while the galla-gin-derived tannins were did as punicalagin isomers at 360 nm and

the ellagic acid as free ellagic acid at 280 nm (González-Molina, Moreno, & García-Viguera, 2009).

2.4. Determination of TPC

For TPC determination, 1:10 dilutions of the juices were used. TPC were determined with Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich Corp., Saint Louis, Missouri MO, USA) in a SPECTROstar Omega UV/VIS absorbance microplate reader (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Germany) (Pérez-Vicente et al., 2004). 10 µL of sample dilution, 50 µL Folin-Ciocalteu reagent, 100 µL of aqueous 20% Na₂CO₃ (Panreac Química S.A., Barcelona, Spain) and 100 µL of distilled water were mixed. The mixture was allowed to stand for 30 min at room temperature before measuring absorbance at 750 nm. Gallic acid (Sigma-Aldrich Corp.) was used as standard. Results were expressed as gallic acid equivalents (mg GAE/L).

2.5. Determination of antioxidant activities

The antioxidant activities of pomegranate juices were evaluated by three different methods. The first method is based on the evaluation of the free-radical scavenging capacity according to the method of Re et al. (1999). The radical cation was prepared by the reaction between a 7 mM solution of ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate; Sigma-Aldrich Corp.)] in water and a 2.45 mM solution of potassium persulfate. The mixture was incubated 24 h in the dark at room temperature. Then this solution was diluted with water to reach an absorbance of

Table 1
Analytical reference methods for pomegranate juices.

Parameter	Method
Relative density 20/20	IFU 1
Corresponding °Brix	IFU 8
Volatile acids as acetic acid	IFU 5
Ethanol	IFU 52
Lactic acid, enzymatic	IFU 53
Patulin, HPLC	IFU Recommendation n° 2
L-Ascorbic acid	IFU 17a
Arsenic and heavy metals	AAS
5-Hydroxymethylfurfural	IFU 69
D-Malic, enzymatic	IFU 64
Titrateable acid at pH 8.1	IFU 3
Citric acid, enzymatic	IFU 22
L-Malic acid, enzymatic	IFU 21
D-Malic acid, enzymatic	IFU 64
D-Isocitric acid, enzymatic	IFU 54
Ash	IFU 9
Sodium	IFU 33
Potassium	IFU 33
Magnesium	IFU 33
Calcium	IFU 33
Total phosphorus	IFU 50
Nitrate	IFU 74
Sulphate	IFU 36
Formol index	IFU 30
Glucose, enzymatic	IFU 55
Fructose, enzymatic	IFU 55
Sucrose, enzymatic	IFU 56
D-Sorbitol, enzymatic	IFU 62
Amino acids	IFU 57
Sugar-free extract	Sugar free extracts (g/L) = total soluble solids (IFU 1) – sugars (glucose + fructose + sucrose, enzymatic)
Copper	IFU 13 Recommendation n° 7
Zinc	IFU 16 Recommendation n° 7
Iron	IFU 15 Recommendation n° 7
Tin	IFU 39 Recommendation n° 7

IFU, International Federation of Fruit Juice Producers; AAS, Atomic Absorption Spectrometry.

0.7 ± 0.02 at 734 nm, measured in a SPECTROstar Omega microplate reader (BMG LabTech GmbH). To determine the antioxidant capacity of pomegranate juice, 200 µL of the ABTS⁺ solution were mixed with 20 µL of juice and after 3 min, the absorbance was measured at 734 nm obtaining the value of the decrease in absorbance. This determination was carried out with a 1:50 dilution of juice. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; Fluka Chemika, Neu-Ulm, Germany) was used as standard and results were expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) (mmol Trolox/L).

The second method applied here is based on the measurement of the ferric reducing antioxidative power (FRAP) of juices according to the method of [Benzie and Strain \(1996\)](#), with some modifications. The FRAP reagent containing 25 mL 300 mM acetate buffer at pH 3.6, 2.5 mL 10 mM 2,4,6-tripyridyl-S-triacine (TPTZ; Merck, Darmstadt, Germany) solution in 40 mM HCl plus 2.5 mL 20 mM ferric hexahydrate (FeCl₃·6H₂O) was freshly prepared. Then using 96-well microplates, 250 µL of this solution were deposited in each well heated to 37 °C for 10 min and determined its absorbance at 593 nm. After that, 40 µL water diluted juice (1:80) was added and evaluated the increase of absorbance at 593 nm for 7 min at 37 °C using a SPECTROstar Omega microplate reader. The results were calculated from the standard curves prepared using different concentrations of FeSO₄·7H₂O or Trolox and expressed as mmol Fe²⁺/L and mmol Trolox/L, respectively.

To assay the capacity of the juices to scavenge peroxy radicals a validated ORAC method which uses fluorescein (FL; Fluka Chemika) as the fluorescent probe (ORAC_{FL}) was utilised with minor modifications ([Laporta, Pérez-Fons, Mallavia, Caturla, & Micol, 2007](#)). The automated ORAC assay was carried out on a FLUOstar Galaxy fluorescence microplate reader (BMG LABTECH GmbH). Several dilutions of Trolox were used to construct the calibration curve. A freshly prepared 2,2'-Azobis(2-Amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (Sigma–Aldrich Corp.) water solution was used for each experiment. The temperature of the incubator was set at 37 °C and the FL fluorescence was recorded every minute after the addition of AAPH.

The ORAC values were calculated by using a regression equation between the Trolox concentration and the net area of the FL decay curve (area under curve, AUC) as previously described ([Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001](#)). ORAC values were expressed as mmol Trolox/L.

3. Results and discussion

3.1. Section A: Parameters that characterise the absolute quality requirements

Results related to compositional, environmental, hygienic, and industrial requirements of eighteen juice samples obtained from Spanish 'Mollar' pomegranates are summarised in [Table 2](#). According to these results, relative density of the direct pomegranate juices varied between 1.061 and 1.064, which correspond to 15.15 and 15.71 °Brix. The lowest acceptable value by the reference guideline for pomegranate juice ([AIJN, 2012](#)) is 1.057 (14 °Brix).

Acetic acid, ethanol and lactic acid are not present in sound fruits; they are indicators of spoilage by epiphytic microorganisms such as yeasts, acetic acid bacteria (AAB) and lactic acid bacteria (LAB). The small amounts detected can be taken as an indication of the processing of good quality pomegranates and absence of fermentation processes in juice.

Several species of *Penicillium* including *Penicillium expansum*, *Penicillium sclerotiorum* and *Penicillium glabrum* can cause blue mold on pomegranate fruits during storage ([Palou, Guardo, & Montesinos-Herero, 2010](#)). The fungal toxin (mycotoxin) patulin is produced by toxigenic strains of *Penicillium griseofulvum* (synonym: *Penicillium patulum*) and *P. expansum*. It causes gastritis and enteritis as biological action. Since patulin has been detected with varying frequencies and levels in pomegranate juices its determination should be mandatory for food safety reasons. The amount detected in juices from Spanish pomegranates cv. 'Mollar' was at least 10-fold lower than the maximum (universal) limit of 50 µg/L ([EMAN, 2012](#)).

Heavy metal elements contained in fertilizer and contaminated soils are transmitted into fruits and other farm produces. Examples of heavy metals that are harmful (causing serious health effects) to humans include arsenic (As), lead (Pb), mercury (Hg), cadmium (Cd) and chromium (Cr). Heavy metal contents detected in all pomegranate juice samples by atomic absorption spectrometry (AAS) were acceptable ([AIJN, 2012](#)).

5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) is practically not present in fresh fruit juice, but it is naturally generated during heating or storage processes in the Maillard reaction as well as sugar caramelization and degradation. Therefore, 5-HMF can be used as an indicator for excess heat treatment and deterioration. In all

Table 2
Absolute quality requirements that are considered as being mandatory for pomegranate juices.

	Unit	QL	Mean ± SD	Range of variation	AIJN proposal
1. Industrially agree upon requirements					
Rel. density 20/20 for juice	–		1.063 ± 0.0009	1.061–1.064	1.0568
Corresponding Brix	°Brix	0.1	15.47 ± 0.23	15.15–15.71	Min. 14
2. Hygiene requirements					
Volatile acids as acetic acid	g/L	0.01	0.358 ± 0.09	0.2–0.4	Max. 0.4
Ethanol	g/L	0.02	0.05 ± 0.01	0.02–0.1	Max. 3.0
d/l. Lactic acid	g/L	0.02	0.11 ± 0.02	0.1–0.14	Max. 0.5
Patulin	µg/L	5	5.00 ± 0.01	<5	NA
3. Environmental requirements					
<i>Arsenic and heavy metals</i>					
Arsenic (As)	mg/L	0.01	<0.005		Max. 0.1
Lead (Pb)	mg/L	0.01	<0.01		Max. 0.05
Mercury (Hg)	mg/L	0.01	<0.01		Max. 0.01
Cadmium (Cd)	mg/L	0.01	<0.01		Max. 0.05
4. Compositional requirements					
5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF)	mg/L	1	1.00 ± 0.01	<1	Max. 20

QL, quantification limit; SD, standard deviation; AIJN, Association of the Industry of Juices and Nectars of the European Union; NA, analysis not performed.

pomegranate juices samples tested herein, concentration of 5-HMF was less than 20 mg/L, the maximum prescribed value by AIJN (2012).

3.2. Section B: Criteria relevant to the evaluation of identity and authenticity

Chemical composition of juice samples from Spanish 'Mollar' pomegranates are given in Table 3. Titratable acidity of pomegranate juices typically varied between 2.6 and 2.8 g/L calculated as anhydrous citric acid (ACA) pH 8.1. Citric acid was the predominant organic acid ranging between 2.3 and 2.8 g/L. It is followed by *l*-malic acid in a range of 1.3–1.4 g/L. The isocitrate level was less than 20 mg/L as could be expected for a pomegranate sweet variety. The citric/isocitric acid ratio is in characteristic low values as reported by Zhang et al. (2009) for pomegranate juices. These findings are consistent with those proposed by AIJN (2012) taking account that 'Mollar' is a low acid variety.

The ash that represents the total mineral content of pomegranate juice was between 2.84 and 3.85 g/L. The concentration of various elements in the tested samples were, in decreasing order, potassium (2400–2900 mg/L) > phosphorus (81–89 mg/L) > magnesium (17.6–28.5 mg/L) > calcium (5.8–7.5 mg/L) > sodium (4.3–5.3 mg/L). Potassium typically is the main mineral in pomegranate. The finding of >2400 mg/L is consistent with this knowledge. There were low levels of zinc (Zn), copper (Cu) and iron (Fe); tin (Sn) was found at trace levels. The mineral components of the pomegranate juices were in compliance with the values listed in the AIJN (2012) proposal.

Amounts of glucose (61.4–65.0 g/L) and fructose (65.3–68.0 g/L) in pomegranate juices were approximately equal. In all juices fructose levels were higher than glucose ones with a ratio glucose/fructose covering a narrow range from 0.8 to 0.95. Sucrose was found in small amounts; its presence should be considered a quality parameter in freshly squeezed juices (Melgarejo, Salazar, & Artés, 2000; Mena et al., 2011) or could be due to analytical methodology.

As pomegranate juices derived from a sweet variety, their sugar-free extracts were slightly higher than the lower limit established in the reference guideline (AIJN, 2012).

The formol number, or formol titration, is merely an index which reflects the amount of free amino acid. It varied between 8.1 and 8.7 mL NaOH 0.1 N/100 mL (Table 4). Generally, the levels of the free amino acids in pomegranate juices are low but they vary widely (AIJN, 2012). The asparagine content was low while a relatively high concentration of glutamine was found. There were high levels of glutamine, glutamic acid, serine, and aspartic acid and there were minor levels of arginine, valine and alanine; cysteine, iso-leucine and phenylalanine were found at minimal levels. The proline concentration was lower than 25 mg/L (Zhang et al., 2009).

3.3. Anthocyanin profile

The anthocyanin profile is a critical parameter for the characterisation of pomegranate juices. The typical anthocyanin profile of juices from different pomegranate varieties and geographical origins is characterised by delphinidin, cyanidin and pelargonidin 3-glucosides and 3,5-diglucosides (Alighourchi, Barzegar, & Abbasi, 2008; Martí, Pérez-Vicente, & García-Viguera, 2002; Pérez-Vicente et al., 2004). These six anthocyanin pigments are responsible for the red–purple colour of pomegranate juice. Concentrations of anthocyanins in raw juices from the 'Mollar' variety were, in decreasing order, Cy3G (60.43 ± 23.64 mg/L), followed by Cy3,5dG (39.13 ± 16.08 mg/L), Dp3,5dG (26.65 ± 20.72 mg/L), Dp3G (21.59 ± 13.72 mg/L), Pg3G (9.06 ± 6.20 mg/L), and Pg3,5dG (2.19 ± 1.33 mg/L). Processing and storage had notable influence on the degradation of individual anthocyanins as indicated by changes in their contents (Table 5). In commercialised samples purchased in local markets Cy3,5dG (19.30 ± 3.47 mg/L) was the most abundant, followed by Dp3,5dG (17.87 ± 6.74 mg/L) and Cy3G (12.91 ± 6.32 mg/L). In general, higher stability of diglucoside anthocyanins than monoglucoside ones was observed as reported by Alighourchi and Barzegar (2009).

Table 3
Other quality parameters and further criteria for evaluation of identity and authenticity of pomegranate juices.

	Unit	QL	Mean ± SD	Range of variation	AIJN proposal
Titrate acidity at pH 8.1	g/L	0.2	2.72 ± 0.08	2.6–2.8	2.0–45.0
Citric acid	g/L	0.2	2.52 ± 0.22	2.3–2.8	1.0–48.0
<i>D</i> -Isocitric acid	mg/L	20	20 ± 0.40	<20	10–140
Citric/Isocitric acid ratio	–			111–145	NA
<i>l</i> -Malic acid	g/L	0.2	1.32 ± 0.05	1.3–1.4	Max. 1.5
<i>D</i> -Malic acid	mg/L	10	10 ± 0.10	<10	NP
Ash	g/L	0.2	3.18 ± 0.43	2.84–3.85	2.5–6.0
Sodium (Na)	mg/L	1	4.88 ± 0.38	4.3–5.3	Max. 30
Potassium (K)	mg/L	1	2597.5 ± 216.08	2400–2900	1300–3000
Magnesium (Mg)	mg/L	1	22.56 ± 4.00	17.6–28.5	20–110
Calcium (Ca)	mg/L	1	6.70 ± 0.71	5.8–7.5	5–120
Total phosphorus (P)	mg/L	10	84.00 ± 4.36	81–89	50–170
Copper (Cu)	mg/L	0.05	0.23 ± 0.02	0.21–0.27	Max. 5.0
Zinc (Zn)	mg/L	0.01	0.52 ± 0.07	0.44–0.58	Max. 5.0
Iron (Fe)	mg/L	0.01	0.20 ± 0.17	0.09–0.5	Max. 5.0
Tin (Sn)	mg/L	0.05	<0.05		Max. 100
Nitrate (NO ₃)	mg/L	1	3.00 ± 1.63	1.4–4.6	Max. 15
Sulphate (SO ₄)	mg/L	10	92.37 ± 15.27	76.3–106.7	Max. 200
Glucose	g/L	2	63.20 ± 1.48	61.4–65	40–80
Fructose	g/L	2	66.65 ± 1.11	65.3–68	45–100
Glucose/fructose	–		0.95 ± 0.02	0.8–0.95	0.8–1
Sucrose	g/L	2	2.0 ± 0.10	<2	ND
Sugar-free extract	g/L	1	35.52 ± 1.06	34.2–36.6	20–60
Manitol	g/L		NA		2–7
Sorbitol	mg/L	20	46.16 ± 1.27	44.7–46.9	Max. 250

QL, quantification limit; SD, standard deviation; AIJN, Association of the Industry of Juices and Nectars of the European Union; NA, analysis not performed; NP, not present; ND, not detectable.

Table 4
Formol number and levels of free amino acids in pomegranate juices from Spanish 'Mollar' pomegranates.

Formol number	Unit	QL	Mean \pm SD	Range of variation	AIJN proposal
Formol number	mL NaOH 0.1 N/100 mL	0.1	8.85 \pm 0.81	8.1–8.7	5–20
<i>Amino acids</i>					
Aspartic acid	mg/L	5	119.00 \pm 13.11	106–136	53–40
Serine	mg/L	5	123.25 \pm 11.18	108–133	63–158
Glutamic acid	mg/L	5	137.80 \pm 4.87	133–145	76–147
Glycine	mg/L	2	14.00 \pm 1.22	12–15	3.5–14
Histidine	mg/L	2	6.80 \pm 1.30	5–8	6–30
Asparagine	mg/L	5	17.00 \pm 1.00	16–18	16–92
Glutamine	mg/L	5	158.75 \pm 15.22	136–168	160–760
Arginine	mg/L	5	69.50 \pm 6.61	62–78	<15–120
Threonine	mg/L	5	13.00 \pm 1.00	12–14	10–33
Alanine	mg/L	5	35.20 \pm 2.28	33–38	32–116
Proline	mg/L	5	22.00 \pm 1.41	20–23	<10–23
Cysteine	mg/L	5	5 \pm 0.01	<5	NA
Tyrosine	mg/L	5	16.25 \pm 0.96	15–17	3–18
Valine	mg/L	5	40.33 \pm 5.03	35–45	15–45
Methionine	mg/L	5	20.00 \pm 2.16	17–22	6–30
Lysine	mg/L	5	7.20 \pm 0.45	7–8	7–66
Iso-leucine	mg/L	5	5 \pm 0.01	<5	1–4
Leucine	mg/L	5	5.33 \pm 0.58	<6	2–8
Phenylalanine	mg/L	5	5.00 \pm 0.01	<5	Traces

QL, quantification limit; SD, standard deviation; AIJN, Association of the Industry of Juices and Nectars of the European Union; NA, analysis not performed.

Table 5
Changes in individual anthocyanin contents in fresh and commercialised juices from the pomegranate variety 'Mollar'.

	Unit	QL	Mean \pm SD	Range of variation
<i>Delphinidin 3,5-diglucoside</i>				
Raw juice	mg/L	3	26.65 \pm 20.72	12.22–71.00
Processed and stored	mg/L	3	17.87 \pm 6.74	13.98–33.00
<i>Cyanidin 3,5-diglucoside</i>				
Raw juice	mg/L	3	39.13 \pm 16.08	15.98–67.00
Processed and stored	mg/L	3	19.30 \pm 3.47	15.54–25.00
<i>Pelargonidin 3,5-diglucoside</i>				
Raw juice	mg/L	3	2.19 \pm 1.33	1.00–5.00
Processed and stored	mg/L	3	1.62 \pm 0.58	1.00–2.39
<i>Delphinidin 3-glucoside</i>				
Raw juice	mg/L	3	21.59 \pm 13.72	8.55–46.00
Processed and stored	mg/L	3	5.25 \pm 2.19	2.89–9.00
<i>Cyanidin 3-glucoside</i>				
Raw juice	mg/L	3	60.43 \pm 23.64	21.69–81.00
Processed and stored	mg/L	3	12.91 \pm 6.32	5.00–21.00
<i>Pelargonidin 3-glucoside</i>				
Raw juice	mg/L	3	9.06 \pm 6.20	2.00–20.00
Processed and stored	mg/L	3	1.55 \pm 0.80	0.79–2.91
<i>Total anthocyanin</i>				
Raw juice	mg/L	3	159.05 \pm 71.07	62.43–276.00
Processed and stored	mg/L	3	58.50 \pm 17.13	41.33–90.00

QL, quantification limit; SD, standard deviation.

Table 6
Ellagitannins, free ellagic acid, total phenolics and antioxidant activities of juices from whole pomegranates 'Mollar'.

	Unit	QL	Mean \pm SD	Range of variation
Punicalagin α	mg/L	10	292.13 \pm 56.81	230.90–359.40
Punicalagin β	mg/L	10	265.20 \pm 73.29	190.40–413.45
Total punicalagins	mg/L	10	623.71 \pm 185.93	503.70–762.85
Punicalin α	mg/L	10	153.07 \pm 23.86	125.85–211.60
Punicalin β	mg/L	10	143.91 \pm 29.21	98.90–187.34
Total punicalins	mg/L	10	296.98 \pm 42.86	239.90–364.50
Ellagic acid	mg/L	5	322.26 \pm 61.65	268.67–389.64
Total phenolic compounds	mg/L	20	2402.16 \pm 695.06	1136.20–3581.10
ABTS radical scavenging assay	mmol Trolox/L	0.1	23.78 \pm 4.88	17.60–30.50
Ferric reducing antioxidative power (FRAP)	mmol Fe ²⁺ /L	0.1	43.96 \pm 9.25	32.10–56.70
Ferric reducing antioxidative power (FRAP)	mmol Trolox/L	0.1	13.04 \pm 2.03	10.40–15.80
Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	mmol Trolox/L	0.1	10.11 \pm 0.96	8.84–11.81

QL, quantification limit; SD, standard deviation.

3.4. Pomegranate ellagitannins

Among the ellagitannins, punicalagin is the most characteristic and found almost exclusively in pomegranate juices (Zhang et al., 2009). However, its presence is insufficient to establish the authenticity of pomegranate juice, because it can be obtained from peel extracts. In fact, pomegranate arils contain low or no punicalagins, but pomegranate husk is an abundant source (Talcott & Krenek, 2012). Since all commercialised pomegranate juices possessed moderate to high concentrations of ellagitannins, minor changes in their contents were resulted from the juice processing and storage conditions. Punicalagin and free ellagic acid levels of juices from the pomegranate variety 'Mollar' are shown in Table 6. Punicalagin concentrations ranged between 503.70 and 762.85 mg/L, while punicalins did in a lower range between 239.9 and 364.5 mg/L. The free ellagic acid level was typically between 268.67 and 389.64 mg/L.

3.5. Antioxidant activity

The beneficial health effects of the pomegranate juice consumption are related to its high levels of antioxidant polyphenols (See-ram et al., 2008). The high antioxidant activity found in commercial juices prepared from whole fruits is mainly attributed to hydrolysable tannins originating from the peel in which

punicalagins are predominant (Gil et al., 2000; Tzulker et al., 2007). Total phenolics and antioxidant activities of juices from Spanish 'Mollar' pomegranates are given in Table 6. The juice samples exhibited high amount of total phenolics ranging from 1136 to 3581 mg/L. Similarly, they showed a high ABTS radical scavenging activity (18–31 mmol Trolox/L) as well as a low ferric reducing ability (32–57 mmol Fe²⁺/L) compared with those reported by Gil et al. (2000) and Tezcan et al. (2009), respectively. The ORAC test generated TEAC values halved approximately (9–12 mmol Trolox/L). FRAP and ABTS assays are based on discrete underlying mechanisms that use different radicals or oxidant sources and therefore cannot be compared directly to the ORAC test.

4. Conclusions

Complete chemical profiles including pomegranate polyphenols anthocyanins and ellagitannins, sugars, organic acids, amino acids and mineral elements were determined in all samples to establish the ranges that were characteristic of authentic commercial pomegranate juices prepared from whole fruits of the 'Mollar' variety. Compared to the current reference guideline for pomegranate juice (AIJN, 2012), chemical determinations of punicalagins, punicalins and ellagic acid as well as different measurements of antioxidant activity were additionally carried out in order to generate new criteria for authenticity and identity control of pomegranate juice. The history of juice adulteration for profit is extensive and detection of the fraudulent methods is important not only to those who manufacture authentic pomegranate juice but also to the farmers who grow the pomegranates and to the consumers who purchase this product for its health value.

References

- AIJN (Association of the Industry of Juices and Nectars of the European Union). (2012). Code of practice for evaluation of fruit and vegetable juices 6.21. Reference guideline for pomegranate juice – Revision June 2012.
- Alighourchi, H., & Barzegar, M. (2009). Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 90, 179–185.
- Alighourchi, H., Barzegar, M., & Abbasi, S. (2008). Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *European Food Research and Technology*, 227, 881–887.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., et al. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*, 23, 423–433.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Braga, L. C., Shupp, J. W., Cummings, C., Jett, M., Takahashi, J. A., Carmo, L. S., et al. (2005). Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 335–339.
- Eksi, A., & Özhamamci, I. (2009). Chemical composition and guide values of pomegranate juice. *CIDA*, 34, 265–270.
- EMAN (European Mycotoxins Awareness Network). (2012). Mycotoxins Legislation Worldwide (last adapted February 2012). Mariko Kubo, Senior Regulatory Advisor. Available from <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=79> (accessed 22 March, 2013).
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4581–4589.
- González-Molina, E., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2009). A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115, 1364–1372.
- Guo, C., Wei, J., Yang, J., Xu, J., Pang, W., & Jiang, Y. (2008). Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutrition Research*, 28, 72–77.
- Kaplan, M., Hayek, T., Raz, A., Coleman, R., Dornfeld, L., Vaya, J., et al. (2001). Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *The Journal of Nutrition*, 131, 2082–2089.
- Kasimsetty, S. G., Bialonska, D., Reddy, M. K., Ma, G., Khan, S. I., & Ferreira, D. (2010). Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and urolithins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2180–2187.
- Lansky, E. P., & Newman, R. A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 177–206.
- Laporta, O., Pérez-Fons, L., Mallavia, R., Caturla, N., & Micol, V. (2007). Isolation, characterization and antioxidant assessment of the bioactive compounds derived from *Hyposiphonia rooperi* corm extract (African potato). *Food Chemistry*, 101, 1425–1437.
- Martí, N., Pérez-Vicente, A., & García-Viguera, C. (2002). Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 217–221.
- Melgarejo, P., Salazar, D. M., & Artés, F. (2000). Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *European Food Research and Technology*, 211, 185–190.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartial, J., Saura, D., et al. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1893–1906.
- Neurath, A. R., Strick, N., Li, Y.-Y., & Debnath, A. K. (2005). *Punica granatum* (pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1056, 311–327.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619–4626.
- Palou, L., Guardo, A., & Montesinos-Herero, C. (2010). First report of *Penicillium* spp. and *Pildidiella granati* causing postharvest fruit rot of pomegranate in Spain. *New Disease Reports*, 22, 21. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2010.022.021>.
- Pantuck, A. J., Leppert, J. T., Zomorodian, N., Aronson, W., Hong, J., Barnard, R. J., et al. (2006). Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 12, 4018–4026.
- Pérez-Vicente, A., Serrano, P., Abellán, P., & García-Viguera, C. (2004). Influence of packaging material on pomegranate juice colour and bioactive compounds, during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 639–644.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rock, W., Rosenblat, M., Miller-Lotan, R., Levy, A. P., Elias, M., & Aviram, M. (2008). Consumption of wonderful variety pomegranate juice and extract by diabetic patients increases paraoxonase 1 association with high-density lipoprotein and stimulates its catalytic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8704–8713.
- Rosenblat, M., Hayek, T., & Aviram, M. (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*, 187, 363–371.
- Seeram, N. P., Zhang, Y., McKeever, R., Henning, S. M., Lee, R. P., Suchard, M. A., et al. (2008). Pomegranate juice and extracts provide similar levels of plasma and urinary ellagitannin metabolites in human subjects. *Journal of Medicinal Food*, 11, 390–394.
- Talbot, S. T., & Krenke, K. A. (2012). Analysis methods of ellagitannins. In Z. Xu & L. R. Howard (Eds.), *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals* (pp. 2082–2095). Wiley-Blackwell.
- Tezcan, F., Gültekin-Özgülven, M., Diken, T., Özçelik, B., & Erim, F. B. (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid, and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115, 873–877.
- Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M., & Amir, R. (2007). Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9559–9570.
- Vasconcelos, L. C. d. S., Sampaio, F. C., Sampaio, M. C. C., Pereira, M. d. S. V., Higino, J. S., & Peixoto, M. H. P. (2006). Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* L (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Brazilian Dental Journal*, 17, 223–227.
- Vidal, A., Fallarero, A., Pena, B. R., Medina, M. E., Gra, B., Rivera, F., et al. (2003). Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 295–300.
- Zhang, Y., Krueger, D., Durst, R., Lee, R., Wang, D., Seeram, N., et al. (2009). International multidimensional authenticity specification (IMAS) algorithm for detection of commercial pomegranate juice adulteration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2550–2557.