



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS Y TECNOLOGÍAS
AGRARIAS, AGROAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS**

**ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO, SENSORIAL E
INSTRUMENTAL DE ARILOS Y SEMILLAS DE
GRANADA (*Punica granatum* L.)**



FRANCISCO ALCARAZ MÁRMOL

TESIS DOCTORAL

2019



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE
ORIHUELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS Y TECNOLOGÍAS
AGRARIAS, AGROAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO, SENSORIAL E
INSTRUMENTAL DE ARILOS Y SEMILLAS DE
GRANADA (*Punica granatum* L.)

TESIS DOCTORAL

FRANCISCO ALCARAZ MÁRMOL

2019

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO, SENSORIAL E INSTRUMENTAL DE ARILOS Y SEMILLAS DE GRANADA (*Punica granatum L.*)

CALIDAD DEL COMPENDIO DE CADA PUBLICACIÓN

Esta Tesis se presenta como compendio de las siguientes publicaciones:

Alcaraz-Mármol, F., Calín-Sánchez, A., Nuncio-Jáuregui, N., Carbonell-Barrachina, A.A., Hernández, F., & Martínez, J.J., (2015). Classification of pomegranate cultivars according to their seed hardness and wood perception. *Journal of Texture Studies*, 46, 467-474. doi:10.1111/jtxs.12145.

Alcaraz-Mármol, F., Nuncio-Jáuregui, N., Calín-Sánchez, A., Carbonell-Barrachina, A.A., Martínez, J.J., & Hernández, F., (2015). Determination of fatty acid composition in arils of 20 pomegranate cultivars grown in Spain. *Scientia Horticulturae*, 197, 712-474. doi: 10.1016/j.scienta.2015.11.004.

Alcaraz-Mármol, F., Nuncio-Jáuregui, N., García-Sánchez, F., Martínez J.J., & Hernández, F., (2017). Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing. *Scientia Horticulturae*, 219, 152-160. doi: 10.1016/j.scienta.2017.03.008.

CLASSIFICATION OF POMEGRANATE CULTIVARS ACCORDING TO THEIR SEED HARDNESS AND WOOD PERCEPTION

Autores: Francisco Alcaraz-Mármol, Ángel Calín-Sánchez, Nallely Nuncio-Jáuregui, Ángel A. Carbonell-Barrachina, Francisca Hernández & Juan José Martínez

Revista: Journal of Texture Studies

doi:10.1111/jtxs.12145

Editor: Jianshe Chen, Fred van de Velde, Chris Vinyard

ISSN: 1745-4603

Ámbito de la publicación: Food Science and Technology

Categoría JCR	Categoría del cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
Food Science and Technology	Q3	67/124	1,261 (2015)	1,669



Determination of fatty acid composition in arils of 20 pomegranates cultivars grown in Spain

Autores: Francisco Alcaraz-Mármol, Nallely Nuncio-Jáuregui, Ángel Calín-Sánchez, Ángel A. Carbonell-Barrachina, Juan José Martínez & Francisca Hernández

Revista: Scientia Horticulturae

doi: 10.1016/j.scienta.2015.11.004

Editor: J.P. Bower, G. Colla, W.W. Guo, S. Kondo, P. Martinez Gómez, B. Pennisi, D. Schwarz

ISSN: 0304-4238

Ámbito de la publicación: Horticulture

Categoría JCR	Categoría del cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
Horticulture	Q1	8/36	1,624 (2016)	1,954



Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing

Autores: Francisco Alcaraz-Mármol, Nallely Nuncio-Jáuregui, Francisco García-Sánchez, Juan José Martínez-Nicolás, Francisca Hernández

Revista: Scientia Horticulturae

doi: 10.1016/j.scienta.2017.03.008

Editor: J.P. Bower, G. Colla, W.W. Guo, S. Kondo, P. Martinez Gómez, B. Pennisi, D. Schwarz

ISSN: 0304-4238

Ámbito de la publicación: Horticulture

Categoría JCR	Categoría del cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
Horticulture	Q1	8/36	1,624 (2016)	1,954





Dr. D. Ángel Antonio Carbonell Barrachina, Catedrático de Universidad y Coordinador del Programa de Doctorado Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH),

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Análisis físico-químico, sensorial e instrumental de arilos y semillas de granada (*Punica granatum* L.)**” del que es autor el Ingeniero Agrónomo **D. Francisco Alcaraz Mármol** ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. Juan José Martínez Nicolás** y de la codirección de la **Dra. Francisca Hernández García**, profesores de la UMH, actuando como tutor el Dr. D. Ángel Antonio Carbonell Barrachina (UMH). Considero que la tesis es conforme en cuanto a forma y contenido a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA por tanto, es apta para su exposición y defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a veintiocho de noviembre de dos mil dieciocho.



Programa Doctorado
ReTos-AAA

Dr. D. Ángel A. Carbonell Barrachina
Coordinador Programa Doctorado ReTos-AAA

Esta memoria ha sido presentada por **D. Francisco Alcaraz Mármol**, Ingeniero Agrónomo, Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Máster en Técnicas Avanzadas para la Investigación y Producción en Fruticultura, para obtener el título de doctor.

FRANCISCO
ALCARAZ
MÁRMOL -
48434058Z

Firmado digitalmente por FRANCISCO ALCARAZ
MÁRMOL - 48434058Z
Nombre de reconocimiento (DN): 2.5.4.13=Qualified
Certificate: AAAP-PP-M-HW-KUSU, cn=FRANCISCO
ALCARAZ MÁRMOL - 48434058Z
givenName=FRANCISCO, sn=ALCARAZ MÁRMOL,
serialNumber=48434058Z, title=DOCTORANTE,
ou=certificado electrónico de empleado público,
ou=CARM, o=CONSEJERÍA DE EDUCACIÓN, c=ES
Fecha: 2018.12.17 02:16:49 +01'00'

Fdo. Francisco Alcaraz Mármol

Esta Tesis Doctoral ha sido dirigida por el **Dr. Juan José Martínez Nicolás**, Catedrático de Escuela Universitaria del Departamento de Producción Vegetal y Microbiología y codirigida por la **Dra. Francisca Hernández García**, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Producción Vegetal

Dr. Juan José Martínez Nicolás

Dra. Francisca Hernández García

**MARTINEZ
NICOLAS,
JUAN JOSE
(AUTENTICA
CIÓN)**

Firmado
digitalmente por
MARTINEZ NICOLAS,
JUAN JOSE
(AUTENTICACIÓN)
Fecha: 2018.12.17
10:04:28 +01'00'

Catedrático de Escuela Universitaria
Dpto. Producción Vegetal y
Microbiología

**FRANCISCA
HERNANDE
Z|GARCIA**

Firmado digitalmente por
FRANCISCA|HERNANDEZ|GARCIA
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=FRANCISCA|HERNANDEZ|
GARCIA, serialNumber=77503529S,
givenName=FRANCISCA,
sn=HERNANDEZ GARCIA,
ou=Ciudadanos, o=ACCV, c=ES
Fecha: 2018.12.17 15:21:15 +01'00'

Profesora Titular de Universidad
Dpto. Producción Vegetal y
Microbiología

Orihuela, 10 de diciembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Dr. Juan José Martínez Nicolás y a mi codirectora la Dra. Francisca Hernández García, por su apoyo, ayuda y cercanía de todos estos años.

Al Dr. Ángel Calín, por haberme evitado “sufrimientos” innecesarios y haber dejado que me “aproveche” de su experiencia. Por sus aportaciones a los artículos, así como su apoyo tanto en lo profesional como en lo personal.

A Huertas y a Eva, por su ayuda en el laboratorio así como al resto de técnicos y responsables de otros departamentos que han aportado su grano de arena cuando se les ha necesitado.


A Toni, por ayudarme con el inglés, idioma más que necesario.

A toda mi familia, en especial a mis padres. Sin ellos hoy no sería quien soy y no estaría donde estoy.

Por supuesto a Amalia, mi mujer. Por estar orgullosa de mis logros y animarme cuando el camino se hace duro.

A todas aquellas personas que han hecho que haya llegado aquí. Tanto a los que han aportado cosas buenas como no tan buenas. Soy consecuencia de mis actos y vivencias, y sin todas ellas no estaría lo orgulloso que estoy de encontrarme donde me encuentro.

Muchas gracias a todos.



La ocasión hay que crearla, no esperar a que llegue
(Francis Bacon)

ÍNDICE

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS	1
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DURANTE EL PERIODO PREDOCTORAL.....	3
ESTRUCTURA DE LA TESIS	4
RESUMEN Y ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN.....	8
<hr/>	
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERAL DEL CULTIVO DEL GRANADO.....	10
1.1.1. Origen, distribución y taxonomía	10
1.1.2. Producción e importancia económica del granado.....	11
1.1.3. Material vegetal	13
1.2. COMPOSICIÓN DE LA GRANADA	15
1.2.1. Sólidos solubles totales, pH y acidez titulabe	16
1.2.2. Ácidos orgánicos	17
1.2.3. Azúcares	17
1.2.4. Minerales	18
1.2.5. Ácidos grasos.....	18
1.2.6. Compuestos fenólicos	19
1.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA GRANADA.....	20
1.4. ANÁLISIS SENSORIAL	21
2. OBJETIVOS	23
<hr/>	
3. RESUMEN DE LA METODOLOGÍA	24
<hr/>	

4. PUBLICACIONES.....	29
<hr/>	
Publicación 1	29
Publicación 2	59
Publicación 3	77
5. RESUMEN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	101
<hr/>	
5.1. Publicación 1	101
5.1.1. Resumen de resultados y discusión	101
5.1.2. Conclusiones.....	103
5.2. Publicación 2	104
5.2.1. Resumen de resultados y discusión	104
5.2.2. Conclusiones.....	106
5.3. Publicación 3	107
5.3.1. Resumen de resultados y discusión	107
5.3.2. Conclusiones.....	108
6. CONCLUSIONES GENERALES E INVESTIGACIONES FUTURAS	109
<hr/>	
6.1. CONCLUSIONES GENERALES	109
6.2. INVESTIGACIONES FUTURAS	110
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
<hr/>	

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

ABREVIACIONES

MA	Mollar de Albaterra
ME	Mollar de Elche
MEC	Mollar de Elche Comercial
MEM	Mollar de Elche Mejorada
MO	Mollar de Orihuela
VA	Valenciana de Albaterra
PTO	Piñón tierno de Ojós
BA	Borde de Albaterra
BBE	Borde de Beniel
HZ	Hicaznar
SM	Smith
WOND	Wonderful
TSS	Sólidos solubles totales
Pt	Test de punción
CF	Fibra cruda
WI	Índice de porción leñosa
Si	Índice de porción leñosa
PCA	Análisis de componentes principales
IH	Dureza instrumental
DH	Dureza descriptiva
HSD	Grado de satisfacción de percepción de porción leñosa
DWP	Percepción descriptiva de porción leñosa
FAME	Metilación de ácidos grasos
BF3	Trifluoruro de boro
GC-MS	Análisis por cromatografía de gases
LSD	Diferencia menos significativa
CLNA	Ácidos linoleicos conjugados
UMH	Universidad Miguel Hernandez de Elche
TA	Acidez valorable total
MI	Índice de madurez
TPC	Contenido total en polifenoles
CA	Análisis de agrupamiento
DW, dw	Peso seco
Aw	Peso del arilo
La	Longitud del arilo

Wa	Ancho del arilo
Ma	Humedad del arilo
Sw	Peso de la semilla
Ls	Longitud de la semilla
Ws	Ancho de la semilla
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados

SÍMBOLOS

ABTS	2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic)
DPPH	(2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
C16:0	Ácido palmítico
C17:0	Ácido heptadecanoico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido linolénico
C20:0	Ácido araquídico



PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DURANTE EL PERIODO PREDOCTORAL

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS

Alcaraz-Mármol, F., Calín-Sánchez, A., Nuncio-Jáuregui, N., Carbonell-Barrachina, A.A., Hernández, F., & Martínez, J.J., (2015). Classification of pomegranate cultivars according to their seed hardness and wood perception. *Journal of Texture Studies*, 46, 467-474. doi:10.1111/jtxs.12145.

Alcaraz-Mármol, F., Nuncio-Jáuregui, N., Calín-Sánchez, A., Carbonell-Barrachina, A.A., Martínez, J.J., & Hernández, F., (2015). Determination of fatty acid composition in arils of 20 pomegranate cultivars grown in Spain. *Scientia Horticulturae*, 197, 712-774. doi: 10.1016/j.scienta.2015.11.004.

Alcaraz-Mármol, F., Nuncio-Jáuregui, N., Martínez, J.J., & Hernández, F., (2017). Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing. *Scientia Horticulturae*, 219, 152-160. doi: 10.1016/j.scienta.2017.03.008.



ESTRUCTURA DE LA TESIS

Para la elaboración de la presente Tesis Doctoral se ha seguido la metodología basada en la publicación de artículos de investigación. Con esta Tesis Doctoral se pretende obtener el título de Doctor, para ello en la redacción de la misma, se ha seguido la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

La Tesis Doctoral se estructura en las siguientes partes:

1. **Introducción**
2. **Objetivos**
3. **Resumen de la Metodología**
4. **Publicaciones Científicas**
5. **Resumen de los Resultados, Discusión y Conclusiones**
6. **Conclusiones Generales e Investigaciones Futuras**
7. **Referencias Bibliográficas**

La **Introducción** contiene una breve revisión bibliográfica sobre la importancia del cultivo de la granada, origen, distribución, descripción general, ubicación taxonómica, y usos. Y por último esta primera parte también incluye una breve revisión de las propiedades funcionales que presenta este frutal. En la segunda parte se describen los **Objetivos** estimados en la presente Tesis Doctoral. En la siguiente parte se detalla un **Resumen de la Metodología** utilizada, para la recopilación de los resultados y entender el diseño y la preparación de las muestras, además incluye los programas informáticos utilizados en los análisis estadísticos de los datos. A continuación, se recogen las **Publicaciones Científicas** publicadas que componen esta Tesis Doctoral.

- La **Primera Publicación** recoge los resultados de la caracterización morfológica y parte de la química de los arilos y las semillas. En ella se estudian las aptitudes que presenta esta fruta tanto para su consumo en fresco como para su industrialización. Se analizan propiedades de calidad, composición en ácidos orgánicos y azúcares, activiad

antioxidante y contenido total de polifenoles. Este artículo está publicado en la revista *Scientia Horticulturae*.

- En la **Segunda Publicación** se aborda la evaluación del contenido e identificación de los ácidos grasos presentes en la semilla de la granada. Este artículo se publicó en la revista *Scientia Horticulturae*.
- La **Tercera Publicación** aborda parte de la caracterización de la dureza desde un punto de vista instrumental y sensorial, así como una clasificación y recomendación de diferentes cultivares de granada. Este artículo se publicó en *Journal of Texture Studies*.

El **Resumen de los Resultados, Discusión y Conclusiones** muestra un resumen con los resultados más interesantes e importantes conseguidos en los estudios, una discusión general de los mismos y las conclusiones de cada publicación. A continuación se recogen las **Conclusiones Generales** obtenidas de los estudios realizados en esta Tesis Doctoral. En la siguiente parte se presentan las **Investigaciones Futuras**. Y en la última parte se recogen las **Referencias Bibliográficas** consultadas para la elaboración de esta memoria, sin tener en cuenta el apartado de Publicaciones Científicas.

RESUMEN

Actualmente, hay un creciente interés de los consumidores en aumentar el consumo de frutas y verduras en su dieta, debido a la presencia de compuestos bioactivos, que están vinculados con beneficios para la salud humana, como la disminución del riesgo de sufrir diferentes enfermedades. Además, los consumidores buscan productos frescos con sabores agradables, dulces y de colores atractivos.

Los arilos de la granada (parte comestible) son de un color rojo brillante y poseen una porción leñosa cuya dureza varía según tipo de granada y cultivares. Esta dureza es capaz de determinar si unos cultivares son aptos para el consumo en fresco, o bien se han de buscar alternativas en la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal la caracterización físico-química y sensorial de los arilos de veinte cultivares de granada cultivados en España. Para alcanzar este objetivo se plantean los siguientes objetivos específicos: (i) caracterización morfológica de arilos y semillas; (ii) caracterización química de arilos y semillas; (iii) identificación de los ácidos grasos presentes en la semilla de los arilos y (iv) determinación de la dureza instrumental y sensorial de los arilos y semillas.

ABSTRACT

Nowadays, there is a growing interest of consumers in increasing the consumption of fruits and vegetables in their diet, due to the presence of bioactive compounds, which are linked with human health benefits, such as reducing the risk of suffering from different diseases. Besides, consumers search for tasty, sweet and attractive colored fresh products.

Pomegranate arils (edible part) are characterized by bright red color and have a woody portion which hardness varies among pomegranate type and cultivars. This hardness is able to determine which cultivars are suitable for fresh

consumption or whether are recommended for alternative uses such as food, pharmaceutical or cosmetic industry.

The main objective of this Doctoral Thesis is to characterize the physical-chemical and sensory properties of twenty pomegranate cultivars grown in Spain. To reach this main objective, the following specific objective are proposed: (i) morphological characterization of arils and seeds; (ii) chemical characterization of arils and seeds; (iii) identification of fatty acids of pomegranate seeds and (iv) determination of instrumental and sensory hardness of arils and seeds.





1. INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAS
Miguel
Hernández

1. INTRODUCCIÓN

El granado es un frutal que presenta unas excepcionales expectativas de cultivo debido: (i) a su alta rentabilidad, (ii) a la posibilidad de su cultivo en zonas áridas o semiáridas, (iii) a sus menores requerimientos hídricos frente a otros cultivos y (iv) a su capacidad de vegetar y producir en condiciones en las que otros frutales más importantes no lo harían de manera rentable. Por ello, el conocimiento del material vegetal y la selección de nuevos individuos capaces de dar abundantes cosechas y frutos de calidad, unido al descubrimiento de sus numerosas propiedades nutricionales, farmacológicas, funcionales y cosméticas, ha hecho que este frutal sea cada día más demandado por los consumidores, lo que está provocando, un incremento considerable de nuevas plantaciones en todos los países en los que es posible su cultivo. Esta creciente demanda ha hecho que se abran líneas de investigación en torno a este frutal en los países productores de granada; investigaciones que abordan desde los aspectos agronómicos hasta los aspectos de calidad.

Esta tesis doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación, que desde hace años viene desarrollando el Grupo de Investigación en Fruticultura y Técnicas de Producción, del departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la Universidad Miguel Hernández, sobre el cultivo del granado. De los distintos aspectos que el grupo de investigación está estudiando sobre dicho frutal, la presente tesis Doctoral se centra en el estudio de las propiedades físicas, químicas, funcionales y sensoriales tanto de los arilos como de las semillas de veinte variedades de granado (*Punica granatum* L.); de las cuales, quince variedades forman parte del Banco de Germoplasma de granado, creado por dicho grupo de investigación, ubicado en la finca experimental de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela de la Universidad Miguel Hernández (Colección de Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación del Programa Nacional; código FAO ESP160), y cinco variedades comerciales.

El objetivo principal de la tesis fue estudiar las propiedades físicas, químicas, funcionales y sensoriales de los arilos y de las semillas (porción leñosa) de veinte variedades de granada, con la finalidad de conocer en profundidad, una parte del material vegetal existente en dicho banco de germoplasma, y así poder seleccionar, para transferir al sector agroalimentario, aquellas variedades que mejores cualidades presenten bien para su consumo en fresco o bien para la industrialización.

Los objetivos específicos planteados y los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis doctoral han dado lugar a las tres publicaciones científicas que se exponen a continuación:

- I. La primera publicación recoge los resultados obtenidos de la caracterización morfológica y química de los arilos y de las semillas. En ella se estudian las aptitudes que presenta esta fruta tanto para su consumo en fresco como para su industrialización. Se analizan propiedades de calidad, composición en ácidos orgánicos y azúcares, actividad antioxidante y contenido total en polifenoles. Este trabajo está publicado en la revista *Scientia Horticulturae*.
Alcaraz-Mármol, F., Nuncio-Jáuregui, N., García-Sánchez, F., Martínez J.J., & Hernández, F., (2017). Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing. *Scientia Horticulturae*, 219, 152-160. doi: 10.1016/j.scienta.2017.03.008.
- II. La segunda publicación recoge los resultados obtenidos de la evaluación del contenido e identificación de los ácidos grasos presentes en los arilos de la granada. Este trabajo se publicó en la revista *Scientia Horticulturae*.
Alcaraz-Mármol, F., Nuncio-Jáuregui, N., Calín-Sánchez, A., Carbonell-Barrachina, A.A., Martínez, J.J., & Hernández, F., (2015). Determination of fatty acid composition in arils of 20 pomegranate cultivars grown in Spain. *Scientia Horticulturae*, 197, 712-474. doi: 10.1016/j.scienta.2015.11.004.
- III. La tercera publicación recoge los resultados obtenidos de la caracterización de la dureza de las semillas desde un punto de vista instrumental y sensorial,

así como una clasificación y recomendación de diferentes cultivares de granada. Este trabajo se publicó en *Journal of Texture Studies*.

Alcaraz-Mármol, F., Calín-Sánchez, A., Nuncio-Jáuregui, N., Carbonell-Barrachina, A.A., Hernández, F., & Martínez, J.J., (2015). Classification of pomegranate cultivars according to their seed hardness and wood perception. *Journal of Texture Studies*, 46, 467-474. doi:10.1111/jtxs.12145.

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CULTIVO DEL GRANADO

1.1.1. Origen, distribución y taxonomía

El granado (*Punica granatum* L.) es un árbol caduco de pequeñas dimensiones que puede alcanzar como máximo 8 metros de altura en estado salvaje. Es un frutal muy interesante para muchas zonas del mundo, especialmente para zonas áridas y semiáridas, ya que, aunque menos importante que otros frutales, es capaz de adaptarse a distintas zonas en las que muchos frutales serían incapaces de dar una producción rentable (Melgarejo y Salazar, 2003).

Esta especie pudo tener su origen en Persia, aunque fenicios y griegos lo cultivaban, tal y como se puede apreciar en sus escritos. También fue apreciado por los egipcios, como lo demuestran los frescos de las habitaciones sepulcrales de Ramsés IV. En la antigua Roma formaba parte en ceremonias y cultos de la época como símbolo de riqueza y fecundidad. En la Edad Media se utilizaba esta especie de forma habitual. Ya en la Edad Moderna, su consumo en fresco estaba muy extendido en el Reino Unido, sobre todo en las cuencas mineras, sacando partido de sus propiedades beneficiosas para la salud, haciendo frente a la contaminación por metales pesados.

Según Nikolai Ivanovich Vavilov, el granado pertenece al Centro IV: Centro de Oriente Próximo (Asia Menor, la Transcaucásica, Irán y las tierras altas de Turkmenistán), centro al que también pertenecen otros frutales como la higuera, manzano, peral, membrillero, cerezo, almendro, avellano, castaño, etc., entre otras especies vegetales (Sánchez-Monge, 1974). Siendo su sistemática la siguiente:

- ✚ División: Fanerógamas
- ✚ Clase: Dicotiledóneas
- ✚ Subclase: Arquiclamídeas
- ✚ Orden: *Myrtales*
- ✚ Familia: *Punicaceae*
- ✚ Género: *Punica*
- ✚ Especie: *granatum*

Actualmente su cultivo se extiende por países como España, Estados Unidos, Irán, Turquía, India, Israel, China y países de la costa norte de África, entre otros.

1.1.2. Producción e importancia económica del granado

Históricamente el cultivo de granado era practicado mayoritariamente en la Región de Murcia y en 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. De esta forma podemos decir que, la comunidad autónoma con mayor superficie cultivada en España es la Comunidad Valenciana (2.608 ha) concentrándose la mayor parte en la provincia de Alicante (2.377 ha), seguida de Andalucía (203 ha) y, por último, la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (187 ha) (MAPAMA, 2015). En éstas tres comunidades autónomas se concentra el 99% de la producción de granado en España; en otras zonas, la presencia de este cultivo se limita a árboles diseminados, posiblemente utilizados en jardinería.

En cuanto a las producciones de estas tres zonas, se observa que la producción de Alicante, expresada en toneladas, es de 45.676, con un rendimiento medio de 19.200 kg/ha, siendo el total de la Comunidad Valenciana de 49.844 tn; de esto se infiere que la mayor parte de la producción de la Comunidad Valenciana la aporta la provincia de Alicante, con un 98% de la producción. En segundo lugar, se sitúa Andalucía con una producción de 2.528 toneladas y un rendimiento medio de 11.575

kg/ha. En tercer lugar se encuentra la Región de Murcia con una producción de 2.244 toneladas y un rendimiento de 11.575 kg/ha (MAPAMA, 2015).

Desde el año 1991 al año 1995 la superficie total dedicada al cultivo de granada permanece prácticamente constante alrededor de las 2.600 ha, mientras que en ese periodo de tiempo la superficie en producción ha ido aumentando, ligeramente, hasta llegar a las 2.200 ha. A partir del año 1994 la superficie de cultivo experimentó un incremento, particularmente acusado durante los años 1996 y 1997, llegando casi a las 3.400 ha plantadas; en ese mismo periodo de tiempo la superficie en producción también experimentó un crecimiento, quedando en las 2.800 ha en el año 1997. A partir del año 1997 y hasta el año 2001 se produce un descenso de la superficie plantada y de la superficie en producción. En el periodo que transcurre entre los años 2001 y 2002 se produce un incremento de ambas superficies. A partir del año 2002, la superficie plantada se iguala a la superficie de granado en producción y ambas disminuyen de manera significativa hasta alcanzar las 2.300 ha del año 2007. Sin embargo, la superficie cultivada aumenta de manera considerable entre 2009 y 2015, llegando a alcanzar las casi 5.000 ha de cultivo.

La producción de granado en España sufre durante los años 1990 y 1995 una serie de altibajos para aumentar considerablemente a partir del año 1995, aunque en el año 1999 se produce un pequeño parón en este ascenso, hasta alcanzar en el año 2002 un pico que sitúa dicha producción de granado en 38.000 toneladas aproximadamente. Es a partir de este año 2002 cuando la producción de granado comienza a disminuir hasta alcanzar las 22.500 toneladas de producción que se tuvieron en el año 2009.

El valor de las producciones de granado ha seguido una trayectoria ascendente en los últimos años, únicamente sufrió un descenso durante los años 1999-2000 para después volver a aumentar su valor hasta situarse en los 20 millones de euros del año 2007. Entre 2007 y 2009 sufrió un descenso hasta los cerca de 14 millones de euros, y es a partir de ese punto donde comienza un ascenso importante hasta 2015

donde casi se registran valores del doble de 2009, situándose en torno a los 28 millones de euros (MAPAMA, 2015).

1.1.3. Material vegetal.

La elección del material vegetal es importante a la hora de conseguir una apropiada explotación comercial de la plantación, por lo que hay que tener una detallada información del material vegetal que se quiere plantar para que se pueda realizar la elección adecuada.

En el granado podemos encontrar dos tipos de variedades (Melgarejo y Salazar, 2003): variedades agrias o bordes y variedades dulces. Esta clasificación de las variedades de granado se establece en base a dos parámetros: la acidez valorable y el índice de madurez. El contenido de ácido cítrico es mayor que el contenido de ácido málico en variedades agrias y agridulces, mientras que en variedades dulces el contenido de ácido cítrico y málico es similar (Mena et al., 2011; Carbonell-Barrachina et al., 2012).

Grupo Varietal	Índice de madurez
Variedades Dulces:	31,7-97,7
Variedades Agridulces:	17,6-23,1
Variedades Agrias:	5,7-6,2

Tabla 1: Clasificación de los grupos varietales según el IM (SS/A) (Melgarejo y Salazar, 2003)

A la hora de seleccionar el material vegetal de una plantación, se tiene que estudiar, por un lado, la elección del patrón y, por otro, la elección de la variedad.

Los requisitos exigibles a los patrones de granado son:

- ✚ Resistencia a los ataques de barrena (*Zeuzera pyrina* L.)
- ✚ Resistencia al escaldado del tronco
- ✚ Resistencia a la salinidad
- ✚ Resistencia a la asfixia radicular

- ✚ Resistencia a la caliza activa
- ✚ Resistencia a la sequía
- ✚ Resistencia a los nematodos
- ✚ Baja o nula producción de sierpes
- ✚ Capacidad de enraizamiento alta

En cuanto a las variedades, hay que hacer una separación entre las características que queremos obtener en los frutos y las características que queremos en la planta.

Requisitos exigibles en el fruto:

- ✚ Que sean dulces o de piñón tierno para su consumo en fresco. Las agridulces van a tener muy pocas posibilidades en el mercado de consumo en fresco, mientras que a las agrias solo se les puede dar un uso industrial u ornamental
- ✚ Tamaño grande o muy grande
- ✚ Gran porcentaje de color rojo exterior
- ✚ Que sus semillas presenten color rojo o rosa intenso
- ✚ Facilidad para el desgranado
- ✚ Que estén bien conformados y con un cáliz no excesivamente largo
- ✚ Resistencia al agrietado
- ✚ Resistencia al albardado
- ✚ Alto contenido en compuestos bioactivos

Características exigibles a la planta:

- ✚ Gran producción
- ✚ Que presente bajo número de flores estaminadas o "masculinas"
- ✚ Periodo de floración y de recolección agrupados
- ✚ Pocas espinas
- ✚ Pocos ramos estaminados
- ✚ Que sea de vigor adecuado para el tipo de suelo utilizado
- ✚ Gran superficie foliar

En España destacan dos grupos varietales comerciales por encima del resto:

- (i) **Mollar de Elche**: árbol muy vigoroso, de rápido desarrollo, fruto de tamaño grande, arilos de color rojo oscuro y semilla pequeña y blanda. Madura entre octubre y noviembre. Es de mayor calidad, de mayor calibre y más productiva que las del grupo de las Valencianas; presenta importantes pérdidas por albardado de frutos, mayor posibilidad de rajado y de ataque de plagas. Es el grupo varietal más cultivado en España (Melgarejo et al., 2010).
- (ii) **Valenciana**: Árbol vigoroso, fruto de tamaño grande, forma redondeada y aplanada, y semilla pequeña. Se caracteriza por ser de recolección temprana. Los precios de venta suelen ser significativamente más elevados que los de la mollar de Elche, debido a la escasez de producto en la época de recolección (Melgarejo et al., 2010).

Mención especial merece la variedad (iii) **Wonderful** que, si bien, es una variedad agria con semillas duras, es la más cultivada en países como Israel y EE.UU. y es conocida mundialmente gracias al peso de estos dos países en el mundo de la agricultura, aunque presenta una calidad muy inferior para su consumo en fresco si la comparamos con las dos variedades españolas expuestas anteriormente. Por último destacar otras variedades españolas como (iv) **Piñón Tierno de Ojós**, categorizada como agridulces, con frutos de gran tamaño, o la variedad agria (v) **Borde Albatera**, cuya porción leñosa es en torno del 13 % (Hernández et al., 1999).

1.2. COMPOSICIÓN DE LA GRANADA

La granada posee numerosos compuestos químicos de alto valor biológico en sus diferentes partes: corteza, membranas carpelares, arilos y semillas (**Figura 1**). El producto más importante derivado de la granada es el zumo, sin duda el producto más estudiado con multitud de referencias en la literatura científica tanto española como internacional. Alrededor del 50 % del peso total de la granada corresponde a

la corteza y a las membranas carpelares, que son una fuente importantísima de compuestos bioactivos como polifenoles, flavonoides, elagitaninos, proantocianidinas

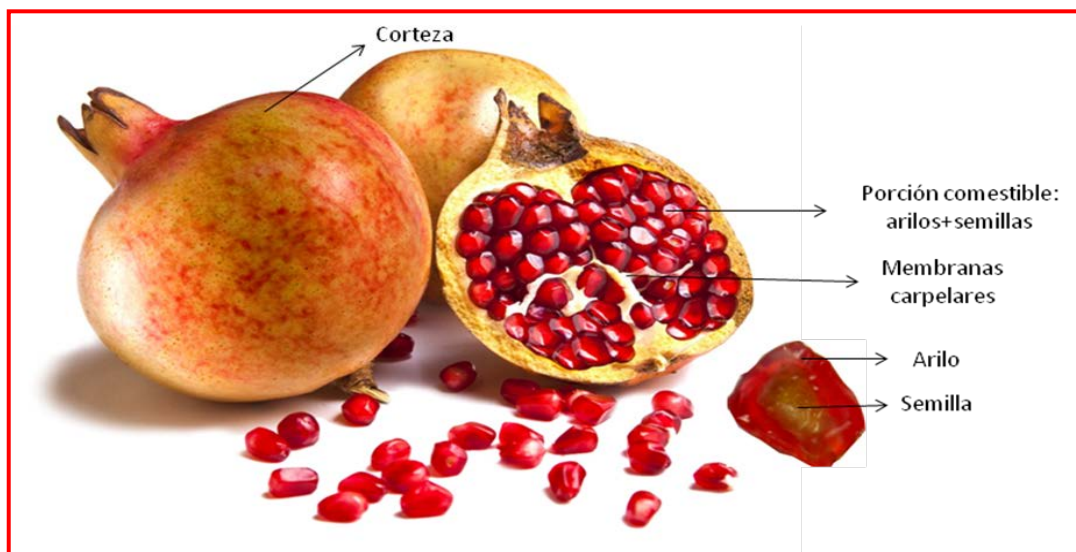


Figura 1. La granada y sus diferentes partes. (fuente: www.granatumplus.com)

y minerales principalmente potasio, nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio y sodio. Por lo que, los productos nutracéuticos y condimentos alimentarios elaborados a partir de extractos de corteza y membranas carpelares pueden ser una fuente importante de todos estos compuestos, si se han procesado de modo correcto.

La parte comestible de la granada representa alrededor del 50 % del peso total del fruto y a su vez consiste en un 80 % de arilo (parte carnosa) y un 20 % de semilla (parte leñosa). La composición de los arilos de la granada es la siguiente: agua (85 %); azúcares (10 %), principalmente fructosa y glucosa; ácidos orgánicos (1,5 %), principalmente, ácido ascórbico, cítrico y málico; compuestos bioactivos tales como polifenoles y flavonoides (principalmente antocianinas) (Fadavi et al., 2005; Viuda-Martos et al., 2010).

1.2.1. Sólidos solubles totales, pH y acidez titulable

Los sólidos solubles totales, pH y la acidez titulable son atributos importantes para identificar y categorizar las diferentes variedades. El pH determina si son variedades agrias. El pH aumenta con la maduración alcanzando valores en torno a 4 en plena maduración (Al-Maiman y Ahmad, 2002). Por otro lado, la acidez titulable

se ve reducida con la maduración, debido a que aumentan el contenido los sólidos solubles totales (Kulkarni y Aradhya, 2005). Los sólidos solubles junto con la acidez titulable permiten determinar el índice de madurez y así poder categorizar las diferentes variedades de granada. Dicho parámetro está en torno a 5-7 en variedades agrias, 17-24 en variedades agridulces y 31-98 en variedades dulces (Martínez et al., 2006). El índice de madurez ha sido descrito como el parámetro más preciso para determinar la madurez de los frutos (Fawole y Opara, 2013).

1.2.2. Ácidos orgánicos

El contenido de ácidos orgánicos de la granada depende de la variedad y categoría de los frutos, entre otros factores (Legua et al., 2000), y son una parte clave en el balance de los diferentes tipos de granadas de acuerdo a su sabor. Según la Guía de Referencia AIJN (2012), los valores de ácido cítrico y málico deben oscilar entre 0,1-33 g/L y 0,02-3,6 g/L, respectivamente. La composición de ácidos orgánicos es importante debido a su contribución a la aceptación de los consumidores (Carbonell-Barrachina et al., 2012).

Cabe destacar que los ácidos orgánicos principales de la granada son el cítrico, málico y oxálico, mientras que el tartárico, succínico y quínico son minoritarios pero presentes en algunas variedades (Poyrazoglu et al., 2002). Diversos autores han descrito la reducción de los ácidos orgánicos durante la maduración de la granada (Fawole y Opara, 2013) debido a que los ácidos orgánicos se acumulan durante el crecimiento de los frutos y son empleados como sustratos respiratorios durante la maduración de los mismos (Moing et al., 2001).

1.2.3. Azúcares

Los azúcares mayoritarios de la granada son la fructosa y glucosa. La fructosa ha sido descrita como el azúcar mayoritario (Melgarejo et al., 2000; Mena et al., 2011), mientras que otros autores afirman que la glucosa prevalece sobre la fructosa (Ozgen et al., 2008). Estas diferencias podrían estar relacionadas con la variedad, condiciones climáticas y manejo del riego (Carbonell-Barrachina et al., 2012). La

presencia de sacarosa está descrita en variedades dulces, mientras que en agridulces y agrias se encuentra a nivel de trazas (Melgarejo et al., 2000). Durante la maduración de los frutos, se incrementa el contenido de azúcares debido a la hidrólisis del almidón por la que se acumulan azúcares simples desde el primer momento del desarrollo del fruto (Shwartz et al., 2009).

1.2.4. Minerales

El macroelemento predominante en los arilos de granada es el potasio (K), mientras que el microelemento mayoritario es el hierro (Fe) (Mirdehghan y Rahemi, 2007; Gozlekci et al., 2011). En general, la concentración de los minerales en el fruto sigue el siguiente orden: $K > Ca > Mg > Na > Fe > Zn > Cu > Mn$. La concentración de los diferentes minerales, tiene gran influencia en algunas deficiencias como el rajado (asociados a B y Ca) (Mir et al., 2012).

1.2.5. Ácidos grasos

Los arilos de granada son una fuente importante de lípidos, ya que las semillas (parte leñosa del arilo) contienen una cantidad de ácidos grasos que oscilan entre el 12 y el 20 % de su peso total (peso seco). El perfil de ácidos grasos se caracteriza por un alto contenido en ácidos grasos insaturados tales como ácido linolénico, linoleico, púnico, oleico, esteárico y palmítico (Hernández et al., 2011). La semilla tiene un perfil de ácidos grasos variable según la variedad estudiada, el contenido lipídico varía de 140 a 270 g/kg (Kirlan et al., 2009; Hernández et al., 2011). El ácido púnico representa el 80 % de la composición total de ácidos grasos (Yamasaki et al., 2006). La fracción lipídica de la granada contiene una cantidad considerable de ácidos grasos insaturados incluyendo diversos isómeros de ácido linolénico conjugado, así como un bajo contenido en ácidos grasos saturados (Yücel, 2005). Diversos autores han estudiado el contenido de ácidos grasos de la semilla de la granada con grandes diferencias entre ellos, dichas diferencias podrían estar conectadas a efectos ambientales y agronómicos, así como a los diferentes genotipos (El-Shaarawy y

Nahapetian, 1983; El-Nemr et al., 1990; Melgarejo y Artés, 2000; Kiralan et al., 2009; Pande y Akoh, 2009).

1.2.6. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son los compuestos bioactivos con mayor capacidad antioxidante presentes en la dieta humana. Los principales compuestos bioactivos presentes en la granada, y que le confieren su gran capacidad antioxidante son: (i) punicalaginas, (ii) antocianinas y el (iii) ácido eláxico (Gil et al., 2000). Tzulker et al. (2007) determinó que las punicalaginas tienen una gran influencia en la capacidad antioxidante de la granada, mientras que las antocianinas juegan un papel mucho menor en este sentido.

Numerosas propiedades biológicas, capacidad de eliminar radicales libres, inhibir la oxidación lipídica o producir efectos beneficiosos contra el cáncer o enfermedades cardiovasculares son algunos de los beneficios que se han atribuido a los compuestos fenólicos de la granada (Aviram et al., 2000). Además, se ha demostrado que existe una correlación positiva entre el contenido total de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (Gil et al., 2000; Wojdyło et al., 2008; Wu et al., 2004).

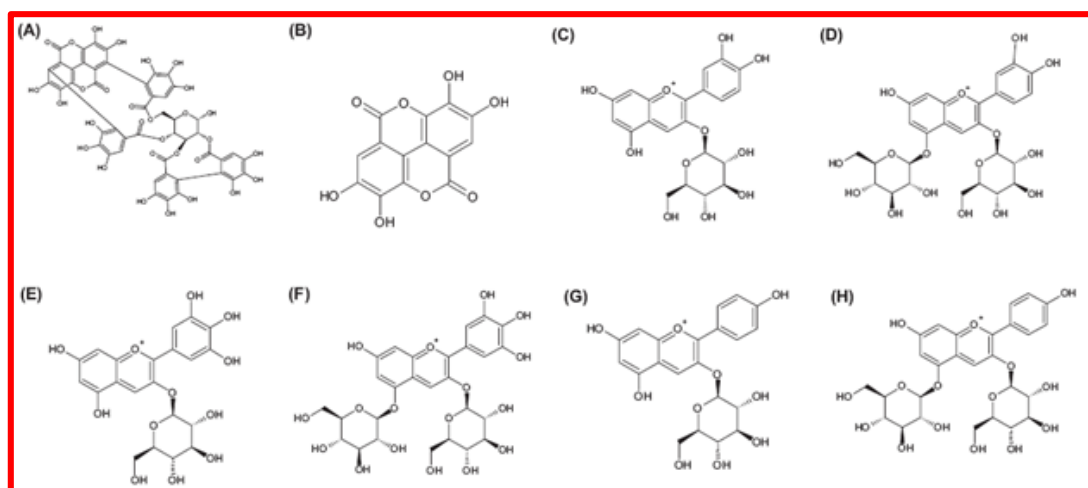


Figura 2. Principales compuestos fenólicos de la granada: (A) punicalagina, (B) ácido eláxico, (C) cianidina 3-glucósido, (D) cianidina 3,5-diglucósido, (E) delphinidina 3-glucósido, (F) delphinidina 3,5-diglucósido, (G) pelargonidina 3-glucósido, (H) pelargonidina 3-5, diglucósido. (Viuda-Martos et al., 2010)

1.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA GRANADA

Los compuestos antioxidantes de frutas y hortalizas son de gran interés por diversas razones, ya que protegen a los propios componentes contra el daño oxidativo o pueden ser absorbidos por el cuerpo humano proporcionando un efecto beneficioso sobre la salud (Prior, 2003).

Debido a la gran variedad de agentes y mecanismos oxidantes, actualmente no existe un método universal para la evaluación de la capacidad antioxidante de los alimentos (Schlesier et al., 2002). A continuación se muestra un resumen de los métodos más comúnmente empleados para la determinación de la capacidad antioxidante de la granada:

- a. Método **DPPH**: se basa en el empleo de este radical libre y su habilidad de donar un electrón (Mena et al., 2012; Calín-Sánchez et al., 2013).
- b. Método **FRAP**: método desarrollado que mide la habilidad para reducir el complejo férrico a forma ferrosa a un pH bajo (Zaouay et al., 2012).
- c. Método **ORAC**: emplea la fluorescencia en la molécula objeto, produciendo radicales peroxilo que reaccionan con la molécula en fluorescencia (Bentayeb et al., 2014).
- d. Método **ABTS**: se añaden los compuestos antioxidantes antes de la generación del radical libre, y se evalúa la inhibición de la formación de los radicales libres (Carbonell-Barrachina et al., 2012; Mena et al., 2012).

El valor de la capacidad antioxidante depende de muchos factores, tales como la variedad, índice de madurez, prácticas culturales, condiciones ambientales, etc. Tal y como se ha citado anteriormente, los compuestos bioactivos que otorgan la capacidad antioxidante a la granada son las punicalaginas, las antocianinas y el ácido eláxico (Gil et al., 2000). Es conocida la capacidad de estos compuestos para eliminar los radicales libres e inhibir la oxidación lipídica (Tezcan et al., 2009).

1.4. ANÁLISIS SENSORIAL

El análisis sensorial es una herramienta de control total sobre la calidad en empresas agrarias y agroalimentarias, y por lo tanto va en la misma dirección de su desarrollo. Así, se puede considerar que está dirigida al asesoramiento, análisis y control tanto de las materias primas como del mercado de destino (Sancho et al., 1999).

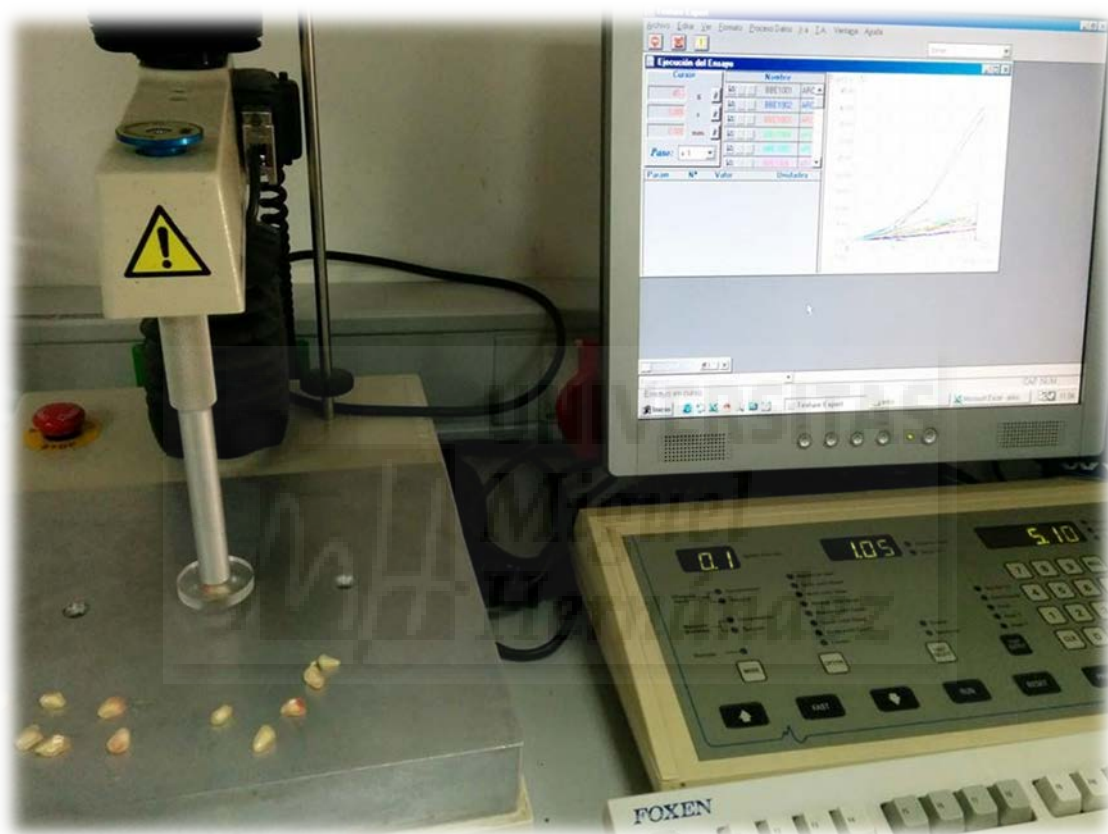
El análisis sensorial de alimentos está íntimamente relacionado con el concepto de calidad sensorial; su importancia, así como las técnicas empleadas para su control y medida, evolucionado paralelamente al desarrollo tecnológico de las prácticas agronómicas y la industria alimentaria. El análisis sensorial no sólo interviene en la selección y obtención de materias primas de gran calidad, sino que además, tiene gran influencia en el procesado de los alimentos y en la idoneidad del producto a su mercado final (Sancho et al., 1999).

La aceptación de la granada por los consumidores y productores, depende básicamente de una combinación de la calidad de atributos externos, tamaño, forma y color de la corteza, y de atributos internos de calidad tales como color, dureza del de la semilla, sólidos solubles totales y acidez (Holland et al., 2009). Estos atributos dependen principalmente de la variedad y el estado de madurez de los frutos. Una recolección temprana impide el completo desarrollo del aroma, color y sabor de la granada, mientras que recolecciones tardías reducen la vida útil de los frutos (Kulkarni & Aradhya, 2005). Koppel y Chambers (2010) elaboraron un léxico sensorial donde determinaron que los 33 atributos sensoriales más relevantes de zumos de granada, y encontraron una gran variabilidad de los resultados. Algunas de estas diferencias, tales como astringencia o amargor pueden estar causadas por el procesado, la presencia de conservantes y/o la presencia de aromas añadidos.

En la actualidad, no existe un léxico específico de la fruta de la granada, pero sí se conocen una serie de limitaciones en función de algunos parámetros de textura relevantes. Algunas publicaciones recientes indicaron que la textura de los arilos es un parámetro relevante de calidad para la industria de la granada (Szychowski et al.,

2015). Como ya se ha mencionado con anterioridad, el arilo contiene a la semilla, la cual es una importante porción del peso fruto, oscilando entre 40 a 100 g/kg (Fadavi et al., 2006). Las semillas se pueden clasificar según la dureza de la semilla en tres categorías: blandas, semi-duras y duras (Martínez et al., 2006). La dureza de la semilla es un atributo sensorial clave para el consumo en fresco de la granada. Si la dureza es muy elevada y la semilla no puede ser masticada con facilidad, la satisfacción del consumidor se reducirá de manera drástica (Szychowski et al., 2015). La granada para consumo en fresco suele ser generalmente del tipo blanda, mientras que para industrial se emplean las variedades del tipo semi-duras y duras (Vázquez-Araújo et al., 2014).





2. OBJETIVOS

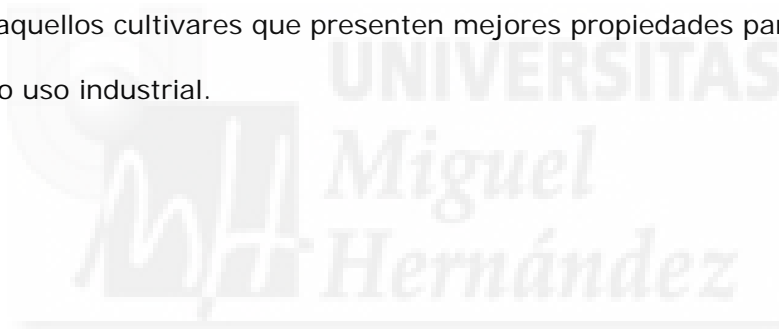
2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue la caracterización físico-química y sensorial de arilos y semillas de veinte cultivares de granadas cultivadas en el sureste español.

Para alcanzar dicho objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- I. Caracterización morfológica de arilos y semillas.
- II. Caracterización química de arilos y semillas.
- III. Identificación de los ácidos grasos presentes en la semilla de los arilos.
- IV. Determinación de la dureza instrumental y sensorial de los arilos y semillas.

Con la finalidad de: (i) conocer el potencial de los veinte cultivares de granada, un frutal adaptado a las condiciones semi-áridas del sudeste español, y (ii) seleccionar aquellos cultivares que presenten mejores propiedades para su consumo en fresco y/o uso industrial.





UNIVERSITAS
3. **RESUMEN DE LA
METODOLOGÍA**

3. RESUMEN DE LA METODOLOGÍA

El **material vegetal** empleado fue el correspondiente a veinte cultivares de granado. Dieciséis de los cultivares estudiados fueron recolectados de uno de los bancos de germoplasma más importantes de la Unión Europea, situado en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante, España longitud 2° 03'50" N, latitud 38 ° 03' 50" E, 25 m sobre el nivel del mar). Los granados del banco de germoplasma están cultivados en condiciones homogéneas, mientras que cuatro de los veinte cultivares fueron obtenidos de una finca comercial situada en Murcia, suroeste de España. Los árboles tienen 25 años de edad con un marco de plantación de 3 x 4 y formación en vaso. La recolección de los frutos se llevó a cabo desde la segunda semana de septiembre hasta la última semana de octubre de las campañas de 2013 y 2014. Se seleccionaron cuatro árboles de cada cultivar, veinte frutos por cultivar, es decir, cinco frutos por árbol. Se recolectaron frutos en estado óptimo de maduración evitando frutos dañados, rajados o con cualquier fisiopatía. Una vez recolectados, los frutos fueron inmediatamente transportados al laboratorio para su análisis. Se extrajeron todos los arilos de cada uno de los cinco frutos y se agruparon según cultivares para formar una mezcla homogénea. De cada una de esas mezclas se tomaron tres muestras por cultivar. Una vez separados y clasificados los arilos se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: peso del arilo (A_w , expresado en g) con una balanza de precisión Mettler AJ50 ($\pm 0,0001$ g); longitud del arilo (L_a , expresada en mm) y anchura del arilo (W_a , expresada en mm), medidas con una calibre Mitutoyo de precisión $\pm 0,01$ mm; la humedad de los arilos (M_a) se determinó a 60 °C en un horno de aire caliente hasta alcanzar peso constante; el peso de la semilla (S_w) determinó con la balanza de precisión descrita anteriormente, al igual que para la longitud de la semilla (L_s) y anchura de las semillas (W_s) se empleó el calibre anteriormente descrito; el índice de porción leñosa según la ecuación: $S_i = (S_w / W_s) \times 100$ (**Ecuación 1**); y por último, el contenido en fibra cruda (CF) que se determinó con un analizador de fibra Ankon (modelo A220), siguiendo la metodología oficial establecida por el Ministerio

de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 1993). Los resultados se expresaron en g/100 g de peso seco (dw).

Código	Cultivar	Origen	Tipo
ME14	Mollar de Elche	Banco de germoplasma UMH	Dulce
ME12	Mollar de Elche	Banco de germoplasma UMH	Dulce
ME17	Mollar de Elche	Banco de germoplasma UMH	Dulce
MEM	Mollar de Elche	Comercial, Murcia	Dulce
MEC	Mollar de Elche	Comercial, Murcia	Dulce
MO2	Mollar de Orihuela	Banco de germoplasma UMH	Dulce
MO5	Mollar de Orihuela	Banco de germoplasma UMH	Dulce
MO6	Mollar de Orihuela	Banco de germoplasma UMH	Dulce
MA3	Mollar de Albaterra	Banco de germoplasma UMH	Dulce
MA5	Mollar de Albaterra	Banco de germoplasma UMH	Dulce
VA1	Valenciana de Albaterra	Banco de germoplasma UMH	Dulce
VA6	Valenciana de Albaterra	Banco de germoplasma UMH	Dulce
VA11	Valenciana de Albaterra	Banco de germoplasma UMH	Dulce
PTO5	Piñón Tierno de Ojós	Banco de germoplasma UMH	Agridulce
PTO10	Piñón Tierno de Ojós	Banco de germoplasma UMH	Agridulce
BA1	Borde de Albaterra	Banco de germoplasma UMH	Agria
BBE1	Borde de Beniel	Banco de germoplasma UMH	Agria
WOND	Wonderful	Comercial, Murcia	Agria
HZ	Hizcaznar	Banco de germoplasma UMH	Agria
SM	Smith	Comercial, Murcia	Agria

Tabla2: Nombre de los cultivares, origen y tipo de granada

La determinación de los **elementos minerales** se llevó a cabo después de una digestión ácida $\text{HNO}_3\text{—H}_2\text{O}_4$ (5:3, v/v) del material previamente deshidratado a 60°C durante 48 horas en un horno de aire caliente. La concentración de N y C se determinó mediante un analizador de elementos Thermo-Finnigan 1112 EA (Milán, Italia). Las concentraciones de Na, K, Mg, Ca, P, S, Al, B, Cu, Fe, Mn y Zn se determinaron por espectroscopía de emisión con plasma de acoplamiento inductivo

(ICP) (OES Thermo ICAP 6000 SERIES®; ThermoElectron Corp., Franklin, MA, EEUU).

El perfil de **ácidos orgánicos** se determinó mediante un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100. El sistema de elución consistió en ácido fosfórico al 0,1% con un caudal de 0,5 mL/min. Los ácidos orgánicos se separaron en una columna Supelcogel TM C-610H (30 cm x 7,8 mm id, Supelco) acoplada a una precolumna Supelguard (5 cm x 4,6 mm, Supelco), y se detectó mediante un detector de diodos a 210 nm.

Para los análisis de **azúcares**, se utilizó el mismo equipo de HPLC, sistema de elución, velocidad de flujo, y las columnas. La detección de los azúcares se llevó a cabo utilizando un detector de índice de refracción (HP 1100, G1362A). Los resultados se expresaron en g/100 mL de peso fresco (fw). Los análisis se realizaron por triplicado.

El contenido de **fenoles totales** (TPC) se determinó por el método del reactivo Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). La extracción se realizó mezclando 5 g de arilos liofilizados con 10 mL de MeOH/H₂O (80:20, v/v) y 2 mM de NaF; a continuación, se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 minutos. Seguidamente, se tomaron 50 mL de la muestra extraída y se mezclaron con 2,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (1:10, v/v), 450 mL de tampón fosfato (pH 7,8) y 2 mL de carbonato sódico (75 g/L). Las muestras se dejaron en un baño de agua caliente a 50°C durante 5 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV-cis (HeliosGamma model, UVG 1002E, Mercers Row, Cambridge, UK). Para la cuantificación se emplearon curvas de calibrado con un rango de concentración de 0 a 25 g de ácido gálico por litro. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por 100 g de peso seco. Los análisis se realizaron por triplicado.

La **actividad antioxidante** se determinó utilizando los métodos *ABTS*•+ y *DPPH*• según la metodología desarrollada por Brand-Williams et al. (1995) y Re et al. (1999). Los ensayos se llevaron a cabo mediante el uso de un espectrofotómetro Uvikon XS de visible-UV (Bio-Tek Instruments, Saint Quentin Yvelines, Francia). Los

resultados se expresaron en mmol de Trolox por kg de materia seca. Los análisis se realizaron por triplicado.

El perfil de **ácidos grasos** se determinó de acuerdo a la metodología desarrollada por Trigueros y Sendra (2015) con ligeras modificaciones. La composición de ácidos grasos FAMES se analizó en un cromatógrafo de gases Agilent (model 6890, Palo alto, CA, USA) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar DB-23 (30 m de largo, 0,25 μ m de espesor de película, 0,25 mm de diámetro interno; J&W Scientific, Agilent Technologies). Los FAMES fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de los estándares de FAMES, y cuantificados a partir del área y su comparación con el área del patrón interno C17:0. Las concentraciones de ácidos grasos en arilos de granada fueron expresadas como porcentaje del total de ácidos grasos y también se cuantificaron unitariamente en mg/100 g de peso seco (dw). Los análisis se realizaron por triplicado.

Además, se realizaron diversas determinaciones, instrumentales y sensoriales, cuyos objetivos fueron determinar la **dureza** de los arilos, especialmente la semilla o parte leñosa. El **test de punción** se empleó para determinar la fuerza necesaria para romper la semilla según la metodología descrita por Martínez-Romero et al. (2002) mediante el empleo de un texturómetro TX-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, UK). Los resultados se expresaron como N/mm. La determinación de la **dureza sensorial** se realizó mediante un panel de catadores entrenados donde se emplearon 8 panelistas (4 mujeres y 4 hombres) de edades comprendidas entre los 25 y 50 años, todos ellos miembros de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Todos los panelistas cuentan con más de 200 horas de experiencia en pruebas descriptivas de alimentos. El panel empleó fundamentalmente dos atributos de textura: dureza sensorial y percepción de la porción leñosa. Para la evaluación de los mismos, se empleó una escala numérica donde 1 representaba dureza o percepción nulas, y 10 extremadamente elevados con un incremento de 0,5. Para la **aceptación de la textura sensorial** se emplearon 30 consumidores habituales de granada del

campus de Orihuela de la Universidad Miguel Hernández (18 mujeres y 12 hombres) con edades de entre 22 y 60 años. Los consumidores fueron preguntados sobre su satisfacción de la dureza y de la percepción de porción leñosa de los arilos de granada. Cada cuestionario contaba con una escala hedónica de 9 puntos donde -4 se refería a "*me disgusta extremadamente*" y +4 a "*me gusta extremadamente*".

Respecto al **tratamiento estadístico**, los datos se analizaron mediante los programas estadísticos SPSS 20.0 para Windows (SPSS Science, Chicago, IL, USA) y Statgraphics Plus 5.0 (Manugistics, Inc., Rockville, MD). Se realizó un análisis estadístico descriptivo básico, seguido de un análisis de la varianza (ANOVA) para las comparaciones de medias. El método utilizado para discriminar medias fue el Test de Rango Múltiple de Fisher de las diferencias mínimas significativas (LSD) a un nivel de confianza del 95,0%. Además, se realizaron análisis multivariantes, en concreto análisis de componentes principales (PCA).



Repositorio-temático Sherpa/Romeo ResearchGate OA Impacto
CiteUlike Dulcinea Mendeley Indicio-calidad Publicación-científica
Difusión-científica Revista-científica
Acceso-abierto Autoarchivo Twitter Repositorio-institucional
LinkedIn Cita Facebook Evaluación-científica Edición-científica

4. PUBLICACIONES



PUBLICACIÓN 1

Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing

Francisco Alcaraz-Mármol, Nallely Nuncio-Jáuregui, Francisco García-Sánchez, Juan José Martínez-Nicolás, Francisca Hernández

***Scientia Horticulturae* 2017, 219, 152-160
doi: 10.1016/j.scienta.2017.03.008**



PUBLICACIÓN 1: TRANSCRIPCIÓN LITERAL

Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing.

Francisco Alcaraz-Mármol^{a*}, Nallely Nuncio-Jáuregui^b, Francisco García-Sánchez^c, Juan José Martínez^a, Francisca Hernández^a

^a Plant Sciences and Microbiology Department, Miguel Hernandez University, Research Group in Plant Production and Technology. Ctra. Beniel, km 3.2, 03312-Orihuela, Alicante, Spain

^b Food Technology Department, Miguel Hernandez University, Research group in Food Quality and Safety. Ctra. Beniel, km 3.2, 03312-Orihuela, Alicante, Spain.

^c Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS). CSIC. Campus Universitario de Espinardo. Espinardo. 30100. Murcia. Spain.

DOI: 10.1016/j.scienta.2017.03.008

ISSN: 0304-4238

*Corresponding author: Tel. (+34) 966749702; e-mail: alcarazmarmol@ingenieros.com

Abstract

Spain is the main European pomegranate producer. Depending on the characteristics and composition, pomegranate fruits may be intended for fresh consumption, industrial processing or medicinal purposes. Therefore, is important to evaluate the variability of different pomegranate cultivars to gain more knowledge about the potential of these fruits. In terms of physicochemical and functional parameters in pomegranate arils, the highest values and concentration were: crude fiber, 2.85 % (BA1); potassium, 1.19 g 100 g⁻¹ dry weight (PTO5); total sugars, 15.9 and 15.5 g 100 mL⁻¹ (SM and VA1 respectively); total acids, 4.89 g 100 mL⁻¹ (SM); total polyphenol content, 1791 mg GAE 100 g⁻¹ dry weight (BBE1); ABTS, 4.24 mmol Trolox kg⁻¹ fresh weight (MEC); DPPH, 7.74 mmol Trolox kg⁻¹ fresh weight (MO6); seed hardness score, 7.0 (BA1 and BBE1), aril color, intensity 7.0 (WOND and SM) and sensorial score, 3.0 (ME12, MEM, MEC). Significant differences were found among pomegranate cultivars: soft seeds and high sweetness are optimal for fresh consumption; an intense red color and hard seed are optimal for juice processing; high total polyphenol content, antioxidant activity, crude fiber and minerals can be used as a functional food. Pomegranate cultivars can be considered as a source of fiber and natural antioxidants to develop functional foods.

Keywords:

Arils

Seeds

Antioxidant activity

Total polyphenols

Sugars

Organic acids

1. INTRODUCTION

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is one of the oldest known edible fruit that is grown in subtropical regions where the period of high temperatures coincide with the pomegranate ripening. Nowadays pomegranate has gained importance mainly because of their antioxidant properties which induce health benefits against cancer, cardiovascular and hypertensive diseases etc. (Patel et al., 2008). Spain is the main European pomegranate producer since south-eastern; the best known and commercial varieties are "Mollar de Elche", "Mollar de Valencia" and Wonderful (Melgarejo et al., 2010).

Depending on their characteristics, chemical composition and bioactive compounds the fruit may be intended for fresh consumption, industrial processing or medicinal purposes (Vázquez-Araújo et al., 2014; Nuncio-Jáuregui et al., 2015). Pomegranate fruit composition comprises 50 % edible part which includes 40 % arils and 10 % seeds. In turn, the aril's juice contains 85 % water, 10 % of total sugars, and 1.5 % pectin, ascorbic acid, and phenolic compounds (Viuda-Martos et al., 2010). Additionally, pomegranate is a good source of micro- and macro-nutrients, organic acids and bioactive compounds (Opara et al., 2009). Martínez et al., (2006) classified the pomegranate fruits based on their maturity index [total soluble solids (TSS) / titratable acidity (TA)] as sweet, sour-sweet and sour. The chemical composition of the pomegranate depends mainly on the ripening stage and type of cultivar (Nuncio-Jáuregui et al., 2014). Since Spain, especially the Mediterranean region, is one of the main worldwide pomegranate producers, it is important to know the physico-chemical and functional properties of different genotypes in the area. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the variability in terms of physicochemical and functional properties of twenty different pomegranate genotypes in order to gain more knowledge about the potential of these fruits. The generated information will be useful to select new pomegranate cultivars from those already available in germplasm banks and to decide their suitability for fresh consumption, industrialization or export.

Table 1. Cultivar names, origin and type of pomegranate fruits under study.

Code	Cultivar	Origin	Type
ME14	Mollar de Elche	UMH Germplasm Bank	Sweet
ME12	Mollar de Elche	UMH Germplasm Bank	Sweet
ME17	Mollar de Elche	UMH Germplasm Bank	Sweet
MEM	Mollar de Elche	Commercial, Alicante	Sweet
MEC	Mollar de Elche	Commercial, Alicante	Sweet
MO2	Mollar de Orihuela	UMH Germplasm Bank	Sweet
MO5	Mollar de Orihuela	UMH Germplasm Bank	Sweet
MO6	Mollar de Orihuela	UMH Germplasm Bank	Sweet
MA3	Mollar de Albaterra	UMH Germplasm Bank	Sweet
MA5	Mollar de Albaterra	UMH Germplasm Bank	Sweet
VA1	Valenciana de Albaterra	UMH Germplasm Bank	Sweet
VA6	Valenciana de Albaterra	UMH Germplasm Bank	Sweet
VA11	Valenciana de Albaterra	UMH Germplasm Bank	Sweet
PTO5	Piñón Tierno de Ojós	UMH Germplasm Bank	Sour-sweet
PTO10	Piñón Tierno de Ojós	UMH Germplasm Bank	Sour-sweet
BA1	Borde de Albaterra	UMH Germplasm Bank	Sour
BBE1	Borde de Beniel	UMH Germplasm Bank	Sour
WOND	Wonderful	Commercial, Alicante	Sour
HZ	Hizcaznar	UMH Germplasm Bank	Sour
SM	Smith	Commercial, Alicante	Sour

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material

Twenty pomegranate cultivars were analysed, all with the same state of maturity (**Table 1**). Fruits of sixteen of the pomegranate cultivars were collected from one of the main European Union pomegranate germplasm banks, located at the experimental field station of the Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH) (Alicante, Spain; 02° 03' 50" E, 38° 03' 50" N, and 25 m above sea level). The pomegranate germplasm bank is cultivated under homogeneous conditions. Fruits from the remaining four commercial cultivars were directly collected from local producers in the Murcia area, southern Spain. The harvest of the fruits was conducted from the 2nd week of September to the last week of October in 2013 and in 2014 (there was no significant difference in appearance, size or colour between the two years of harvesting, therefore the two harvests were combined and the results are the average of the two crops). Four trees of each cultivar were selected, and 20 fruits per cultivar every year (that is 5 fruits per tree) were picked according to the ripening stage and avoiding injured fruits in order to prevent skewing of results. After picking, the fruits were immediately transported to the laboratory. The arils from each cultivar were removed from the fruits, to form a homogeneous mixture and three samples were taken from each variety. Based on the maturity index (Martínez et al., 2006), the 20 pomegranate cultivars were classified into three groups: sour (5 samples), sour-sweet (2 samples) and sweet (13 samples).

2.2. Principal morphological parameters

Each pomegranate fruit was carefully cut at the equatorial zone with a sharpened knife, and then, arils were manually extracted. Twenty-five arils were randomly chosen from homogenized sample. Aril weight (A_w), was determined by a precision weighing device (Mettler AJ50), with an accuracy of ± 0.0001 g. The maximum aril length (L_a) and width (W_a) were measured by a digital caliper (Mitutoyo) with ± 0.01 mm accuracy. The moisture percentage of arils (M_a) was determined after being dried in a hot air oven at 60°C until reaching a constant

weight. Seed weight (S_w) was measured using the preceding precision scales; maximum seed length (L_s) and width (W_s) were measured by a digital caliper (Mitutoyo) with 0.01 mm accuracy. Woody portion index (S_i) was determined as following: $S_i = [S_w / W_s] \times 100$. The crude fiber content was determined following the official methodology established by the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAPA, 1993) using an ANKOM200/220 fiber analyzer (ANKOM Technology, Macedon, NY, USA). Results (mean \pm standard error) were the mean of three determinations.

2.3. Quality parameters

2.3.1. Total soluble solids, pH and total titratable acidity

The quality parameters were determined on the juice obtained by squeezing the arils. The juice was filtered through filter paper. The TSS was measured with a digital Atago refractometer (model N-20; Atago, Bellevue, Wash., U.S.A.) at 20 °C with values being expressed as °Brix. The TA and pH was determined by acid-base potentiometer (877 Titrino plus, Metrohm ion analyses CH9101, Herisau, Switzerland), using 0.1 N NaOH up to pH 8.1, values were expressed as g of citric acid L⁻¹. Maturity index (MI), was also calculated for each sample. Results (mean \pm standard error) were the mean of three determinations.

2.3.2. Mineral analysis

The arils were oven-dried at 60 °C for at least 48 h, then were weighed and ground to a fine powder. Later, an acid digestion was carried out with HNO₃:H₂O₂ (5:3, v/v) in a microwave reaching 200 °C in 20 min and holding at this temperature for 2 h (CEM Mars Xpress, North Carolina, USA). The N and C concentration were measured using a Thermo-Finnigan 1112 EA elemental analyzer (Thermo-Finnigan, Milan, Italy). The Na, K, Mg, Ca, P, S, Al, B, Cu, Fe, Mn, Zn concentrations were determined by inductively coupled plasma emission optical spectrometry (Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA). Macronutrients were expressed in g 100 g⁻¹ dw (dry weight) and micronutrients in mg kg⁻¹ dw. Results (mean \pm standard error) were the mean of three determinations.

2.3.3. Organic acids and sugars profile

Organic acids and sugars were quantified according to Melgarejo-Sánchez et al. (2015). The juices obtained by squeezing the arils were centrifuged at 10,000 x g for 20 min (Sigma 3–18K, Osterode and Harz, Germany). Then, 1 mL of supernatant was filtered through a 0.45 µm *millipore* filter and injected into a Hewlett-Packard HPLC series 1100 (Wilmington Del., U.S.A.). The elution buffer consisted of 0.1 % phosphoric acid with a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. Organic acids were isolated using a Supelco column (Supelcogel™ C-610H column 30 cm × 7.8 mm) and Supelguard (5 cm x 4.6 mm, Supelco, Inc., Bellefonte, PA) and absorbance was measured at 210 nm using a diode-array detector (DAD). These same HPLC conditions (elution buffer, flow rate and column) were used for the analysis of sugars. The detection was conducted using a refractive index detector (RID). Standards of organic acids (citric, malic, quinic, shikimic and oxalic acids) and sugars (glucose, fructose and sucrose) were obtained from Sigma (Poole, Dorset, UK). Calibration curves, obtained by triplicate injection of standard solutions, were used for quantification purposes and showed good linearity ($R^2 > 0.999$). Results (mean ± standard error) were the mean of three determinations. Organic acids and sugars were expressed in g 100 mL⁻¹.

2.3.4. Total polyphenol content (TPC)

The TPC was quantified using Folin-Ciocalteu reagent (Singleton, Orthofer and Lamuela-Raventos, 1999). Briefly, freeze-dried arils (0.5 g) were mixed with 10 mL of MeOH/water (80:20, v/v) containing 2 mM NaF and then centrifuged at 15,000 rpm for 15 min. Later, 50 mL of sample were mixed with 2.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (1:10, v/v), 450 mL of phosphate buffer (pH 7.8) and 2 mL of sodium carbonate (75 g L⁻¹). The samples were left in a water bath at 50 °C for 5 min. Absorption was measured at 760 nm using a UV-Visible Spectrophotometer (Helios Gamma model, UVG 1002E, Mercers Row, Cambridge, UK). Calibration curves, with a concentration range between 0 and 0.25 g GAE L⁻¹, were used for the quantification of TPC, and showed good linearity ($R^2 \geq 0.996$). Results (mean ± standard error) were the mean of three determinations. TPC were expressed in mg GAE 100 g⁻¹ dw.

2.3.5. Antioxidant activity (DPPH and ABTS methods)

For the antioxidant activity determination, a methanol extract was prepared with each sample to be analyzed. Freeze-dried arils (0.5 g) were mixed with 10 mL of MeOH/water (80:20, v/v) + 1 % HCl, sonicated at 20 °C for 15 min and left for 24 h at 4 °C. Then the extract was again sonicated for 15 min, and centrifuged at 10,000 x g for 10 min. The radical scavenging activity was evaluated using the DPPH radical (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method, as described by Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995) with a modification in the reaction time. Briefly, 10 µL of the supernatant were mixed with 40 µL of MeOH and added to 950 µL of DPPH solution. The mixture was shaken and placed in a dark room for 15 min. The decrease in absorbance was measured at 515 nm using a UV-Visible Spectrophotometer (Helios Gamma model, UVG 1002E, Merckers Row, Cambridge, UK). Additionally, the ABTS [2, 2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic acid)] radical cation was also employed, according to Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang and Rice-Evans (1999). Briefly, 10 µL of the supernatant were mixed with 990 µL of ABTS. After 10 min of reaction, the absorbance was measured at 734 nm. The absorbance was measured by UV-Vis Uvikon XS spectrophotometer (Bio-Tek Instruments, Saint Quentin Yvelines, France). Calibration curves, in the range 0.5–5.00 mmol Trolox L⁻¹ were used for the quantification of the two methods of antioxidant activity showing good linearity ($R^2 \geq 0.998$). Results (mean \pm standard error) were the mean of three determinations. Antioxidant activity was expressed in mmol Trolox kg⁻¹ fw (fresh weight).

2.4. Sensory seed hardness and visual characteristics

Seven trained panelist (4 female and 3 male) participated in this study. Each panelist evaluated the seed hardness as well as quality overall appreciation of taste and visual color of pomegranate arils. The samples (pomegranate arils/seeds) were served into disposable 25 mL plastic cups for evaluation. Seed hardness was scored on a scale from 1 to 3 (1= soft and 3= hard). The quality (sensorial score) was established according to the following scale: poor, acceptable, good and excellent. Three categories of taste were established: sweet, sour-sweet

and sour. For color evaluation, four categories were established: pink, pink-red, red and deep red (Martínez et al., 2012).

2.5. Statistical analyses

The results were analyzed using SPSS 22.0 program for Windows (SPSS Science, Chicago, IL, USA). The differences among cultivars ($P < 0.05$) were evaluated by analysis of variance (ANOVA). The method used to discriminate among means (Multiple Range Test) was Duncan's test. Principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) were also performed. Cluster analysis was applied to standardized data for hierarchical associations employing Ward's method for agglomeration and the squared Euclidean distance as dissimilarity measure.



3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Physical parameters

Table 2 shows the mean values for the physical parameters of arils and seeds. For the arils A_w were ranging from 267 g (SM) to 497 g (PTO10); the L_a from 9.56 mm (SM) to 12.7 mm (VA6); the W_a from 6.40 mm (SM) to 9.28 mm (VA6) and M_a from 76.3 % (VA11) to 81.6 % (MEM). For the seeds, the S_w ranging from 21.0 mg (MA5) to 51.6 mg (WOND); the L_s from 6.29 mm (MA3) to 7.50 mm (BBE1); the W_s from 2.16 mm (MA5) to 3.45 mm (MO6) and the Si from 4.75 % (MA5) to 15.3 % (SM). The results agreed with Martínez et al. (2006) and Tehranifar et al. (2010). In general, cultivars with the highest values in A_w and Si and simultaneously low values in S_w can be considered optimal for fresh consumption (Vázquez-Araújo et al., 2014).

3.2. Chemical parameters

The mean values of pH, TSS, TA, MI and CF of the juice obtained by manually squeezing arils are shown in **Table 3**. The cultivar type significantly affected ($P < 0.05$) all five parameters. The pH values were ranging from 3.13 (SM) to 6.78 (VA6). Similar trends were found in TSS with values from 15.1 °Brix (SM) to 17.7 °Brix (VA11).

The sour cultivars presented the highest values in TA, especially SM cultivar (19.2 g citric acid L⁻¹). The lowest values were presented by sweet cultivars, especially VA6 cultivar (1.44 g citric acid L⁻¹). The MI has been reported as one of the most reliable indicators of pomegranate fruit maturity and it depends on the cultivar and climatic conditions (Shwartzet et al., 2009; Fawole and Opara, 2013). The sweet cultivar presented a MI values between 67.1- 111, sour-sweet cultivars between 40.2- 66.4 and sour cultivars between 7.85- 21.8. The values of pH, TSS, TA and MI for these cultivars of pomegranate were similar to those reported by Calín-Sánchez et al. (2011) and Nuncio-Jáuregui et al. (2014).

The crude fiber content in the seeds varied from 0.78 % (VA1) to 2.85 % (BA1). These values were similar to those obtained in pomegranate arils from India (Ramulu and Rao, 2003) and Morocco (Martínez et al., 2012).

Table 2. Mean values of principal physical parameters of arils and seeds.

Cultivar	ARILS			
	<i>A_w</i> (g)	<i>L_a</i> (mm)	<i>W_a</i> (mm)	<i>M_a</i> (%)
ME12	364±11bc	11.2±0.20def	7.94±0.13hij	78.9±0.21fg
ME14	399±9de	11.7±0.20hij	8.70±0.14m	79.1±0.03gh
ME17	390±11cde	11.3±0.20efg	6.90±0.15cd	79.3±0.13hi
MEM	392±11cde	11.7±0.20hij	7.88±0.14ghi	81.6±0.04l
MEC	477±10ij	11.9±0.20jk	7.73±0.18fgh	80.4±0.02k
MO2	390±11cde	11.3±0.10efg	8.47±0.13klm	78.8±0.13efg
MO5	464±10hi	11.7±0.20hij	7.48±0.13ef	79.6±0.03ij
MO6	443±8gh	11.8±0.20ij	8.68±0.12lm	78.6±0.06ef
MA3	409±9def	11.1±0.20cde	7.78±0.12fghi	78.4±0.08de
MA5	431±9fg	11.1±0.20cde	6.48±0.16a	78.1±0.29d
VA1	402±11de	11.5±0.20fghi	8.30±0.13jkl	80.6±0.07k
VA6	499±11j	12.7±0.20l	9.28±0.14n	81.2±0.14l
VA11	385±8cd	11.2±0.20def	8.17±0.14ijk	76.3±0.38a
PTO5	439±11gh	10.8±0.10cd	7.99±0.14hij	79.4±0.21hij
PTO10	497±12j	12.3±0.20kl	6.82±0.10bc	79.8±0.06j
BA1	342±11b	10.1±0.10b	6.49±0.09ab	76.8±0.14b
BBE1	418±13efg	11.4±0.20efgh	8.40±0.14klm	77.3±0.11bc
WOND	403±10def	10.6 ±0.10c	7.25±0.17de	77.5±0.1c
HZ	396±10de	10.8±0.20cd	7.50±0.16efg	77.7±0.08c
SM	267±11a	9.56±0.20a	6.40±0.17ab	79.0±0.14fgh

Cultivar	SEEDS			
	S_w (mg)	L_s (mm)	W_s (mm)	Si (%)
ME12	31.3±1.7fgh	6.77±0.18cdef	3.13±0.11ij	8.64±0.44ef
ME14	28.0±0.9cde	6.43±0.17abc	2.96±0.07ghi	7.10±0.23cd
ME17	22.9±0.5ab	6.34±0.09ab	2.23±0.04ab	6.07±0.26b
MEM	29.0±1.3def	6.46±0.14abcd	2.74±0.07ef	7.34±0.30d
MEC	41.2±1.2kl	6.66±0.19bcde	2.63±0.06de	8.77±0.32f
MO2	34.2±1.0hi	6.43±0.12abcd	2.49±0.13cd	8.86±0.28f
MO5	29.0±1.0def	6.59±0.09abcde	2.52±0.07cd	6.22±0.26bc
MO6	34.2±1.1hi	6.79±0.16defg	3.45±0.09k	7.73±0.24cd
MA3	25.2±1.0bc	6.29±0.15a	2.57±0.07cde	6.22±0.27bc
MA5	21.0±0.9a	6.40±0.12ab	2.16±0.06a	4.75±0.16a
VA1	25.4±1.3bc	6.39±0.12ab	2.96±0.06ghi	6.38±0.32bc
VA6	27.0±1.6cde	6.65±0.15bcde	3.13±0.07ij	5.57±0.30ab
VA11	36.6±1.3ij	6.85±0.12efg	3.06±0.09ghij	9.50±0.26f
PTO5	37.3±1.0ij	6.81±0.10defg	2.97±0.06ghi	8.65±0.29ef
PTO10	30.3±0.9efg	7.48±0.12i	2.41±0.05bc	6.20±0.24bc
BA1	32.0±0.9gh	6.65±0.08bcde	2.56±0.04cde	9.49±0.29f
BBE1	47.1±1.5m	7.50±0.11i	3.44±0.08k	11.60±0.55g
WOND	51.6±1.7n	7.08±0.11fgh	3.10±0.05hij	13.05±0.55h
HZ	43.1±1.1l	7.14±0.09ghi	2.88±0.06fg	11.05±0.38g
SM	39.3±1.3jk	7.42±0.10hi	2.92±0.05fgh	15.26±0.57i

Values followed by the same letter within the same column were not significantly different ($P < 0.05$), ($n = 50$). A_w , aril weight; L_a , aril length; W_a , maximum aril width; M_a , aril moisture. S_w , seed weight; L_s , seed length; W_s , maximum seed width; seed index, $Si = (W_s/A_w) \times 100$.

Table 3. Mean values of arils quality parameters.

Cultivar	pH	TSS (°Brix)	TA (g citric acid L ⁻¹)	MI	CF (%)
ME12	6.02±0.19efgh	17.1±0.20fgh	1.86±0.03cde	91.8±2.10gh	1.13±0.05efgh
ME14	6.60±0.38ghi	17.2±0.10ghi	1.71±0.03bc	100.1±1.60i	1.16±0.12fgh
ME17	6.10±0.21efghi	16.9±0.01efg	1.83±0.04cd	92.5±2.30gh	1.29±0.05h
MEM	6.26±0.25ghij	15.4±0.01b	1.54±0.01ab	99.8±0.60i	0.79±0.05ab
MEC	6.20±0.40fghij	16.6±0.01e	1.50±0.09a	111.4±6.70j	0.94±0.05abc
MO2	5.98±0.20efgh	16.9±0.02efg	1.81±0.01c	93.4±0.60h	1.19±0.03gh
MO5	6.37±0.29ghij	16.6±0.10e	2.04±0.03ef	81.4±1.20e	1.14±0.04efgh
MO6	5.79±0.19efg	16.9±0.10efg	2.01±0.05def	84.2±2.30ef	1.04±0.02cdefg
MA3	5.57±0.08ef	17.6±0.20j	2.01±0.05def	87.6±1.70fg	0.99±0.01cde
MA5	5.92±0.21efg	17.4±0.02hij	2.07±0.03f	84.4±0.90ef	1.11±0.03defg
VA1	5.90±0.41efg	15.9±0.10c	2.37±0.03g	67.1±0.50d	0.78±0.01a
VA6	6.78±0.28i	15.3±0.02ab	1.44±0.04a	106.7±2.70j	0.88±0.02abc
VA11	6.66±0.02hi	17.7±0.10j	1.75±0.01c	100.9±0.80i	1.02±0.06cdef
PTO5	4.79±0.12d	16.3±0.01d	4.04±0.04h	40.2±0.40c	1.75±0.11i
PTO10	5.50±0.19e	16.9±0.10efg	2.55±0.03g	66.4±0.30d	0.96±0.05bcd
BA1	4.46±0.08cd	17.1±0.10fgh	17.5±0.12j	9.8±0.10a	2.85±0.05l
BBE1	4.45±0.08bcd	17.1±0.20fgh	17.3±0.05j	9.9±0.10a	2.28±0.02k
WOND	3.89±0.05bc	17.2±0.02ghi	7.89±0.04i	21.8±0.10b	1.13±0.09efgh
HZ	3.82±0.02b	17.5±0.10ij	8.04±0.13i	21.7±0.30b	1.89±0.10ij
SM	3.13±0.08a	15.1±0.01a	19.2±0.17k	7.8±0.10a	2.01±0.02j

Values followed by the same letter within the same column were not significantly different ($P < 0.05$), ($n = 6$). TSS, total soluble solids; TA, titratable acidity; MI = TSS x 10/TA; CF=Crude fiber.

3.3. Mineral composition

The mineral contents in pomegranate fruits are presented in **Table 4A and 4B**. The data clearly shows that potassium (K) was the predominant macro-element in all cultivars, especially in PTO5 cultivar (1.19 g 100 g⁻¹ dw). In general, K is the most abundant and characteristic mineral in pomegranate fruit (KFL, Krueger Food Laboratories, I.N.C., 2012). The results agreed with Ekşi and Özhamamcı (2009) and the AIJN (2012).

Aluminum (Al) was the predominant micro-element in the majority of the cultivars, also, boron (B) and iron (Fe), presented also relatively high contents. In general, the sour-sweet and sour cultivars had the highest amount of macro elements. Previous studies, reported that K and Fe were the most abundant macro and micro-elements, respectively (Mirdehghan and Rahemi, 2007; Gozlekci et al., 2011). According to Nuncio-Jáuregui et al., (2014) the contents of the macronutrients (Ca, Mg, K, and Na) and micro-nutrients (Fe, Zn, Cu, and Mn) in pure pomegranate juice were: 25.3, 27.3, 2492, and 29.5 mg L⁻¹, and 1.03, 1.28, 0.41, and 0.35 mg L⁻¹, respectively. This variation could be attributed to differences in cultivar, plant nutrition, and climate and soil conditions.

Table 4A. Minerals contents in pomegranate arils (**g 100 g⁻¹ dw**)

Cultivar	Macronutrients (g 100 g ⁻¹ dw)					
	Na	K	Mg	Ca	P	S
ME12	0.003±0.000ab	1.077±0.041fghi	0.053±0.003abc	0.020±0.000a	0.170±0.010efg	0.073±0.003de
ME14	0.003±0.001ab	0.867±0.030ab	0.050±0.000abc	0.037±0.003def	0.130±0.006abc	0.050±0.000a
ME17	0.002±0.000a	1.007±0.048cdef	0.060±0.006cd	0.030±0.000bcd	0.163±0.009def	0.057±0.003ab
MEM	0.012±0.001f	1.130±0.032hij	0.060±0.000cd	0.040±0.000ef	0.173±0.007efg	0.067±0.003bcd
MEC	0.008±0.001d	0.920±0.015abc	0.057±0.003bcd	0.037±0.003def	0.150±0.003cde	0.060±0.000abc
MO2	0.004±0.001bc	0.963±0.019bcde	0.057±0.003bcd	0.030±0.000bcd	0.140±0.006bcd	0.057±0.003ab
MO5	0.003±0.000ab	0.927±0.061abc	0.053±0.003abc	0.020±0.000a	0.130±0.006abc	0.057±0.003ab
MO6	0.004±0.001bc	1.050±0.010efghi	0.057±0.003bcd	0.030±0.000bcd	0.157±0.003def	0.060±0.000abc
MA3	0.003±0.00ab	0.953±0.019abcde	0.053±0.003abc	0.030±0.000bcd	0.157±0.003def	0.060±0.000abc
MA5	0.002±0.000a	1.047±0.003efghi	0.060±0.000cd	0.023±0.003ab	0.157±0.003def	0.060±0.000abc
VA1	0.005±0.000c	1.113±0.024ghij	0.067±0.003d	0.037±0.003def	0.177±0.007hi	0.070±0.000cd
VA6	0.005±0.000c	0.940±0.068abcd	0.047±0.003ab	0.033±0.003cde	0.140±0.006bcd	0.057±0.003ab
VA11	0.014±0.001f	0.857±0.035a	0.043±0.003a	0.043±0.003f	0.120±0.006a	0.053±0.003a
PTO5	0.015±0.001fg	1.193±0.007j	0.057±0.007bcd	0.027±0.003abc	0.170±0.010efg	0.067±0.007bcd
PTO10	0.017±0.003g	1.020±0.035cdefg	0.050±0.000abc	0.027±0.003abc	0.123±0.003ab	0.053±0.009a
BA1	0.005±0.001c	1.15±0.007ij	0.067±0.003d	0.037±0.003def	0.177±0.003hi	0.077±0.003de
BBE1	0.004±0.000bc	1.143±0.009hij	0.057±0.003bcd	0.020±0.000a	0.150±0.003cde	0.060±0.000abc
WOND	0.008±0.002d	1.040±0.015defgh	0.057±0.003bcd	0.053±0.003g	0.163±0.007def	0.067±0.003bcd
HZ	0.009±0.001de	0.947±0.012abcde	0.050±0.000abc	0.033±0.003cde	0.130±0.000abc	0.060±0.000abc
SM	0.010±0.001e	1.123±0.088ghij	0.057±bcd	0.033±0.007cde	0.187±0.013i	0.083±0.007e

Values followed by the same letter within the same column were not significantly different ($P < 0.05$), ($n = 6$)

Table 4B. Minerals contents in pomegranate arils (mg 100 g⁻¹ dw)

Cultivar	Micronutrients (g 100 g ⁻¹ dw)				
	Al	B	Cu	Fe	Mn
ME12	49.7±8.90b	17.9±0.40efg	6.24±0.16cde	11.13±0.71abcd	7.83±0.42bcd
ME14	107.2±8.80cd	18.3±0.50efg	5.66±0.27bc	10.45±0.53abc	7.08±0.14abc
ME17	10.0±0.50a	16.6±0.80abcde	5.54±0.19bc	9.95±0.45abc	8.05±0.48cde
MEM	6.2±1.00a	25.9±1.00j	8.24±0.34ghi	18.43±0.57f	9.71±0.22fg
MEC	7.3±1.20a	23.6±0.60hi	4.34±0.10a	10.38±0.25abc	7.73±0.12bcd
MO2	21.1±0.20a	16.8±0.40abcde	7.35±0.14fg	9.76±0.67ab	7.15±0.31abc
MO5	19.2±3.00a	17.4±1.40cdef	5.55±0.51bc	8.35±0.66a	7.19±0.36abc
MO6	156±28.50e	16.9±0.60bcde	5.45±0.24bc	11.64±0.63bcd	7.14±0.29abc
MA3	13.5±1.70a	21.8±0.40h	6.23±0.16cde	9.85±2.03abc	7.38±0.14abc
MA5	15.6±2.60a	18.2±0.20efg	5.91±0.11bcd	8.49±0.55ab	7.70±0.18bcd
VA1	17.5±1.50a	15.6±0.80abc	6.64±0.24def	8.77±0.25ab	7.44±0.14abcd
VA6	23.5±2.50a	17.8±0.40defg	5.75±0.32bcd	8.04±1.16a	6.27±0.34a
VA11	10.9±0.40a	15.1±0.50ab	5.17±0.26ab	14.88±2.74e	6.80±0.39ab
PTO5	11.2±0.60a	15.4±0.30ab	7.56±0.48fgh	9.59±1.22ab	8.57±0.69def
PTO10	14.8±2.30a	15.0±0.40a	6.36±0.27cde	11.66±0.79bcd	6.77±0.30ab
BA1	125.0±9.40d	19.4±0.10g	8.20±0.13ghi	15.02±0.72e	10.0±0.26g
BBE1	89.3±14.10c	18.9±0.10fg	7.50±0.11fgh	13.05±0.31cde	8.20±0.15cde
WOND	25.5±4.00a	25.5±1.20ij	8.37±0.33hi	18.76±0.77f	9.20±0.33efg
HZ	5.6±0.90a	15.9±0.60abcd	7.13±0.12ef	14.01±2.06de	7.85±0.07bcd
SM	21.0±8.60a	17.5±1.10cdefg	8.97±0.98i	18.89±1.28f	9.64±0.20fg

Values followed by the same letter within the same column were not significantly different ($P < 0.05$), ($n = 6$).

3.1. Organic acids and sugars profile

The organic acids and sugars profile determines the sensory attributes of pomegranate juice and contributes to potential health benefits (Aarabi et al., 2008). The results showed significant differences ($P < 0.05$) in the organic acids content of pomegranate fruits between cultivars (**Table 5**). The results agreed with those previously obtained by Melgarejo et al. (2000) Citric acid predominated over malic acid in sour cultivars (BA1, BBE1, WOND, HZ and SM) while the concentration of malic acid was higher in sweet cultivars (ME14, MEC, MO5, MA3 and VA6). Glucose and fructose were the most abundant sugars found in pomegranate fruits. The glucose/fructose ratio presented approximately values of 0.6. The fructose concentration was greater than glucose and is agreeing with those previously reported in the literature (Mena et al., 2011; Fawole et al., 2013). However, the cultivar and/or the agro-climatic effect were evident in other studies in which the glucose content was higher than that of fructose (Hasnaoui et al., 2011).

3.2. Total polyphenol content (TPC)

Polyphenols are secondary metabolites widely distributed in the vegetable kingdom. In fruits, phenolic compounds are responsible for major organoleptic characteristics of foods and beverages, especially color and taste properties, therefore they have an effect on food quality. Significant differences ($P < 0.05$) were found among cultivars in TPC values (**Table 5**). The TPC values ranging from 1283 to 1791 mg GAE 100 g⁻¹ dw). The cultivars with the highest values were: BBE1, VA11 and ME12. TPC concentrations reported in the literature shows that the contents in pomegranate fruits are varied (Mena et al., 2011; Li et al., 2015). This is because the TPC depends on factors such as weather conditions, cultivar type, ripeness, fruit part (rind, membrane, aryl, seed or juice), etc. However, there is no doubt that pomegranate fruits are a good source of polyphenols.

Table 5. Sugar profile and organic acids content (g 100 mL⁻¹), total polyphenols content (TPC, mg GAE 100 g⁻¹ dw), and antioxidant activity by ABTS and DPPH methods (mmol Trolox kg⁻¹ fw) of pomegranate (dry aril and juice).

Cultivar	Glucose	Fructose	Total sugars	Citric	Malic	Quinic	Total acids	TPC	ABTS	DPPH
ME12	5.05±0.02cde	8.85±0.04cdefg	13.9±0.1cde	0.12±0.01ab	0.60±0.03bc	0.41±0.04a	1.14±0.03a	1693±145efg	3.81±0.08gh	6.69±0.06ab
ME14	4.74±0.08bc	8.68±0.03cdef	13.4±0.1cd	0.11±0.00a	0.60±0.03bc	0.40±0.04a	1.11±0.01a	1639±90defg	3.58±0.38fgh	6.72±0.10ab
ME17	4.50±0.23ab	8.41±0.12bcde	12.9±0.4abc	0.11±0.00a	0.58±0.01bc	0.36±0.00a	1.05±0.01a	1544±40cdef	2.77±0.05cde	6.69±0.14ab
MEM	4.57±0.03ab	7.78±0.10ab	12.3±0.1ab	0.12±0.17ab	0.28±0.02a	1.41±0.14c	1.81±0.30abc	1331±89abc	4.06±0.21gh	7.53±0.53cd
MEC	4.78±0.03bcd	8.32±0.06bcd	13.1±0.1cd	0.11±0.00a	0.56±0.01bc	0.57±0.03a	1.24±0.03ab	1283±137a	4.24±0.73h	6.77±0.39ab
MO2	5.27±0.10efg	9.03±0.40efg	14.3±0.4def	0.07±0.03a	0.63±0.02bc	0.43±0.01a	1.12±0.05a	1538±47bcdef	2.72±0.11cde	6.83±0.17ab
MO5	5.00±0.01cde	8.79±0.03cdefg	13.8±0.0cde	0.09±0.00a	0.59±0.00bc	0.48±0.05a	1.16±0.05ab	1609±64defg	2.37±0.14bcd	6.68±0.16ab
MO6	5.26±0.06ef	9.49±0.19ghij	14.7±0.2efg	0.12±0.00a	0.62±0.02bc	0.39±0.01a	1.13±0.02a	1660±20defg	2.94±0.14def	7.74±0.38d
MA3	5.12±0.01cde	9.02±0.03defgh	14.1±0.0def	0.09±0.00a	0.60±0.03bc	0.42±0.02a	1.10±0.01a	1675±70defg	2.99±0.26def	6.99±0.05abc
MA5	5.01±0.05cde	9.03±0.03efg	14.0±0.1def	0.10±0.00a	0.59±0.01bc	0.43±0.0.1a	1.12±0.01a	1521±18bcdef	3.34±0.15efg	6.76±0.11ab
VA1	5.37±0.08efg	10.0±0.23ij	15.4±0.3fgh	0.04±0.00a	0.93±0.02d	1.39±0.03bc	3.07±0.04c	1683±15defg	1.55±0.29a	6.92±0.13abc
VA6	5.21±0.01ef	9.74±0.03hij	15.0±0.0efg	0.06±0.00a	0.64±0.03c	0.31±0.03a	1.01±0.01a	1618±52defg	2.10±0.37bc	6.72±0.19ab
VA11	4.44±0.01ab	8.21±0.03abc	12.6±0.0abc	0.09±0.00a	0.62±0.02bc	0.43±0.04a	1.14±0.02ab	1725±128fg	2.94±0.15def	6.50±0.90ab
PTO5	4.21±0.52a	7.60±0.95a	11.8±1.5a	0.36±0.04b	0.45±0.05abc	0.48±0.08a	1.29±0.17ab	1478±49abcde	3.94±0.22gh	7.01±0.22abc
PTO10	5.18±0.03ef	9.26±0.07fgh	14.0±0.1def	0.34±0.00b	0.58±0.01bc	0.32±0.01a	1.24±0.01ab	1316±14ab	4.22±0.21h	7.08±0.34bcd
BA1	5.02±0.03cde	8.49±0.06cde	13.5±0.1cde	1.90±0.01e	0.35±0.01ab	0.92±0.04abc	3.17±0.06c	1647±38defg	2.31±0.25bcd	6.53±0.17ab
BBE1	5.15±0.02de	8.78±0.05cdef	13.9±0.1cde	1.67±0.01de	0.41±0.01abc	0.69±0.02ab	2.77±0.02bc	1791±61g	1.74±0.05a	6.39±0.18a
WOND	5.54±0.06fgh	9.01±0.08defgh	14.5±0.1def	1.08±0.01c	0.47±0.01abc	0.99±0.03abc	2.55±0.05abc	1463±95abcd	3.84±0.28gh	6.41±0.18ab
HZ	5.65±0.01gh	9.35±0.03fghi	15.0±0.0efg	1.07±0.00c	0.52±0.01abc	0.83±0.00abc	2.42±0.01abc	1679±29defg	2.44±0.31bcd	6.44±0.17ab
SM	5.83±0.02h	10.1±0.04j	15.9±0.1ghi	1.52±0.00de	1.21±0.00e	2.15±0.02d	4.89±0.02d	1600±142defg	2.89±0.38cdef	6.90±0.16abc

Values followed by the same letter within the same column were not significantly different ($P < 0.05$), ($n = 6$).

3.3. Antioxidant activity

Table 5 shows the ABTS and DPPH antioxidant activity. Significant differences were found among cultivars. The ABTS values ranging from 1.55 (VA1) to 4.24 (MEC) mmol Trolox kg⁻¹ fw, while DPPH ranging from 6.39 (BBE1) to 7.74 (MO6) mmol Trolox kg⁻¹ fw. In general, DPPH values are usually higher than those values obtained by ABTS assay (Mena et al., 2011). Factors such as pomegranate cultivars and sample extraction could explain this trend. Moreover, pomegranate antioxidant activity fluctuated depending on the fruit portion processed (Calín-Sánchez et al., 2011). Tzulker et al. (2007) reported that whole pomegranate fruit has an antioxidant activity of approximately 20 times higher than those from arils. The results agree with the antioxidant activity values found previously in the literature which are between 2.51-6.35 TEAC mmol L⁻¹ (Ferrara et al., 2014).

3.4. Sensory seed hardness and visual characteristics

The evaluation of aril characteristics (seed hardness, aril color, taste and sensorial score) by sensory panel is shown in **Table 6**.

In general, sweet cultivars showed the lowest values in seed hardness, whilst sour cultivars the highest. The values of seed hardness were highly correlated with TA, CF and *Si* parameters (0.6852, 0.5845 and 0.5270, respectively). Pomegranate sweet cultivars, especially "Mollar" variety have appropriate sensory attributes for their commercialization as fresh products (soft seeds and high sweetness).

Intense color of arils is a key requirement for juice manufacturing because the heat treatments involved in the processing will drastically reduce the color of the juice (Vazquez Araujo et al., 2014). Aril color was highly correlated with *Si* (0.6990); in these two parameters, the WOND and SM cultivars presented the highest values (color intensity of 7.0). Results in the taste evaluation, agreed with the classification

established previously by Melgarejo et al. (2000). The results in the sensorial score which evaluates the pomegranate quality as poor, acceptable, good and excellent were: (i) good quality~3 for cultivars ME12, MEM, MEC and MA5; (ii) acceptable quality ~2.0 for cultivars ME14, ME17, MO2, MO5, MA3, VA6, VA11, PTO5, SM, MO6 and HZ; (iii) poor quality~1.0 for cultivars VA1, PTO10, BA1, BBE1 and WOND. The results showed that the cultivars with high scores in sensorial taste and with low values of seed hardness are a good option for fresh consumption.

Table 6. Evaluation of aril characteristics (seed hardness, aril color, taste and sensorial score) by sensory panel

Cultivar	seed hardness	aril color	taste	sensorial score
ME12	3.0±0.0b	5.0±0.0e	1.0±0.0a	3.0±0.0c
ME14	1.0±0.0a	2.7±0.3b	1.0±0.0a	2.0±0.0c
ME17	1.0±0.0a	2.0±0.0a	1.0±0.0a	2.0±0.0c
MEM	1.0±0.0a	3.0±0.0c	1.0±0.0a	3.0±0.0d
MEC	1.0±0.0a	3.0±0.0c	1.0±0.0a	3.0±0.0d
MO2	1.7±0.7a	5.0±0.0e	1.0±0.0a	2.0±0.0c
MO5	1.0±0.0a	4.0±0.0d	1.0±0.0a	2.0±0.0c
MO6	1.7±0.7a	6.0±0.0f	1.0±0.0a	1.7±0.3bc
MA3	1.0±0.0a	4.0±0.0d	1.0±0.0a	2.0±0.0c
MA5	1.0±0.0a	4.0±0.0d	1.0±0.0a	2.7±0.3d
VA1	5.0±0.0c	6.0±0.0f	1.0±0.0a	1.0±0.0a
VA6	5.0±0.0c	2.0±0.0a	1.0±0.0a	2.0±0.0c
VA11	5.0±0.0c	5.0±0.0e	1.0±0.0a	2.0±0.0c
PTO5	3.7±0.7b	6.0±0.0f	2.0±0.0b	2.0±0.0c
PTO10	5.0±0.0c	2.0±0.0a	1.0±0.0a	1.0±0.0a
BA1	7.0±0.0c	6.0±0.0f	3.0±0.0d	1.0±0.0a
BBE1	7.0	5.0±0.0e	3.0±0.0d	1.0±0.0a
WOND	5.0±0.0c	7.0±0.0g	2.7±0.3c	1.3±0.3ab
HZ	5.0±0.0c	6.0±0.0f	2.0±0.0b	1.7±0.3bc
SM	5.0±0.0c	7.0±0.0g	2.7±0.3c	2.0±0.0c

Values followed by the same letter within the same column were not significantly different ($P < 0.05$), ($n = 6$).

3.5. Principal components analysis (PCA)

In order of enabling a better and simple visual interpretation of all data for each pomegranate cultivar, four PCs were performed (**Figure 1a-1d**). PC1 and PC2 explained the major percentage in the variability of the samples (64.32 %) (**Table 7**). As show in the map, **Figure 1a** (PC1 and PC2) was characterized by parameters: glucose (SM, HZ and VA1), fructose (VA1), total sugars (VA1 and SM), citric acid (BBE1 and BA1), malic acid (VA1, VA6 and SM), quinic acid (HZ and WOND), total acids (SM, HZ and WOND), ABTS (MEC and MEM), MI (MEC, EM and VA6), CF (BA1 and BBE1), Si (HZ, WOND and BBE1), pH (MEC, MEM and VA6), and TA (HZ, BBE1 and BA1) and explains the 64.32 % of variability. **Figure 1b** (PC1 and PC3) was characterized by parameters: fructose (VA1 and HZ), glucose and total sugars (SM and VA1), malic acid (VA1), citric (BA1 and BBE1), ABTS (MEC and MEM), DPPH (MEM, PTO10 and PTO5), MI (ME17 and ME14), CF (HZ, BA1 and BBE1), TA (BA1) and explains the 59.82 %. **Figure 1c** (PC2 and PC3) was characterized by parameters: glucose (VA6, VA1 and MO6), fructose and total sugars (VA1 and VA6), ABTS (MEM and MEC), DPPH (PTO10), TPC (HZ and MA3), CF (BA1 and BBE1), TSS (VA11 and BBE1) and explains the 32.21 %. **Figure 1d** (PC3 and PC4) was characterized by parameters: glucose (HZ and MA5), ABTS (MEC and PTO10), TPC (BBE1), pH (VA6 and VA1), TSS (HZ) and explains the 20.75 %.

In addition the values of the chemical parameters and the variation associated with each PC were also calculated. Results show that the cumulative proportion of variation is 85.07 %. The PC1 and PC2 presented the highest eigenvalues, thus explaining the greater variability of the data. The **Figure 2** shows the dendrogram of pomegranate cultivars where three main groups were clustered. The first group consisted mostly of sweet cultivars: ME12, ME14, ME17, MO5, MA3, MA5, MO2, VA11,

PTO10, MEC, MO6, VA1, VA6, PTO5 and MEM. The second group consisted mostly of acids cultivars: BA1, BBE1, HZ and WOND. The third group was formed only by SM cultivar. Within the first group, cultivars ME12, ME14, ME17, MO5 and MA3, MA5 were close showing very similar characteristics.

Table 7. Eigenvalues, proportion of variation and eigenvectors associated with each principal component in pomegranates varieties.

Principal components (axes)	1	2	3	4
Eigenvalues	7.35	2.94	2.22	1.10
Cumulated proportion of variation (%)	45.97	64.32	78.17	85.07
Characters	Eigenvectors			
pH	0,32	-0,10	0,14	-0,26
TSS	0,06	0,27	0,39	0,51
TA	-0,34	0,16	-0,04	-0,11
MI	0,33	-0,18	0,04	-0,09
CF	-0,27	0,33	0,05	-0,12
Si	-0,29	0,10	-0,15	0,19
Citric	-0,33	0,22	-0,02	0,03
Malic	-0,14	-0,34	-0,05	0,02
Quinic	-0,25	-0,13	-0,36	-0,23
Total acids	-0,34	-0,04	-0,18	-0,15
Glucose	-0,25	-0,32	0,12	0,31
Fructose	-0,17	-0,47	0,21	0,10
Total sugars	-0,21	-0,43	0,18	0,18
ABTS	0,17	0,01	-0,43	0,51
DPPH	0,13	-0,22	-0,32	-0,16
TPC	-0,13	0,01	0,51	-0,32

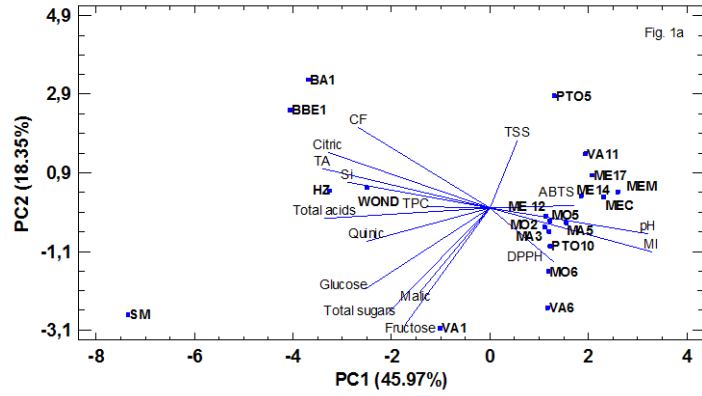


Fig. 1. a–d PCA map showing representative chemical parameters of pomegranate (aril and juice).



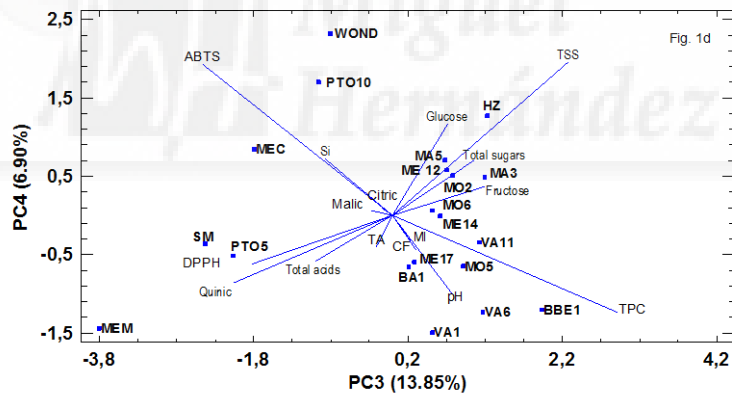
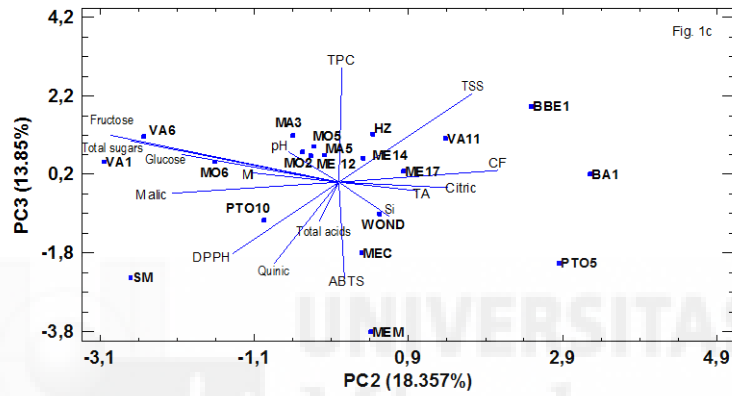
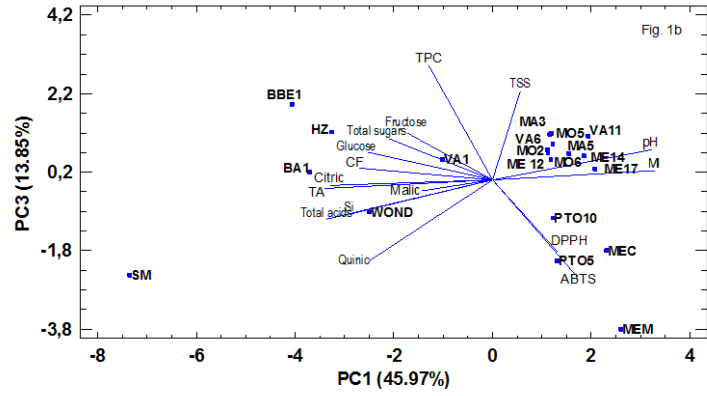


Fig. 1. a–d PCA map showing representative chemical parameters of pomegranate (aril and juice).

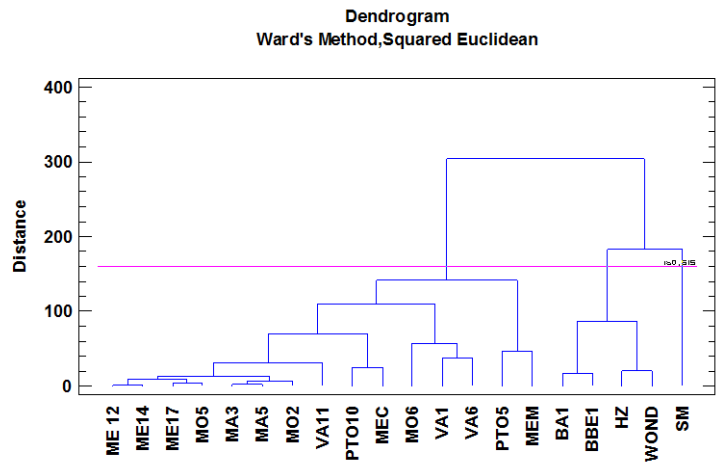


Fig. 2. Dendrogram of pomegranate cultivars using Ward's method based on squared Euclidean distance from chemical parameters.



4. CONCLUSIONS

Physicochemical and functional differences were found among the 20 Spanish pomegranate cultivars. The physicochemical and functional characterization of pomegranate fruits is oriented to the use of each fruit. Cultivars with soft seeds and high sweetness are optimal for fresh consumption (ME12, ME14, MO5 and MA3). Cultivars with an intense red color and hard seed are optimal for juice processing (WOND and SM). Cultivars with high total polyphenol content (BBE1, ME12) and antioxidant activity (MEC, MEM, MO6 and PTO10), crude fiber (BA1 and BBE1) and minerals like potassium (MEM, VA1, BA1 and SM) can be used as a functional food in the field of medical or cosmetic industry. Pomegranate cultivars can be considered as a source of fiber and natural antioxidants to develop or enhance functional foods.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the Project on Genetic Resources, Preservation of Endangered Species: pomegranate and quince. Ref. RFP2012-00009-00-00, funded by INIA-MINECO and FEDER the maintenance of pomegranate tree and quince collection in which this study was performed.

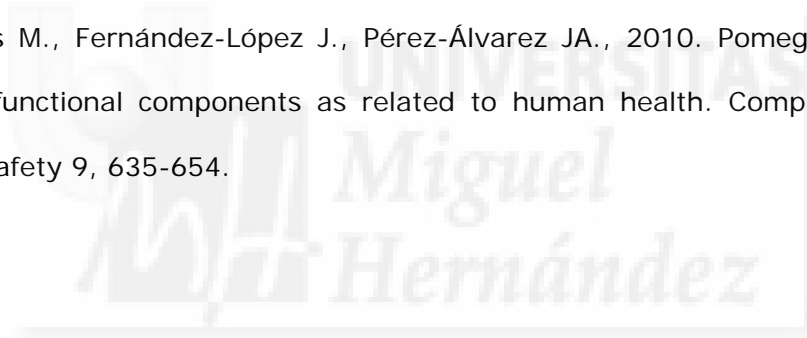
REFERENCES

- Aarabi, A., Barzegar, M., Azizi, M.H., 2008. Effect of Cultivar and Cold Storage of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juices on Organic Acid Composition. ASEAN Food J 15 (1), 45-55.
- AIJN. Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the EEC, 2012. Reference Guide for Pomegranate Juice. AIJN, Brussels.
- Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT- Food Sci. Technol. 28, 25-30.
- Calín-Sánchez A., Martínez JJ., Vázquez-Araújo L., Burló F., Melgarejo P., Carbonell-Barrachina AA., 2011. Volatile composition and sensory quality of Spanish pomegranates (*Punica granatum* L.). J Sci Food Agric 91, 586-592.
- Ekşi A., Özhamamcı I., 2009. Chemical composition and guide values of pomegranate juice. GIDA, 34, 265-270.
- Fawole O A., Opara U L., 2013. Changes in physical properties, chemical and elemental composition and antioxidant capacity of pomegranate (cv. 'Ruby') fruit at five maturity stages. Sci Hortic 150, 37-46.
- Ferrara G., Giancaspro A., Mazzeo A., Giove SL., Matarrese AMS., Pacucci C., Punzi R., Trani A., Gambacorta G., Blanco A., Gadaleta A., 2014. Characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes collected in Puglia region, Southeastern Italy. Sci Hortic 178, 70-78.
- Gozlekci S., Ercili S., Okturen F., Sonmez S., 2011. Physico-chemical characteristics of three development stages in pomegranate cv. 'Hicaznar". Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca 39, 241–245.
- Hasnaoui N., Jbir R., Mars M., Trifib M., Kamal-Eldin A., Melgarejo P., Hernandez Fca., 2011. Organic Acids, Sugars, and Anthocyanins Contents in Juices of Tunisian Pomegranate Fruits. Int J Food Prop 14, 741–757.

- KFL. Krueger Food Laboratories, I.N.C., 2012. Analytical Services for the Food Industry, Composition of Pomegranate Juice. KFL, Massachusetts, USA.
- Li X., Wasila H., Liu L., Yuan T., Gao Z., Zhao B., Ahmad I., 2015. Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis. *Food Chem* 175, 575-584.
- M.A.P.A. 1993. Métodos Oficiales de Análisis. Tomo: I, pp. 344–346.
- Martínez JJ., Melgarejo P., Hernández F., Salazar DM., Martínez R., 2006. Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. *Sci Hortic* 110 (3), 241-246.
- Martínez JJ, Hernández F, Abdelmajid H, Legua P, Martínez R, El Amine A, Melgarejo P. (2012). Physico-chemical characterization of six pomegranate cultivars from Morocco: processing and fresh market aptitudes. *Sci. Hortic*, 140, 100–106.
- Melgarejo P., Salazar DM., Artés F., 2000. Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *Eur Food Res Technol* 211, 185-190.
- Melgarejo P., Hernández F., Legua P., 2010. El Granado. Proceedings of I Jornadas Nacionales sobre el Granado: Producción, Economía, Industrialización, Alimentación y Salud. Universidad Miguel Hernández de Elche, Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Alicante, Spain, pp. 8-37.
- Melgarejo-Sánchez P., José Martínez J., Legua P., Martínez R., Hernández Fca., Melgarejo P., 2015. Quality, antioxidant activity and total phenols of six Spanish pomegranates clones. *Sci Hortic*, 182, 65–72.
- Mena P., García-Viguera C., Navarro-Rico J., Moreno DA., Bartual J., Saura D., Martí N., 2011. Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *J Sci Food Agr*, 91, 1893–1906.

- Mirdehghan SH., Rahemi M., 2007. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Sci Hort* 111, 120-127.
- Nuncio-Jáuregui N., Calín-Sánchez A., Carbonell-Barrachina AA., Hernández Fca., 2014. Changes in quality parameters, proline, antioxidant activity and color of pomegranate (*Punica granatum* L.) as affected by fruit position within tree, cultivar and ripening stage. *Sci Hort* 165, 181-189.
- Nuncio-Jáuregui N., Munera-Picazo S., Calín-Sánchez A., Wojdyło A., Hernández Fca., Carbonell-Barrachina AA., 2015. Potential of pomegranate fruits removed during thinning as source of bioactive compounds. *J Food Compos Anal* 37, 11-19.
- Opara LU., Al-Ani MR., Al-Shuaib YS., 2009. Physico-chemical Properties, Vitamin C Content, and Antimicrobial Properties of Pomegranate Fruit (*Punica granatum* L.). *Food Bioprocess Tech*, 2(3), 315-321.
- Patel C., Dadhaniya P., Hingorani L., Soni MG., 2008. Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol* 46(8), 2728-2735.
- Ramulu P, Rao PU. 2003. Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits, *J Food Compos Anal* 16, 677-685.
- 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 Bio Med*, 26, 1231–1237.
- Shwartz E., Glazer I., Bar-Ya'akov I., Matityahu I., Bar-Ilan I., Holland D., Amir R., 2009. Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions. *Food Chem* 115, 965-973.
- Singleton VL., Orthofer R., Lamuela-Raventos RM., (1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178.

- Tehranifar A., Zareia M., Nematia Z., Esfandiyaria B., Vazifeshenas MR., 2010. Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Sci Hortic* 126, 180–185.
- 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. *J Agric Food Chem* 55, 9559–9570.
- Vázquez-Araújo L., Nuncio-Jáuregui PN., Cherdchu P., Hernández F, Chambers IV E., Carbonell-Barrachina AA., 2014. Use of descriptive sensory analysis to find the best market option for Spanish pomegranates. *Int J Food Sci Tech* 49, 2259-2265.
- Viuda-Martos M., Fernández-López J., Pérez-Álvarez JA., 2010. Pomegranate and its many functional components as related to human health. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 9, 635-654.



PUBLICACIÓN 2

**Determination of fatty acid composition in arils of
20 pomegranates cultivars grown in Spain**

Francisco Alcaraz-Mármol, Nallely Nuncio-Jáuregui, Ángel Calín-Sánchez,
Ángel A. Carbonell-Barrachina, Juan José Martínez-Nicolás, Francisca Hernández

Scientia Horticulturae 2015, 197, 712-718
doi: 10.1016/j.scienta.2017.03.008



PUBLICACIÓN 2: TRANSCRIPCIÓN LITERAL

Determination of Fatty Acid Composition of 20 Pomegranates Cultivars Grown in Spain

Francisco Alcaraz-Mármol¹, Nallely Nuncio-Jáuregui^{2*}, Ángel Calín-Sánchez², Ángel A.
Carbonell-Barrachina², Juan José Martínez¹, Francisca Hernández¹

¹ Universidad Miguel Hernández de Elche. Departamento de Producción Vegetal y Microbiología. Grupo de Fruticultura y Técnicas de Producción. Carretera de Beniel, km 3,2. 03312-Orihuela, Alicante (Spain).

² Universidad Miguel Hernández de Elche. Departamento de Tecnología Agroalimentaria. Grupo Calidad y Seguridad Alimentaria. Carretera de Beniel, km 3,2. 03312-Orihuela, Alicante (Spain).

* **Corresponding author:** pnallelynuncio@gmail.com

DOI: 10.1016/j.scienta.2015.11.004

ISSN: 0304-4238

Abstract

The present study was conducted to determine the fatty acids composition of Spanish pomegranate arils by gas chromatography. Nine fatty acids were identified and quantified in 20 different pomegranate cultivars. The predominant fatty acids were puniic, conjugated linolenic acid (C18:3), oleic (C18:1), linoleic (C18:2), palmitic (C16:0), arachidic (C20:0), and stearic (C18:0). The most abundant fatty acid was puniic acid (*cis*-9, *trans*-11, *cis*-13), characteristic from pomegranate seeds, with concentration ranging from 2509 to 7538 mg per 100 g dried arils; this range was equivalent in terms of percentage of total fatty acid profile, to 59.7 to 74.3 %. The saturated and polyunsaturated acids contents ranged from 3.02 to 6.65 % and from 88.1 to 91.7 %, respectively. The saturated/unsaturated acid ratio (SFA/UFA) ranged from 0.03 to 0.07. Spanish pomegranate fruits, especially sweet cultivars, could be a good source of essential fatty acids such as puniic and conjugated linolenic acids, increasing the health benefits and nutritional potential.

Keywords:

Punica granatum

Puniic acid

Linolenic acid

Polyunsaturated fatty acids

Saturated fatty acids

1. INTRODUCTION

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is one of the oldest known edible fruits. It is an interesting and promising species cultivated around the world, particularly in the Mediterranean area (Lucci et al., 2015). The percentage of arils (edible part of the pomegranate fruit) ranges from 50 to 70% of the total fruit and comprises of 78% juice and 22% seeds (Goula and Adamopoulos, 2012). Seeds (woody portion of arils) in pomegranate fruit are often abundant, although its amount depends on the cultivar, geographical location, growing conditions, maturity stage, etc. In recent decades the scientific interest in pomegranate fruit and seed oil has increased considerably due to potential beneficial effects on human health (Fernández et al., 2015).

Nowadays there is clear evidence that the replacement saturated fatty acids (SFA) by unsaturated fatty acids (UFA) reduces the risk of coronary heart disease (FAO, 2012). Pomegranate oil is particularly rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA), including isomers of conjugated linolenic acids, which have attracted considerable attention because their suggested health benefits on inflammation and some types of cancer (Boussetta et al., 2009). Punicic acid is a PUFA, conjugated of linolenic acid (C18:3, *cis*-9, *trans*-11, *cis*-13). Likewise, puniceic acid is a major component of pomegranate seed oil, which has been reported to inhibit *in vitro* invasion of human prostate cancer cells (Mietkiewska et al., 2014). Gathering further information about the composition of pomegranate seed oil is essential to support development of new products with potential applications in food and cosmetics industries. The main aim of the present study was to determine the composition of the principal fatty acids as well as their identification in 20 of the most representative Spanish pomegranate cultivars.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material and sample processing

Twenty different pomegranate cultivars were collected in September and October 2014. Sixteen cultivars belong to one of the most important European pomegranate gene banks, which is located at the experimental field station of the Miguel Hernandez University in the province of Alicante, Spain (02°03'50"E, 38°03'50"N, and 25 masl). According to the classification established for Spanish pomegranate (Martínez et al., 2006), were:

- sour [*Borde de Albaterra 1 (BA1)*, *Hizcanar (HIZ)*, *Borde de Beniel 1 (BBE1)*],
- sour-sweet [*Piñón Tierno de Ojós 5 (PTO5)*, *Piñón Tierno de Ojós 10 (PTO10)*, and
- sweet [*Mollar de Elche 12 (ME12)*, *Mollar de Elche 14 (ME14)*, *Mollar de Elche 17 (ME17)*, *Mollar de Orihuela 2 (MO2)*, *Mollar de Orihuela 5 (MO5)*, *Mollar de Orihuela 6 (MO6)*, *Mollar de Albaterra 3 (MA3)*, *Mollar de Albaterra 5 (MA5)*, *Valenciana 1 (VA1)*, *Valenciana 6 (VA6)* and *Valenciana 11 (VA11)*].
- Another four cultivars were purchased in the farmer's market of the area: sour: [*Wonderfull (WOND)*, *Smith (SM)*] and sweet: [*Mollar de Elche Mejorada (MEM)*, *Mollar de Elche Comercial (MEC)*].

Fully mature fruits were manually harvested and immediately transported to the Miguel Hernandez de Elche University (UMH) laboratories. Three trees were selected for each cultivar and 15 fruits per cultivar (5 fruits per tree) were randomly picked at the commercially ripe stage for analytical determinations. Each husk was carefully cut at the equatorial zone with a sharpened knife, and then arils were manually extracted. All the arils were oven dried to constant weight and milled.

2.2. Fatty acid extraction

2.2.1. Methylation of fatty acids (FAME)

Fatty acids were *in situ* methylated according to Trigueros and Sendra (2015) with some modifications. Briefly, 0.50 g dried pomegranate arils were transferred into a test tube. The internal standard used was C17:0; the standard was freshly prepared as 20 mg mL⁻¹ solution in HPLC grade *n*-hexane. 30 µL of C17:0 in *n*-hexane solution were added to each tube containing the dried sample. Then, 100 µL of methylene chloride and 1 mL of 0.5 N NaOH in methanol were added and the tubes were heated in a water bath at 90 °C for 10 min. 1 mL of BF₃ in methanol was added and the mixture, and samples were left at room temperature (25 °C) for 30 min to prevent intrasomerization of long chain fatty acids isomers. Later, 1 mL of distilled water and 600 µL of hexane were added, and then FAMEs were extracted by vigorous shaking for about 1 min. Following centrifugation, the aliquots were dried with anhydrous sodium sulphate and the top layer was transferred into a vial, which was flushed with nitrogen, and vials were stored at -20 °C until analyzed by gas chromatography.

2.2.2. Gas chromatography (GC-MS) analysis

Identification and quantification of FAMEs was analyzed according to Carbonell-Barrachina et al. (2015) using a Shimadzu GC-17A gas chromatograph coupled with a Shimadzu QP-5050A mass spectrometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The GC-MS system was equipped with a TRACSIL Meta.X5 column (95 % dimethylpolysiloxane/ 5 % diphenylpolysiloxane, 60 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness; Teknokroma S. Coop. C. Ltd, Barcelona, Spain). Analyses were carried out using helium as carrier gas at a column flow rate of 0.6 mL min⁻¹ in a split ratio of 1:6 and the following program: (a) initial temperature 80 °C for 2 min; (b) rate of 8 °C

min⁻¹ from 80 to 160 °C; (c) rate of 4 °C min⁻¹ from 160 to 240 °C and hold for 30 min. The temperatures of the injector and detector were 230 and 300 °C respectively. A 2 µL aliquot of the extracts was injected.

Most of the FAMES compounds were simultaneously identified using retention indices and GC-MS retention times by comparison with FAME standards from Sigma-Aldrich and quantified using heptadecanoic (C17:0) acid as internal standard. Analysis of FAMES were run in triplicate and the results were expressed as percentage of total fatty acids and also were quantified unitarily in mg *per* 100 g dw.

2.3. Chemicals compounds and reagents

The reagents hexane, methanol, boron trifluoride (BF₃) and the individual standards of palmitic (C16:0), heptadecanoic (C17:0), stearic (C18:0), oleic (C18:1), linoleic (C18:2), linolenic (C18:3) and arachidic (C20:0) acids were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). The reagent methylene chloride was obtained from Labscan, Ltd (Dublin, Ireland); sodium hydroxide and anhydrous sodium sulphate from Panreac (Castellar del Vallès, Barcelona, Spain).

2.4. Statistical analysis

One way analysis of variance (ANOVA) and multiple-range tests were used to evaluate the significance of differences among samples regarding individual fatty acids composition. The method used to discriminate among the means (Multiple Range Test) was Fisher's Least Significant Difference (LSD) procedure. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$. Statistical analyses were performed using SPSS 22.0 for Windows (SPSS Science, Chicago, IL, USA). Principal component analyses (PCA) was also performed using SPSS.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Fatty acid composition of pomegranate fruit

Table 1 shows the fatty acid composition expressed as percentage of the total fatty acid concentration in 20 pomegranate cultivars. Nine fatty acids were identified and quantified in pomegranate fruits. The predominant fatty acids were punicic acid, CLNA1, and CLNA3 (all conjugated linolenic acid, C18:3). The other six fatty acids found in pomegranate seeds were (in decreasing order of abundance): oleic (C18:1), linoleic (C18:2), palmitic (C16:0), CLNA2 (C18:3), arachidic (C20:0), and stearic (C18:0).

For all cultivars analyzed, punicic acid ranged from 59.7 (ME14) to 74.3 (MO2) % of total fatty acid content. These results agreed with those previously found by Kýralan *et al.* (2009) and Lucci *et al.* (2015) who reported a mean content of 73.3 %. Likewise, Hernández *et al.* (2011) reported punicic acid content ranging from 66.7 to 79.2 % in Spanish pomegranates and Fadavi *et al.* (2006) from 55.8 to 86.6 % in Iranian pomegranate cultivars.

The punicic acid content significantly varied depending on cultivar; however, no significant difference was found when analyzing the factor “pomegranate group” (sour, sour-sweet and sweet). **Fig. 1** shows a model chromatogram of fatty acids and their retention times for a sample of the ME17 cultivar. In general, the conjugated linolenic acids (CLNA) including punicic acid, comprised approximately 83.4 % of total identified fatty acids. This is the main reason why pomegranate oil is particularly rich in PUFA (Ferrara *et al.*, 2014). The results agreed with those previously obtained by Goula and Adamopoulos (2012).

Table 1

Fatty acids composition of pomegranate cultivars as percentage of total fatty acid profile.

Cultivar	Type	Palmitic (C16:0)	Linoleic (C18:2)	Oleic (C18:1)	Stearic (C18:0)	Punicic (C18:3)	CLNA1 (C18:3)	CLNA 2 (C18:3)	CLNA 3 (C18:3)	Arachidic (C20:0)
BA1		3.38 [†] ± 0.07 h	5.27 ± 0.11 bc	4.59 ± 0.18 de	0.58 ± 0.01 efg	65.0 ± 2.0 fgh	10.9 ± 0.8 de	2.00 ± 0.09 g	7.65 ± 0.69 c	0.56 ± 0.05 cd
WOND		2.11 ± 0.05 k	3.42 ± 0.05 i	4.07 ± 0.18 f	0.32 ± 0.01 j	63.9 ± 1.9 ghi	13.2 ± 1.0 b	2.88 ± 0.23 def	9.42 ± 0.86 a	0.59 ± 0.02 c
HIZ	sour	2.77 ± 0.08 i	4.06 ± 0.12 gh	5.82 ± 0.02 a	0.44 ± 0.02 i	73.6 ± 0.2 a	7.63 ± 0.17 ij	1.29 ± 0.08 hi	3.87 ± 0.18 gh	0.55 ± 0.01 cd
BBE		2.87 ± 0.02 i	4.23 ± 0.10 fg	4.49 ± 0.06 de	0.49 ± 0.01 h	65.3 ± 0.2 efg	11.8 ± 0.1 cd	3.65 ± 0.01 bc	4.22 ± 0.83 efg	0.37 ± 0.08 h
SM		2.52 ± 0.04 j	5.15 ± 0.09 cd	5.17 ± 0.06 c	0.52 ± 0.01 h	68.2 ± 0.7 cd	9.94 ± 0.22 efg	3.13 ± 0.04 cd	4.90 ± 0.35 defg	0.45 ± 0.01 fgh
PTO5	sour-sweet	3.74 ± 0.03 def	5.19 ± 0.08 cd	5.56 ± 0.01 ab	0.62 ± 0.01 bcd	67.9 ± 0.1 cde	9.58 ± 0.03 fg	2.77 ± 0.08 ef	4.06 ± 0.02 fgh	0.57 ± 0.01 c
PTO10		3.91 ± 0.06 de	4.35 ± 0.08 ef	5.13 ± 0.05 c	0.56 ± 0.01 fg	67.9 ± 0.2 cde	10.3 ± 0.1 ef	2.56 ± 0.04 f	4.79 ± 0.30 defgh	0.41 ± 0.03 gh
MEM		2.87 ± 0.02 i	4.08 ± 0.02 fgh	4.46 ± 0.04 de	0.56 ± 0.02 fg	65.7 ± 0.1 defgh	11.9 ± 0.2 cd	4.25 ± 0.01 a	5.63 ± 0.21 d	0.56 ± 0.02 cd
ME12		3.47 ± 0.04 ef	3.76 ± 0.30 hi	4.36 ± 0.02 def	0.61 ± 0.01 abc	72.7 ± 0.8 ab	8.15 ± 0.18 hij	1.38 ± 0.19 hi	4.95 ± 0.04 def	0.56 ± 0.01 cd
ME14		3.69 ± 0.14 fgh	3.59 ± 0.30hi	4.09 ± 0.27 f	0.44 ± 0.04 i	59.7 ± 2.1 j	14.9 ± 0.8 a	3.73 ± 0.28 b	9.17 ± 0.24 ab	0.57 ± 0.05 de
ME17		5.06 ± 0.04 a	5.67 ± 0.09 ab	5.18 ± 0.03 c	0.67 ± 0.01 a	63.6 ± 0.1 hi	10.5 ± 0.2 ef	3.30 ± 0.22 cd	5.11 ± 0.20 de	0.92 ± 0.02 a
MEC		2.78 ± 0.02 i	3.61 ± 0.02 i	3.63 ± 0.04 g	0.58 ± 0.01 efg	67.2 ± 0.3 def	11.8 ± 0.1 cd	4.57 ± 0.10 a	5.29 ± 0.15 d	0.52 ± 0.03 cdef
MO2	sweet	3.52 ± 0.07 gh	4.5 ± 0.01 ef	4.52 ± 0.01 de	0.64 ± 0.01 abc	74.3 ± 0.7 a	7.13 ± 0.36 j	1.07 ± 0.14 i	3.76 ± 0.22 h	0.48 ± 0.02 defg
MO5		2.91 ± 0.04 i	4.20 ± 0.02 fg	4.35 ± 0.05 def	0.56 ± 0.01 g	73.1 ± 1.1 a	8.17 ± 0.54 hij	1.52 ± 0.24 h	4.66 ± 0.42 defgh	0.47 ± 0.03 efg
MO6		4.48 ± 0.05 b	5.18 ± 0.01 cd	5.44 ± 0.14 bc	0.65 ± 0.01 ab	60.2 ± 0.6 j	12.6 ± 0.3 bc	2.53 ± 0.10 f	8.20 ± 0.08 bc	0.73 ± 0.01 b
MA3		4.19 ± 0.05 c	4.97 ± 0.14 cd	5.63 ± 0.13 ab	0.66 ± 0.03 a	62.1 ± 1.0 ij	12.2 ± 0.4 bc	3.77 ± 0.16 b	5.61 ± 0.19 d	0.84 ± 0.01 a
MA5		3.95 ± 0.05 d	4.78 ± 0.07 de	5.58 ± 0.07 ab	0.61 ± 0.01 cde	66.5 ± 0.6 defg	10.2 ± 0.3 ef	2.78 ± 0.10 ef	4.87 ± 0.12 defg	0.68 ± 0.03 b
VA1		4.41 ± 0.23 bc	5.76 ± 0.36 a	4.66 ± 0.21 d	0.60 ± 0.01 cdef	68.1 ± 0.1 cd	8.83 ± 0.42 ghi	1.44 ± 0.10 hi	5.59 ± 0.23 d	0.55 ± 0.02 cde
VA6		4.19 ± 0.10 c	5.31 ± 0.03 bc	5.77 ± 0.04 a	0.58 ± 0.01 defg	64.5 ± 0.1 ghi	10.6 ± 0.1 def	2.88 ± 0.02 def	5.53 ± 0.05 d	0.55 ± 0.01 cde
VA11		3.81 ± 0.13 de	5.03 ± 0.20 cd	4.30 ± 0.09 ef	0.66 ± 0.01 a	70.1 ± 0.3 bc	8.96 ± 0.06 gh	2.81 ± 0.05 ef	3.78 ± 0.02 h	0.54 ± 0.01 cde
ANOVA[†]		***	***	***	***	***	***	***	***	***
means percentage of fatty acids content by pomegranate type (% means ± sd)										
Sour		2.73 [†] ± 0.15 b	4.42 ± 0.19	4.82 ± 0.17	0.47 ± 0.02 b	67.2 ± 1.1	10.7 ± 0.5	2.59 ± 0.26	6.01 ± 0.44	0.50 ± 0.33 b
Sour-sweet		3.82 ± 0.24 a	4.76 ± 0.30	5.34 ± 0.26	0.59 ± 0.02 a	67.9 ± 1.8	9.96 ± 0.85	2.66 ± 0.42	4.42 ± 0.70	0.48 ± 0.05 b
Sweet		3.79 ± 0.09 a	4.65 ± 0.11	4.76 ± 0.10	0.60 ± 0.01 a	66.7 ± 0.7	10.4 ± 0.3	2.77 ± 0.16	5.54 ± 0.27	0.61 ± 0.02 a
ANOVA[†]		***	NS	NS	***	NS	NS	NS	NS	**

[†] Values are the mean ± standard error. [‡] Values followed by the same letter, within the same column, were not significantly different according to Fisher's least significant difference (LSD) test. [†]NS = not significant F ratio (p < 0.05); **, and ***, significant at p < 0.01, and 0.001, respectively.

Oleic acid ranged from 3.63 (MEC) to 5.82 (HIZ) % and linoleic acid from 3.42 (WOND) to 5.67 (ME17) %. The content in these two acids were similar to those found by Ösgül-Yücel (2005) who reported 3.7 % and 3.3 % of oleic and linoleic acid, respectively. The palmitic acid content ranged from 2.11 (WOND) to 5.06 (ME17) %, stearic acid from 0.32 (WOND) to 0.67 (ME17) % and finally, arachidic acid from 0.37 (BBE) to 0.92 (ME17) %. The content of these three acids agree with the values obtained by Kýralan et al. (2009). Significant differences were found when analyzing the factor “pomegranate group”; the highest values were found in sweet cultivars for stearic, CLNA1, CLNA2, CLNA3 and arachidic acids.

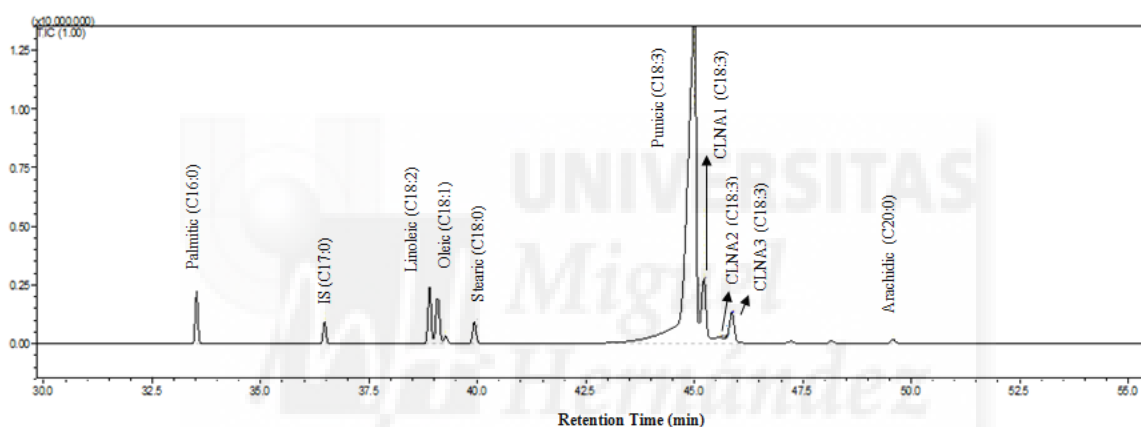


Figure 1. Model chromatogram of fatty acid profile of pomegranate arils (sample of ME17 cultivar).

The total SFA and PUFA content in pomegranate cultivars ranged from 3.02 to 6.65 % and 88.1 to 91.7 %, respectively. Regarding with PUFA concentration (punicic acid and conjugated linolnic acids) the means percentage were 86.5, 84.94 and 85.41% for sour, sour-sweet and sweet cultivars respectively. Jing et al. (2012) reported similar concentration of PUFA (87.0-92 %) and SFA (4.7-6.6 %) in pomegranate seed cultivars from China, being C18:3 the main PUFA, including linolenic and punicic acid.

Unsaturated fatty acids (UFA) were predominant in all pomegranate cultivars (**Table 2**). The high UFA content are highly recommended for human health benefits because they play a natural preventive role in cardiovascular disease and in alleviation of some other health problems such as cholesterolemia (Fadavi et al., 2006). The saturated/unsaturated acid ratio (SFA/UFA) ranged from 0.03 to 0.07. The results showed that this ratio followed the order: sour < sour-sweet = sweet, with the highest ratio being found in ME17 cultivar. These ratios were similar to those previously reported by Fadavi et al. (2006) but lower than those reported by Melgarejo and Artés (2000).

Table 2. Saturated (SFA) and unsaturated (UFA) fatty acids composition of pomegranate cultivars as percentage of total fatty acid profile.

Cultivar	Type	% SFA	% UFA	SFA / UFA
BA1		4.52 ^r ± 0.13 j	95.5 ± 0.3 cdef	0.04 ± 0.01 e
WOND		3.02 ± 0.03 m	96.9 ± 0.1 a	0.03 ± 0.01 g
HIZ	sour	3.76 ± 0.08 kl	96.2 ± 0.1 abc	0.04 ± 0.01 f
BBE		3.73 ± 0.11 kl	93.7 ± 1.3 jk	0.04 ± 0.01 f
SM		3.48 ± 0.03 l	96.5 ± 0.3 ab	0.04 ± 0.02
PTO5	sour-sweet	4.92 ± 0.04 gh	95.1 ± 0.4 ghhi	0.05 ± 0.01 de
PTO10		4.88 ± 0.03 ghi	95.1 ± 0.3 fghi	0.05 ± 0.01 de
MEM		3.98 ± 0.06 k	96.0 ± 0.1 bod	0.04 ± 0.02 f
ME12		4.64 ± 0.05 hij	95.3 ± 0.5 cdef	0.05 ± 0.03 de
ME14		4.70 ± 0.23 hij	95.3 ± 0.2 defg	0.04 ± 0.01 e
ME17		6.65 ± 0.05 a	93.3 ± 0.5 k	0.07 ± 0.01 a
MEC		3.88 ± 0.05 k	96.1 ± 0.5 abcd	0.04 ± 0.02 f
MO2	sweet	4.64 ± 0.05 ij	95.3 ± 0.1 cdef	0.05 ± 0.01 de
MO5		3.94 ± 0.01 k	96.1 ± 0.1 bcd	0.04 ± 0.02 f
MO6		5.86 ± 0.05 b	94.1 ± 0.1ijk	0.06 ± 0.03 b
MA3		5.70 ± 0.08 bc	94.3 ± 0.1hij	0.06 ± 0.01 b
MA5		5.23 ± 0.03 ef	94.7 ± 0.2 ghij	0.05 ± 0.01 bc
VA1		5.55 ± 0.23 cd	94.4 ± 0.1ghij	0.05 ± 0.01 bc
VA6		5.32 ± 0.11 de	94.7 ± 0.1 fghi	0.05 ± 0.01 bc
VA11		5.01 ± 0.13 fg	95.0 ± 0.1 ghij	0.05 ± 0.01 cd
ANOVA[†]		***	***	***
means SFA and UFA content by pomegranate type (% means ± sd)				
Sour		3.70 ^r ± 0.18 b	95.8 ± 0.25 a	0.04 ± 0.02 b
Sour-sweet		4.90 ± 0.29 a	95.1 ± 0.40 ab	0.05 ± 0.01 a
Sweet		5.01 ± 0.11 a	94.9 ± 0.15 b	0.05 ± 0.01 a
ANOVA[†]		***	*	***

[†]Values are the mean ± standard error. [‡]Values followed by the same letter, within the same column, were not significantly different according to Fisher's least significant difference (LSD) test. [†]NS = not significant F ratio ($p < 0.05$); *, **, and ***, significant at $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively.

3.2. Fatty acid content in pomegranate fruit

Table 3 shows the fatty acid content expressed in mg *per* 100 g of dried pomegranate arils. The main fatty acid was puniceic acid, which concentration ranged from 2509 (MO6) to 7538 (ME17) mg *per* 100 g dw. The ranges for the remaining fatty acids found in the pomegranate seed oil were:

- CLNA1 acid, from 348 (VA1) to 1177 (WOND) mg *per* 100 g dw,
- CLNA3 acid, from 221 (VA1) to 837 (WOND) mg *per* 100 g dw,
- oleic acid, from 240 (SM) to 570 (ME17) mg *per* 100 g dw,
- linoleic acid, from 215 (MO6) to 567 (ME17) mg *per* 100 g dw,
- palmitic acid, from 180 (HIZ) to 299 (MA5) mg *per* 100 g dw,
- CLNA2 acid, from 56,7 (VA1) to 407 (MEC) mg *per* 100 g dw,
- arachidic acid, from 20.2 (PTO10) to 179 (BBE) mg *per* 100 g dw,
- stearic acid, from 24.0 (VA1) to 57.0 (ME17) mg *per* 100 g dw.

Significant differences ($p < 0.05$) among cultivars were observed. The factor "pomegranate type" significantly affected the contents of palmitic, stearic, and arachidic acids, with the highest contents being found in sweet cultivars (especially ME17 cultivar). Gil Hernández (2010) in his treatise on nutrition recommends a total fat intake of 35% of total energy; even though there is no specific information for linolenic or linoleic acids, intake of PUFA should represent about 6.1% and 5.8% of the total intake in men and women (between 19 to 64 years) (EFSA, 2010). Taking into account these facts, the current results showed that 100 g of fresh pomegranate (ME17 cultivar) contains 2.07 g of PUFA. The α -linolenic and linoleic acids are essential fatty acids as they cannot be synthesized by the human organism, due to the lack of "desaturase enzymes" required for their production (Barros et al., 2010). These acids must be obtained by the diet; therefore, the results generated in the present study showed that Spanish pomegranates could be good source of essential fatty acids,

especially punicic and CLNAs acids and could be involved in the prevention of cardiovascular disease or health disorders.



Table 3. Fatty acid content of pomegranate arils (mg per 100 g of dry weight).

Cultivar	Type	Palmitic (C16:0)	Linoleic (C18:2)	Oleic (C18:1)	Stearic (C18:0)	Punicic (C18:3)	CLNA1 (C18:3)	CLNA 2 (C18:3)	CLNA 3 (C18:3)	Arachidic (C20:0)
BA1		238 [†] ± 1 f	370 ± 2 bc	321 ± 8 efgh	40.7 ± 0.3 f	4574 ± 210 ghi	769 ± 46 c	140 ± 3 ef	535 ± 40 bc	39.3 ± 3.2 b
WOND		188 ± 7 g	305 ± 8 efgh	363 ± 20 cdef	29.1 ± 0.5 gh	5710 ± 239 cd	1177 ± 74 a	256 ± 25 c	837 ± 66 a	52.0 ± 1.3 b
HIZ	sour	180 ± 1 g	264 ± 1 hijk	380 ± 11 bcd	29.0 ± 0.6 gh	4797 ± 112 fgh	498 ± 24 ef	84.3 ± 7 ghi	253 ± 18 gh	36.2 ± 1.5 b
BBE		190 ± 8 g	281 ± 17 fghij	298 ± 15 ghi	32.6 ± 2.0 g	4340 ± 191 hij	785 ± 37 c	242 ± 9 cd	286 ± 66 fgh	179 ± 8.2 a
SM		278 ± 1 f	263 ± 1 hijk	240 ± 3 j	30.6 ± 1.3 g	2953 ± 221 mn	484 ± 31 e	154 ± 11 e	236 ± 28 h	42.6 ± 1.8 b
PTO5	sour-sweet	277 ± 13 abc	385 ± 27 b	412 ± 23 bc	45.7 ± 1.9 cdef	5029 ± 278 efg	709 ± 38 cd	206 ± 17 d	301 ± 18 fgh	42.0 ± 2.8 b
PTO10		195 ± 1 g	217 ± 1 k	256 ± 3 ij	28.3 ± 0.8 gh	3399 ± 64 lm	518 ± 19 e	128 ± 10 efg	240 ± 20 h	20.2 ± 1.7 b
MEM		238 ± 8 ef	339 ± 7 bcde	370 ± 13 cde	47.0 ± 2.5 bcde	5460 ± 134 cde	986 ± 40 b	353 ± 9 b	466 ± 5 cd	46.3 ± 2.6 b
ME12		247 ± 13 cdef	270 ± 32 ghij	310 ± 15 gh	43.0 ± 2.3 ef	5171 ± 165 def	581 ± 37 de	100 ± 18 fghi	352 ± 17 efg	40.0 ± 2.1 b
ME14		245 ± 25 ef	240 ± 35 ijk	273 ± 35 hij	30.0 ± 4.8 gh	3911 ± 117 jkl	999 ± 121 b	249 ± 34 cd	607 ± 55 b	38.1 ± 5.7 b
ME17		278 ± 1 ab	567 ± 1 a	570 ± 3 a	57.0 ± 1.3 a	7538 ± 221 a	1095 ± 31 ab	346 ± 11 b	539 ± 28 bc	49.0 ± 1.8 b
MEC		247 ± 5 cdef	322 ± 10 cdefg	323 ± 6 efgh	51.3 ± 1.2 abc	5984 ± 148 c	1047 ± 40 ab	407 ± 20 a	472 ± 27 c	46.3 ± 1.3 b
MO2		246 ± 9 def	317 ± 18 defg	318 ± 19 fgh	45.0 ± 2.9 def	5219 ± 260 def	505 ± 55 e	77.0 ± 14 hi	267 ± 31 gh	34.0 ± 3.4 b
MO5	sweet	268 ± 17 bcd	388 ± 31 b	403 ± 35 bc	52.0 ± 4.6 ab	6733 ± 423 b	766 ± 108 c	142 ± 20 ef	440 ± 72 cde	44.1 ± 5.9 b
MO6		186 ± 4 g	215 ± 7 k	227 ± 13 jk	27.3 ± 0.8 gh	2509 ± 110 n	522 ± 24 e	104 ± 6 fgh	341 ± 8 efg	30.3 ± 1.3 b
MA3		275 ± 12 abcd	327 ± 19 cdef	370 ± 20 cde	43.3 ± 3.2 ef	4064 ± 59 ijk	806 ± 52 c	248 ± 14 cd	369 ± 23 def	55.0 ± 1.7 b
MA5		299 ± 6 a	362 ± 8 bcd	424 ± 21 b	46.3 ± 1.5 bcdef	5042 ± 140 efg	780 ± 51 c	212 ± 19 cd	370 ± 22 def	51.6 ± 3.9 b
VA1		176 ± 16 g	230 ± 23 jk	186 ± 16 k	24.0 ± 1.5 h	2707 ± 108 n	348 ± 25 f	56.7 ± 2 i	221 ± 1 h	21.6 ± 0.3 b
VA6		229 ± 5 f	290 ± 15 efghi	315 ± 12 fgh	31.7 ± 1.4 g	3532 ± 168 kl	583 ± 26 de	157 ± 8 e	303 ± 16 fgh	30.0 ± 1.1b
VA11		294 ± 2 ab	387 ± 1 b	332 ± 8 defg	51.1 ± 1.7 abcd	5439 ± 264 cde	695 ± 35 cd	218 ± 13 cd	292 ± 11 fgh	42.1 ± 2.3 b
ANOVA[†]		***	***	***	***	***	***	***	***	**
means content (mg per 100 g) of fatty acids by pomegranate type (means ± sd)										
Sour		206 [‡] ± 9 b	297 ± 21	320 ± 22	32.4 ± 2.5 b	4474 ± 341	742 ± 62	175 ± 25	429 ± 40	69.9 ± 10.3 a
Sour-sweet		236 ± 15 ab	301 ± 34	334 ± 35	37.0 ± 3.9 ab	4214 ± 539	614 ± 98	167 ± 40	270 ± 63	31.0 ± 16.0 b
Sweet		248 ± 6 a	327 ± 13	340 ± 14	42.2 ± 1.5 a	4870 ± 211	747 ± 38	205 ± 15	387 ± 25	42.6 ± 6.4 b
ANOVA[†]		**	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	*

[†]Values are the mean ± standard error. [‡] Values followed by the same letter, within the same column, were not significantly

different according to Fisher's least significant difference (LSD) test. [†]NS = not significant F ratio ($p < 0.05$); *, **, and ***,

significant at $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively.

3.3. Principal component analysis (PCA)

With the aim of enabling a better and simple visual interpretation of the results and relationships among the pomegranate cultivars (20) and the fatty acids identified (9), a principal component analysis (PCA) was conducted (**Fig. 2**). PCA1 and PCA2 explained 67.0 % of the variability of the samples. The first group of cultivars (negative PCA1 and positive PCA2) included ME14, MO6, MA3, and BA1 pomegranate cultivars; it was characterized by the high contents of conjugated linolenic acid [CLNA1, CLNA2, CLNA3] (C18:3) and arachidic (C20:0) acid. The second group included 5 cultivars, ME17, VA6, Ma5, PTO5, and VA1. In general, this group of pomegranate cultivars was characterized by sweet cultivar type and present high percentages of palmitic (C16:0), linoleic (C18:2), stearic (C18:0), and oleic (C18:1) acids. The third group of cultivars (positive PCA1 and negative PCA2) included PTO10, SM, VA11, ME12, MO2, HIZ, and MO5 and was defined by high percentage of punicic acid (C18:3), especially MO2 cultivar (**Table 1**). The fourth and last group included the cultivars BBE, MEC, MEM and WOND, and no high contents of any of the studied fatty acids were linked to these cultivars.

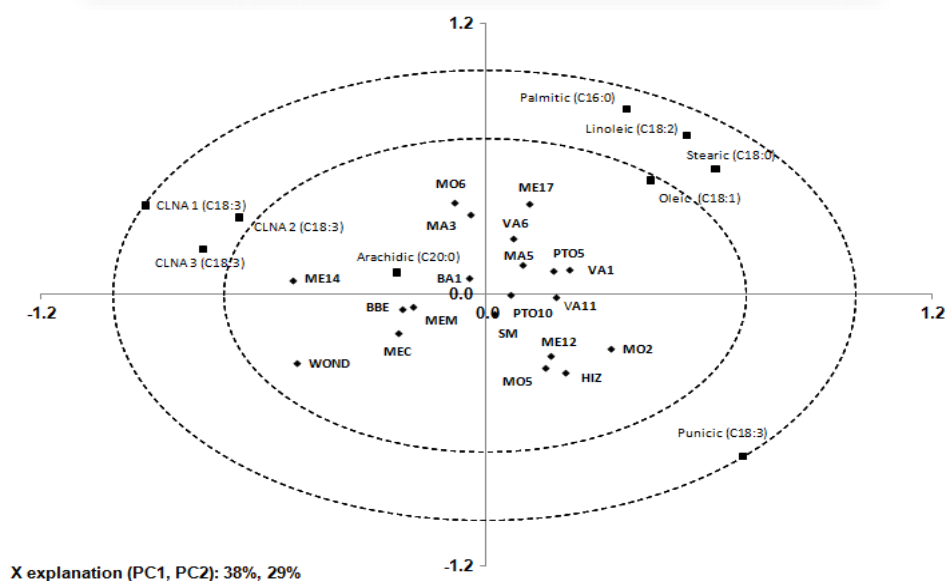


Figure 2. Principal component analysis (PCA1 and PCA2) of pomegranate cultivars.

4. CONCLUSIONS

The results of this study have showed that Spanish pomegranate fruits, especially sweet cultivars, are a good source of essential fatty acids with an important nutritional potential. The most abundant fatty acids were conjugated linolenic acid (C18:3), especially puniceic acid who dominated the fatty acid profile with 67 % of total fatty acids in the studied cultivars. The cultivars ME17, MA5, MO2, MEC, HIZ, and WOND contained the highest contents of fatty acids. These results showed that pomegranate fruits could be considered as a natural source of essential fatty acids, particularly puniceic acid, making this material interesting for food, pharmaceutical, chemical or cosmetic industries.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully to the Project on Genetic Resources, Preservation of Endangered Species: pomegranate and quince. Ref. RFP2012-00009-00-00, funded by INIA MINECO and FEDER the maintenance of pomegranate tree and quince collection in which this study was performed.

REFERENCES

- Barros, L., Carvalho, A.M., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R., 2010. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.* 120 (1), 247–254.
- Boussetta, T., Raad, H., Letteron, P., Gougerot-Pocidalo, M.A., Marie, J.C., Driss, F., El-Benna, J., 2009. Punicic acid a conjugated linolenic acid inhibits TNF α -induced neutrophil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. *Plos One* 4 (7), e6458.
- Carbonell-Barrachina, A.A., Memmi, H., Noguera-Artiaga, L., Gijon-Lopez, M.D., Ciapa, R., Perez-Lopez, D., 2015. Quality attributes of pistachio nuts as affected by rootstock and deficit irrigation. *J. Sci. Food Agric.* 95 (14), 2866–2873.
- EFSA. European Food Safety Authority, 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *J. EFSA* 8 (3), 1461.
- 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. *J. Food Compost. Anal.* 19 (6–7), 676–680.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012. Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an expert consultation. *Food Nutr (FAO)* 91, 1014–2916.
- Fernández, L., Pereira, J.A., López-Cortés, I., Salazar, D.M., Ramalhosa, E., Casal, S., 2015. Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *J. Food Compost. Anal.* 39, 13–22.

- Ferrara, G., Giancaspro, A., Mazzeo, A., Giove, S.L., Matarrese, A.M.S., Pacucci, C., Punzi, R., Trani, A., Gambacorta, G., Blanco, A., Gadaleta, A., 2014. Characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes collected in Puglia region, Southeastern Italy. *Sci. Hortic.* 178, 70–78.
- Gil-Hernández, A., 2010. Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. *Tratado de Nutrición (rústica)*. Panamericana, 2a Ed. 316–319.
- Goula, A.M., Adamopoulos, K.G., 2012. A method for pomegranate seed application in food industries: seed oil encapsulation. *Food Bioprod. Process.* 90 (4), 639–652.
- Hernández, F., Melgarejo, P., Martínez, J.J., Martínez, R., Legua, P., 2011. Fatty acid composition of seed oils from important Spanish pomegranate cultivars. *Ital. J. Food Sci.* 23, 1–6.
- Jing, P., Ye, T., Shi, H., Sheng, Y., Slavin, M., Gao, B., Liu, L., Yu, L., 2012. Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds. *Food Chem.* 132 (3), 1457–1464.
- Kyralan, M., Gölükcü, M., Tokgöz, H., 2009. Oil and Conjugated Linolenic Acid Contents of Seeds from Important Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86 (10), 985–990.
- Lucci, P., Pacetti, D., Loizzo, M.R., Frega, N.G., 2015. *Punica granatum* cv. Dente di Cavallo seed ethanolic extract: antioxidant and antiproliferative activities. *Food Chem.* 167, 475–483.
- Martínez, J.J., Melgarejo, P., Hernández, F., Salazar, D.M., Martínez, R., 2006. Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. *Sci. Hortic.* 110 (3), 241–246.
- Melgarejo, P., Artés, F., 2000. Total lipid content and fatty acid composition of oilseed from lesser known sweet pomegranate clones. *J.Sci. Food Agric.* 80 (10), 1452–1454.

- Mietkiewska, E., Lin, Y., Weselake, R.J., 2014. Engineering production of C18 conjugated fatty acids in developing seeds of oil crops. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3 (1), 44–48.
- Ösgül-Yücel, S., 2005. Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82 (12), 893–897.
- Trigueros, L., Sendra, E., 2015. Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) content in fermented milks as assessed by direct methylation. *LWT—Food Sci. Technol.* 60 (1), 315–319.



PUBLICACIÓN 3

**Classification of pomegranate cultivars according
to their seed hardness and wood perception**

Francisco Alcaraz-Mármol, Ángel Calín-Sánchez, Nallely Nuncio-Jáuregui,
Ángel A. Carbonell-Barrachina, Francisca Hernández, Juan José Martínez-Nicolás

Journal of Texture Studies, 2015, 46, 467-474
doi:10.1111/jtxs.12145



PUBLICACIÓN 3: TRANSCRIPCIÓN LITERAL

Classification of Pomegranate Cultivars according to their Seed Hardness and Wood Perception

Francisco Alcaraz-Mármol¹, Ángel Calín-Sánchez^{2*}, Nallely Nuncio-Jáuregui², Ángel A. Carbonell-Barrachina², Francisca Hernández¹, Juan José Martínez¹

¹ Plant Science and Microbiology Department, University Miguel Hernandez. Research group in Plant Production and Technology. Ctra. Beniel, km 3.2, 03312-Orihuela, Alicante, Spain.

² Food Technology Department, University Miguel Hernandez. Research group in Food Quality and Safety. Ctra. Beniel, km 3.2, 03312-Orihuela, Alicante, Spain.

DOI: 10.1111/jtxs.12145

ISSN: 1745-4603

*Corresponding author: Tel.: (+34) 966749738; fax: (+34) 966749677; E-mail address: acalin@umh.es

Keywords

Consumers, *Punica granatum*, sensory analysis, texture

ABSTRACT

Excessive seed hardness and wood perception will drastically limit consumer acceptance for pomegranate. To classify pomegranate cultivars, easy-to-measure instrumental texture parameters and consumer satisfaction degree were assayed. Twenty pomegranate cultivars (sweet, sour-sweet and sour tastes) with a wide range of seed hardness were used. The instrumental hardness ranged from 9.60 up to 59.5 N/mm, while the wood index ranged from 4.77 to 15.3%. Classifications based on hardness and wood perception agreed quite well; cultivars MA3, ME14, MO5, PTO10 or VA1 were classified as appropriate for fresh consumption while cultivars BO1, HZ and WOND were classified as appropriate for industrialization. Cultivars ME12, MEC, MO2, and VA11 were finally recommended for fresh consumption because the low seed hardness, intermediate wood perception but sweet taste; however, cultivars BA1 and SM were recommended for industrialization because their taste was sour, which is normally not acceptable to consumers. Finally, the cultivar PTO5 can be used for both purposes, as needed.

PRACTICAL APPLICATIONS

Because of market demand, it is important to characterize different pomegranate cultivars, not only to classify them in terms of their beneficial properties, but also to gather information about the effects of texture attributes (seed hardness and wood perception) on consumer acceptance. Regressions of (1) seed hardness and wood perception *versus* descriptive hardness, and (2) descriptive hardness and wood perception *versus* instrumental hardness and wood index, allowed the classification of pomegranate cultivars according to their final use (fresh consumption and/or industrialization, mainly juice manufacturing).

INTRODUCTION

Nowadays, pomegranate has gained popularity due to the number of scientific publications that shown that pomegranate and its juices have antiatherogenic, antioxidant, and antihypertensive effects (Basu and Penugonda, 2009; Nuncio-Jáuregui et al., 2015;). Consequently, the biological and chemical studies are the aim of many researches (Vazquez-Araújo et al., 2014; Nuncio-Jáuregui et al., 2015). Likewise, there is growing interest in this fruit for industrial processing to obtain pomegranate products such as juice, jams food supplements etc. Due to market demand, it is important to characterize different pomegranate cultivars, not only to classify these cultivars in terms of its beneficial properties, but also to know other instrumental parameters such as hardness, wood perception and its comparison with a sensory analysis.

Texture of arils is an important quality parameter in the pomegranate industry (Szychowski et al., 2015). The aril (the edible part of the pomegranate) contains the seed, which are an important portion of the fruit weight, ranging from 40 to 100 g/kg of the fruit (Fadavi et al., 2006). The seeds can be classified according to seed hardness, in three categories: soft, semi-hard and hard (Martínez et al., 2006). Seed hardness is a key sensory attribute for fruit intended for fresh consumption. If the seeds are too hard and thus too difficult to chew, consumer satisfaction can be drastically reduced (Szychowski et al., 2015). Pomegranate for fresh consumption is generally of the soft type, whereas for industry both semi-hard and hard type can be used (Vázquez-Araújo et al., 2014).

Sensory analysis of food is intimately linked to the concept of sensory quality but does not act only in the selection of premium materials, but it is also useful in the control of the manufacturing process, as well as adaptation of the product to its final market (Murray et al., 2001). Recent researches have been reported the relation

between sensory quality and color (Borochoy-Neori et al., 2009) or sensory analysis and aroma profile (Vázquez-Araújo et al., 2011) but there are a few studies which made a comparison of hardness and wood perception with sensory and instrumental data, wherein a correlation between this two analysis has been established.

Therefore, the aim of the study was to determine the fiber content, hardness and wood perception of different Spanish pomegranate cultivars by instrumental and sensory analysis. This study will be used to establish a correlation between instrumental and sensory data (affective and descriptive) in hardness and wood perception. Also, obtain the sensory cutoff point by correlating data of hardness and wood perception generated by an affective consumer panel (satisfaction degree) with a descriptive panel.



TABLE 1. CULTIVAR NAMES, ORIGIN AND TASTE GROUP OF THE POMEGRANATE UNDER STUDY

Code	Cultivar name	Origin	Type
MA3	<i>Mollar de Albatera</i>	UMH Germplasm Bank	Sweet
MA5	<i>Mollar de Albatera</i>	UMH Germplasm Bank	Sweet
ME12	<i>Mollar de Elche</i>	UMH Germplasm Bank	Sweet
ME14	<i>Mollar de Elche</i>	UMH* Germplasm Bank	Sweet
ME17	<i>Mollar de Elche</i>	UMH Germplasm Bank	Sweet
MEC	<i>Mollar de Elche</i>	Commercial, Alicante	Sweet
MEM	<i>Mollar de Elche</i>	Commercial, Alicante	Sweet
MO2	<i>Mollar de Orihuela</i>	UMH Germplasm Bank	Sweet
MO5	<i>Mollar de Orihuela</i>	UMH Germplasm Bank	Sweet
MO6	<i>Mollar de Orihuela</i>	UMH Germplasm Bank	Sweet
VA1	<i>Valenciana de Albatera</i>	UMH Germplasm Bank	Sweet
VA6	<i>Valenciana de Albatera</i>	UMH Germplasm Bank	Sweet
VA11	<i>Valenciana de Albatera</i>	UMH Germplasm Bank	Sweet
PTO5	<i>Piñón Tierno de Ojós</i>	UMH Germplasm Bank	Sour-sweet
PTO10	<i>Piñón Tierno de Ojós</i>	UMH Germplasm Bank	Sour-sweet
BA1	<i>Borde de Albatera</i>	UMH Germplasm Bank	Sour
BBE1	<i>Borde de Beniel</i>	UMH Germplasm Bank	Sour
HZ	<i>Hicaznar</i>	UMH Germplasm Bank	Sour
SM	<i>Smith</i>	Commercial, Alicante	Sour
WOND	<i>Wonderful</i>	Commercial, Alicante	Sour

*Universidad Miguel Hernández de Elche.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and sample processing

Fruits of 16 cultivars were collected from one of the main European Union pomegranate germplasm banks, located at the experimental field station of the Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante, Spain; 02°03'50''E, 38°03'50''N, and 25 m above sea level). Also, fruits from four commercial cultivars (MEC, MEM, SM, and WOND) were directly collected from local producers. Cultivars and codification for the study can be seen in **Table 1**. These 20 cultivars have been classified into three taste categories according to their predominant basic taste: sour (five samples), sour-sweet (two samples) and sweet (13 samples); this design was based on the number of cultivars being cultivated in Spain for each one of these three categories. This classification is based on the maturity index: (1) sour: 5-7; (2) sour-sweet: 17-24, and (3) sweet: 31-98 (Martínez et al., 2006). In the present study the word "seeds" was used to represent only the wood portion of the arils, and the word "arils" was used for the whole seed. All samples were collected at commercial ripening, with total soluble solids (TSS) above 15.0 °Brix (October 2014). Ten fruits, avoiding injured fruits and looking for similar ripening characteristics (size, external color, and TSS), were randomly harvested.

For each cultivar, five fruits were used for instrumental analyses and the other five were used for sensory analyses. Arils were manually extracted, cleaned and thoroughly mixed. For instrumental analyses and from the mixture of five fruits, 25 arils and 25 seeds (manually isolated and cleaned) were randomly selected and used for each one of the instrumental analyses.

Instrumental Analysis

Puncture Test. Puncture Test (Pt; force) was measured using a stainless-steel needle probe P/2N (2 mm thickness) that was applied in the center of the seed. This probe moved at a speed of 0.5 mm/s and caused seed rupture after closed contact with the seed. The parameter evaluated was the maximum force of rupture, obtained through the registry of the curve force versus the time (Martínez-Romero et al., 2002). The results were expressed as the mean of individual determinations in N/mm (n = 25).

Crude Fiber (CF)

The instrumental parameters measured in the seed were as following: crude fiber (CF) contents were determined by a digester, an Ankon fiber analyzer model A220 made in USA, following the official methodology established by the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAPA, 1993).

Wood index (WI)

Wood index (WI) was calculated from the relation between the weight of the seed (g) divided per the weight of the aril (g) and multiply per 100 (Hernández et al., 2014). Both CF and WI are expressed as %. Three repetitions per variety were carried out.

Sensory texture by a trained panel

Eight trained panelists (4 female and 4 male, ages between 25-50 years old) from the Universidad Miguel Hernández de Elche participated in this study. Each of the panelists had more than 200 h of testing experience with a variety of vegetables and fruits, especially pomegranate. The samples (pomegranate arils) were served into disposable 25 mL plastic cups for the evaluation. All samples were served at room temperature. Unsalted crackers and distilled water were used to clean palates

between samples. Three 2 h sessions (one for each replicate) were held for the samples' evaluations over 3 days. All 20 samples were evaluated per session and thus each sample was evaluated in triplicate. The panel used two main texture attributes which were the sensory hardness and the wood perception. For the descriptive evaluation of these two texture attributes, the following definitions, testing techniques, and reference were used:

- Hardness: the degree of force required in the initial bite of a seed with the molars until it deforms or compresses.
 - *Testing technique*: take a seed between the molars and then bite evenly. Evaluate the force required to compress and deform the seed.
 - *Reference*: sunflower seeds= 2.5
roasted peanut= 6.5
roasted almond= 7.5
- Wood perception: sensation of wood remaining in the mouth and/or teeth at the end of the chewing process, which makes swallowing difficult.
 - *Testing technique*: take a seed between the molars and then bite evenly for 4-5 times. Evaluate the amount of wood left and how difficult is to swallow the sample.
 - *Reference*: seedless grapes= 0
Aledo grapes (with seeds)= 3.0

Descriptive sensory analysis: a numerical scale where 1 represents none and 10 extremely strong with 0.5 increments was used. The panelists scored each sample independently and the mean of the three replicates was used for further statistical processes. The testing room was at ~21 °C; the illumination was a combination of natural and non-natural (fluorescent) light.

Sensory texture acceptance

A sample group of 30 consumers was recruited at the Orihuela campus of UMH. The group consisted of 18 women and 12 men aged between 22 and 60 years. Consumers lived in the Communities of Valencia and Murcia and more specifically in the provinces of Valencia, Alicante and Murcia; the main requirement for their recruitment was that they consumed pomegranate fruit during the optimal season for fresh consumption of this fruit. The consumer study was carried out at UMH during three different sessions. In each session, consumers tested 7 cultivars ensuring that the instrumental texture of them cover the full range of the values of this parameter. The order of samples for each consumer was randomized using William's Latin square design. Approximately 5 g samples were served at room temperature, one at a time and with a 5 min gap between samples, along with the appropriate questionnaire. Unsalted crackers and water were provided for palate cleansing between samples. In each questionnaire, consumers were asked, using 9 point hedonic scale [1 (-4) = dislike extremely and 9 (+4) = like extremely] about their overall liking of the sample and their satisfaction degree for the sensory hardness and wood perception attributes.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using SPSS 20 for Windows (SPSS Science, Chicago, IL, USA). A basic descriptive statistical analysis was followed by an analysis of variance (ANOVA) test for mean comparisons. The method used to discriminate among the means (multiple range test) was Tukey's, procedure at a 95.0% confidence level. Correlation analyses between traits to reveal possible relationships were also carried out. Principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) were also performed.

RESULTS AND DISCUSSION

Instrumental Hardness, Crude Fiber and Wood Index

The experimental data on instrumental parameters (IH = instrumental hardness; CF = crude fiber; WI = wood index) of pomegranate arils as affected by cultivar and taste group (sweet, sour-sweet and sour); all instrumental parameters of the arils were affected by both factors (**Table 2**).

TABLE 2. INSTRUMENTAL HARDNESS (IH), CRUDE FIBER CONTENT (CF) AND WOOD INDEX (WI) AND DESCRIPTIVE SENSORY ANALYSIS (DSA) OF POMEGRANATE SEEDS: DESCRIPTIVE HARDNESS (DH) AND DESCRIPTIVE WOOD PERCEPTION (DWP).

Cultivar	Instrumental analysis			Descriptive sensory analysis (DSA)	
	IH (N mm ⁻¹)	CF (%)	WI (%)	DH	DWP
BA1	59.5 d	2.85 f	9.33 fg	9.1 a	9.7 a
BBE1	56.2 d	2.28 e	11.2 hi	10.0 a	9.1 ab
MA3	15.5 ab	0.99 abc	6.16 abc	2.2 cdef	3.8 def
MA5	16.8 ab	1.11 bc	4.77 a	1.3 ef	1.8 f
ME12	20.7 b	1.13 bc	8.60 def	2.8 cdef	3.4 ef
ME14	18.4 ab	1.29 c	7.01 bcd	2.0 cdef	1.4 f
ME17	17.4 ab	1.16 bc	5.90 abc	2.0 cdef	3.0 ef
MO2	13.8 ab	1.19 bc	8.76 ef	0.9 f	1.4 f
MO5	17.8 ab	1.14 bc	6.15 abc	1.4 ef	2.3 ef
MO6	14.9 ab	1.04 abc	7.71 cde	1.5 def	3.1 ef
PTO5	20.6 b	1.75 c	8.51 def	3.8 bc	5.2 cde
PTO10	9.60 a	0.96 ab	6.11 abc	1.7 def	1.8 f
VA1	15.8 ab	0.78 a	6.32 abc	2.6 cdef	6.5 bcd
VA6	18.5 ab	0.88 ab	5.53 ab	3.1 cde	3.1 ef
VA11	19.3 ab	1.02 abc	9.52 fg	2.6 cd	4.4 cde
HZ	36.6 c	1.90 c	11.1 gh	8.1 a	7.2 abc
MEC	12.0 ab	0.94 ab	8.77 def	2.6 cdef	5.0 cde
MEM	16.4 ab	0.79 a	7.34 cde	2.6 cdef	3.8 def
SM	18.5 ab	2.01 de	15.3 j	5.6 b	8.5 ab
WOND	49.1 d	1.13 bc	13.1 i	9.7 a	9.6 a

The values followed by the same letter do not show statistically significant differences

(P < 0.05)

The results for IH obtained from the puncture test varied from 9.60 up to 59.5 N mm⁻¹. The arils of the sour-sweet cultivar PTO10 had the lowest value of IH; sweet cultivars showed very close values to those obtained by sour-sweet cultivars, specially MEC and MO2 with values of 12.0 and 13.8 N mm⁻¹, respectively. On the other hand and far from the values obtained in sour-sweet and sweet cultivars, sour pomegranates showed the highest values of IH. For instance, BBE1 showed values of 56.2 N mm⁻¹, while the highest values were found BA1 with 59.5 N mm⁻¹ of IH.

Similar trend was observed in Oman pomegranates where sour pomegranates showed higher values of hardness compared to those ones obtained in sour-sweet cultivars (Al-Said et al., 2009). Szychowski et al. (2015) reported that sweet Spanish pomegranates are characterized by intermediate values of hardness between sour-sweet and sour types of pomegranates. The significant differences observed can be attributed to both cultivars and type factors (Szychowski et al., 2015).

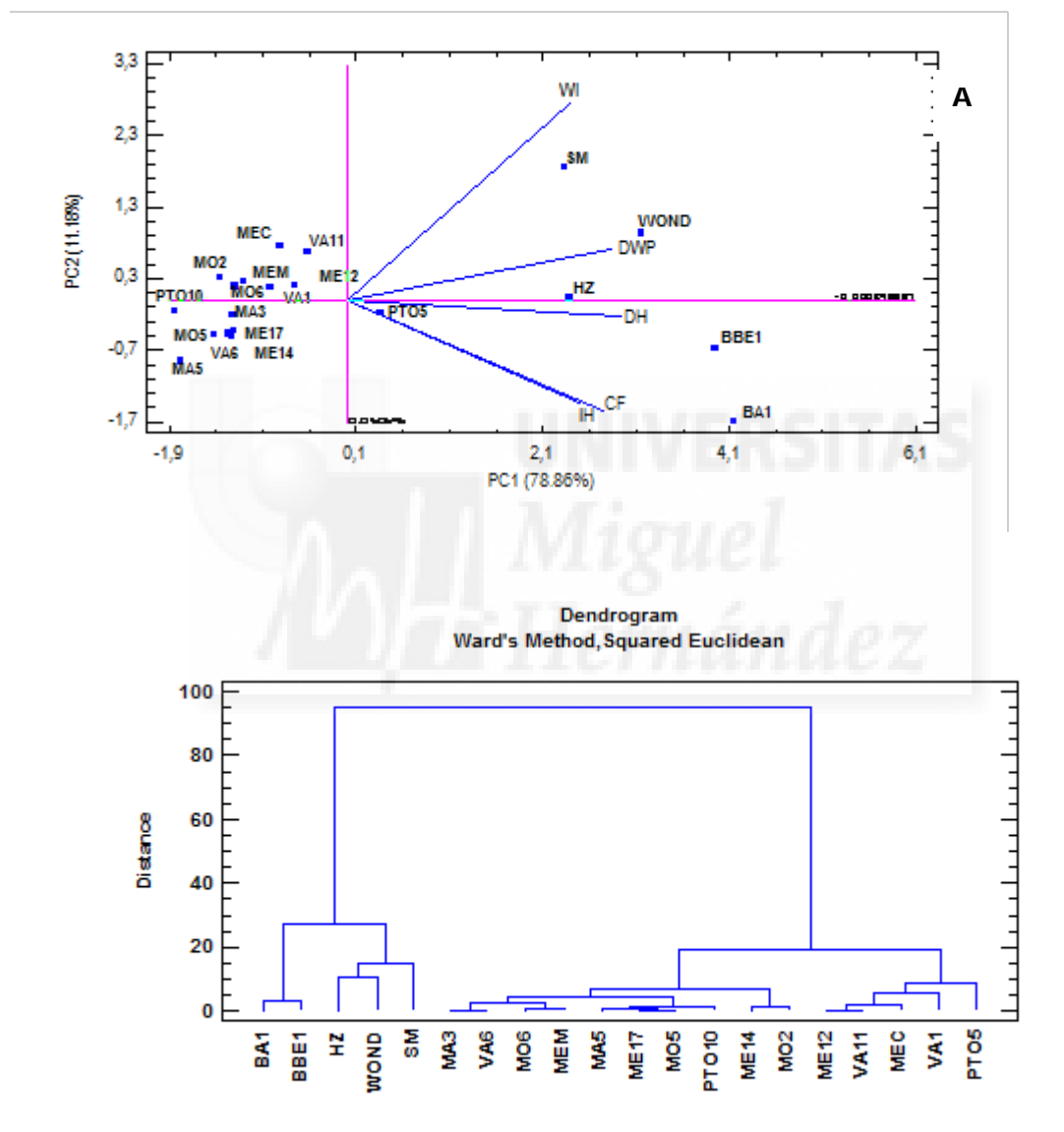
Pomegranate arils contain juice, pulp, and seed which is rich in crude fiber and other compounds interesting for breeders and industry. The WI indicates the proportion of the total weight of the aril comprised by the seed. The CF in the seeds ranged from 0.78% (VA1) up to 2.85% (BA1). These results are in concordance with those obtained in pomegranate cultivars from Morocco (Martínez et al., 2012). As shown in **Figure 1A**, CF was better correlated with IH and DH than with WI and DWP; the coefficients of determination (R^2) for the correlations among CF and IH, DH, DWP, and WI were 0.568, 0.535, 0.435, and 0.296. In this way, the higher the CF content, the higher the IH. Regarding the WI, the values of the current work varied from 4.77% (MA5) up to 11.2 (BBE1). Moroccan and Italian cultivars obtained similar results of WI. In general, instrumental analysis of IH, CF and WI is characterized by a correlation between the higher values of IH with higher values of CF and WI (**Table 2**). The

significant difference obtained among the samples under study can be attributed to both pomegranate cultivars and types.

Descriptive Sensory Analysis

The intensity of descriptive seed hardness (DH), according to the trained panel, ranged between 0.9 and 10.0 for fruits of the cultivars MO2 and BBE1, respectively; with a mean value for the seeds of all studied cultivars of 3.8 (**Table 2**). An initial and intuitive grouping of cultivars can be done: (i) 1st group with intensity of seed hardness ranging from 0 to 4: this group included 15 out of a total of 20 cultivars, (ii) 2nd group, with an intensity between 4.0 and 8.0: this group only included the cultivar SM, and (iii) 3rd group, with an intensity above 8.0: this group included 4 cultivars (BA1, BBE1, HZ, and WOND). This sensory classification was reasonable because it included all *Mollar* cultivars/clones in the group of lowest seed hardness; in fact, *Mollar* is a Spanish term related with the softness of edible products, including pomegranate seeds.

FIG. 1. (A) PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PC1 AND PC2) OF DESCRIPTIVE HARDNESS (DH), INSTRUMENTAL HARDNESS (IH AND CF), DESCRIPTIVE WOOD PERCEPTION (DWP) AND WOOD INDEX (WI) IN TWENTY CULTIVARS OF POMEGRANATE AND (B) CLUSTER ANALYSIS GROUPING OF 20 CULTIVARS OF POMEGRANATE BASED ON DH, IH AND CF, DWP, AND WI



According to our knowledge, this is the first study evaluation the sensory attribute “wood perception”. The intensity of descriptive wood perception (DWP), according to the trained panel, ranged between 1.4 and 9.7 for fruits of the cultivars

MO2 and BA1, respectively; with a mean value for the seeds of all studied cultivars of 4.7. The grouping of cultivars according to this texture attribute was similar to that previously described for seed hardness but with more cultivars being in the intermediate range (PTO10, PTO5, VA1, HZ, and MEC).

Principal components analysis

To achieve a better understanding of the trends and relationships among the studied variables (5) for the different pomegranate samples (20 cultivars), principal component analysis (PCA) was applied. Two principal components were able to explain 90.0 % of the total variation. The first component, PC1, representing 78.86 % of total variance was positively linked to descriptive hardness (DH), descriptive wood perception (DWP), instrumental hardness (IH) and crude fiber (CF) (**Figure 1**), with Eigenvectors values above 0.4. PC2 accounted for 11.18 % of the total variance and was positively correlated with wood index (WI), with an Eigenvector of 0.776 (**Figure 1A**).

SM, WOND, HZ, BBE1 and BA1 cultivars showed the highest positive value for PC1 (**Figure 3**) and was located far from the rest of the cultivars. This fact pointed out that these cultivars were characterized by a high descriptive hardness (DH), instrumental hardness (IH), crude fiber (CF), descriptive wood perception (DWP) and wood index (WI), notably superior to the rest of the cultivars assayed. BBE1 and BA1 cultivars exhibited similar PC1 values. SM cultivar was mainly defined by their high PC2 value, corresponding to high rates of wood portion. Finally, the rest of cultivars formed a cluster (**Figure 1B**) with negative values for PC1 and negative and positive values for PC2, characterized mainly by their low content in wood portion and low hardness. Hence, these cultivars would be those pomegranate fruits more interesting from fresh consumption point of view.

The different hardness of the wood portion can be used by taxonomic tool. Overall, this new classification criterion based on descriptive and instrumental hardness of the seeds of the fruits of pomegranate studied represents valuable information for future consumer's studies.

Classification of pomegranate cultivars

A summary of the protocol that will be followed in the next part of the study is: first affective scores (satisfaction degree) will be used to determine key values of the descriptive texture attributes (hardness and wood perception). Then, these key descriptive intensities will be used to determine the instrumental values of instrumental hardness and wood index. In this way, data from highly complicated and expensive affective tests will be transformed into easy to measure information about instrumental parameters.

Affective tests were conducted to evaluate the satisfaction degree of consumers for seed hardness and wood perception in pomegranate cultivars with different intensities of these two texture attributes. It was almost impossible to conduct affective tests with samples from 20 cultivars. Consequently, 7 cultivars covering whole range of hardness and wood perception (**Table 2**) were chosen; these cultivars were: BA1, ME12, MO2, PTO5, HZ, SM, and WOND. The satisfaction degree associated with the hardness and wood perception of the seeds from these 7 cultivars are shown in **Table 3**. Results can be summarized stating that the harder the seeds, the lowest the satisfaction degree; similarly, the more intense the wood perception, the lowest the satisfaction degree.

Figure 2 shows the relationship among consumer satisfaction on seed hardness and the intensity of seed hardness. The values 0 (neither like nor dislike) and 1 (like slightly) of the satisfaction degree were used to establish 3 classification zones. The

zone above the y -value 1 (zone 1) can be described as that of pomegranate cultivars intended for fresh consumption because their seed hardness is low. On the contrary, the zone below the y -value 0 (zone 3) can be described as that of pomegranate cultivars intended for industrialization because the high intensity of their seed hardness preclude its fresh consumption. Cultivars in the zone 2 can be used for both purposes (fresh consumption or industrialization) as needed. The correlation of the affective and descriptive data showed good linearity ($R^2=0.9277$), and the y -values 1 and 0 corresponded to x -values of 3.5 and 6.4, respectively, for the intensity of descriptive hardness. Taking these values (3.5 and 6.4) into the x -axis of **Figure 3**, these values were equivalent to the approximate values of instrumental hardness (y -axis) 22 and 35 $N\ mm^{-1}$, respectively. In consequence, the proposed classification of the pomegranate cultivars according to objective instrumental values of hardness will be made into the following 3 zones (**Table 4**):

1. *Zone 1 or very soft seeds* (0-22 $N\ mm^{-1}$): fresh consumption.
2. *Zone 2 or intermediate hard seeds* (22-33 $N\ mm^{-1}$): both uses, fresh consumption or industrialization, as needed.
3. *Zone 3 or very hard seeds* (above 33 $N\ mm^{-1}$): industrialization.

FIG. 2. RELATIONSHIPS AMONG (A) DESCRIPTIVE HARDNESS (DH; SCALE FROM 0 TO 10), AND INSTRUMENTAL HARDNESS AND (B) DESCRIPTIVE WOOD PERCEPTION (DWP; SCALE FROM 0 TPO 10) AND WOODY INDEX

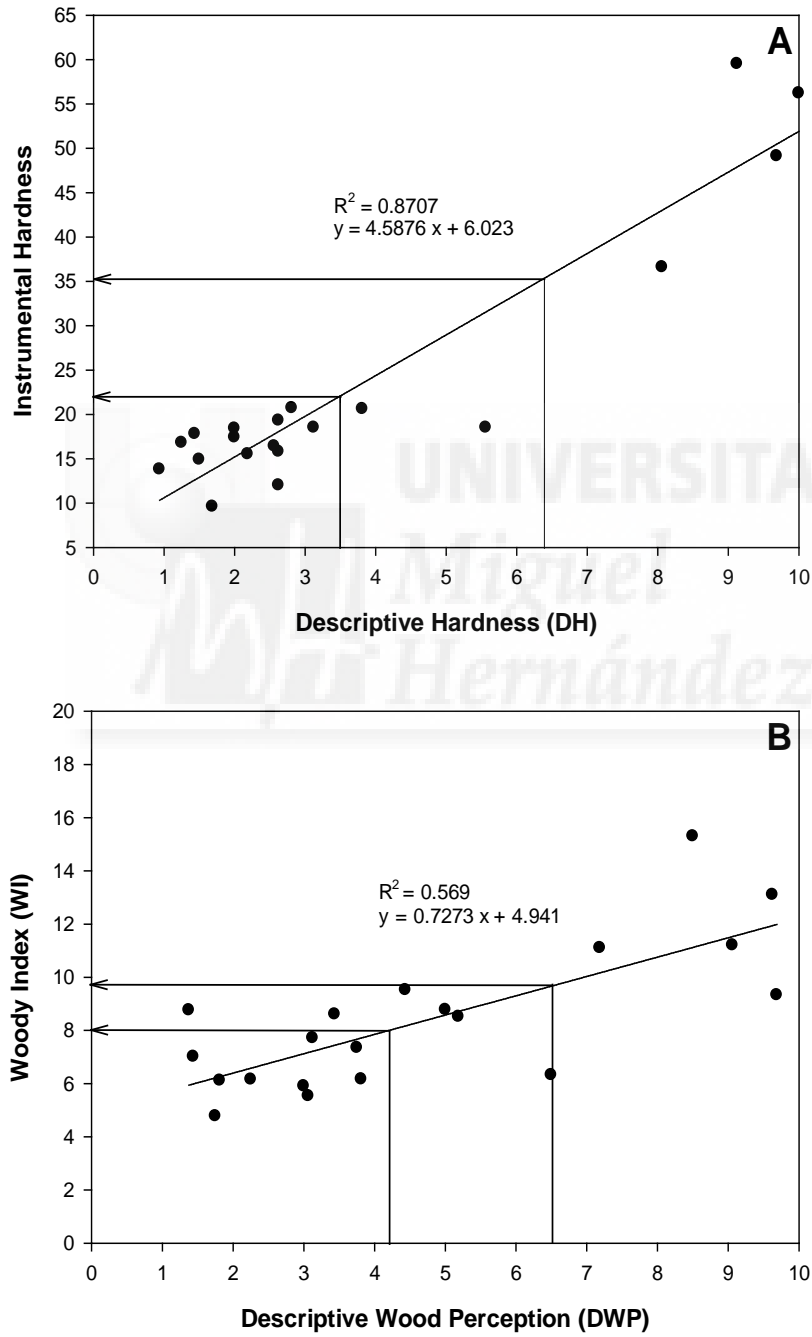
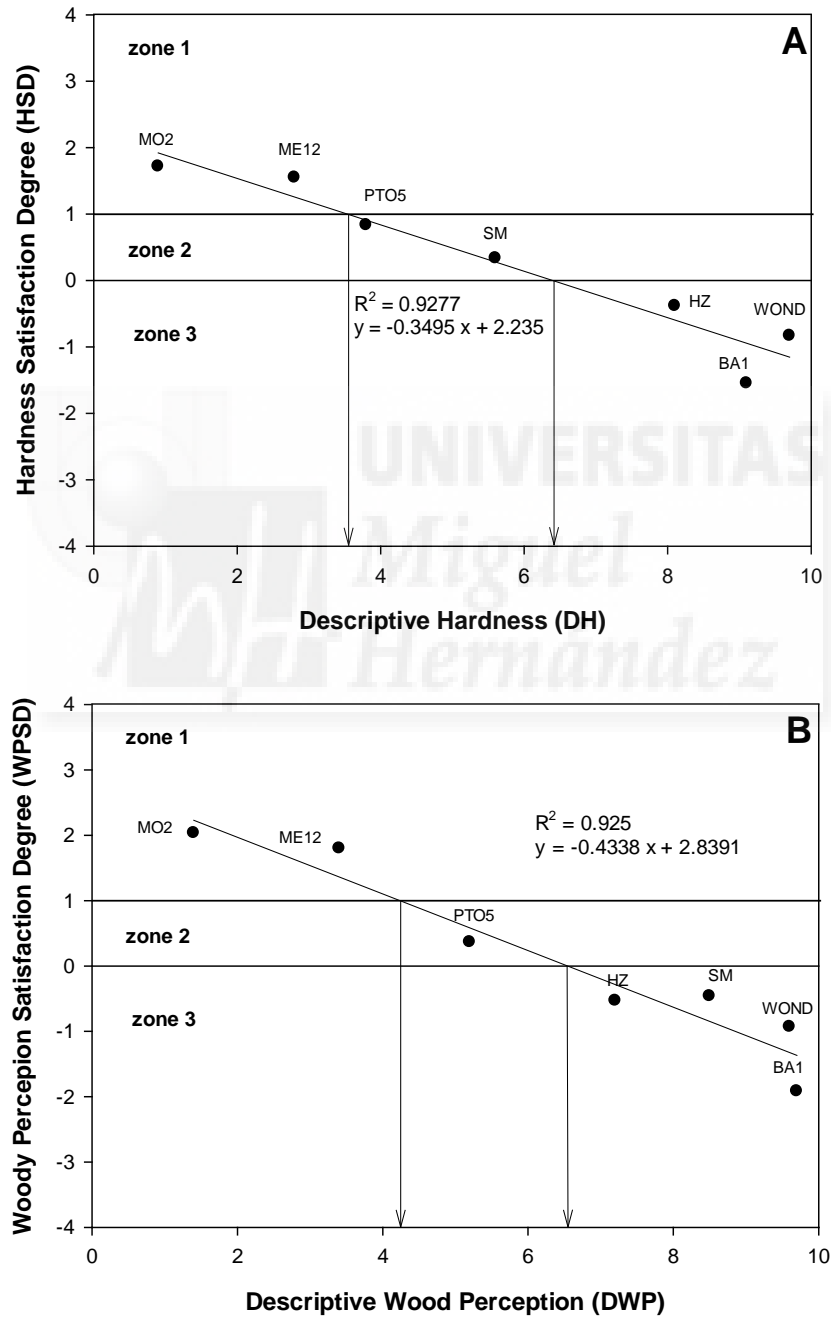


FIG. 3. RELATIONSHIPS AMONG (A) DESCRIPTIVE HARDNESS (DH; SCALE FROM 0 TO 10) AND HARDNESS SATISFACTION DEGREE (HSD; SCALE FROM -4 TO 4) AND (B) DESCRIPTIVE WOOD PERCEPTION (DWP; SCALE FROM 0 TO 10) AND WOOD PERCEPTION SATISFACTION DEGREE (WPSD; SCALE FROM -4 TO 4)



Following the same procedure previously described for hardness, **Figure 2** led to key values of the descriptive wood perception of 4.2 and 6.5 for values 1 and 0 of the affective study (satisfaction degree). Taking these values to the x-axis of **Figure 3** led to values of wood index (y-axis) of 8.0 and 9.7, respectively. Therefore, the proposed classification of the pomegranate cultivars according to the objective instrumental values of wood index will be made into the following 3 zones (**Table 4**):

1. *Zone 1 or low values of WI (0-8.0%)*: fresh consumption.
2. *Zone 2 or intermediate values of WI (8.0-9.7%)*: both uses, fresh consumption or industrialization, as needed.
3. *Zone 3 or high values of WI (above 9.7%)*: industrialization.

TABLE 3. SATISFACTION DEGREE OF CONSUMERS ON HARDNESS OR WOOD PERCEPTION OF POMEGRANATE SEEDS FROM SELECTED CULTIVARS

Cultivar	Affective Test	
	Hardness	Wood perception
BA1	-1.6 c	-1.9 d
ME12	1.6 a	1.8 ab
MO2	1.7 a	2.0 a
PTO5	0.8 ab	0.4 bc
HZ	-0.4 bc	-0.5 cd
SM	0.3 abc	-0.5 cd
WOND	-0.8 bc	-0.9 cd

The values followed by the same letter do not show statistically significant differences (P < 0.05)

The final recommended classification of the studied pomegranate cultivars is summarized in **Table 4**. In most of the cases, the classification based on hardness and wood perception agreed. For instances, the cultivars MA3, MA5, ME14, ME17, MEM, MO5, MO6, PTO10, VA1, and VA6 were classified as appropriate for fresh consumption; on the other hand, the cultivars BO1, HZ, and WOND were classified as appropriate for industrialization, mainly juice manufacture. In general, if the classification of the pomegranate cultivars is different according to the two studied factors “seed hardness” and “wood perception”, it is recommended to also consider the factor “taste” to reach a final decision. The cultivars ME12, MEC, MO2, and VA11 were finally recommended for fresh consumption because the seed hardness was low, the wood perception was intermediate and were sweet. The cultivars BA1 and SM were recommended for industrialization because their seed hardness was low, the wood perception was low or intermediate but were sour, which normally does not like to consumers. All sour cultivars were recommended for industrialization, basically juice manufacturing; however, these pomegranate fruits are too sour to be used alone and mixing with sweet fruits, pomegranate or other type of fruits, is highly recommended. Finally, the cultivar PTO5 can be used for both purposes, as needed; however, our recommendation would be to use it for industrialization because it will add complexity to the juices and there are many other cultivars being recommended for fresh consumption.

TABLE 4. CLASSIFICATION OF CULTIVARS ATTENDING TO THEIR INSTRUMENTAL HARDNESS AND WOOD INDEX

Cultivar Classification				
Code	Hardness (H)	Wood Perception (WP)	Predominant Basic Taste	Global (H-WP)
BA1	Industrialization	Both uses	Sour	Industrialization
BO1	Industrialization	Industrialization	Sour	Industrialization
HZ	Industrialization	Industrialization	Sour	Industrialization
MA3	Fresh consumption	Fresh consumption	Sweet	Fresh consumption
MA5	Fresh consumption	Fresh consumption	Sweet	Fresh consumption
ME12	Fresh consumption	Both uses	Sweet	Fresh consumption
ME14	Fresh consumption	Fresh consumption	Sweet	Fresh consumption
ME17	Fresh consumption	Fresh consumption	Sweet	Fresh consumption
MEC	Fresh consumption	Both uses	Sweet	Fresh consumption
MEM	Fresh consumption	Fresh consumption	Sweet	Fresh consumption
MO2	Fresh consumption	Both uses	Sweet	Fresh consumption
MO5	Fresh consumption	Fresh consumption	Sweet	Fresh consumption
MO6	Fresh consumption	Fresh consumption	Sweet	Fresh consumption
PTO5	Fresh consumption	Both uses	Sour-sweet	Both uses
PTO10	Fresh consumption	Fresh consumption	Sour-sweet	Fresh consumption
SM	Fresh consumption	Industrialization	Sour	Industrialization
VA1	Fresh consumption	Fresh consumption	Sweet	Fresh consumption
VA11	Fresh consumption	Both uses	Sweet	Fresh consumption
VA6	Fresh consumption	Fresh consumption	Sweet	Fresh consumption
WOND	Industrialization	Industrialization	Sour	Industrialization

ACKNOWLEDGEMENTS

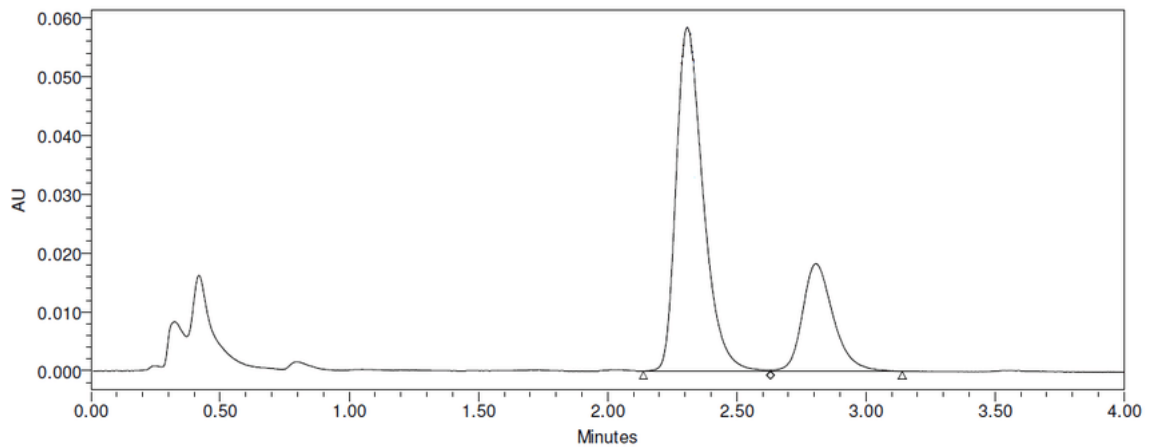
The authors gratefully to the Project on Genetic Resources, Preservation of Endangered Species: pomegranate and quince. Ref. RFP2012-00009-00-00, funded by INIA-MINECO and FEDER the maintenance of pomegranate tree and quince collection in which this study was performed.



REFERENCES

- AL-SAID, F.A., OPARA, L.U., and AL-YAHYAI, R.A. 2009. Physico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in the Sultanate of Oman. *Journal of Food Engineering*, 90, 129-134.
- BASU, A., and PENUGONDA, K. 2009. Pomegranate juice: A heart healthy fruit juice. *Nutrition Reviews*, 67, 49–56.
- BOROCHOV-NEORI, H., JUDEINSTEIN, S., TRIPLER, E., HARARI, M., GREENBERG, A., SHOMER, I., and HOLLAND, D. 2009. Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 189–195.
- FADAVI, A., BARZEGAR, M., and AZIZI, M. H. 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, 676–680.
- HERNÁNDEZ, F., LEGUA, P., MARTÍNEZ, R., MELGAREJO, P., and MARTÍNEZ, J.J. 2014. Fruit quality characterization of seven pomegranate accessions (*Punica granatum* L.) grown in southeast of Spain. *Scientia Horticulturae*, 175, 174-180.
- MAPA. 1993. *Métodos Oficiales de Análisis (In Spanish)*. Tomo I. Pp. 344–346.
- MARTÍNEZ, J.J., HERNANDEZ, F., ABDELMAJID, H., LEGUA, P., MARTÍNEZ, R., EL AMINE, A., and MELGAREJO, P. 2012. Physico-chemical characterization of six pomegranate cultivars from Morocco: processing and fresh market aptitudes. *Scientia Horticulturae*, 140,100-106.
- MARTÍNEZ, J.J., MELGAREJO, P., HERNÁNDEZ, F., SALAZAR, D.M., and MARTÍNEZ, R. 2006. Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. *Scientia Horticulturae*, 110, 241-246.

- MARTÍNEZ-ROMERO, D., SERRANO, M., CARBONELL, A., BURGOS, L., RIQUELME, F., and VALERO, D. 2002. Effects of postharvest putrescine treatment on extending shelf life and reducing mechanical damage in apricot. *Journal of Food Science*, *67*, 1706-1712.
- MURRAY, J. M., DELAHUNTY, C. M., and BAXTER, I. A. 2001. Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food Research International*, *34*, 461- 471.
- NUNCIO-JÁUREGUI, N., NOWICKA, P., MUNERA-PICAZO, S., HERNÁNDEZ, FCA., CARBONELL-BARRACHINA, A. A., and WOJDYŁO, A. 2015. Identification and quantification of major derivatives of ellagic acid and antioxidant properties of thinning and ripe Spanish pomegranates. *Journal of Functional Foods*, *12*, 354–364.
- SZYCHOWSKI, P.J., FRUTOS, M. J., BURLÓ, F., PÉREZ-LÓPEZ, A. J., CARBONELL-BARRACHINA, A. A., and HERNÁNDEZ, F. 2015. Instrumental and sensory texture attributes of pomegranate arils and seeds as affected by cultivar. *LWT - Food Science and Technology*, *60*, 656-663.
- VÁZQUEZ-ARAÚJO, L., KOPPEL, K., CHAMBERS, E., ADHIKARIA, K., and CARBONELL-BARRACHINA, A. A. 2011. Instrumental and sensory aroma profile of pomegranate juices from the USA: differences between fresh and commercial juice. *Flavor and Fragrance Journal*, *26*, 129–138.
- VÁZQUEZ-ARAÚJO, L., NUNCIO-JÁUREGUI, N., CHERDCHU, P., HERNÁNDEZ, FCA., CHAMBERS IV, E., and CARBONELL-BARRACHINA, A. A. 2014. Physicochemical and descriptive sensory characterization of Spanish pomegranates: aptitudes for processing and fresh consumption. *International Journal of Food Science and Technology*, *49*, 1663-1672.



4. RESUMEN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5. RESUMEN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5.1. PUBLICACIÓN 1

Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing

Francisco Alcaraz-Mármol, Nallely Nuncio-Jáuregui, Francisco García-Sánchez, Juan José Martínez-Nicolás, Francisca Hernández

Scientia Horticulturae 2017, 219, 152-160
doi: 10.1016/j.scienta.2017.03.008

El **objetivo** de este estudio fue evaluar la variabilidad en términos de propiedades físico-químicas y funcionales de veinte genotipos diferentes de granada para establecer el verdadero potencial de las mismas en función del destino de los frutos.

5.1.1. Resumen de Resultados y Discusión

En lo que se refiere a los **parámetros físicos** de los arilos, el peso osciló entre 267 g de la variedad SM y los 497 g de la variedad PTO10, la longitud estuvo comprendida entre 9,56 mm y 12,7 mm para las variedades SM y VA6, respectivamente. La anchura del arilo varió entre los 6,40 mm (SM) y los 9,28 mm (VA6). En cuanto a las semillas, su peso estuvo comprendido entre 21,0 mg para MA5 y 51,6 para WOND; su longitud osciló entre 6,29 mm para MA3, hasta 7,50 mm para BBE1, su anchura entre 2,16 mm para MA5 y 3,45 para MO6, y por último, el índice de porción leñosa desde 4,75% hasta 15,3% para las variedades MA5 y SM, respectivamente. En general, las variedades con mayores valores de peso del arilo e índice de porción leñosa y valores bajos de peso de la semilla, son considerados óptimos para el consumo en fresco (Vázquez-Araújo et al., 2014).

En cuanto a los **parámetros químicos** de los arilos se observó un aumento de pH desde 3,13 (SM) hasta 6,78 (VA6), así como una tendencia similar en los sólidos solubles totales, donde los valores oscilaron entre 15,1 °Brix para SM hasta 17,7 °Brix para VA11. En general, las variedades agrias presentaron los mayores valores

de acidez titulable (19,2 g de ácido cítrico/L para SM), mientras que los menores valores fueron obtenidos en variedades dulces como VA6 con 1,44 g de ácido cítrico/L, asimismo, las variedades dulces presentaron mayores valores del índice madurez frente a los valores obtenidos en variedades dulces y agridulces. En cuanto al contenido en fibra de las semillas, se observó una variación desde 0,78% para VA1 hasta 2,85% para BA1.

Los datos obtenidos para los **minerales** mostraron claramente que el K fue el macroelemento que se presentó de manera mayoritaria especialmente en la variedad PTO5 (1,19 g/100 de peso seco). En cuanto a los microelementos, el Al fue el predominante seguido de B y Fe. En general, los cultivares agridulces y agrios presentan las mayores cantidades de macroelementos. Diversas investigaciones han demostrado que tanto el K como el Fe son los macro y microelementos, respectivamente, que se presentan en mayor cantidad en la granada (Mirdehghan y Rahemi, 2007; Gozlekci et al., 2011).

El **ácido orgánico** predominante en las variedades agrias fue el ácido cítrico (BA1, BBE1, WOND, HZ y SM), mientras que la concentración de ácido málico fue el mayoritario en las variedades dulces (ME14, MEC, MO5, MA3 y VA6). En relación a los **azúcares**, la glucosa y la fructosa fueron los mayoritarios, y el ratio glucosa/fructosa estuvo en torno a 0,6. La concentración de fructosa fue mayor que la de glucosa, valores que están de acuerdo con los obtenidos por Mena et al. (2011) y Fawole y Opara, (2013).

El **contenido de polifenoles** totales osciló entre 1.283 y 1.791 mg de ácido gálico/100 g de peso seco. Las variedades con mayor contenido fueron BBE1, VA11 y ME12. No se observó ninguna tendencia clara entre variedades dulces, agridulces o agrias. La concentración de polifenoles total depende de varios factores tales como la variedad, madurez, parte del fruto, etc.

Los valores de la **actividad antioxidante** obtenidos con el método ABTS proporcionó valores que oscilaron desde los 1,55 (VA11) a los 4,24 (MEC) mmol de Trolox/ kg de peso fresco, mientras que por el método DPPH, oscilaron entre los 6,39

(BBE1) y los 7,74 (MO6) mmol de Trolox/ kg de peso fresco. En general, los valores obtenidos por DPPH son mayores que los obtenidos por ABTS (Mena et al., 2011). Existen factores como el método de extracción que podrían explicar esta variabilidad. Los resultados obtenidos están en concordancia con los obtenidos por Ferrara et al. (2014), donde los valores oscilaron entre 2,51 y 6,35 mmol de Trolox/L.

El **análisis de conglomerados** ha permitido la agrupación de la 20 variedades estudiadas en tres grupos: (i) ME12, ME14, ME17, MO5, MA3, MA5, MO2, VA11, PTO10, MEC, MO6, VA1, VA6, PTO5 y MEM; (ii) BA1, BBE1, HZ y WOND; y (iii) SM.

5.1.2. Resumen de las conclusiones

La caracterización físico-química y funcional de las 20 variedades de granada fue destinada a determinar el uso de cada una de ellas. Se mostraron diferencias entre todas las variedades. Las variedades dulces, ME12, ME14, MO5 y MA3, son óptimas para su consumo en fresco. Las variedades de mayor dureza de semilla (WOND y SM) son recomendadas para la producción de zumos, mientras que las variedades con mejores propiedades funcionales (BBE1, ME12, MEC, MEM, MO6, PTO10, VA1, BA1) pueden ser utilizadas como ingredientes de alimentos funcionales, cosméticos y médicos.

5.2. PUBLICACIÓN 2

Determination of fatty acid composition in arils of 20 pomegranates cultivars grown in Spain

Francisco Alcaraz-Mármol, Nallely Nuncio-Jáuregui, Ángel Calín-Sánchez, Ángel A. Carbonell-Barrachina, Juan José Martínez-Nicolás, Francisca Hernández

Scientia Horticulturae 2015, 197, 712-718

doi: 10.1016/j.scienta.2015.11.00

El **objetivo** de este estudio fue determinar la composición de los ácidos grasos principales de las 20 variedades de granadas españolas más representativas.

5.2.1. Resumen de Resultados y Discusión

El perfil de las 20 variedades de granadas españolas quedó definido por 9 **ácidos grasos**. Los ácidos grasos predominantes fueron el ácido puníco, CLNA1 y CLNA3 (todos ellos ácidos linolénicos conjugados C18:3). El resto de ácidos grasos encontrados (por orden de abundancia en términos de porcentaje) fueron: ácido oleico (C18:1), linoleico (C18:2), palmítico (C16:0), CLNA2 (C18:3), araquídico (C20:0) y esteárico (C18:0). El porcentaje de ácido puníco osciló entre 59,7% y 74,3% para ME14 y MO2, respectivamente, del porcentaje total de ácidos grasos. El porcentaje de ácido puníco varió de manera significativa en función de las diferentes variedades; sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el factor "tipo de granada" (agrias, agridulces y dulces). En general, los ácidos linolénicos conjugados (CLNA), incluyendo el ácido puníco, comprendieron alrededor de un 83,4% del total de los ácidos grasos identificados. Este hecho hace que el aceite de la semilla de la granada sea rico en ácidos grasos polinsaturados (Ferrara et al., 2014). El ácido oleico varió desde 3,63% (MEC) a 5,82% (HZ), mientras que el linoleico varió entre 3,42% para WOND y 5,76% para VA1. El contenido de ácido palmítico varió de 2,11% (WOND) a 5,06% (ME17), el de ácido esteárico de 0,32% (WOND) a 0,67% (ME17) y el araquídico de 0,37% (BBE) a 0,92% (ME17). El factor

“tipo de granada” afectó de manera significativa, donde los mayores valores fueron obtenidos en variedades dulces para ácido esteárico, CLNA2 y araquídico.

La concentración total de ácidos grasos saturados e insaturados osciló entre 3,02% a 6,65% y 93,3% a 96,9%, respectivamente. En cuanto a la concentración de ácidos grasos polinsaturados (ácido punícico y ácidos linolénicos conjugados), los porcentajes medios fueron de 86,5%, 84,9% y 85,4% para variedades agrias, agridulces y dulces, respectivamente. El alto contenido de ácidos grasos insaturados le atribuye a la granada numerosos beneficios sobre la salud como la prevención natural de enfermedades cardiovasculares (Fadavi et al., 2006). La relación entre ácidos saturados e insaturados osciló entre 0,03 y 0,07 para WOND y ME17, respectivamente. Este ratio siguió el orden de: agrias < agridulces < dulces.

En cuanto a la **concentración**, el contenido de ácidos grasos se cuantificó y expresó en mg por 100 g de arilos deshidratados (materia seca). La concentración del ácido punícico, ácido graso mayoritario, varió desde valores de 2.509 mg/100 m.s., a 7.538 mg/100 m.s., para MO6 y ME17, respectivamente. A continuación se muestran los rangos entre los que osciló la concentración del resto de ácidos grasos encontrados en los arilos de granada:

- CLNA1: de 348-1177 mg/100 m.s., para VA1 y WOND, respectivamente.
- CLNA3: de 221-837 mg/100 m.s., para VA1 y WOND, respectivamente.
- Oleico: de 240-570 mg/100 m.s., para SM y ME17, respectivamente.
- Linoleico: de 215-567 mg/100 m.s., para MO6 y ME17, respectivamente.
- Palmítico: de 180-299 mg/100 m.s., para HIZ y MA5, respectivamente.
- CLNA2: de 56,7-407 mg/100 m.s., para VA1 y MEC, respectivamente.
- Araquídico: de 20,2 a 179 mg/100 m.s., para PTO10 y BBE, respectivamente.
- Esteárico: de 24 a 57 mg/100 m.s., para VA1 y ME17, respectivamente.

Se obtuvieron diferencias significativas entre las diferentes variedades, y el factor “tipo de granada” y afectó de manera significativa al contenido de ácido palmítico, esteárico y araquídico, con las mayores concentraciones encontradas en granadas dulces, especialmente ME17.

El análisis de componentes principales (PCA) ha permitido el agrupamiento en 4 grupos principales. El primero (i) formado por ME14, MO6, MA3 y BA1 y caracterizado por elevadas concentraciones de CLNA1, CLNA2, CLNA3 y ácido araquídico, el segundo grupo (ii) formado por ME17, VA6, MA5, PTO5 y VA1, caracterizado por elevadas concentraciones de ácido palmítico, linoleico, esteárico y oleico, el tercer grupo (iii) formado por PTO10, SM, VA11, ME12, MO2, HIZ y MO5, caracterizados por gran contenido en ácido púnicico, especialmente MO2, y cuarto y último grupo (iv) formado por BBE, MEC, MEM y WOND, ninguna de las variedades rica en los ácidos grasos bajo estudio.

5.2.2. Resumen de las conclusiones

Los resultados muestran que las variedades españolas de granada son una fuente importante de ácidos grasos, especialmente las variedades dulces. Los arilos de granada poseen un alto contenido de ácido linolénico conjugado, especialmente de ácido púnicico. Este hecho hace que las variedades españolas sean interesantes para industrias cosméticas, farmacéuticas y alimentarias.

5.3. PUBLICACIÓN 3

Classification of pomegranate cultivars according to their seed hardness and wood perception

Francisco Alcaraz-Mármol, Ángel Calín-Sánchez, Nallely Nuncio-Jáuregui, Ángel A. Carbonell-Barrachina, Francisca Hernández, Juan José Martínez-Nicolás

Journal of Texture Studies, 2015, 46, 467-474

doi:10.1111/jtxs.12145

El **objetivo** principal de este estudio fue el de correlacionar datos instrumentales y sensoriales (afectivos y descriptivos) en términos de dureza y percepción leñosa. Además, se propuso establecer un punto de corte mediante la correlación de dureza y percepción leñosa obtenidos mediante un panel afectivo y un panel sensorial.

5.3.1. Resumen de Resultados y Discusión

La **dureza instrumental** obtenida mediante el test de punción, determinó valores que oscilaron entre 9,60 N/mm y 59,5 N/mm. Las variedades dulce y agridulce obtuvieron valores muy cercanos, por ejemplo, PTO10 (agridulce) obtuvo los menores valores de dureza, mientras que variedades dulces como MEC y MO2 tuvieron valores de dureza de 12,0 y 13,8 N/mm, respectivamente. Por el contrario, las variedades agrias obtuvieron valores de 56,2 N/mm (BBE1) y 59,5 N/mm para BA1. Las diferencias en cuanto a la dureza se atribuyen a las variedades y al factor "tipo de granada" (Szychowski et al., 2015).

En cuanto a la **dureza descriptiva** evaluada por un panel entrenado, los valores oscilaron entre 0,9 y 10 para MO2 y BBE1, respectivamente. Mediante la medición de este parámetro, se realizó un primer e intuitivo agrupamiento en: (i) variedades con valores entre 0 y 4 con 15 de las 20 variedades; (ii) variedades con intensidades entre 4 y 8, solamente incluyó la variedad SM y (iii) variedades con intensidades por encima de 8 (BA1, BBE1, HZ y WOND).

En cuanto a la percepción leñosa descriptiva, los valores oscilaron entre 1,4 y 9,7 para MO2 y BA1, respectivamente. El agrupamiento fue similar al de la dureza descriptiva con la salvedad de incluir mayor número de variedades en el grupo intermedio (PTO10, PTO5, VA1, HZ y MEC).

La determinación de la **aceptación de dureza** y de **percepción leñosa** sirvió para determinar parámetros claves de la dureza y percepción leñosa descriptiva con el fin de agrupar las diferentes variedades. Para evaluar la aceptación de la dureza y la percepción leñosa, se contó con 7 variedades de todos los tipos y grupos de granada, ya que no se pudo realizar con las 20 variedades empleadas para otras determinaciones. Los resultados obtenidos se resumen estableciendo que a mayor dureza descriptiva de la semilla, la menor satisfacción por parte de los consumidores, igualmente, a mayor percepción leñosa descriptiva, la menor satisfacción. La correlación entre parámetros descriptivos y afectivos mostró unos valores elevados de R^2 en torno a 0,9277. Estas determinaciones permitieron establecer diferentes zonas y recomendaciones para las diferentes variedades en función de dureza y percepción leñosa:

- Zona 1 o zona de semillas muy blandas: 0-22 N/mm → Consumo en fresco.
- Zona 2 o zona de semillas de dureza intermedia: 22-33 N/mm → Consumo en fresco o industrialización según necesidades.
- Zona 3 o zona de semillas de elevada dureza: >33 N/mm → Industrialización.

5.3.2. Resumen de las conclusiones

Por un lado, MA3, MA5, ME14, ME17, MEM, MO5, MO6, PTO10, VA1 y VA6 se clasificaron como variedades apropiadas para el consumo en fresco, y por otro lado, variedades como BO1, HZ y WOND se clasificaron como apropiadas para la industrialización. Si existieran dudas en cuanto a las recomendaciones de uso o consumo sobre una variedad en función de la dureza y/o la percepción leñosa, se recomienda llevar a cabo estudios sensoriales en los que se tenga en cuenta el sabor

de las diferentes variedades. La variedad PTO5 se recomienda tanto para consumo en fresco como para industrialización.





5. CONCLUSIONES E INVESTIGACIONES FUTURAS

6. CONCLUSIONES GENERALES E INVESTIGACIONES FUTURAS

6.1. CONCLUSIONES GENERALES

En general, los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que:

- o Los 20 cultivares de granada estudiados mostraron diferencias significativas en términos de parámetros físico-químicos y funcionales. Los cultivares con mayor contenido en azúcares se categorizaron como idóneos para su consumo en fresco (ME12, ME14, MO5 y MA). Los cultivares con mayor contenido de polifenoles (BBE1 y ME12), actividad antioxidante (MEC, MEM; MO6 y PTO10), fibra cruda (BA1 y BBE1) y minerales (MEM, VA1, BA1 y SM) son adecuadas para su uso como ingredientes funcionales mientras que WOND e HZ son idóneas para la producción de zumo.
- o Los arilos de los 20 cultivares estudiados son una fuente importante de ácidos grasos esenciales con un importante potencial nutricional.
- o Los ácidos grasos más abundantes son los ácidos linolénicos conjugados (C18:3), especialmente el ácido púnicico que representó un 67% del perfil de ácidos grasos de los arilos.
- o Los cultivares ME17, MA5, MO2, MEC, HZ y WOND contienen la mayor cantidad de ácidos grasos, haciendo que estas variedades sean un material interesante para las industrias alimentarias, farmacéuticas y cosméticas.
- o En términos de dureza e índices de porción leñosa, tanto instrumentales como sensoriales, se establecen las siguientes recomendaciones en cuanto a su uso de los 20 cultivares de granada estudiados: (i) consumo en fresco: MA3, MA5, ME12, ME14, ME17, MEC, MEM, MO2, MO5, MO6, PTO10, VA1, VA11 y VA6; (ii) industrialización: BA1, BO1, HZ, SM y WOND y (iii) ambos usos: PTO5.
- o Los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas permiten determinar las diferentes recomendaciones de uso de los 20 cultivares de granada estudiados en función de diferentes variables, físicas, químicas, funcionales y sensoriales de acuerdo a los intereses de los productores y los fabricantes de productos derivados de la granada.

6.2. INVESTIGACIONES FUTURAS

Esta Tesis deja abiertos varios campos de actuación, cabe destacar:

- o Determinación de la posible relación entre el espesor de la capa externa de las semillas y la dureza de las mismas mediante la realización de cortes histológicos y su posterior digitalización de los cortes para su medición.
- o Realización de modelos matemáticos capaces de predecir la dureza sensorial de las semillas y aceptación de los cultivares a partir de parámetros instrumentales.
- o Realización de modelos matemáticos capaces de predecir la dureza instrumental a partir de datos de dureza sensorial y aceptación de la dureza de las semillas.





7. REFERENCIAS

7. REFERENCIAS**-A-**

Al-Maiman, S. Ahmad, D., 2002. Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chemistry*, 76, 437–441.

Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser D, Fuhrman B., 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1062-1076.

-B-

Bentayeb, K., Vera, P., Rubio, C., Nerín, C., 2014. The additive properties of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay: The case of essential oils. *Food Chemistry*, 148, 204–208.

-C-

Calín-Sánchez, A., Figiel, A., Hernández, F., Melgarejo, P., Lech, K., Carbonell-Barrachina, A. A., 2013. Chemical composition, antioxidant capacity, and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) arils and rind as affected by drying method. *Food and Bioprocess technology*, 6, 1644-1654.

Carbonell-Barrachina, A. A., Calín-Sánchez, A., Bagatar, B., Hernandez, F., Legua, P., Martínez-Font, R., and Melgarejo, P., 2012. Potential of Spanish sour-sweet pomegranates (cultivar C25) for juice industry. *Food Science and Technology International*, 18(2), 129-138.

-E-

El-Nemr S.E., Ismail I.A., Ragab M., 1990. Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit. *Die Nahrung*. 34: 601.

El-Shaarawy M.I., Nahapetian A, 1983. Studies on pomegranate seed oil. *Fette Seifen Anstrichmittel*. 85: 123.

-F-

Fadavi, A., Barzegar, M., Azizi, M.H. Bayat, M., 2005. Physicochemical composition of 10 pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Science and Technology International*, 11, 113–119.

Fawole, O. A., Opara, U. L., 2013. Developmental changes in maturity indices of pomegranate fruit: A descriptive review. *Scientia Horticulturae*, 159, 152–161.

-G-

Gil, M.I., Tomas-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.

Gozlekci, S., Ercili, S., Okturen, F., Sonmez, S., 2011. Physico-chemical characteristics of three development stages in pomegranate cv. *Hicaznar*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39, 241–245.

-H-

Hernández, F., Melgarejo, P., Martínez, J.J., Martínez, R., Legua, P., 2011. Fatty acid composition of seed oils from important Spanish pomegranate cultivars. *Italian Journal of Food Science*, 23, 1–6.

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.

Holland, D., Hatib, K., Bar-Ya'akov, I., 2009. Pomegranate: botany, horticulture, breeding. *Horticultural Reviews*, 35, 127–191.

-K-

Koppel, K., Chambers, E. IV, 2010. Development and application of a lexicon to describe the flavor of pomegranate juice. *Journal of Sensory Studies*, 25(6), 819–837.

Kulkarni, A.P., Aradhya, S.M., 2005. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry*, 93, 319–324.

Kyralan, M., Gölükcü, M., Tokgöz, H., 2009. Oil and Conjugated Linolenic Acid Contents of Seeds from Important Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey. *Journal of American Oil Chemical Society*, 86 (10), 985–990.

-L-

Legua, P., Melgarejo, P., Martínez, M., Hernandez, F., 2000. Evolution of sugars and organic acid content in three pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.). *Options Mediterranean*, 42, 99–104.

-M-

Martínez, J.J., Melgarejo, P., Hernández, F., Salazar, D.M., Martínez, R., 2006. Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. *Scientia Horticulturae*, 110 (3), 241-246.

Melgarejo P., Artés F., 2000. Total lipid content and fatty acid composition of oilseed from lesser known sweet pomegranate clones. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1452.

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

Melgarejo, P., Salazar, D.M., 2003. Tratado de fruticultura para zonas áridas, vol. II. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

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., 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, 1893–1906.

Mena, P., Martí, N., Saura, D., Valero, M., García-Viguera, C., 2012. Combinatory effect of thermal treatments and blending on the quality of pomegranate juices. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 3186-3199.

Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2015. Anuario de Estadística Agraria.

Mir, M. M., Umar, I., Mir, S. A., Rehman, M. U., 2012. Quality evaluation of pomegranate crop. *International Journal of Agricultural and Biology*, 14, 658–667.

Mirdehghan, S.H., Rahemi, M., 2007. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 111, 120–127.

Moing, A., Renaud, C., Gaudillère, M., Raymond, P., Roudeillac, P., Denoyes-Rothan, B., 2001. Biochemical changes during fruit development of four strawberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126, 394–403.

-O-

Ozgen, M., Durgac, C., Serce, S., Kaya, C., 2008. Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. *Food Chemistry*, 111, 703–706.

-P-

Pande G., Akoh C.C., 2009. Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia grown pomegranate cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 9427.

Poyrazoglu, E., Gökmenw, V., Artik, N., 2002. Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 567–575.

Prior, R. L., 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 570S-578S.

-S-

- Sánchez-Monge E., 1974. Fitogenética (mejora de plantas). Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias-Ministerio de Agricultura. Madrid. 456 pp.
- Sancho, J., Bota, E., Castro, J. J., 1999. Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Ediciones Universitat de Barcelona. 26-27pp.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., Bitsch, R., 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36(2), 177-187.
- Shwartz, E., Glazer, I., Bar-Yáakov, I., Matityahu, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Amir, R., 2009. Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions. *Food Chemistry*, 115, 965–973.
- Szychowski, P.J., Frutos, M.J., Burló, F., Pérez-López, A.J., Carbonell-Barrachina, A.A., Hernández, F., 2015. Instrumental and sensory texture attributes of pomegranate arils and seeds as affected by cultivar. *LWT–Food Science and Technology*, 60, 656–663.
- T-**
- 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.
- V-**
- Vázquez-Araújo, L., Nuncio-Jáuregui, N., Cherdchu, P., Hernández, F, Chambers, E., IV, Carbonell-Barrachina, Á,A. 2014. Physicochemical and descriptive sensory characterization of Spanish pomegranates: Aptitudes for processing and fresh consumption. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 1663–1672.
- 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, Institute of Food Technologists, 9, 635-654.

-W-

Wojdyło, A., Oszmiański, J., Laskowski, P., 2008. The polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6520–6530.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., and Prior, R.L., 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4026–4037.

-Y-

Yamasaki M., Kitagawa T., Koyanagi N., Chujo H., Maeda H., 2006. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. *Nutrition*, 22: 54.

Yücel S.Ö., 2005. Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey. *Journal of American Oil Chemical Society*, 82: 893.

-Z-

Zaouay, F., Mena, P., Garcia-Viguera, C., Mars, M., 2012. Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Industrial Crops and Products*, 40, 81-89.

