



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Extracción sostenible de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria transformadora de cítricos, alcachofa y granada

D. Francisco Lorca Salcedo
2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Extracción sostenible de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria transformadora de cítricos, alcachofa y granada

Autor: D. Francisco Lorca Salcedo

Director/es: D.^a Presentación García Gómez



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Francisco Lorca Salcedo

doctorando del Programa de Doctorado en

Química Básica y Aplicada

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Extracción sostenible de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria transformadora de cítricos, alcachofa y granada.

y dirigida por,

D./Dña. Presentación García Gómez

D./Dña. Pilar Sanchez Andrada

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 30 de octubre de 2023

Fdo.: Francisco Lorca Salcedo

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia



**Centro Tecnológico
Nacional de la Conserva
y Alimentación**

La Dra. Presentación García Gómez, responsable del Área de Tecnología del Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación (CTNC), como Directora de la Tesis

AUTORIZO,

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Extracción sostenible de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria transformadora de cítricos, alcachofa y granada”, realizada por D. Francisco Lorca Salcedo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de octubre de 2023



Dra. Pilar Sánchez Andrada, como Tutora de Tesis y Doctora de la Universidad de Murcia del Área de Química Orgánica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Extracción sostenible de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria transformadora de cítricos, alcachofa y granada”, realizada por D. Francisco Lorca Salcedo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de octubre de 2023

Agradecimientos

En primer lugar, dar las gracias a mi Directora de Tesis, Presentación García Gómez por haberme dado la oportunidad de adentrarme en el mundo de la investigación alimentaria, por el apoyo diario, por enseñarme a ser crítico y seguir alimentando la ilusión de la investigación.

Dar las gracias a mi Tutora de Tesis, Pilar Sánchez Andrada por haberme guiado en el mundo de la investigación de química orgánica, por tu compromiso, colaboración y haber acogido con interés este proyecto.

Gracias a mis compañeros de departamento, Sese, David, Paco y Milagros, por estar presentes, afrontar y superar en equipo todos los retos que se nos presentan, por hacer que todo parezca más sencillo a base de bromas y risas.

Agradecer al Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación (CTNC) por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

A mis padres y mi familia, gracias por contar con vosotros siempre en todo y por apoyarme en todas las decisiones de mi vida.

A mis amigos, por hacer más llevadero el estrés del día a día.

A María, mi pareja, por ser mi compañera de vida, estar a mi lado en los momentos más complicados, contar con su apoyo incondicional y hacerme el viaje más ameno

*“Lo bueno de la ciencia es que es cierta
independientemente de si crees o no en ella”*

Neil deGrasse Tyson

Artículos originales de investigación

1. **Lorca, F.**; Quintín, D.; García, P. Recovery of hesperidin from lemon by-products using green techniques. *J. Food Saf.* **2022.** 21, 4, 354-363.
2. **Lorca, F.**; Quintín, D.; López, M. D.; García, P. Removal of toxic compounds from natural extracts using green techniques. *J. Food Saf.* **2021.** 20, 3, 289-297.

Comunicaciones en congresos

1. Autores: **Lorca, F.**; Quintín, D.; Núñez, P.; García, P.
Título: Comparison of conventional and emerging technologies for the extraction of compounds of interest from agri-food wastes.
Congreso: XI Symposium Internacional Sobre Tecnologías Alimentarias
Año: 2023
2. Autores: **Lorca, F.**; Quintín, D.; Núñez, P.; García, P.
Título: Treatment of food by-products for the production of bioplastics.
Congreso: XI Symposium Internacional Sobre Tecnologías Alimentarias
Año: 2023
3. Autores: **Lorca, F.**; Quintín, D.; Núñez, P.; García, P.
Título: Research on encapsulation and microencapsulation of strawberry extracts.
Congreso: XI Symposium Internacional Sobre Tecnologías Alimentarias
Año: 2023
4. Autores: **Lorca, F.**; Quintín, D.; García, P.
Título: Recovery of compounds of interest from lemon by-product using green techniques.
Congreso: 1st International Congress on Food, Nutrition and Public Health
Año: 2022
5. Autores: **Lorca, F.**; Quintín, D.; Núñez, P.; García, P.
Título: Novel clean extraction processes for the recovery of polyphenols from Food by-product.
Congreso: X Symposium Internacional Sobre Tecnologías Alimentarias
Año: 2021
6. Autores: **Lorca, F.**; Quintín, D.; Núñez, P.; García, P.
Título: Removal of toxic compounds from natural extracts using green techniques.
Congreso: X Symposium Internacional Sobre Tecnologías Alimentarias
Año: 2021

Índice

Abreviaturas.....	i
Resumen.....	v
Abstract.....	vii
1. Introducción.....	1
1.1. Industria agroalimentaria y subproductos alimentarios.....	4
1.2. Industria de los cítricos y sus compuestos de interés.....	12
1.3. Industria de la alcachofa y sus compuestos de interés.....	14
1.4. Industria de la granada y sus compuestos de interés.....	17
1.5. Técnicas de extracción para la obtención de compuestos orgánicos en subproductos alimentarios.....	19
1.6. Obtención de compuestos bioactivos y tendencia de mercado de ingredientes funcionales.....	23
2. Justificación y objetivos.....	31
3. Materiales y métodos.....	35
3.1. Subproductos alimentarios	37
3.1.1. Subproducto de limón.....	37
3.1.2. Subproducto de alcachofa.....	37
3.1.3. Subproducto de granada.....	37
3.2. Optimización de la extracción de compuestos a escala de laboratorio.....	38
3.2.1. Optimización de la extracción acuosa de subproductos agroalimentarios.....	39
3.2.2. Optimización de la extracción enzimática de subproductos agroalimentarios...	40
3.2.3. Optimización de la extracción asistida por ultrasonidos de subproductos agroalimentarios.....	41
3.2.4. Optimización de la extracción con agua subcrítica de subproductos agroalimentarios.....	41
3.3. Protocolo de extracción a escala de planta piloto..	42
3.3.1. Descripción del protocolo común para todos los procesos de extracción a escala piloto.....	43
3.4. Purificación de compuestos de interés de subproductos agroalimentarios.....	46
3.5. Cuantificación de compuestos de interés.....	48
3.5.1. Identificación y cuantificación de compuestos de interés de los extractos de limón.....	48
3.5.2. Identificación y cuantificación de compuestos de interés de extractos de alcachofa.....	49
3.5.3. Identificación y cuantificación de compuestos de interés de extractos de granada.....	50
3.5.4. Cuantificación de vitamina C.....	50
3.5.5. Cuantificación de los compuestos fenólicos totales método Folin Ciocalteu.....	50
3.5.6. Cuantificación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS	51
3.5.7. Cuantificación de humedad.....	51
3.5.8. Cuantificación de proteínas.....	51
3.5.9. Cuantificación de azúcares totales.....	52
3.5.10. Cuantificación de fibra alimentaria.....	53
3.5.11. Medida de la capacidad antimicrobiana in vivo por impedancia eléctrica.....	54
3.5.12. Medida de la capacidad antioxidante in vivo por impedancia eléctrica.....	54

Índice

3.5.13. Caracterización nutricional y toxicológica de los extractos.....	55
3.5.14. Tratamiento de los datos.....	56
4. Resultados y discusión.....	57
4.1. Revalorización del subproducto de limón.....	59
4.1.1. Optimización de extracción de los compuestos de interés del subproducto de limón a escala de laboratorio.....	59
4.1.1.1. Optimización de la extracción acuosa del subproducto de limón.....	60
4.1.1.2. Optimización de la extracción enzimática del subproducto de limón.....	61
4.1.1.3. Optimización de la extracción asistida por ultrasonidos del subproducto de limón.....	63
4.1.1.4. Optimización de la extracción con agua subcrítica del subproducto de limón.....	64
4.1.2. Extracción y caracterización de los extractos de limón obtenidos a escala piloto.....	65
4.1.3. Medida de la capacidad antimicrobiana y antioxidante <i>in vivo</i> de los extractos de limón obtenidos.....	67
4.1.4. Purificación de los compuestos de interés del subproducto de limón.....	71
4.2. Revalorización del subproducto de alcachofa.....	75
4.2.1. Optimización de la extracción de los compuestos de interés del subproducto de alcachofa a escala de laboratorio.....	75
4.2.1.1. Optimización de la extracción acuosa del subproducto de alcachofa.....	76
4.2.1.2. Optimización de la extracción enzimática del subproducto de alcachofa.....	77
4.2.1.3. Optimización de la extracción asistida por ultrasonidos del subproducto de alcachofa.....	79
4.2.1.4. Optimización de la extracción con agua subcrítica del subproducto de alcachofa.....	80
4.2.2. Extracción y caracterización de los extractos de alcachofa obtenidos a escala piloto.....	82
4.2.3. Medida de la capacidad antimicrobiana y antioxidante <i>in vivo</i> de los extractos de alcachofa obtenidos.....	83
4.2.4. Purificación de compuestos de interés del subproducto de alcachofa.....	86
4.3. Revalorización del subproducto de granada.....	91
4.3.1. Optimización de la extracción de los compuestos de interés del subproducto de granada a escala laboratorio.....	91
4.3.1.1. Optimización de la extracción acuosa del subproducto de granada.....	91
4.3.1.2. Optimización de la extracción enzimática del subproducto de granada.....	93
4.3.1.3. Optimización de la extracción asistida por ultrasonidos del subproducto de granada.....	94
4.3.1.4. Optimización de la extracción con agua subcrítica del subproducto de granada.....	96
4.3.2. Extracción y caracterización de los extractos de granada obtenidos a escala piloto.....	97
4.3.3. Medida de la capacidad antimicrobiana y antioxidante <i>in vivo</i> de los extractos de granada obtenidos.....	99
4.3.4. Purificación de compuestos de interés del subproducto de granada.....	102
5. Conclusiones.....	107

6. Bibliografía.....	111
7. Anexo.....	123
7.1. Anexo I. Ficha de los compuestos bioactivos.....	125
7.2. Anexo II. Caracterización de productos: análisis nutricional, análisis toxicológico y análisis microbiológico.....	129
7.3. Anexo III. Caracterización detallada de productos.....	136

Abreviaturas

Å: ángstrom

ABTS: 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio

ASE: extracción acelerada con disolventes

°C: grados centígrados

C: concentración que obtenemos al introducir el área problema en la calibración

CAG: carbón activo granular

CAGR: tasa de crecimiento anual compuesta proyectada

CG: cromatografía gases

cm: centímetro

CO₂: dióxido de carbono

COVID-19: enfermedad respiratoria por el coronavirus 2019

Da: dalton

DAD: detección de matriz de diodos

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

EAS: extracción con agua subcrítica

EAT: extracción acuosa

EE: extracción enzimática

EEUU: Estados Unidos

ESI: ionización por electroespray

EtOH: etanol

EUS: extracción asistida por ultrasonidos

f_c: factor de corrección de la humedad y grasa

FR: factor de respuesta

FID: decaimiento por inducción libre

g/100g: gramos/100 gramos

g/kg: gramo/kilogramo

g/L: gramo/litro

g: gramos

Abreviaturas

h: hora

H₂O: Agua

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HCl: Ácido clorhídrico

HOCl: Ácido hipocloroso

HPLC: cromatografía Líquida de alta eficiencia

ISTD: estándar interno

IT: trampa de iones

Kcal: kilocaloría

Kg/cm²: kilogramo/centímetro cuadrado

Kg: kilogramo

kHz: kilohercio

kJ: kilojulio

KOH: potasa

kV: kilovoltio

kW: kilovatio

L/h: Litro/hora

LQ: límite de cuantificación

m/z: masa/carga

m²·g⁻¹: metro cuadrado/gramo

mbar: milibar

mg·L⁻¹: miligramo/litro

min: minuto

mL/min: mililitro/minuto

mL: mililitro

mm: milímetros

mM: milimolar

MPa: megapascal

MS: espectrometría de masas

MKTTn: caldo enriquecimiento Muller-Kauffmann con tetracionato y novobiocina

n.d: no determinado

N: normalidad

N₂: nitrógeno

nm: nanómetro

O₂: oxígeno atmosférico

O₂⁻: superóxido

p/v: peso/volumen

P: peso de muestra

P₀: peso en gramos de muestra inicial

P₁: peso en gramos del crisol con celite

P₁: peso en gramos del crisol con celite

P₂: peso en gramos del crisol con celite más fibra

P_{iniciales}: Polifenoles de la fase líquida inicial

P_{desorbidos}: Polifenoles desorbidos de la matriz adsorbente

P_{líquido tras adsorción}: Polifenoles en fase líquida tras ser tratada con la matriz adsorbente

P_{retenidos}: Polifenoles retenidos en matriz adsorbente

PCA: placas de agar nutritivo

PDVB: polidivinilbenceno

Pm: peso en gramos de la muestra mg: Miligramo

PMC-DVB: polimetacrílicos reticulados con divinilbenceno

P_T: peso total o final de la dilución

PTFE: politetrafluoroetileno

PVDF: difluoruro de polivinilideno

Q-TOF: espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo

ROS: especies reactivas de oxígeno

RVS: caldo enriquecimiento Rappaport-Vassiliadis soja

rpm: revoluciones por minuto

TSB: caldo soja tripticaseína

Trolox: ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

Abreviaturas

ufc/g: unidades formadoras de colonias/gramo

ufc/mL: unidades formadoras de colonias/mililitro

UV: ultravioleta

UV-Vis: ultravioleta-visible

v/v/v: volumen/volumen/volumen

v/v: volumen/volumen

v: Volumen

V_b: volumen de mL consumido por un blanco

V_{bl}: volumen gastado para el blanco

V_g: volumen gastado para la muestra

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

V_m: volumen en litros de la muestra.

W: vatio

μL: microlitro

μm: micrómetro

RESUMEN

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es la revalorización de los residuos de la industria de cítricos, alcachofa y granada, que son los que se generan en mayor cantidad en la Región de Murcia, mediante el desarrollo de procesos de extracción alternativos a los tradicionales, para la obtención de compuestos de interés. Se han desarrollado procesos de extracción como resultado de la investigación en diferentes tecnologías sostenibles, como tratamientos con enzimas, ultrasonidos, fluidos subcríticos y procesos de adsorción-desorción, para la obtención de compuestos de bioactivos. La extracción enzimática ha resultado ser el proceso que alcanza mayores rendimientos de extracción para la obtención de compuestos polifenólicos a partir de los subproductos industriales de limón (59.61 g ácido gálico/kg) y de alcachofa (77.92 g ácido gálico/kg), con probada actividad antioxidante. En el caso del subproducto de granada se obtuvo un extracto con una concentración de polifenoles totales de 231.67 g ácido gálico/kg, siendo el extracto que presenta mayor capacidad antioxidante, mediante la técnica de extracción asistida por ultrasonidos. Los compuestos de interés obtenidos han sido purificados mediante procesos de adsorción-desorción obteniendo una concentración de polifenoles totales de 142.73, 169.95 y 308.52 g ácido gálico/kg en el caso del subproducto de limón, alcachofa y granada, respectivamente, utilizando como matriz de adsorción la resina PAD950.

ABSTRACT

The main objective of this doctoral thesis is the revaluation of waste from the citrus, artichoke, and pomegranate industries, which are those generated in the greatest quantity in the Region of Murcia, through the development of alternative extraction processes to the traditional ones, to obtain compounds of interest. Extraction processes have been developed because of research into different sustainable technologies, such as enzyme treatments, ultrasound, subcritical water and adsorption-desorption processes, to obtain bioactive compounds. Enzymatic extraction has proved to be the process that achieves the highest extraction yields for obtaining polyphenolic compounds from the industrial by-products of lemon (59.61 g gallic acid/kg) and artichoke (77.92 g gallic acid/kg), with proven antioxidant activity. In the case of the pomegranate by-product, an extract with a total polyphenol concentration of 231.67 g gallic acid/kg was obtained, being the extract with the highest antioxidant capacity, using the ultrasound-assisted extraction technique. The compounds of interest obtained were purified by adsorption-desorption processes, obtaining a concentration of total polyphenols of 142.73, 169.95 and 308.52 g gallic acid/kg in the case of the lemon, artichoke and pomegranate by-products, respectively, using PAD950 resin as adsorption matrix.

1. Introducción

La producción de frutas y hortalizas europea asciende a 105 millones toneladas, de las que el 25 % se producen en España. A nivel mundial, esta producción se acerca a 2.000 millones de toneladas. Esto se traduce en la generación de millones de toneladas de subproductos y residuos a los que es prioritario dar una salida viable técnica, económica y respetuosa con el medio ambiente, fomentado además por la Directiva Marco de Residuos que establece la obligatoriedad de su recogida y reutilización.

Actualmente, en Europa se generan grandes cantidades de residuos durante los procesos de transformación en las industrias agroalimentarias como bagazos, pulpas, cáscaras, residuos hortofrutícolas, jugos, o como consecuencia de las actividades agrícolas (como cascarilla de arroz, pieles de frutos secos, restos de poda, restos de invernaderos, paja de arroz) y los residuos que se generan en las industrias procesadoras de alimentos. Este desaprovechamiento de alimentos, además de suponer una pérdida de competitividad para sector agroalimentario, se considera un problema importante en todo el mundo debido principalmente a los impactos ambientales perjudiciales que genera, causando problemas de sostenibilidad debido a las grandes cantidades que se producen en un período de tiempo limitado y al contenido de materia orgánica (Coderoni, S. et al, 2019).

En este contexto, la Región de Murcia es una potencia en la producción de frutas y hortalizas. El procesamiento de estos productos genera una cantidad ingente de subproductos que en la mayoría de los casos no tienen ninguna aplicación en la producción de nuevos alimentos o productos, y que se desechan provocando retos medioambientales. Aunque existen algunos usos menores como es la producción de biomasa y de piensos para alimentación animal, estas estrategias no garantizan una eficiente utilización de este material que puede ofrecer interesantes posibilidades para la industria agroalimentaria y la reducción de esta problemática medioambiental. Diversas investigaciones han demostrado que son una excelente fuente de sustancias bioactivas (como antimicrobianos y antioxidantes) que pueden usarse como alternativas naturales a los aditivos sintéticos en la producción de alimentos, cosméticos y envases plásticos activos. Sin embargo, actualmente se continúan usando en gran medida los aditivos sintéticos debido a su alta estabilidad y bajo coste en comparación con las alternativas naturales. Además, casi todas las empresas dedicadas a la extracción de compuestos de interés para su posterior aplicación industrial utilizan las tecnologías de hidrodestilación y maceración, especialmente diseñadas para la extracción de aceites esenciales de plantas y/o fibra. A nivel industrial, la extracción con disolventes orgánicos está menos extendida debido a los problemas medioambientales y de salud humana que ocasiona y al elevado coste de inversión, ya que las plantas deben disponer de equipos que cumplan íntegramente la directiva 2014/34/UE sobre equipos para atmósferas potencialmente explosivas. En cualquier caso, las tecnologías convencionales, además de requerir grandes volúmenes de disolventes orgánicos o agua, precisan mucho tiempo y tienen un bajo rendimiento.

Por todo lo expuesto hasta aquí, es imperativo reducir el uso de reactivos y excipientes en general, así como eliminar el uso de disolventes peligrosos en particular, o al menos sustituirlos por otros más seguros. Este cambio debe lograrse asegurando métodos sensibles, selectivos, precisos y robustos, que permitan obtener extractos de alta pureza, requieran tiempos de tratamiento bajos y sean baratos, sostenibles y energéticamente eficientes (Janicka, P. et al, 2022).

Introducción

La necesidad de transformar el modelo lineal de economía en un modelo circular ha convertido los subproductos agrarios y del sector agroalimentario en un pilar fundamental. La Estrategia Española de Economía Circular (EEEC) se alinea con los objetivos de los dos planes de acción de economía circular de la Unión Europea, “Cerrar el círculo: un plan de acción de la UE para la economía circular” de 2015 y “Un nuevo Plan de Acción de Economía Circular para una Europa más limpia y competitiva” de 2020, además de con el Pacto Verde Europeo y la Agenda 2030 para el desarrollo sostenible. En particular, la EEEEC para 2030 establece como objetivo “Reducir la generación de residuos de alimentos en toda la cadena alimentaria: 20 % en las cadenas de producción y suministro”. La valorización sostenible de los residuos agroalimentarios es una de las prioridades de la Comisión Europea, siendo parte del Plan Europeo de Economía Circular (European Commission, 2023).

El 47% de los residuos agroalimentarios se producen en las fábricas de procesamiento de los alimentos. El desperdicio de alimentos cuantificado por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) por cada habitante de la Unión Europea representa, de media, 179 kilos de alimentos desechados en buen estado al año, medio kilo de comida al día. Este problema mundial exige medidas a todos los niveles, siendo necesario y fundamental reducir la pérdida y el desperdicio de alimentos para crear un mundo Hambre Cero y alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), especialmente el ODS 2 (Hambre Cero) y ODS 12 (Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles). La valorización de subproductos de la industria alimentaria se presenta como una alternativa sostenible dentro del marco europeo, considerando el grave problema medioambiental que provoca, donde 1.600 MT de deshecho generan 3300 millones de toneladas de equivalente de CO₂ de gases de efecto invernadero liberados a la atmósfera por año (FAO, 2020).

1.1. Industria agroalimentaria y subproductos alimentarios

La Comisión Europea estima que se generan hasta 90 millones de toneladas de desechos alimentarios en los países de la Unión Europea cada año, el 39% de los cuales procede del procesamiento de los alimentos. De hecho, las autoridades europeas han manifestado la necesidad de un cambio radical en los sistemas de producción, consumo, procesamiento, almacenamiento, reciclado y eliminación de fuentes biológicas. Según la Agencia Europea de Medio Ambiente (ABE), la industria alimentaria europea representa 114.960 toneladas millones de residuos, lo que representa alrededor del 4.6% del total generado en Europa. Por sectores, las frutas y hortalizas se caracterizan por ser aquellas que generan más biorresiduos (60%). Este problema mundial exige medidas a todos los niveles, siendo necesario y fundamental reducir la pérdida y el desperdicio de alimentos para crear un mundo Hambre Cero y alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), especialmente el ODS 2 (Hambre Cero) y ODS 12 (Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles) (FAO, 2020).

La industria alimentaria produce entre un 5 y un 90% de residuos en función del material de partida. La ausencia de infraestructuras y procesos que permitan la gestión de este material, junto con el elevado precio de su procesamiento, hacen que estos residuos constituyan un grave problema. Aunque, en algunas ocasiones estos residuos son empleados en alimentación animal o en la fabricación de compost, en la mayor parte de los casos, estos subproductos van destinados al vertedero o son incinerados. Ambas opciones resultan en la emisión de gases de

efecto invernadero, como metano y dióxido de carbono, y la liberación de contaminantes (dioxinas, furanos, etc.).

La cuenca Mediterránea es una región vulnerable a los cambios climáticos y afectada por la demanda de agua humana, siendo particularmente susceptible a los efectos perjudiciales de la escasez de agua y la sequía. En cuanto a la Región de Murcia, la agricultura tiene una gran relevancia debido a que asociada a esta existe una importante actividad industrial dedicada al procesamiento de productos hortofrutícolas.

En línea con la política Residuo Cero, y respondiendo a las recomendaciones de la UE para 2030, el desarrollo del presente proyecto representa un avance en la agricultura sostenible, promoviendo también ventajas en la economía. Uno de los principales retos tecnológicos es el uso de un conjunto de técnicas innovadoras para la valorización de los desechos generados en el procesamiento de vegetales mediante la extracción de distintos componentes, con el fin de obtener extractos de alto valor funcional y con alta concentración de compuestos bioactivos (European Commission, 2023).

La valorización de los componentes bioactivos y funcionales presentes en la materia de desecho del procesamiento industrial de materiales vegetales como limón, alcachofa y granada, objeto principal de investigación de esta Tesis, depende de la naturaleza de los residuos, y estos se pueden obtener y posteriormente transformar en innovadores aditivos funcionales para el desarrollo de otros productos alimenticios, de nuevos materiales y también de la industria cosmética, debido a la capacidad antioxidante y antimicrobiana que posee. De este modo, este tipo de residuos industriales, que se consideran un punto crítico para la cadena de producción debido a los altos costos de eliminación, se convertirán en ingredientes con un alto valor funcional.

Este tipo de estrategia viene avalada por la Comisión Europea que contempla iniciativas que permitan la utilización de subproductos alimentarios descartados en los procesos productivos y que además tienen un valor añadido que hay que aprovechar desde un punto de vista sostenible, y está íntimamente ligada al concepto de economía circular, que relaciona los conceptos de economía y sostenibilidad. Se trata de una estrategia cuya finalidad es alcanzar una sociedad y una economía de "cero residuos", lo que lógicamente implica reducir la generación de residuos y utilizar los generados como fuente de recursos para nuevos productos y aplicaciones. Este concepto está a la vez ligado al concepto de simbiosis industrial, cuyo objetivo es utilizar los residuos de un determinado sector como materia de partida de otro sector industrial (Mirabella, N. et al, 2014).

Actualmente, la regulación vigente sobre residuos, tanto a nivel comunitario como nacional, recomienda avanzar en la aplicación de planes de gestión y programas de prevención, que deberán seguir la siguiente jerarquía, por orden de importancia: prevención, reutilización, reciclaje, valorización y eliminación de residuos (Directiva 2018/851 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas y la Ley 7/2022 del 8 abril de residuos y suelos contaminados para una economía circular).

El procesamiento de productos hortofrutícolas es variable en función del producto buscado, ya sea conservas, zumos, encurtidos, congelados, platos preparados, etc., y en consecuencia se lleva a

Introducción

cabo aplicando diferentes tecnologías y etapas: triturado, pelado, cortado, escaldado, exprimido, congelado, etc. Sin embargo, a pesar de esta variedad de productos y tecnologías, existe un punto en común, y es que generan una cantidad muy importante de residuos vegetales que son las partes de materia prima comercialmente no aprovechables. La Tabla 1 hace referencia a los porcentajes de restos vegetales generados en el procesado de los diferentes productos a tratar en esta investigación.

Tabla 1. Porcentajes de restos generados en función de la materia prima procesada. (Ayuso, L. M. et al, 2014)

Materia Prima	Tipo de restos	% Restos total
Limón	Piel, corteza, semillas	50-55
Granada	Piel y semillas	60-67
Alcachofa	Brácteas, tallos	60-65

Estos restos vegetales están considerados como subproductos por la normativa de acuerdo con el Capítulo 23 del Anexo 1 de la CE: “RESIDUOS Y DESPERDICIOS DE LAS INDUSTRIAS ALIMENTICIAS”, siendo su destino principal la alimentación animal de forma directa, una práctica tradicional que no siempre se lleva a cabo de forma controlada.

España es el primer país de la Unión Europea en superficie dedicada al cultivo, lo que supone la generación de millones de toneladas de subproductos y residuos a los que conviene dar una salida viable técnica, económica y respetuosa con el medio ambiente, fomentado por la Directiva Marco de Residuos que establece la obligatoriedad de su recogida y reutilización. Desde hace varias décadas los residuos agroindustriales han sido un foco de atención para investigadores a nivel mundial. En la década de los años 70, una parte importante de los científicos de todo el mundo enfocaron sus investigaciones hacia la utilización y aprovechamiento de los residuos agroindustriales para la producción de compuestos útiles como insumos de otros procesos industriales. Desde este marco de referencia, se puede plantear que los residuos industriales y agrícolas, como materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social (Fernandes de Araújo et al., 2021).

Esta tendencia a la revalorización de subproductos agroalimentarios está respaldada por el potencial de estos desechos, que podrían utilizarse para la obtención de compuestos de interés de alto valor añadido. De hecho, las cáscaras, semillas, tallos o pulpas vegetales se consideran materias primas para obtener ingredientes bioactivos con múltiples aplicaciones, principalmente para la producción de ingredientes alimentarios, cosméticos o nutracéuticos. Además, se ha demostrado que los compuestos bioactivos de desechos vegetales poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas en aditivos alimentarios que se utilizan con fines conservadores, por lo que darles un valor a estos subproductos constituye una alternativa muy atractiva desde el punto de vista económico y medioambiental. En la última década se han realizado diversos estudios cuyo objetivo principal es la revalorización de estos residuos hortofrutícolas debido a que son fuentes de diferentes compuestos bioactivos de interés tales

como fibra, vitaminas, polifenoles, carotenoides, glucosinolatos, ácidos, grasos insaturados, fitoestrógenos, isoprenoides, ácidos grasos vegetales, compuestos organosulfurados, compuestos aromáticos, azúcares, materias gelificantes (pectinas), aceites, aromas y sabores. Así pues, muchos de estos compuestos de interés han demostrado tener un elevado potencial para su valorización industrial como aditivos, conservantes, antimicrobianos, biofertilizantes, biopesticidas, etc (Mármol, I. et al, 2019).

Aparte de las ya conocidas vitaminas, minerales y fibra dietética que se encuentran en frutas y verduras, existen otros compuestos bioactivos, con efectos potencialmente beneficiosos sobre la salud humana. Estos fitoquímicos pertenecen a los metabolitos secundarios de las plantas e incluyen terpenoides, compuestos azufrados, compuestos nitrogenados y compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos pueden sintetizarse a partir de dos rutas metabólicas, la vía del ácido shikímico, que da lugar a fenilpropanoides, y la vía del ácido acético, que puede producir fenoles simples, o la combinación de ambas que da lugar a la formación de flavonoides. Sus funciones en las plantas incluyen desde contribuir al soporte mecánico, la pigmentación, el crecimiento y el desarrollo (como agentes de señalización), hasta actuar como agentes de defensa contra daños fisiológicos y ambientales (Vazquez-Ovando, A. et al, 2016).

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en las plantas y se han descrito más de 8.000 moléculas. Estas especies contienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Por lo tanto, pueden encontrarse desde compuestos de un solo anillo aromático con bajo peso molecular hasta moléculas complejas conjugadas con azúcares o ácidos orgánicos. En función de su estructura química, el número de anillos fenólicos y los elementos estructurales que se unen a estos anillos, los (poli)fenoles pueden clasificarse en cinco grupos, flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, elagitaninos y lignanos (Singh, A. et al, 2011).

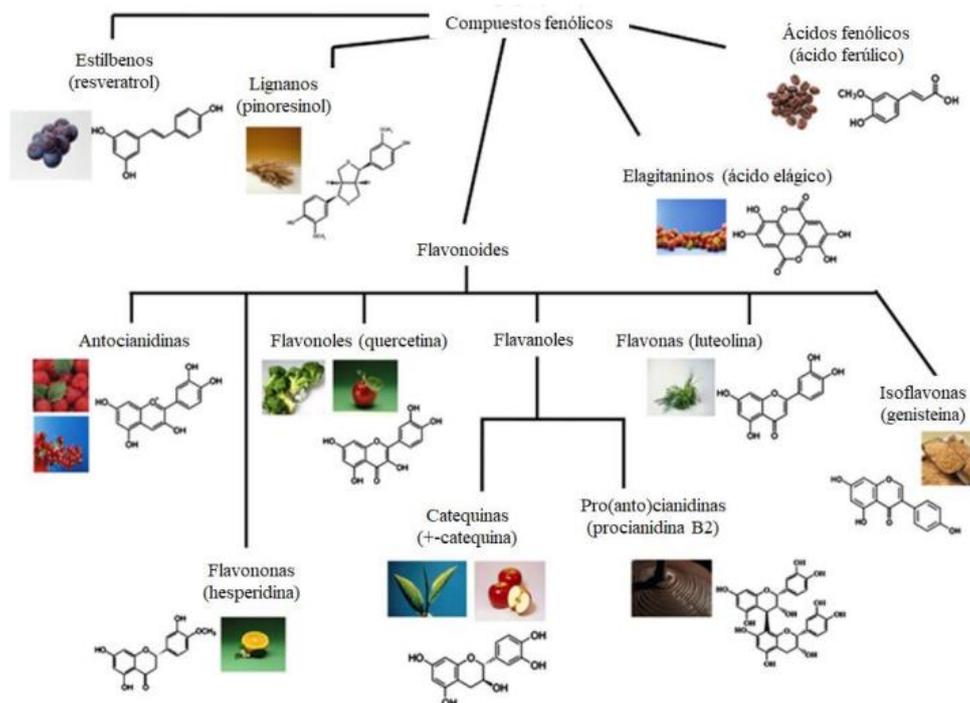


Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos.

Introducción

Dentro de esta familia de compuestos fenólicos, encontramos compuestos de interés como flavonoides, los cuales están presentes en residuos cítricos como corteza de limón, entre ellos la Hesperidina y Neohesperidina cuyas estructuras son de tipo flavonona. Otro compuesto presente en limón es la Luteolina, también de estructura flavona. Por otra parte, con respecto a los ácidos fenólicos, muy comunes en residuos de la industria de la alcachofa como brácteas y el tallo, es importante destacar los ácidos clorogénico, cafeico y la cinarina (ácido hidroxicinámico). En la industria de procesamiento de granada, cuyo principal residuo es su corteza, encontramos en mayoritariamente el grupo de Elagitaninos como la Punicalagina y el ácido Elágico (Singh, A. et al, 2011).

A continuación, se resumen las características estructurales de estos compuestos.

Flavonoides. La estructura básica del esqueleto de los flavonoides consiste en un anillo de cromon-4-ona al que se une un grupo arilo en posición 2. La variación en el grado y posición de la hidroxilación y el tipo de sustituyente en el heterociclo hace que puedan clasificarse en once grupos. Según su contribución al contenido alimentario, las principales subclases de flavonoides son flavonoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, antocianinas y flavanoles. Los flavonoides están ampliamente presentes en las plantas, particularmente en la epidermis de las hojas y la piel de los frutos (Abbas, M. et al, 2017).

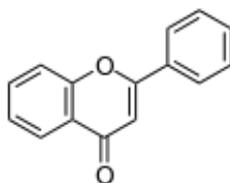


Figura 2. Estructura molecular de un flavonoide.

Los *flavonoles* son los principales flavonoides presentes en el reino vegetal, su biosíntesis se activa por la luz. Contienen un grupo hidroxilo en el átomo de carbono tres del anillo de cromona. Los más representativos son la quercetina, el kaempferol y la miricetina, que se encuentran predominantemente como O-glicósidos. También pueden estar presentes como agliconas. Las principales fuentes de flavonoles son la cebolla amarilla, la col rizada, el brécol, las manzanas, el té y el clavo (Kamiloglu, S. et al, 2020).

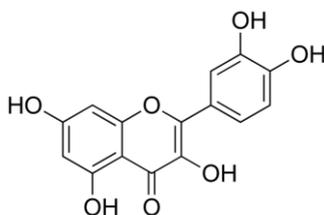


Figura 3. Estructura molecular de la quercetina, un flavonol.

Las *flavanonas* no son moléculas planas, y contienen un centro quiral en C2. Suelen estar glicosiladas por un disacárido (rutinosido o neohesperidósido) a través de un grupo hidroxilo en C7. Si el disacárido es neohesperidosido, adquiere un sabor amargo, mientras que en presencia de rutinosido da lugar a flavanonas insípidas. Se encuentran en altas concentraciones

sobre todo en los cítricos, como pomelos, naranjas y limones. Las más comunes son la naringenina, la hesperidina y el eriodictiol (Motilva, M. J. et al, 2013).

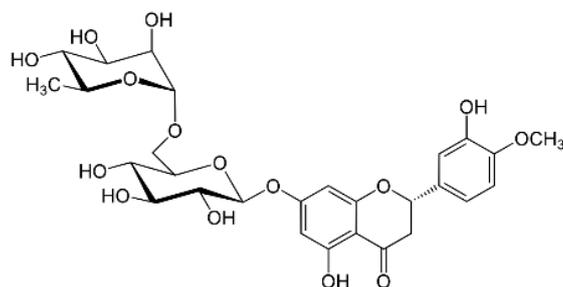


Figura 4. Estructura molecular de la hesperidina, una flavanona.

Las *flavonas* comparten una característica interesante como es su falta de hidroxilación en C3. Están representadas por la luteolina y la apigenina, la mayoría en forma de 7-O-glicósidos. Al contrario que los flavonoles, éstos no están presentes en las frutas. Sin embargo, se ha encontrado una cantidad significativa en el perejil y el apio, así como, en el pimiento verde, el brócoli, las aceitunas y algunas hierbas (salvia, tomillo, orégano) aunque en menor cantidad (Durazzo, A. et al, 2019).

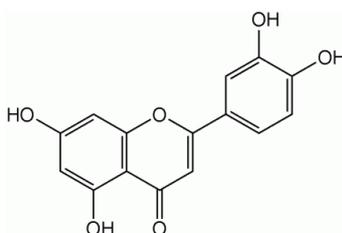


Figura 5. Estructura molecular de la luteolina, una flavona.

Las *isoflavonas* se caracterizan por tener un anillo de benceno unido a C3. Las tres moléculas principales son la genisteína, la daidzeína y la gliciteína, que se encuentran casi exclusivamente en plantas leguminosas, y las mayores concentraciones se dan en la soja y sus productos procesados (Abbas, M. et al, 2017).

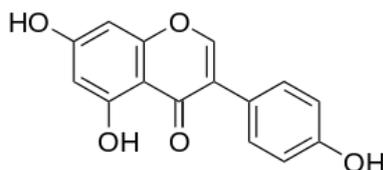


Figura 6. Estructura molecular de la genisteína, una isoflavona.

Las *antocianinas*, formadas por una columna vertebral de catión cromenilo, están estructuradas por una unidad de aglicona (antocianidina) con un glucósido. Las seis antocianidinas más comunes son la pelargonidina, la cianidina, la delphinidina, la peonidina, la petunidina y la malvidina. Éstas están presentes predominantemente en frutos y flores, pero también se encuentran en hojas, tallos y raíces, y son responsables de los colores rojo-naranja, a azul-violeta (Castañeda-Ovando, A. et al, 2009).

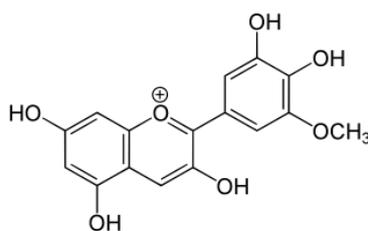


Figura 7. Estructura molecular de la petunidina, una antocianina.

Los *flavonoles* son la subclase estructuralmente más compleja de los flavonoides, e incluyen desde moneros simples, la catequina y su isómero la epicatequina, hasta estructuras complejas denominadas proantocianidinas que comprenden dímeros, trímeros y oligómeros. Los monómeros son moléculas no planas, con dos centros quirales. Suelen estar unidos a un grupo hidroxilo, aunque también pueden estar esterificados con ácido gálico (Herrero, M. et al, 2019).

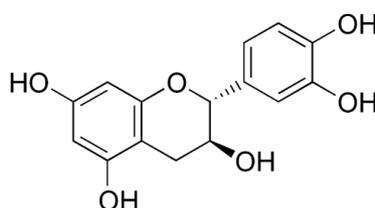


Figura 8. Estructura molecular de la catequina, un flavanol.

Ácidos fenólicos. Como resultado de la variación en el grado y la posición del grupo carboxílico en el anillo aromático o en una cadena propanoica lateral, los ácidos fenólicos pueden subdividirse en dos grupos, ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Éstos contribuyen a algunas características organolépticas importantes de los alimentos, como el color, el sabor, la astringencia y la dureza (Rashmi, H. B. et al, 2020).

Los *ácidos hidroxibenzoicos* están presentes de forma natural en su forma soluble, conjugados con un azúcar o ácidos orgánicos o, en su forma ligada, unida a los constituyentes de la pared celular como lignina. Los más representativos son el ácido gálico, el ácido *p*-hidroxibenzoico, el ácido vanílico, ácido siringico (Kumar, M. et al, 2019).

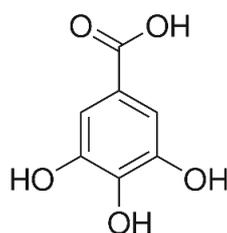


Figura 9. Estructura molecular del ácido gálico, un ácido hidroxibenzoico.

En cuanto a los *ácidos hidroxicinámicos* más representativos, comúnmente se encuentran conjugados como ésteres con ácidos quínicos o glucosa, o como amidas (conjugados con mono o poliaminas, aminoácidos o péptidos). Los más comunes son el ácido cafeico, el ácido ferúlico, el ácido sinápico y el ácido *p*-cumárico. Mientras que el ácido cafeico es el ácido fenólico más abundante en la mayoría de las frutas, el ácido ferúlico se encuentra principalmente en los cereales, como el trigo, el arroz, la avena y el maíz (Kumar, M. et al, 2019).

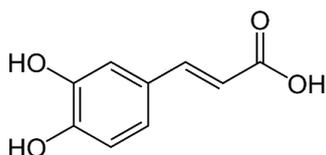


Figura 10. Estructura molecular del ácido cafeico, un ácido hidroxicinámico.

Elagitaninos. Son una clase de taninos hidrolizables, polifenoles formados principalmente de la unión oxidativa de grupos galoilo en la glucosa 1,2,3,4,6-pentagaloilo. Desde un punto de vista químico, los elagitaninos se diferencian de los galotaninos en que sus grupos galoílo están conectados mediante enlaces C-C, mientras que los grupos galoílo de los galotaninos están conectados por enlaces depsido (compuesto polifenólico que constan de dos o más unidades aromáticas). Los elagitaninos generalmente forman macrociclos, mientras que los galotaninos no. Los ellagitaninos contienen un número variable de unidades de hexahidroxiidifenilo, así como unidades de galoilo ligados a una fracción azucarada. Los elagitaninos están presentes en el mundo vegetal como en la granada, que contiene numerosas sustancias beneficiosas para nuestro organismo, entre ellas elagitaninos como punicalagina y ácido elágico, vitaminas y minerales. Los ellagitaninos son moléculas de especial interés por sus propiedades antioxidantes y neuroprotectoras (Sepulveda, L. et al, 2011).

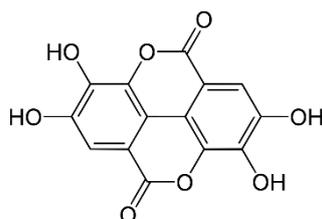


Figura 11. Estructura molecular del ácido elágico, un elagitanino.

Los compuestos polifenólicos en general son compuestos con capacidad antioxidante, que pueden actuar mediante dos mecanismos de acción; en el primero la molécula de polifenol reacciona con el radical libre, con la transferencia de un átomo de hidrógeno. En el segundo el oxidante transfiere un electrón singlete (Mendoza-Isaza, N. A. et al, 2020).

Además, los compuestos polifenólicos también se conocen por su capacidad antimicrobiana. Esto se debe a que pueden aumentar el contenido de radicales libres oxidantes y causar estrés oxidativo endógeno en cepas bacterianas. Estos compuestos aumentan la permeabilidad de la membrana bacteriana interna, anulando su potencial, disminuyendo la producción de ATP, el transporte de la membrana y su movilidad (Xiong, L. G. et al, 2017).

La naturaleza y distribución de los compuestos fenólicos en nuestra dieta dependen de la matriz alimentaria. En general, las frutas y verduras podrían contener hasta 200-300 mg de polifenoles por 100 g de peso fresco, por lo que pueden considerarse una gran fuente de compuestos bioactivos (Rasouli, H. et al, 2017).

Como se comentó antes, la necesidad actual de una cadena alimentaria sostenible exige la implementación de un enfoque de economía circular en las industrias de procesamiento. El enfoque principal de este es revalorizar las partes descartadas de vegetales debido a su gran contenido en compuestos bioactivos.

1.2. Industria de los cítricos y sus compuestos de interés

Los cítricos pertenecen al género *Citrus* y a la familia *Rutaceae*, y son frutas ampliamente comercializadas. En este grupo se encuentran el limón, la naranja, la lima, el pomelo y la mandarina, con diversas variedades que dependen de la región en la que se cultive cada una de ellas. En la Región de Murcia el limón (*Citrus Limón L. Burm*), la naranja (*Citrus X Sinensis*) y la mandarina (*Citrus Reticulata/Unshiu*) son las de mayor relevancia. Uno de los desechos agrícolas más significativos de la región mediterránea es la piel de los frutos cítricos. Las empresas dedicadas a la industrialización de cítricos (limón, naranja, mandarina, lima y pomelo), ya sea para producir zumos, cremogenados u otros productos, generan un porcentaje de residuos próximo al 50% del peso de la fruta entera original en forma de corteza constituida fundamentalmente por el albedo y el flavedo, semillas, membranas y hollejos de las vesículas del jugo (Marín, F. R. et al, 2007).

En la actualidad, el tratamiento y procesamiento de los residuos generados en la cadena de cítricos industriales representan uno de los problemas más importante en la empresa agroalimentaria, concretamente, el 50% de los cítricos son procesados, generando así entre 2 y 2.5 millones de toneladas en el área mediterránea. Dichos residuos suponen altos costes de eliminación, por lo que se considera un punto crítico en términos de sostenibilidad ambiental y económica dentro del sector (Ailimpo, 2020).

Por otra parte, las cortezas de cítricos son ricas en fibra dietética, flavonoides, carotenoides y otros muchos nutrientes valiosos que se pierden cuando se desechan como residuos. A esto se une el hecho de que, si se tratan como materiales de desecho, ocasionan notables problemas ambientales, particularmente la contaminación del agua. No obstante, este problema podría convertirse en una ventaja, si los subproductos potencialmente comercializables pueden extraerse y valorarse en varios ingredientes de valor añadido.

El procesamiento de cítricos en la agroindustria tiene diferentes fases, desde la recolección de materias primas hasta la obtención de los productos deseados. Durante este proceso, se genera una cantidad significativa de residuos. La naturaleza de los residuos mencionados son frutas de baja calidad y, especialmente, partes de las frutas sin valor comercial (corteza), que se eliminan durante el proceso de transformación. Este enorme volumen de residuos de cítricos no se gestiona y elimina mediante enfoques científicos y técnicos avanzados, sino que se realiza principalmente de manera inadecuada.

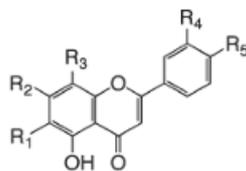
Los subproductos de los cítricos representan una importante fuente de flavonoides, encontrándose la mayoría de estos en la corteza. Los principales polifenoles que se encuentran en los cítricos son los flavonoides, de los cuales los más abundantes en el limón son los siguientes: flavanonas, flavonas, flavonoles y antocianinas (Horowitz, 1963).

Estudios realizados por Fernández et al, demuestran que las concentraciones presentes en la piel de limón son de alrededor de 1900 mg/kg peso fresco de polifenoles totales (Fernández-López et al, 2004).

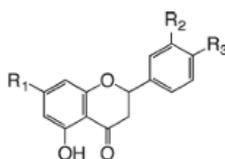
Los principales compuestos bioactivos encontrados en el limón son la hesperidina y neoeriocitrina, compuestos de tipo flavanona, encontrándose localizados en el flavedo y en el albedo de la corteza de limón (Pei-Hsin, S. et al, 2013).

Tabla 2. Estructura de diferentes flavonas (Barreca, H. et al, 2010).

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Compuesto
Glucosa	OH	Glucosa	H	OH	Vicenín-2 (Apigenín 6,8-di-C-glucósido)
Glucosa	OH	Glucosa	OH	OCH ₃	Diosmetín 6,8-di-C-glucósido
Glucosa	OH	Glucosa	OCH ₃	OH	Crisoeriol 6,8-DI-C-glucósido

**Tabla 3.** Estructura molecular de diferentes flavanonas (Barreca, H. et al, 2010).

R ₁	R ₂	R ₃	Compuesto
O-Rutinosa	H	OH	Narirutina (Naringenina 7-O-rutinósido)
O-Rutinosa	OH	OCH ₃	Hesperidina (Hesperidina 7-O-rutinósido)
O-Neohesperidosa	OH	OH	Neoeriocitrina (Erioditiol-7-O-neohesperidósido)
O-Neohesperidosa	O-glucosa	OH	Luteolin-neohesperidosidose



La mayoría de los flavonoides en los cítricos son flavanonas: la hesperidina, la narirutina y la neoeriocitrina predominan en los limones. Estos compuestos han atraído un interés considerable debido a sus efectos beneficiosos para la salud. Muchos trabajos publicados han referido que los flavonoides cítricos poseen actividades biológicas notables, como antioxidantes (Wang, Y. et al, 2020), antiinflamatorios (Carvalho, J.d.S. et al, 2021), anticancerígenos (Koolaji, N. et al, 2020), antidiabéticos y efectos de protección cardiovascular (Gandhi, G.R. et al, 2020), así como potenciales antiplaquetarios (Olas, B. 2021).

Los cítricos también presentan otros compuestos tipo terpenoide, como la limonina, compuesto triterpenoide, importante metabolito secundario con una importante actividad biológica en las plantas. Estudios recientes han demostrado que tiene actividades antitumorales, neuroprotectoras, antioxidantes y otras actividades biológicas, especialmente sus efectos supresores sobre el tallo tumoral. También compuestos tipo esteroide, donde encontramos el ácido nomilínico que es una lactona esteroidea. (Singh, Y. et al, 2022)



Figura 12. Estructura molecular limonina (izquierda) y ácido nomilínico (derecha).

Otro de los compuestos presentes es el ácido ascórbico (vitamina C), los productos enriquecidos con vitamina C han ganado mucho interés en el mercado debido a los beneficios que tiene en la salud humana. De hecho, la vitamina C es un componente importante en la dieta alimentaria ya que mejora la absorción de hierro no hémico (Teucher, B. et al., 2004), y porque podría estar relacionada con un menor riesgo de patologías como enfermedades cardíacas y cáncer. (Lykkesfeldt, 2020)

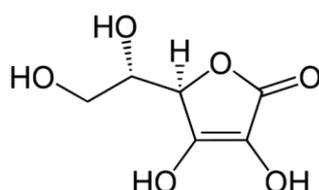


Figura 13. Estructura molecular vitamina C.

Algunos flavonoides, como los de estructura tipo flavanona, pueden captar directamente especies reactivas de oxígeno (ROS), como superóxido (O_2^-), agua oxigenada (H_2O_2) o ácido hipocloroso ($HOCl$), que pueden ser muy dañinos para lípidos, proteínas y DNA. Los flavonoides actúan fundamentalmente como tampones, capturando radicales libres con formación del radical flavínico, mucho menos reactivo ya que los electrones desapareados están más deslocalizados. La hesperidina tiene una estructura molecular tipo flavanona, la cual actúa como antioxidantes al unirse a especies reactivas de oxígeno (ROS) para limitar la cantidad de radicales libres (Zheng, M. et al, 2021).

1.3. Industria de la alcachofa y sus compuestos de interés

La alcachofa (*Cynara Scolymus L.*) es una planta herbácea perenne perteneciente al género *Cynara* y la familia *Asteraceae*. Comúnmente conocida como alcachofa de globo, se consume tradicionalmente en la dieta mediterránea. Su cultivo se considera una actividad importante de la agroeconomía de estos países mediterráneos (Sonnante, G. et al, 2007; Abu-Reidah, I. M. et al, 2013). La región mediterránea tiene una producción anual de alrededor de 770.000 toneladas. La porción comestible de esta planta incluye el receptáculo de flores inmaduras y las brácteas internas, denominadas “capítulos” o cabezas. Durante el procesado de la alcachofa, los residuos, principalmente hojas o tallos externos, representan aproximadamente el 60-80% del total de material vegetal cosechado, lo que se traduce en más de 460.000 toneladas de residuos generados anualmente. Sin embargo, estos subproductos poseen un gran contenido de compuestos bioactivos, inulina, fibras y minerales (Lattanzio, V. et al, 2009; El-Mesallamy, A. M. D. et al, 2020; Sanchez-Rabaneda, F. et al, 2003; Pandino, G. et al, 2013; Orlovskaya, T. V. et al, 2007)

A pesar de su contenido en estos interesantes compuestos, es la presencia de otras especies bioactivas lo que ha despertado mayor interés, especialmente los compuestos fenólicos (Shallan, M. A., et al. 2020). Además, la alcachofa se ha utilizado con fines medicinales desde la antigüedad, considerándose un alimento funcional (Lattanzio, V. et al, 2009; El-Mesallamy, A. M. D. et al, 2020). En consecuencia, la revalorización de subproductos alimentarios como material fuente de bioactivos ha experimentado un gran crecimiento debido a los beneficios económicos y ambientales que produce. En el caso de la alcachofa, los estudios más recientes basaron su investigación en brácteas externas, hojas y subproductos de tallos florales, que se consideran los principales descartes del procesamiento de la alcachofa por no ser aptos para el consumo humano (Rejeb, I. B. et al, 2020).

Estudios realizados por diversos autores como el de Fratianni et al, señalan que las hojas externas de alcachofa de algunas variedades poseen concentraciones importantes de compuestos de interés con actividad antioxidante. Los principales compuestos que se encuentran en las brácteas son el ácido 1,3-O-dicafeoilquínico (cinarina), seguido del ácido clorogénico. También se han encontrado concentraciones de cinarina en el tallo. Otro compuesto que se puede encontrar en elevadas concentraciones en las hojas externas de la alcachofa es el ácido cafeico (Fratianni, F. et al, 2007).

Cinarina. También llamada ácido 1,3-O-dicafeoilquínico, es un fitoquímico de la alcachofa conocido por sus potenciales actividades farmacológicas como antioxidante, antibacteriano, antirradical, anticolinérgico, antiaterosclerótico, anti-VIH, anticancerígeno y reductor del colesterol.

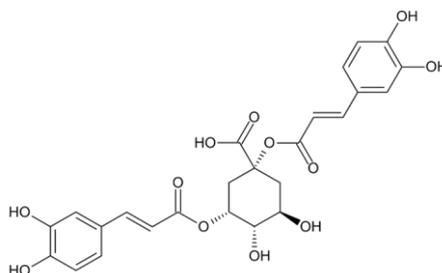


Figura 14. Estructura molecular de la cinarina.

Ácido clorogénico. También llamado ácido 5-O-cafeoilquínico, es el éster de ácido cafeico y del ácido quínico, funcionando como un intermedio en la biosíntesis de la lignina. En consecuencia, se ha prestado especial atención al ácido clorogénico por estar asociado a la vía del metabolismo secundario de diversas moléculas en las plantas (Pereira, J. C. et al, 2018). Numerosos investigadores han establecido los beneficios para la salud del ácido clorogénico, como la reducción de la respuesta glucémica a la sobrecarga de glucosa (Garambone, E. et al, 2007), la acción antioxidante (Scorsatto, M. et al., 2017) y prevención y reversión de la hemólisis asociada al daño del hidroperóxido de t-butilo en eritrocitos humanos (Portela, J. L. et al., 2017).

Lou Z. et al. encontraron actividad antimicrobiana en diferentes extractos de hojas de bardana (*Arctium lappa*) que contenían ácido clorogénico. Concluyeron que el ácido clorogénico muestra una fuerte actividad antimicrobiana, por lo que también se planteó la hipótesis de que se dirige a los procesos intracelulares de las bacterias, excepto la permeabilización de la membrana. El ácido clorogénico puede unirse y penetrar en la membrana bacteriana, provocando daño a la

Introducción

integridad de la membrana y resultando en muerte bacteriana. En este estudio si observó que este compuesto actúa con mayor intensidad sobre bacteria Gram Positivas como la *Listeria* y con menos intensidad sobre las bacterias Gram Negativas como la *Salmonella* (Lou, Z. et al, 2011).

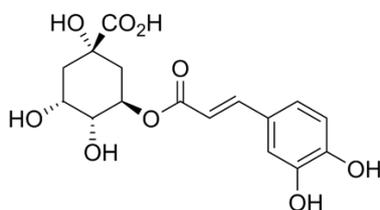


Figura 15. Estructura molecular del ácido clorogénico.

Ácido cafeico. También conocido como ácido 3,4-dihidroxicinámico, es un compuesto metabolito producido por las plantas, clasificado como hidroxicinamato y fenilpropanoide. El ácido cafeico está disponible en arándanos, manzanas, sidra, café y propóleos, entre otros. También se conoce como inhibidor carcinogénico y tiene un alto efecto antioxidante y cierta actividad antimicrobiana. Además, puede ayudar a prevenir enfermedades cardíacas y aterosclerosis, entre muchos otros beneficios. (Tabart, J. et al, 2009)

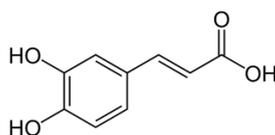


Figura 16. Estructura molecular del ácido cafeico.

Los estudios científicos ya han demostrado la relación de una dieta rica en antioxidantes y la protección de las enfermedades resultantes del daño oxidativo (Wang, J. et al, 2017). Algunas sustancias conocidas por su actividad antioxidante, como los tocoferoles, el β -caroteno y el ácido ascórbico, tienen una actividad inhibitoria restringida sobre los procesos de radicales libres; Los compuestos fenólicos contribuyen mucho más a la inhibición del daño oxidativo (Ignat, I. et al, 2011; Harasym, J. et al, 2014).

Los antioxidantes actúan inhibiendo y reduciendo los resultados provocados por especies de radicales y compuestos oxidantes. Sin embargo, los antioxidantes fenólicos funcionan como captadores de especies reactivas, que incluyen radicales libres, y actúan continuamente sobre la quelación de metales en la etapa de iniciación y en el proceso oxidativo (Hynes, M. J., et al, 2004).

El interés en una alimentación saludable, en las características antioxidantes y en los posibles beneficios para la salud de una dieta rica en compuestos fenólicos antioxidantes está aumentando con el tiempo (Roleira, F. M. et al, 2015). El ácido cafeico y el ácido ferúlico, así como otros antioxidantes fenólicos naturales, lograron una atención notable como agentes fotoprotectores prometedores, y pueden utilizarse en productos para el cuidado de la piel debido a su actividad antioxidante (Yamada, Y. et al, 2006; Murray, J. C. et al, 2008).

1.4. Industria de la granada y sus compuestos de interés

Punica granatum L., comúnmente conocida como granada, es originaria de la región mediterránea y hoy en día se cultiva y consume en todo el mundo como fruta fresca, zumo extraído, mermelada, infusión o ingrediente en varias recetas. En la producción industrial de zumo de granada la estadística es que de cada tonelada de fruta fresca genera 669 kg de subproducto que contiene 78% de cáscara y 22% de semillas (El-Shamy, S. et al, 2021). Las cáscaras de granada, que constituyen el 50% de la fruta entera, son el principal componente de desecho de la producción de zumo de granada, además de ser muy ricas en fibra, contiene un alto contenido de polifenoles en comparación con su concentración en cualquier otra parte de la fruta, conteniendo alrededor de 249.4 mg/g de compuestos fenólicos (expresado en equivalentes de ácido tánico) (Akhtar, S. et al., 2014).

La granada se ha utilizado en la medicina popular desde la antigüedad y es conocida por una variedad de efectos que promueven la salud, que incluyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antidiabéticas y antimicrobianas (Andrade, M. A. et al, 2019). Las moléculas bioactivas que se encuentran con mayor frecuencia son las antocianinas y los taninos hidrolizables (punicalina, punicalagina, ácido gálico y ácido elágico), específicamente punicalaginas, que son múltiples ésteres de ácido gálico y glucosa conocidos por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias (Kharchoufi, S. et al., 2018).

Punicalagina. Es un elagitanino antioxidante con 16 grupos hidroxilo, y es el compuesto principal de los polifenoles de la granada (*Punica granatum L.*). Posee diversa bioactividad, incluyendo propiedades antiinflamatorias y anti-apoptosis. (Kong, J. et al., 2020). Además, estudios anteriores han revelado que las altas dosis orales repetidas de Punicalagina en ratas no fueron tóxicas. Este hecho parece indicar que la punicalagina se considera un conservante de alimentos prometedor debido a que no es un compuesto tóxico para seres vivos y un candidato medicinal (Cao, Y. et al., 2019).

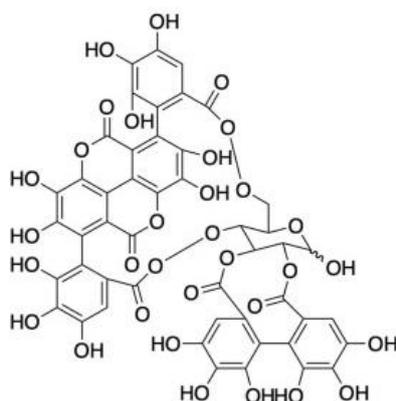


Figura 17. Estructura molecular de la punicalagina.

La punicalagina representa alrededor del 70% de los elagitaninos totales en la cáscara de la granada, con un gran peso molecular de 1084,7 Da y las características de un alto grado de hidroxilación. Al igual que otros polifenoles, la punicalagina de la cáscara de la granada exhibe muchas bioactividades, como actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, antibacterianas, anticancerígenas y antiateroscleróticas (Almowallad, S. et al., 2020).

Introducción

Punicalina. Es un elagitanino, también conocido como 4,6-(S,S)-galagil-D-glucosa. Es un compuesto bioactivo que se encuentra en la granada, encontrándose en la cáscara de granada en baja concentración, aproximadamente del 2% (Wang, Y. et al, 2013).

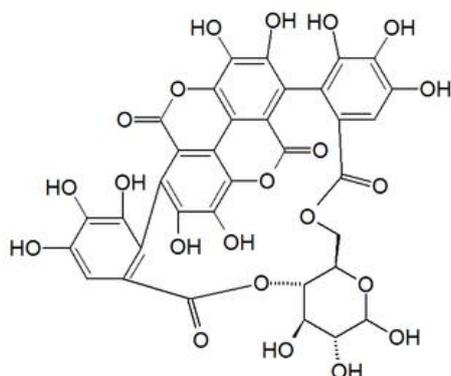


Figura 18. Estructura molecular de la punicalina.

Este compuesto ha generado un interés particular con respecto a los efectos en la salud humana, incluidas las actividades antioxidantes (Tzulkar, R. et al, 2007), la terapia multidirigida contra el cáncer (Heber, D., 2008), la actividad inhibidora del VIH- 1 transcriptasa inversa (V. Martino, V. et al, 2004)

Ácido Elágico. El ácido elágico es un polifenol natural que se encuentra ampliamente distribuido en nueces y frutas, incluidas nueces, granadas, arándanos y fresas (Kikuchi, H. et al, 2021). Diversos estudios refieren que posee actividades biológicas tales como antioxidante, anti-fibrosis y antiinflamatorio (Gupta, A. et al, 2021). En particular, el ácido elágico tiene un excelente potencial antioxidante gracias a su actividad quelante de metales, la actividad de eliminación de radicales y la mediación de la actividad de la enzima antioxidante (Vekiari, S. A. et al, 2008). Además, la actividad captadora de radicales del ácido elágico inhibe significativamente la peroxidación lipídica, y por otra parte, se ha usado para prevenir el cáncer, el sistema cardiovascular y la diabetes. El ácido elágico se aplica ampliamente en diversos campos, como las industrias de alimentos y medicamentos, debido a sus diversas actividades biológicas, que incluyen fuertes propiedades antioxidantes, anticancerosas y antimutagénicas (Zeb, A. et al, 2018).

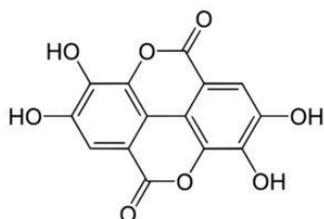


Figura 19. Estructura molecular del ácido elágico.

La punicalina y el ácido elágico en la cáscara de la granada actúan como inhibidores de la α - glucosidasa, disminuyendo de este modo la absorción de carbohidratos desde el tracto digestivo, reduciendo los niveles de glucosa después de las comidas. El resultado es una demora en la digestión de los hidratos de carbono con reducción de los picos glucémicos postprandiales,

por lo que su utilidad clínica es la corrección de hiperglucemias postprandiales (Bellesia, A. *et al.*, 2015).

Pedunculagina. Es un elagitanino el cual se forma a partir de casuarictin a través de la pérdida de un grupo de galato.

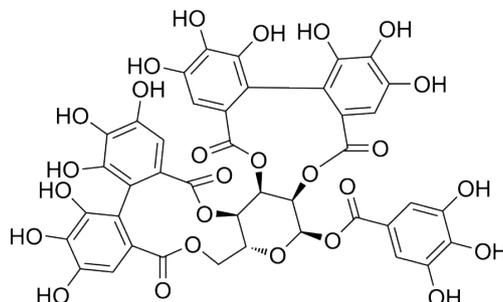


Figura 20. Estructura molecular de la pedunculagina.

Estudios como el de Silva, R. M et al muestran el poder antioxidante y los efectos beneficiosos para la salud de este compuesto, concluyendo que no solo protege el ADN de lesiones, sino que también acelera la eficiencia de la reparación del ADN en las células dañadas (Silva, R. M. et al, 2016).

1.5. Técnicas de extracción para la obtención de compuestos orgánicos en los subproductos alimentarios

La gestión de residuos agrícolas se contempla como un enfoque vital para lograr la conservación de los recursos y mantener la calidad del medio ambiente. El concepto actual de química verde se extiende en todo el mundo, afectando a la estrategia de aislamiento de macromoléculas de las plantas y, como resultado, en los últimos años novedosas técnicas respetuosas con el medio ambiente han surgido como una alternativa a los métodos tradicionales.

De este modo, a medida que aumenta la producción, también aumenta la generación de residuos sólidos y líquidos, lo que representa cantidades significativas de subproductos no explotados plenamente a nivel industrial. Un ejemplo de ello, son cantidades significativas de cáscaras de cítricos, brácteas y tallos de alcachofa y corteza de granada como subproductos. Estos subproductos se consideran recursos económicos y renovables para la producción de compuestos/extractos valiosos. (Sarangi, P. K. et al, 2023)

Por ello, con el fin de reducir el impacto ambiental causado por los materiales de desecho de la industria alimentaria de los cítricos, alcachofa y granada se plantea el desarrollo de alternativas necesarias para obtener productos de valor añadido a partir de estos residuos que puedan ser explotados en diferentes mercados.

Los principales compuestos de interés contenidos en un material vegetal pueden ser extraídos mediante diversas técnicas extractivas. La extracción es un proceso que utiliza diferentes disolventes (más o menos polares), dependiente del tipo de extracto a conseguir. El agua es uno de los disolventes más utilizados, pero tiene un poder de extracción relativamente pequeño comparado con otros disolventes orgánicos también empleados. Por esta razón, es un objetivo fundamental de este estudio aumentar el poder de extracción del agua mediante el empleo de

Introducción

diferentes tecnologías sostenibles con el medioambiente, a la par que novedosas en estos sectores, y reemplazar a los disolventes orgánicos.

El fin último de estas técnicas extractivas es el aprovechamiento de los subproductos vegetales para la obtención de compuestos orgánicos de alto valor añadido, por sus características funcionales, antimicrobianas o antioxidantes, para la industria agraria, alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. En relación con el estado del arte actual para la obtención de estos compuestos de interés de subproductos agroalimentarios, se describen a continuación las más relevantes. (Sarangi, P. K. et al, 2023)

Extracción convencional con disolventes. Se basa en la transferencia selectiva del compuesto de interés desde una mezcla sólida o líquida con otros compuestos hacia una fase líquida (normalmente un disolvente orgánico). El éxito de la técnica depende básicamente de la diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial. Cabe destacar métodos como la extracción tipo maceración y tipo Soxhlet, que suelen hacer uso de disolventes orgánicos muy contaminantes para la obtención de compuestos de orgánicos (Marsoul, M. et al., 2020).

Extracción mediante tratamiento enzimático. Las enzimas, como es sabido, actúan como catalizadores de una reacción, acelerando el proceso. Con las enzimas apropiadas se consigue romper la estructura de las membranas celulares para provocar la liberación del compuesto de interés en el interior de la estructura vegetal. Con esta extracción se pretende un aumento del rendimiento y facilitar la extracción de compuestos de fenólicos del material vegetal con la mayor pureza posible. Los principales factores que influyen en las reacciones enzimáticas son: pH, temperatura, cofactores, concentración de sustrato y de productos finales, actividad de inhibidores, costes y disponibilidad del compuesto de interés (Gligor, O. et al., 2019).

Extracción asistida por ultrasonidos. Esta técnica extractiva se basa en la utilización de sonidos de alta frecuencia para extraer un compuesto de interés de residuos agroalimentarios. Utiliza ondas que causan una presión negativa a través de un líquido suficiente para que la distancia entre las moléculas del mismo exceda la mínima distancia molecular requerida para mantener el líquido intacto, lo que origina que las fuerzas de cohesión se rompan y se cree un vacío. A este vacío es a lo que se denomina burbujas de cavitación. Las colisiones entre las burbujas de cavitación constituyen la primera fuente de los efectos químicos y mecánicos de la energía de ultrasonido. Al reducir el tamaño de las partículas del material vegetal, se aumenta el área de exposición al solvente y a la cavitación producida. Se requiere de un medio líquido, un generador de energía y un transductor, el cual convierte energía eléctrica, magnética o cinética en energía acústica (Khandare, R. D. et al., 2020). Cuando se aplican ultrasonidos lo suficientemente intensos, los ciclos de expansión pueden crear burbujas o cavidades en el líquido, y cuando las burbujas explotan (porque no pueden absorber más energía) se producen temperaturas y presiones muy elevadas que favorecen la liberación de compuestos. El empleo de la extracción asistida por ultrasonidos para la extracción de los compuestos de interés, como los compuestos polifenólicos, aumenta el rendimiento de extracción para la materia vegetal de los subproductos agroalimentarios (Dzah, C. S. et al., 2020).

Extracción con fluidos subcríticos. La extracción de agua subcrítica es una técnica sostenible con el medioambiente que utiliza las propiedades únicas del agua subcrítica, es decir, agua caliente por encima del punto de ebullición a condiciones de alta temperatura-presión justo por debajo de su punto crítico (374 °C, 220 bar). El uso de agua subcrítica se basa en un rango de

temperatura y presión de (100-250 °C) y (1-15 MPa) respectivamente. El conocimiento de los cambios en el agua con la presión y la temperatura es fundamental para comprender este método, esto se debe a la constante dieléctrica, que se reduce a valores similares a los del disolvente orgánico en condiciones subcríticas. Las propiedades físico-químicas del fluido se modifican, lo que le confiere una mayor reactividad que se aproxima a la de los disolventes de polaridad reducida. El fluido en estado subcrítico, además de tener una difusividad mayor, puede sustituir potencialmente a los disolventes orgánicos, como el metanol o la acetona, para determinadas aplicaciones. Las aplicaciones industriales adecuadas para esta tecnología son sobre todo la hidrólisis y la extracción selectiva. Sus ventajas son numerosas:

- Las extracciones son más rápidas, debido a la mejor difusividad del disolvente.
- Los costes de tratamiento de los efluentes se reducen, y no se producen emanaciones de componentes orgánicos volátiles.
- Desaparecen los problemas asociados al contenido residual de disolventes, a veces tóxicos, en los productos acabados.
- Ya no es necesaria la etapa tradicional de desolventización de la materia prima tras la extracción, lo que permite reducir los consumos de energía.

De este modo, el procedimiento se integra totalmente en el marco de una química más segura y respetuosa con el medioambiente (Trigueros, E. *et al.*, 2021).

Procesos de adsorción-desorción mediante adsorbatos. Este método consiste en la adsorción selectiva de compuestos orgánicos de interés en los poros de diferentes adsorbatos. Los adsorbatos son sustancias porosas capaces de retener diversas sustancias en sus poros. Esto se debe a la afinidad que tienen algunos compuestos orgánicos hacia la superficie porosa de algunas sustancias adsorbentes, las cuales son capaces de retener selectivamente a compuestos orgánicos en un alto rendimiento. Posteriormente, el adsorbato se trata en un proceso de desorción, liberando así los compuestos retenidos en este en un alto grado de pureza. (Buran, T. J. *et al.*, 2014). En la última década diversas son las investigaciones que dejan de lado las técnicas de extracción alternativas con disolventes orgánicos centrándose más en técnicas más limpias como puede ser procesos de adsorción-desorción. Esto se debe a que diversos adsorbatos como las resinas poliméricas son selectivas para adsorber diversos compuestos con buenos rendimientos y en un alto grado de purificación (Yu, Q. *et al.*, 2020). La adsorción se presenta como una medida prometedor, eficaz, sostenible y de bajo coste frente a muchos de los tratamientos alternativos actualmente utilizados o en estudio, que implica la propiedad de ciertas biomoléculas para unir y concentrar iones seleccionados u otras moléculas de soluciones acuosas. Se trata de un proceso de separación en el cual los componentes de la fase líquida de la solución pasan a la fase sólida del adsorbente, quedando enlazados a su superficie. La adsorción física se debe principalmente a fuerzas de Van de Waals y fuerzas electrostáticas entre los compuestos de interés y las que componen la superficie del adsorbente. Por tanto, las propiedades de la superficie del material adsorbente (área superficial y polaridad) son muy condicionantes. Además del bajo coste, este método tiene otras ventajas, incluida la simplicidad y la fácil adaptación a escala industrial y su elevada facilidad de manejo. (Mateen, F. *et al.*, 2016).

El proceso de adsorción consta de dos fases: una sólida (adsorbato) y una líquida (solvente), que contiene las especies disueltas que van a ser retenidas por el sólido. Los materiales adsorbentes están formados por macromoléculas que contienen una serie de grupos funcionales que pueden

Introducción

interactuar con los compuestos de interés de diferentes maneras, como la complejación superficial, el intercambio iónico, la interacción electrostática y la precipitación, que pueden ocurrir individualmente o en combinación. En general, el coste-eficiencia, la disponibilidad y las propiedades de adsorción, son los principales criterios que guían la selección de un adsorbente para la recuperación de compuestos orgánicos de interés (do Carmo, S. N. *et al.*, 2017). Un buen material adsorbente debería poseer además una estructura porosa (lo que supone una gran área específica ya que proporcionan una elevada superficie de sorción) y el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción debería ser lo más pequeño posible. Es interesante así mismo que posean una buena estabilidad mecánica y química y resistencia a la degradación microbiológica, pues de esta forma se alargará la vida útil del sorbente.

El proceso de adsorción puede verse afectado por diversos factores físicos y químicos, y estos factores determinan el rendimiento general de biosorción de un biosorbente determinado. Algunos de estos factores son: Tamaño de partícula. Debido a que la adsorción tiene lugar fundamentalmente en la superficie de las partículas, y que la capacidad de adsorción es directamente proporcional al volumen. Así mismo, el tamaño de partícula de la molécula que se desea adsorber condicionará la adsorción, pues las moléculas con un menor tamaño de partícula facilitan la difusión entre los poros del material adsorbente, mejorando el proceso de adsorción. pH de la solución. La eficiencia de la actividad de adsorción depende en gran medida del pH de la solución, debido a que la variación del pH podría provocar cambios adicionales en las cargas y estados de los grupos funcionales de los materiales adsorbente (Ali, M. *et al.*, 2018). Temperatura. La temperatura ejerce un efecto sobre la adsorción que depende de la entalpia. Si la adsorción es de tipo físico, el calor de adsorción es negativo, es decir, la reacción es exotérmica. Sin embargo, si la adsorción es de tipo químico, el calor de adsorción es positivo, lo que indica que el proceso es endotérmico y se ve favorecido por altas temperaturas. Así, y debido a que la adsorción es, de forma general, de tipo físico, el aumento de la temperatura conduce a una disminución de la tasa de adsorción debido a que las moléculas adsorbidas tienen mayores energías y, por lo tanto, es más probable que se liberen de la superficie del adsorbente. Tiempo de contacto. La tasa de fijación de los compuestos de interés en los poros del material adsorbente aumenta de forma progresiva con el tiempo de contacto hasta cierto punto. Alcanzado este punto, un aumento adicional en el tiempo de contacto no implica un aumento en la adsorción, debido que los sitios de adsorción del material adsorbente están ocupados por moléculas de contaminante y, por tanto, no están disponibles para las moléculas de interés. En este punto, la cantidad de compuestos orgánicos de interés que se desorbe está en un estado de equilibrio dinámico con la cantidad que se adsorbe. El tiempo requerido para alcanzar el estado de equilibrio se denomina tiempo de equilibrio, y la cantidad de compuestos bioactivos adsorbidos en el tiempo de equilibrio refleja la capacidad máxima de adsorción del adsorbente en esas condiciones operativas (Sahu, O. *et al.*, 2019).

Proceso de deshidratación mediante liofilización. La liofilización es una forma de secar relativamente novedosa, que tiene como aplicación más conocida la producción de café soluble. Para otros productos vegetales, esta opción de secado ha estado limitada por la elevada inversión requerida para adquirir los equipos y por los costos de producción, comparativamente superiores respecto de los de otras formas de deshidratación, destinándose sobre todo aquellos productos que, por sus características, composición o sensibilidad al calor, o por su alto valor añadido no hacen posible la aplicación de otras tecnologías de deshidratación convencionales o

más económicas. La liofilización es un segmento muy especializado de la industria. Se utiliza intensivamente en farmacia, en alimentos deshidratados, en producción de catalizadores y en nuevos materiales. La industria farmacéutica utilizó por primera vez el proceso de liofilización en 1909, cuando Schackell llevó a cabo la preservación de sustancias biológicas mediante este método. La liofilización del plasma de la sangre se consiguió en 1933, gracias a Farl W. Flosdorf, y estuvo en producción comercial en 1940. Las investigaciones para la liofilización de alimentos se iniciaron antes de la Segunda Guerra Mundial, sin embargo, esta técnica sólo se aplicó a productos comerciales a principios de los sesenta, y se usa principalmente en café soluble liofilizado y en otros productos como sopas deshidratadas, hongos, carne, aves, pescados, frutas y vegetales.

La liofilización es el secado bajo condiciones particulares, que comienza con la congelación a baja temperatura seguida de una evaporación al vacío eliminando por sublimación casi todo el contenido de agua. El producto obtenido por liofilización es un polvo o una sustancia dura y porosa, higroscópica en muchos casos, que necesita ser conservada en envases herméticamente sellados. Cuando se le restituye la cantidad de agua evaporada, el producto reproduce muy cercanamente su aspecto y sus propiedades originales. La liofilización se emplea en la obtención de compuestos de interés deshidratados con el fin de reducir las pérdidas de los compuestos responsables del sabor y el aroma en los alimentos, así como la desnaturalización de compuestos orgánicos sensibles al calor, los cuales se pierden durante los procesos convencionales de secado. Esta tecnología se presenta como alternativa al proceso de atomización para la obtención de compuestos de interés deshidratados a partir de subproductos alimentarios (Bajić, A. *et al.*, 2020).

1.6. Obtención de compuestos bioactivos y tendencia de mercado de ingredientes funcionales

Una de las principales investigaciones en la industria alimentaria es la recuperación y obtención de compuestos de interés de los desechos industriales agrícolas y alimentarios, cumpliendo con los objetivos de establecer una economía sostenible y circular en todo el mundo. En este sentido, los objetivos finales de las tecnologías convencionales y emergentes han sido maximizar el rendimiento, evitar la alteración y mantener la naturaleza de calidad alimentaria de los compuestos objetivo durante y después del proceso de recuperación. En años recientes, ha cobrado un gran impulso el desarrollo de tecnologías limpias de extracción de compuestos bioactivos disminuyendo el uso de disolventes orgánicos, el tiempo de extracción y las grandes cantidades de disolvente usado para estas extracciones, sin que ocurra pérdida de la funcionalidad de los compuestos de interés. Todo ello, además, con un menor costo de operación. Dentro de estas tecnologías se encuentra la extracción con enzimas, extracción asistida por ultrasonidos y la extracción con fluidos subcríticos. (Saffarzadeh-Matin, S. *et al.*, 2018). Algunas de las ventajas de estas técnicas extractivas se comentan en los siguientes párrafos.

- La extracción mediante tratamiento enzimático sin utilizar disolventes orgánicos no contamina el medio ambiente, y la versatilidad de las enzimas para catalizar una gran variedad de procesos para la producción de compuestos bioactivos naturales, representa un enfoque interesante para ser explotado (Gligor, O. *et al.*, 2019).

Introducción

- La extracción asistida por ultrasonidos es una tecnología económica y presenta los requerimientos instrumentales más bajos. Su aplicación resulta muy oportuna cuando la estabilidad de la materia prima o del componente activo a extraer se afecta con las temperaturas elevadas de los procesos convencionales (Trigueros, E. *et al.*, 2021).
- La extracción con fluidos subcríticos tiene unos requisitos instrumentales elevados debido a que son equipos que trabajan a altas presiones y temperaturas, esta técnica puede utilizar disolventes no tóxicos y respetuosos con el medio ambiente. A diferencia de las alternativas convencionales, esta técnica de extracción requiere menores cantidades de disolventes orgánicos y tiempos de extracción más cortos, lo que proporciona mejores rendimientos y extractos selectivos (Vidović, S. *et al.*, 2021).

En la obtención de compuestos de interés de la granada, existe literatura científica acerca del uso de técnicas de extracción como agua subcrítica en las semillas de granada. Así, en el estudio realizado por He, L. *et al.*, se optimizó la recuperación de polifenoles de la semilla de granada utilizando 180 °C de temperatura, 379 bares de presión, 30 minutos de extracción y una relación sólido/agua de 1:40 como condiciones de agua subcrítica, obteniendo 27.52 g/kg de polifenoles totales. Estos valores fueron comparados con los obtenidos de la extracción con disolventes orgánicos como metanol, etanol y acetona, que recuperaban 21.94, 11.48 y 12.51 g/kg de polifenoles totales respectivamente. En esta investigación también se utilizó la extracción con ultrasonidos y disolventes orgánicos, pero los resultados obtenidos fueron peores en cuanto a concentración de polifenoles en semilla de granada (He, L. *et al.*, 2012). En otro estudio encabezado por Yan, L. *et al.* se refiere la extracción de compuestos fenólicos en cáscara de granada mediante extracción con agua subcrítica, utilizando grandes cantidades de relación líquido: sólido (1:55), una temperatura de 126 °C y una presión de 30 bares durante 18.5 minutos, obteniéndose un extracto con una concentración de punicalagina de 81 g/kg en extracto seco liofilizado (Yan, L. *et al.*, 2017). También se han realizado investigaciones en las que se trata mediante ultrasonidos la cáscara de granada para la obtención de polifenoles, donde hacen uso de mezclas hidroalcohólicas como disolvente de extracción. Por ejemplo, Živković, J. *et al.* utilizó una relación cáscara de granada:disolvente de 1:44, utilizando como disolvente etanol al 59%, cuyo tiempo de extracción fue 25 minutos a 80 °C con una amplitud de ultrasonidos del 30% consiguiéndose un extracto seco con una concentración de 149 g/kg de compuestos polifenólicos, 12 g/kg de ácido elágico, 62 g/kg de punicalina y 18 g/kg de punicalagina (Živković, J. *et al.*, 2018).

Respecto a extracciones enzimáticas de compuestos de interés en cáscara de granada, una de las investigaciones realizadas es la de Nag, S. *et al.*, en las que utilizando una relación sólido: agua 1:10 con una enzima (viscozima) y un tiempo de extracción de 2 horas a 50 °C, obtuvieron 19.77 g/kg de polifenoles en el extracto seco. (Nag, S. *et al.*, 2018)

En la obtención de compuestos de interés de cítricos, el grupo de Liu, Y. obtuvo extractos a partir de cáscara de naranja, limón y mandarina mediante extracción con etanol absoluto utilizando una relación de cáscara:disolvente 1:20 y un tiempo de extracción de 2 horas. En este estudio, se comprobó la capacidad antifúngica de estos extractos contra *Aspergillus Flavus*, inhibiendo su crecimiento hasta en un 40% en el caso más favorable (Liu, Y. *et al.*, 2021). Otro estudio similar obtuvo extractos de limón a partir de cáscara de limón mediante una extracción con etanol absoluto en un ratio 1:10 sólido:disolvente y 30 minutos de extracción a temperatura ambiente.

El extracto obtenido y deshidratado se usó en la síntesis de polímeros para producir film activos para envases con capacidad antioxidante. (Mariño-Cortegoso, S. et al, 2022).

Lu, S. et al realizaron una comparativa sobre el efecto de ultrasonidos y de tratamientos enzimáticos en la extracción de polifenoles con capacidad antioxidante en flavedo de limón, y observaron que cuando trataban mediante ultrasonidos el flavedo con una potencia de 150W en una proporción de mezcla 1:20 sólido:agua durante 20 minutos a temperatura ambiente se obtenía una concentración de polifenoles de 23 g/kg en el extracto, mientras que cuando trataban el flavelo con un tratamiento enzimático se obtenían mejores resultados con las mismas condiciones de operación mediante una enzima amilasa, ya que se obtenía un extracto con una concentración de 36.8 g/kg de compuestos polifenólicos (Lu, S. et al, 2021).

Respecto la extracción con agua subcrítica de cáscara de cítricos, Kim, D. S. et al, trabajando con cáscara de mandarina, observaron como la concentración de flavonoides aumentaba de 26.1 g/kg, cuando la temperatura era de 120 °C, hasta 50.7 g/kg a 160 °C, ambas extracciones se realizaron a 50 bares de presión, con un tiempo de extracción de 15 minutos y utilizando como ratio 1:30 sólido:disolvente en todas las experiencias. Comparando en este mismo estudio con extracciones utilizando disolventes orgánicos como metanol, etanol y acetona con las mismas condiciones de extracción, pero a presión atmosférica y temperaturas de extracción de 65, 78 y 56 °C obteniendo 38.0, 21.1 y 8.7 g/kg de concentración de flavonoides respectivamente, por lo que obtuvieron valores más elevados en cuanto a contenido en flavonoides cuando usaban la extracción con agua subcrítica (Kim, D. S. et al, 2020)

En cuanto a la obtención de compuestos de interés de alcachofa, Stumpf, B. et al realizaron una comparativa sobre el uso de la extracción en hojas de alcachofa para la obtención de compuestos bioactivos con metanol, agua caliente y ultrasonidos, utilizando como disolvente metanol al 80%, y ratio de extracción 1:10, 1:3 y 1:5 hoja alcachofa:disolvente respectivamente. El tiempo de extracción fue en todos los casos 1 hora y la temperatura 70 °C, la potencia en el caso de la extracción con ultrasonidos fue de 35 kHz. Tras la obtención de los productos de extracción y análisis de contenido en polifenoles, observaron que la mayor concentración de compuestos bioactivos se obtenía al tratar las hojas de alcachofa con metanol, obteniéndose una concentración de 32.7 g/kg de polifenoles, seguido de cuando se utilizaba la tecnología de ultrasonidos (31.9 g/kg de polifenoles) y la extracción con agua caliente (29.5 g/kg de polifenoles) (Stumpf, B. et al, 2020). El uso de enzimas en técnicas de extracción en subproductos de alcachofa se ha documentado con el fin de obtener pectina, como el estudio de Sabater, C. et al, donde utilizaron la enzima Celluclast®1.5L para la obtención de un extracto con un 20.9% en pectina de alcachofa que contenía un 69.5% de ácido galacturónico y un 12.2% de arabinosa (Sabater, C. et al, 2018).

Respecto el uso de agua subcrítica como método de extracción en alcachofa, Aceituno, L. R. et al utilizaron esta técnica para la extracción de fibras solubles como inulina. Realizaron la extracción a 100 bares de presión y a 120 °C de temperatura durante 30 minutos, y una ratio de 1:36 sólido:agua, observándose se aumentaba la recuperación de fibra tipo inulina en comparación con tecnologías de extracción tipo microondas (Aceituno, L. R. et al, 2016).

El mercado de ingredientes de alimentos funcionales consiste en las ventas de ingredientes funcionales que son compuestos bioactivos o ingredientes utilizados en la fabricación de

productos funcionales, ya sea del sector alimentario, cosmético, farmacéutico. Vitaminas, minerales, antioxidantes, antimicrobianos, hidrocoloides, prebióticos, aminoácidos, extractos de plantas y carotenoides son algunos ejemplos de ingredientes alimentarios funcionales. Los ingredientes de los alimentos funcionales aportan beneficios para la salud y algunos de ellos incluyen suplementos u otros aditivos. Uno de los ejemplos de ingrediente funcional son los antioxidantes, agentes clave con diversas funciones, como la de proteger los productos terminados contra incrustaciones como el enranciamiento de la grasa y los cambios de color debido a la oxidación causada por bacterias, hongos, mohos y levaduras. Los ingredientes funcionales con capacidad antimicrobiana tienen como objetivo la sustitución de conservantes químicos, es por ello que la principal función es alargar la vida útil de los productos finales (Misra, S. et al, 2021).

El auge de la popularidad de los hábitos de vida saludables está propiciando el rápido crecimiento de empresas innovadoras de ingredientes naturales y orgánicos, convirtiéndose en un atractivo sector para la inversión dentro de la industria alimentaria. El tamaño del mercado mundial de ingredientes funcionales se valoró en 106.25 mil millones de dólares en 2021 y se espera que alcance los 210.58 mil millones de dólares en 2030, listo para crecer a una tasa compuesta anual del 7.9% durante el período previsto de 2022 a 2030. (Functional Ingredients Market Size & Share, 2023)



Figura 21. Valor de mercado de ingredientes funcionales y alcance esperado en el periodo 2021-2030.

Esto se atribuye a la creciente conciencia de los consumidores sobre los beneficios para la salud de los ingredientes funcionales, además de la creciente demanda de alimentos y bebidas funcionales y el aumento de la inversión en investigación y desarrollo. También se espera que el aumento del número de consumidores preocupados por su salud y la creciente incidencia de enfermedades crónicas contribuyan al crecimiento del mercado. Ya en 2015 se evidenció una tendencia cada vez más clara hacia los ingredientes funcionales en comparación con otras sustancias y aditivos comerciales. (Functional Ingredients Market Size & Share, 2023)

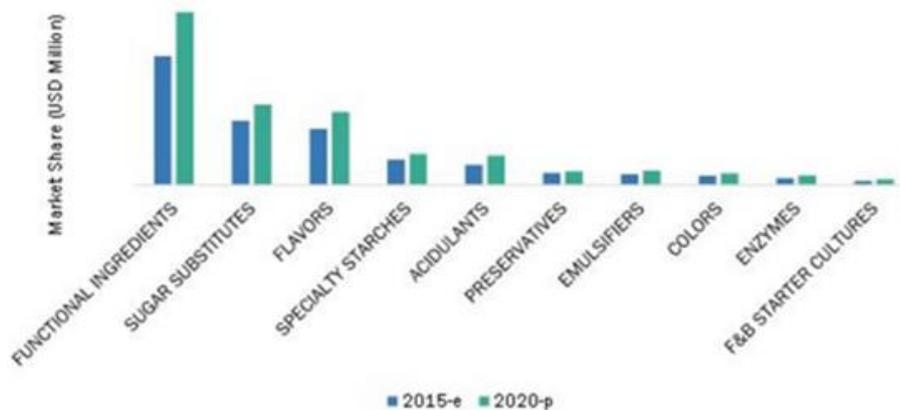


Figura 22. Evolución del mercado de los ingredientes funcionales en comparación con otras sustancias en el periodo 2015-2020. (Specialty Food Ingredients Market by Ingredient, 2015)

Además, se prevé que el aumento de la población mundial (hasta 9.700 millones de personas en 2050 según algunas estimaciones) impulse la demanda de ingredientes naturales funcionales capaces de sustituir muchos aditivos actuales de las formulaciones de productos.

Uno de los principales factores que impulsan el crecimiento del mercado es el avance de la tecnología y, posteriormente, las innovaciones en ingredientes funcionales. Las empresas desarrollan constantemente nuevos ingredientes que ofrecen una amplia gama de beneficios para la salud, por ejemplo, reducir el riesgo de cáncer y mejorar la función cognitiva. Por ejemplo, Cargill, empresa importante en este mercado, ha desarrollado una nueva línea de proteínas de origen vegetal que se pueden utilizar en alimentos y bebidas funcionales. La pandemia de COVID-19 tuvo un impacto moderado en el mercado, pero generó una mayor conciencia sobre la salud y la inmunidad entre los consumidores, lo que aumentó la demanda de ingredientes que puedan mejorar la inmunidad y la salud en general. Por ejemplo, ha habido un aumento en la demanda de vitaminas, minerales y probióticos, que se sabe que apoyan el sistema inmunológico. Se espera que el mercado de bebidas funcionales crezca hasta \$208.13 mil millones para 2024, con una tasa de crecimiento anual compuesta proyectada (CAGR) (2022-2027) de 7.5%, contribuyendo al crecimiento del mercado de los ingredientes funcionales. El consumo de alimentos y bebidas funcionales está aumentando debido a la creciente conciencia de los consumidores sobre la salud, el aumento de la aparición de enfermedades y el aumento de los ingresos disponibles de los consumidores. Las propiedades medicinales de estos alimentos al proporcionar beneficios curativos además de energía y nutrientes esenciales están motivando a los consumidores a gastar más en productos alimenticios saludables. (Kumar, E. K. et al., 2023).

El segmento de alimentos y bebidas dominó el mercado con la mayor participación en los ingresos del 44.8% en 2022. Esto se atribuye a vitaminas como minerales, fibras y aminoácidos, que se utilizan pródigamente en la industria de alimentos y bebidas para mejorar el valor nutricional de productos alimenticios y proporcionar beneficios específicos para la salud. A medida que los consumidores se vuelvan más conscientes de su salud, aumentará la demanda de alimentos y bebidas funcionales, lo que a su vez contribuirá a la demanda de productos en el futuro próximo. Además, se espera que el segmento farmacéutico registre un crecimiento durante el período previsto debido al creciente enfoque en la personalización y la medicina de precisión. Este enfoque implica adaptar el tratamiento y las estrategias de prevención a cada

paciente individual en función de su composición genética, estilo de vida y otros factores. Como resultado, las empresas están desarrollando ingredientes funcionales dirigidos a poblaciones y condiciones de salud específicas. Por ejemplo, existen suplementos probióticos dirigidos a la salud intestinal, suplementos de omega-3 para la salud del corazón y suplementos de vitamina D para la salud ósea. (Functional Ingredients Market Size & Share, 2023)

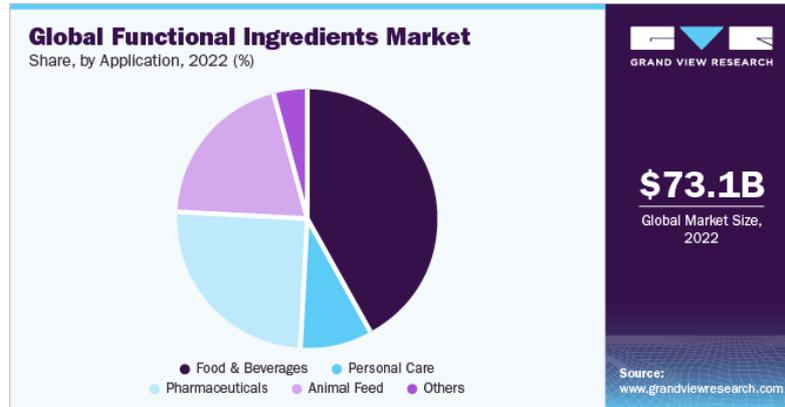


Figura 23. Participación de ingredientes funcionales en diferentes sectores industriales en 2022.

Por otra parte, la industria del cuidado personal, donde entra el sector cosmético, ha experimentado un crecimiento significativo debido a la mayor conciencia de los consumidores sobre los ingredientes utilizados para fabricar dichos productos. Los consumidores están optando por productos más naturales y saludables que no contengan productos químicos nocivos. Por lo tanto, los fabricantes utilizan ampliamente estos ingredientes funcionales como sustitución de compuestos químicos nocivos en las formulaciones de productos. La industria farmacéutica reconoce cada vez más el valor de los ingredientes alimentarios especiales en el desarrollo de nuevos productos que pueden ayudar a mejorar los resultados de salud de los pacientes. Los ingredientes alimentarios especiales se utilizan en una variedad de aplicaciones farmacéuticas, incluidos sistemas de administración de medicamentos, nutracéuticos y alimentos funcionales. (Misra, S. et al, 2021)

América del Norte dominó el mercado de los ingredientes funcionales con la participación de ingresos más alta del 32.2% en 2022. En la industria de ingredientes funcionales de América del Norte, se espera que los alimentos y bebidas funcionales ocupen una participación importante del mercado debido a la creciente demanda de alimentos y bebidas enriquecidos. También se espera que el segmento de suplementos dietéticos experimente una tasa de crecimiento significativa en los próximos años debido a la creciente demanda de suplementos dietéticos para la salud y el bienestar. (Functional Ingredients Market Size & Share, 2023)

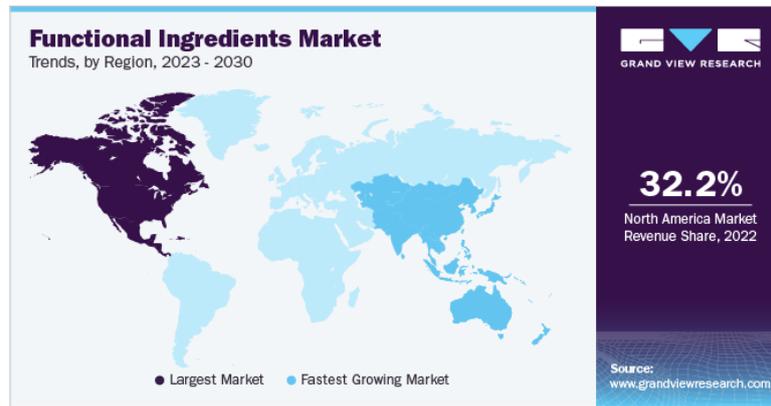


Figura 24. Mercado de ingresos por ingredientes funcionales en el mundo en 2022.

Los actores clave que operan en el mercado norteamericano incluyen DuPont de Nemours, Inc.; Cargill, Inc.; Grupo Kerry; Alimentos Arla; y DSM. Estas empresas se están centrando en lanzamientos de nuevos productos, colaboraciones y asociaciones para ampliar su presencia en el mercado. Por ejemplo, DuPont de Nemours, Inc. lanzó recientemente una gama de nuevos ingredientes probióticos que pueden usarse en una variedad de aplicaciones de alimentos y bebidas. Los principales actores en el mercado de ingredientes de alimentos funcionales son Cargill, BASF, Archer Daniels Midland, DuPont Nutrition & Biosciences, Arla Foods, Kerry Group, Ajinomoto, DSM, Ingredion Incorporated, Tate & Lyle, Roquette Freres, Nestlé, Fuerst Day Lawson, Ashland, Ingredientes A&B y Royal Cosun. (Functional Ingredients Market Size & Share, 2023)

En la actualidad, la búsqueda de un estilo de vida saludable ha vuelto a provocar un cambio en el comportamiento de los consumidores, que cada vez prestan más atención a la composición de los productos que adquieren y demandan productos con ingredientes y aditivos naturales. Tanto es así que el etiquetado “Clean Label”, que se convirtió en tendencia hace unos años, ha pasado ya a ser un estándar dentro del sector de la alimentación. Esto ha provocado a su vez grandes cambios en los procesos de producción de la industria alimentaria, que debe adaptar sus formulaciones a las nuevas demandas de los consumidores a través de ingredientes más naturales y libres de aditivos, emplear nuevas tecnologías de conservación y tipo de envasado (Misra, S. et al, 2021).

2. Justificación y objetivos

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, se generan grandes cantidades de residuos durante los procesos de transformación en las industrias agroalimentarias, y a pesar de que para ellos existen algunos usos como la producción de biomasa y de piensos para alimentación animal, su producción es tan elevada que supone un problema importante en todo el mundo debido a los impactos ambientales perjudiciales que genera.

La Región de Murcia es una potencia en el sector de transformación de productos agroalimentarios, destacando los sectores de los cítricos, la alcachofa y la granada. En cualquiera de ellos, y debido a la alta producción, se genera una cantidad ingente de residuos. Sin embargo, estos residuos constituyen fuentes potenciales de compuestos de alto valor añadido y de gran interés, por lo que, con su revalorización, además de reducir el volumen de desecho y minimizar el gasto de gestión de residuos, se podrían producir diversos compuestos de provecho. En general, el interés de estos productos se debe a sus propiedades como agentes bioactivos, especialmente como antioxidantes y antimicrobianos, y su uso como alternativa natural a aditivos químicos sintéticos en las formulaciones de diferentes sectores industriales.

La extracción de compuestos bioactivos de estas materias vegetales se realiza utilizando métodos tradicionales que hacen uso de disolventes orgánicos, siendo estos procesos poco viables a escala industrial debido a los problemas medioambientales y de salud humana que ocasionan, y al elevado coste de inversión de estas plantas industriales. Por todas estas razones, la investigación en tecnologías de extracción de compuestos de interés que permitan la reducción de disolventes orgánicos ha cobrado un gran impulso. Algunos de estos procesos verdes se han descrito en bibliografía a escala laboratorio, pero en la literatura científica referente a procesos a gran escala, así como en las patentes existentes para la revalorización de estos subproductos, no hemos encontrado procesos alternativos al uso de disolventes orgánicos.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente Tesis Doctoral se centra en la obtención de compuestos bioactivos, a través de tecnologías verdes de extracción, con el objetivo de eliminar los disolventes orgánicos altamente contaminantes que se utilizan en la actualidad en las industria de ingredientes alimentarios, permitiendo la obtención productos naturales, estables, con un alto contenido en compuestos bioactivos y producidos como consecuencia de la revalorización de los residuos agroalimentarios que se generan mayoritariamente en los sectores de cítricos, alcachofa, y granada de la Región de Murcia.

Los resultados de la presente tesis son de aplicación directa a nivel industrial y no solo para la Región de Murcia, también a nivel nacional e internacional en toda el área mediterránea, donde se encuentran los principales generadores de estos subproductos.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es dar un valor a los residuos de la industria de cítricos, alcachofa y granada, que son los que se generan en mayor cantidad en la Región de Murcia y que suponen un mayor impacto para el medioambiente, mediante el desarrollo de procesos de extracción alternativos a los tradicionales, para la obtención de compuestos de interés. En el desarrollo de unas nuevas técnicas extractivas no perjudiciales para el medio ambiente, en las

Justificación y objetivos

que se elimina el uso de disolventes orgánicos, también se ha contemplado que su escalabilidad sea viable industrialmente.

Para alcanzar este objetivo general se han planteado otros más específicos que se requieren a continuación:

- Determinar la viabilidad de la revalorización de los residuos de la industria de los cítricos, alcachofa, y granada generados en industrias procesadoras de frutas de la Región de Murcia como fuente de compuestos bioactivos potencialmente presentes en los mismos.
- Desarrollar y optimizar un proceso de extracción como resultado de la investigación en diferentes tecnologías sostenibles, como tratamientos con enzimas, ultrasonidos, fluidos subcríticos y procesos de adsorción-desorción, escalables a nivel industrial y basados en la recuperación sostenible de compuestos de interés para la nutrición humana.
- Validar los extractos naturales obtenidos como ingredientes sustitutivos de aditivos antioxidantes y antimicrobianos para la industria alimentaria mediante la caracterización nutricional, toxicológica y determinación de sus capacidades antioxidante y antimicrobiana.

3. Materiales y métodos

3.1. Subproductos alimentarios

Los subproductos con los que se ha llevado a cabo esta investigación han sido residuos agroalimentarios de las industria del limón, alcachofa y granada, y han sido proporcionados por empresas de la Región de Murcia. Este material vegetal, que se detalla a continuación, es el que ha utilizado para realizar los diferentes procesos de extracción de los compuestos de interés contenidos en dicho material.

3.1.1. Subproducto de limón

El subproducto de limón consta de corteza de limón de la variedad *Fino*, recogida tras la etapa de exprimido y retirada de aceites esenciales en la elaboración de zumo. Las cáscaras de limón se transportaron directamente al laboratorio en un plazo no superior a 1 hora tras su obtención y se almacenaron a -18 ± 1 °C hasta la realización de los experimentos de extracción.



Imagen 1. Subproducto de limón de variedad *Fino*.

3.1.2. Subproducto de alcachofa

El subproducto de alcachofa está compuesto por brácteas y tallos de alcachofas, sin escaldar, de la variedad *Blanca de Tudela*, recogido como descarte en las diferentes líneas de producción. Las brácteas y tallos de alcachofa se transportaron directamente al laboratorio en un plazo no superior a 1 hora tras su obtención y se almacenaron a -18 ± 1 °C hasta la realización de los experimentos de extracción.



Imagen 2. Subproducto de alcachofa de variedad *Blanca de Tudela*.

3.1.3. Subproducto de granada

Por último, el subproducto de granada lo compone la corteza de granada de la variedad *Mollar*, y se recoge tras la extracción de las semillas de su interior. Como en los dos casos anteriores, las cortezas de granada se transportaron directamente al laboratorio en un plazo no superior a 1

hora tras su obtención y se almacenaron a -18 ± 1 °C hasta la realización de los experimentos de extracción.



Imagen 3. Subproducto de granada de variedad *Mollar*.

3.2. Optimización de la extracción de compuestos a escala de laboratorio

Se han llevado a cabo diferentes experimentos con el fin de optimizar las diversas técnicas de extracción. Dicha optimización se refiere al poder extractivo de cada tratamiento en función de la capacidad de la técnica para recuperar compuestos polifenólicos. Además, a lo largo de todos nuestros estudios, se han utilizado técnicas de extracción sostenibles.

Con los objetivos de establecer los protocolos de extracción y poner en marcha las diferentes técnicas, se ha diseñado un protocolo común a todas que contempla tanto el pretratamiento y como el post-tratamiento, y que se presenta a continuación:

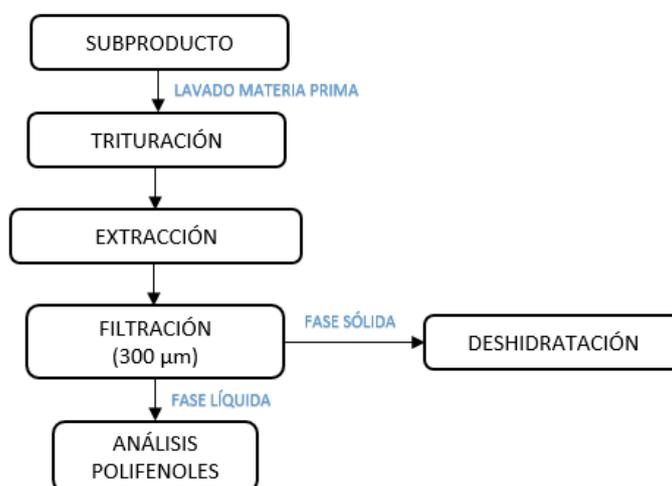


Figura 25. Diagrama común para la optimización de las técnicas de extracción a escala de laboratorio.

La optimización de la extracción de compuestos a escala de laboratorio se ha realizado partiendo de 1 kilogramo de subproducto para cada experiencia. En este protocolo se ha establecido que una vez recepcionado el subproducto agroalimentario, en la primera etapa del proceso, el material vegetal se lava con agua para eliminar posibles sólidos no deseables en su superficie. Posteriormente, se tritura el material en dados de 20 mm x 20 mm con el fin de disminuir el tamaño de la matriz vegetal y que los compuestos de interés estén más expuestos al disolvente.

Una vez realizado el pretratamiento de la muestra, el residuo agroalimentario pretratado se somete a las diferentes técnicas de extracción, variando los diferentes parámetros de proceso para comprobar cuales son los óptimos en cada tipo de tecnología extractiva y para cada subproducto agroalimentario. Estos experimentos se comentan detalladamente en los siguientes apartados.

Las técnicas de extracción que se han optimizado a escala de laboratorio son:

- **Extracción acuosa**
- **Extracción mediante tratamiento enzimático**
- **Extracción asistida por ultrasonidos**
- **Extracción con agua subcrítica**

Finalizado el tratamiento de extracción, se separa la fase acuosa de la sólida mediante un filtro de malla de acero inoxidable de 300 μm y se procede a analizar la fase acuosa extraída y comprobar con cuál de las condiciones extractivas se ha obtenido un mayor contenido de polifenoles totales.

Los ensayos para optimizar las condiciones experimentales de las diferentes tecnologías extractivas se han realizado por triplicado, esto es, tres réplicas de extracción por cada proceso.

3.2.1. Optimización de la extracción acuosa de subproductos agroalimentarios

Para la optimización de las condiciones de extracción cuando esta es acuosa, se seleccionaron diferentes parámetros de operación y se siguió el protocolo descrito anteriormente. Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

- **Relación sólido:líquido**
- **Temperatura de extracción**
- **Tiempo de extracción**

En primer lugar, se optimizó la cantidad de disolvente (agua) necesaria en relación a la cantidad de subproducto en la etapa de extracción. Los diferentes ensayos se realizaron manteniendo constantes la temperatura, temperatura ambiente, y el tiempo de extracción (60 minutos), pero modificando la relación sólido:líquido en las proporciones 1:2, 1:3 y 1:4 peso subproducto/volumen de agua.

Tras establecer la relación sólido:líquido óptima, se procedió a estudiar la influencia de la temperatura de extracción, y se realizaron ensayos a 50 °C, 75 °C y 98 °C, manteniendo la relación sólido:líquido en 1:3, pues fue la que mayor concentración de polifenoles rindió en los experimentos anteriores, y se mantuvo constante en 60 minutos el tiempo de extracción.

Los rangos de tiempos de extracción y ratio subproducto:disolvente que se ensayaron para optimizar los procesos de extracción, se eligieron basándonos en la investigación realizada por Saini et al, en la que se realiza una optimización de la extracción de polifenoles en corteza de mandarina concluyendo que los parámetros óptimos son un ratio 1:3 (p/v) y un tiempo de 60 minutos de extracción. (Saini et al, 2019)

En los ensayos destinados a optimizar otros parámetros experimentales del resto de técnicas de extracción estudiadas en esta Tesis, se emplearon distintos valores de temperatura de extracción según las peculiaridades de cada una de las técnicas. Así, en las extracciones

Materiales y métodos

enzimáticas se fijó la temperatura a 50 °C debido a que es el valor de máxima eficacia de las enzimas utilizadas, y por tanto nos permitiría posteriormente realizar una comparativa sobre la eficacia de la extracción. Para los ensayos de extracción mediante ultrasonidos se fijó la temperatura a 75 °C dado que, en todas las ocasiones, fue la temperatura que alcanzaba la mezcla en la extracción por ultrasonidos. Por último, la temperatura de 98 °C se seleccionó debido a que es la máxima temperatura que alcanzó la mezcla a presión atmosférica.

Por último, se optimizó el tiempo de extracción manteniendo los parámetros de ratio de subproducto:disolvente y temperatura óptimos constantes.

Finalizada la extracción con las diferentes condiciones de proceso, se caracterizó la fase acuosa filtrada atendiendo al contenido de polifenoles totales mediante el método Folin Ciocalteu (Singleton, V. L. et al, 1999).

3.2.2. Optimización de la extracción enzimática de subproductos agroalimentarios

Para llevar a cabo los ensayos destinados a la optimización de las condiciones de extracción de la extracción enzimática se seleccionaron los siguientes parámetros de operación:

- **Tipo de enzima**
- **Concentración de enzima**

Dado que en la extracción enzimática se usa también agua como disolvente, se han usado algunos de los parámetros optimizados en la extracción acuosa, como son:

- **Relación sólido:líquido**
- **Tiempo de extracción**

Así pues, se utilizaron dos enzimas celulasas, NATUZYM UF (WeissBiotech) y VALIDASE TRL (DSM Food Specialties B.V.), la temperatura a la que se llevaron a cabo este tipo de extracciones fue la indicada en la ficha técnica de cada enzima; en ambos casos, tanto la NATUZYM UF como la VALIDASE TRL, la temperatura recomendada para la actividad efectiva de la enzima es 50 °C. El pH indicado por el proveedor para la mayor efectividad de ambas celulasas se sitúa en el intervalo 3.5-5.0.

Nuevamente, atendiendo a lo establecido en la ficha técnica de ambas enzimas, se eligió un rango de concentración enzimática para la enzima NATUZYM UF de 0.01 – 0.02% de cantidad en relación a la matriz vegetal seca, mientras que en el caso de la VALIDASE TRL el rango de concentración fue de 0.001 – 0.01% de cantidad en relación a la matriz vegetal seca.

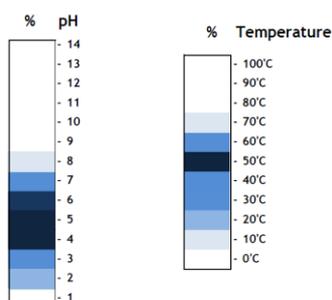


Figura 26. Rangos de pH y temperatura de máxima efectividad de las enzimas VALIDASE TRL y NATUZYM UF

Finalizados los ensayos de extracción empleando las diferentes condiciones experimentales, se caracterizó la fase acuosa, sin realizar la etapa de desactivación enzimática, atendiendo al contenido de polifenoles totales mediante el método Folin Ciocalteu (Singleton, V. L. et al, 1999).

3.2.3. Optimización de la extracción asistida por ultrasonidos de subproductos agroalimentarios

Para la optimización de las condiciones de extracción de la extracción asistida por ultrasonidos se seleccionó el siguiente parámetro de operación:

- **Potencia de extracción**

Como en el caso anterior, en la extracción asistida por ultrasonidos se han utilizado algunos de los parámetros optimizados en la extracción acuosa, debido a que también se usa agua como disolvente de extracción:

- **Relación sólido:líquido**
- **Tiempo de extracción**

Estas extracciones se han llevado a cabo utilizando un ultrasonidos UIP500hDT (Hielscher) a diferentes potencias ultrasónicas, en concreto a 135, 250 y 320W. La temperatura de extracción fue la alcanzada debido al choque de ondas sonoras en la mezcla, y que en todas las ocasiones llegó a los 75 °C.

Basándonos en el valor de tiempo de extracción optimizado tras los ensayos de la extracción acuosa, además de en el análisis de artículos científicos como el de Yang et al, donde refiere que el valor óptimo del tiempo de extracción de compuestos de interés de las semillas de cítricos es de 60 minutos. (Yang, M. et al, 2020)

Las potencias ultrasónicas se han fijado teniendo en cuenta los resultados de las experiencias realizadas por Zheng et al, donde encontraron las condiciones de extracción óptimas cuando utilizaron como potencia 320 W en mandarina. (Zheng, G. et al, 2020)

Posteriormente, y como en los casos anteriores, se caracterizó la fase acuosa filtrada atendiendo al contenido de polifenoles totales mediante el método Folin Ciocalteu (Singleton, V. L. et al, 1999).

3.2.4. Optimización de la extracción con agua subcrítica de subproductos agroalimentarios

Para la optimización de las condiciones experimentales en la extracción con agua subcrítica se han seleccionado los siguientes parámetros de operación:

- **Temperatura de extracción**
- **Tiempo de extracción**

Todas estas experiencias se han llevado a cabo utilizando un equipo Thermo Scientific Dionex™ ASE™ 350, el cual tiene configurada una presión de operación constante en sus tratamientos extractivos de alrededor de **150 bares**. El volumen de líquido de extracción usado por el equipo depende de la cantidad de muestra introducida en la celda metálica de extracción, en todos los casos ensayados, la relación sólido:líquido que se empleó con este equipo fue una **relación 1:3 p/v**.

Materiales y métodos

En primer lugar, se optimizó la temperatura de extracción con agua subcrítica realizando los ensayos a 80, 100 y 120 °C, siendo el valor de 120 °C el que mejores resultados proporcionó. Tras establecer la temperatura de trabajo óptima, se procedió a evaluar el tiempo de extracción, realizándose ensayos de 1, 5 y 10 minutos.

Los valores utilizados de temperaturas y tiempos de reacción se eligieron tras la búsqueda bibliográfica de diferentes artículos científicos. Cabe resaltar la investigación realizada por Arapitsas *et al*, donde se demuestra que cuando se aplican altas presiones, temperaturas por debajo de 80 °C conducen a bajos rendimientos de extracción de compuestos polifenólicos, y temperaturas por encima de 120 °C degradan los compuestos polifenólicos. (Arapitsas, P. et al, 2008)

El agua subcrítica se genera con un extractor acelerado de disolventes, por lo que con esta técnica se busca reducir el tiempo de extracción lo máximo posible y establecer si con valores pequeños de tiempo esta tecnología es capaz de recuperar igual o más compuestos de interés que el resto de tecnologías. Los tiempos seleccionados para esta tecnología se fijaron de acuerdo con los resultados descritos por Lachos-Perez et al. Estos investigadores concluyeron que una temperatura de 120 °C y un tiempo de 5 minutos son las condiciones óptimas para obtener el máximo rendimiento en la extracción con agua subcrítica de flavonoides en corteza de naranja. (Lachos-Perez et al, 2018)

Finalizadas las extracciones con las diferentes condiciones ensayadas, se caracterizó la fase acuosa atendiendo al contenido de polifenoles totales mediante el método Folin Ciocalteu. (Singleton et al, 1999)

3.3. Protocolo de extracción a escala de planta piloto

Una vez optimizadas las condiciones de extracción para cada una de las diferentes técnicas para la revalorización de los subproductos agroalimentarios, se procedió a escalar el procedimiento a planta piloto.

En este apartado se detalla el protocolo de extracción a escala de planta piloto seguido en los siguientes tratamientos:

- **Extracción acuosa**
- **Extracción mediante tratamiento enzimático**
- **Extracción asistida por ultrasonidos**
- **Extracción con agua subcrítica**

A continuación, se describe el protocolo general que se ha seguido para la revalorización con las diferentes técnicas de extracción objeto de estudio, haciendo uso de las condiciones óptimas de proceso a escala de laboratorio.

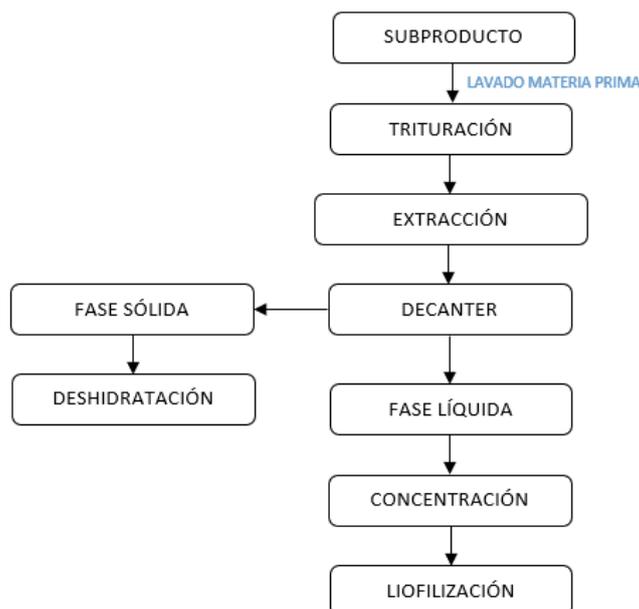


Figura 27. Protocolo para la revalorización de subproductos agroalimentarios a escala de planta piloto.

3.3.1. Descripción del protocolo común para todos los procesos de extracción a escala piloto

La extracción de compuestos de interés a escala de planta piloto se ha realizado partiendo de 100 kilogramos de subproducto para cada experiencia, excepto en la extracción con agua subcrítica, en la que se ha partido de 20 kilogramos de subproducto debido a la menor capacidad del equipo.

En la primera etapa del proceso, el subproducto agroalimentario se lava para la eliminación de posibles sólidos no deseables en su superficie en una lavadora de vegetales. La lavadora utilizada se compone de dos depósitos de lavado con agujeros de diámetro de 475 mm, provistos de desagüe y rebosadero, contruidos en chapa de 2 mm. Los depósitos están provistos de entrada de agua y de aire soplante de 1.3 kW para producir burbujeo y cesto para el lavado del material vegetal.

Posteriormente, se elimina el agua sobrante del material vegetal mediante una centrífuga de vegetales. Dicho aparato está compuesto por un depósito con agujeros de diámetro de 475 mm, provistos de desagüe para la disminución de nivel de humedad de vegetales post-lavado mediante rotación del cesto a alta velocidad.

Para disminuir el tamaño de la matriz vegetal y que los compuestos de interés estén más expuestos al disolvente, se tritura el material en una cortadora (Urschel), obteniéndose dados de 20 mm x 20 mm gracias a un juego de cuchillas que cortan la muestra en cubitos uniformes de dicho tamaño. La máquina ofrece un funcionamiento continuo para producción ininterrumpida, y un diseño simplificado para facilitar la limpieza y el mantenimiento.

Una vez hecho el pretratamiento al subproducto recepcionado (lavado y triturado), se somete al tratamiento de extracción. Los parámetros óptimos para la extracción se han obtenido atendiendo al rendimiento en la extracción de polifenoles, y se resumen a continuación:

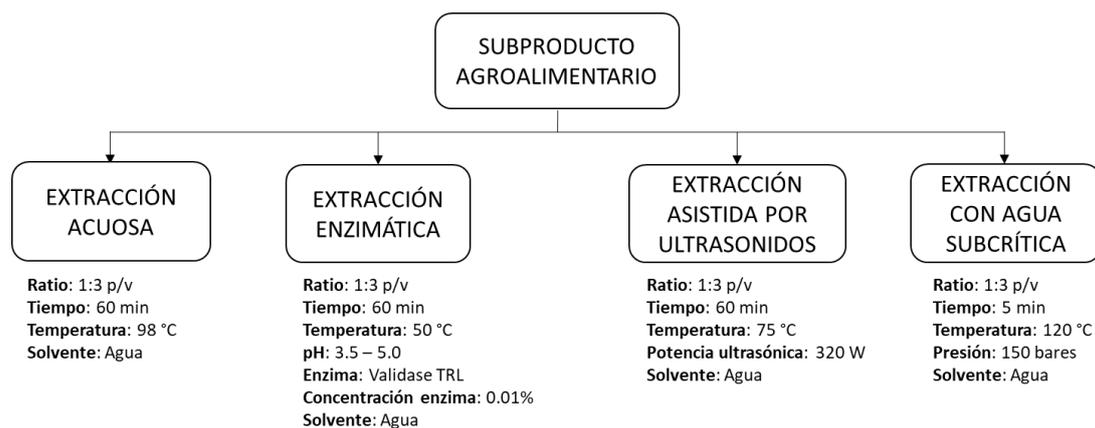


Figura 28. Resumen condiciones de proceso optimizadas de extracción con diferentes tecnologías sostenibles.

- **Extracción acuosa:** Se mezcla en proporción 1:3 (p/v) subproducto: agua en un tanque de mezcla, la mezcla se lleva 98 °C de temperatura y se mantiene una agitación constante de 27 rpm durante 60 minutos.
- **Extracción enzimática:** Se mezcla en proporción 1:3 (p/v) subproducto:agua en un tanque de mezcla, posteriormente se añade un 0.01% de la celulasa VALIDASE TRL (DSM Food Specialties B.V.) respecto la materia seca, la mezcla se mantiene a temperatura de 50°C y en agitación constante de 27 rpm durante 60 minutos. Para realizar la desactivación enzimática, se procede a aumentar la temperatura de la mezcla hasta llegar a ebullición. El tanque de mezcla utilizado tanto en la extracción acuosa como en la extracción enzimática está construido en acero inoxidable AISI 316, válido para trabajar con una capacidad máxima de 200 litros con calentamiento en su interior mediante inyección de vapor en el doble fondo.
- **Extracción asistida por ultrasonidos:** Se mezcla en proporción 1:3 (p/v) subproducto:agua en el recipiente de ultrasonidos, la mezcla se trata con ultrasonidos de potencia de 320 W y una temperatura de 75 °C, esta mezcla se mantiene en agitación constante durante 1 hora. El tratamiento de ultrasonidos se ha realizado usando el equipo UIP500hdT (Hielscher), es un procesador ultrasónico, con una potencia máxima de 320 W con ajuste de amplitudes de frecuencias de 20 kHz, que producen cavitación, aumentando así la permeabilidad de las células de las paredes vegetales para liberar el compuesto de interés.
- **Extracción con agua subcrítica:** La extracción mediante agua subcrítica se realiza con una presión de 150 bares y 120 °C de temperatura mediante una relación subproducto:agua subcrítica de 1:3 (p/v), la extracción con estas condiciones dura 5 minutos. El tratamiento de agua subcrítica se ha realizado usando el equipo Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor (Thermo Scientific™), sistema automatizado para la extracción que utiliza una combinación de temperatura y presión elevadas para aumentar la eficacia del proceso de extracción. Este equipo trabaja con una presión constante de 150 bares y una temperatura variable hasta un máximo de 200 °C.

Transcurrido el tiempo de extracción indicado en cada caso, se procede a separar la fase acuosa de la sólida mediante un Decanter, el cual consta de un tambor cilíndrico horizontal equipado con un tornillo sin fin transportador; la separación se ha realizado utilizando 3600 rpm en el

tornillo sin fin y 3800 rpm en el tambor cilíndrico. El proceso se ha llevado a cabo mediante un caudal de alimentación de la mezcla de 200 L/h.

El separador utilizado es una centrífuga decanter NX2017 (ALFA LAVAL), provisto de un motor con una potencia de 5.5 kW, bomba de alimentación, bomba helicoidal y un caudal de trabajo de 200 – 1000 L/h. La separación de las fases sólida y líquida tiene lugar en un rotor cilíndrico horizontal provisto de un tornillo sinfín transportador. La alimentación entra en el rotor a través de un tubo de entrada fijo y se acelera suavemente mediante un distribuidor de entrada. La fuerza centrífuga que se origina en la rotación produce la sedimentación de los sólidos en la pared del rotor.

La etapa final es la de deshidratación de las fases sólida y acuosa. Con respecto al sólido obtenido, se deshidrata a 70 °C durante 2 días en una estufa con control de humedad. Por otra parte, la fase acuosa se deshidrata mediante un proceso de concentración en una bola de vacío aplicando un vacío de -0,7 bares y 65 °C hasta llegar a una concentración de 25 grados brix.

En lo que se refiere al equipo utilizado para el tratamiento de concentración, se trata de un aparato de bola de vacío de capacidad mínima de carga 30 Kg y máxima de 60 Kg. Su dimensiones constan de 450 mm de diámetro y una longitud de virola 1.500 mm, construida en acero inoxidable AISI 316, provista en su parte inferior de un intercambiador construido con el mismo material. El calentamiento en su interior se realiza mediante inyección de vapor en el doble fondo situado en la parte inferior de la bola de vacío. Calentamiento independiente del intercambiador de calor hasta una presión de 4 Kg/cm².

Una vez que la fase acuosa está concentrada, se congela y se obtiene en polvo mediante un proceso de liofilización, el cual se llevó a cabo aplicando una presión de 0,03 mbar y una temperatura de -85 °C gracias al condensador presente en el equipo.

El liofilizador utilizado es un LYOEPIK -85 (COOLVACUUM), utiliza la tecnología de liofilización por vacío, que también se llama secado por sublimación. Es un método técnico en el que se debe congelar las muestras de antemano, y luego sublimamos su humedad en ambiente de vacío. Los parámetros técnicos son: temperatura del condensador mínima de -85 °C sin carga, con un vacío final mínimo de 0.020 mbar sin carga, capacidad de líquido a liofilizar de 8300 mL con un espesor por bandeja de 10 mm. Dispone de 6 bandejas de 40 cm de diámetro y 3 cm de altura.

Los ensayos de extracción a escala de planta piloto con las diferentes técnicas extractivas se han realizado por triplicado, es decir, se llevaron a cabo tres réplicas de extracción por cada proceso.

3.4. Purificación de compuestos de interés de subproductos agroalimentarios

Los métodos de purificación que se han empleado en este trabajo son procesos de adsorción-desorción a escala laboratorio, y se han realizado sobre la fase líquida obtenida de la extracción en condiciones óptimas.

La purificación de compuestos de interés de los subproductos de alimentación se ha realizado partiendo de 1 litro de extracto acuoso obtenido de la extracción óptima de cada subproducto. El protocolo consiste en realizar el pretratamiento (lavado y triturado) y la extracción óptima al subproducto en cuestión. Finalizado el proceso de extracción, la fase líquida se separa de la fase sólida mediante un filtro de 300 μm , recuperando de esta forma la fase acuosa. Esta fase líquida se trata con diferentes adsorbatos en una relación adsorbato:fase acuosa 1:10 p/v (la ratio adsorbato:fase líquida y el tiempo utilizados se eligieron atendiendo a las recomendaciones del fabricante de los adsorbatos), y el proceso de adsorción se mantiene a temperatura ambiente en agitación suave y constante durante 3 horas.

Pasado este tiempo se recupera el adsorbato, en el cual han quedado adsorbidos los compuestos de interés, mediante un proceso de filtración con un filtro de 300 μm .

El material adsorbente recuperado se somete a un proceso de desorción con etanol al 50 % para obtener los compuestos de interés retenidos en el adsorbato, para ello se realiza una mezcla resina:EtOH 50% 1:3 p/v y se mantiene en agitación constante durante 1 hora a 45 °C. Los tipos de resina ensayados se detallan más adelante.

Una vez finalizado el proceso de desorción, la fase etanólica se somete a una filtración de 300 μm , y el disolvente se recupera en un rotavapor a vacío de laboratorio utilizando como parámetros en el rotavapor una presión de vacío de -0.7 bares y 65 °C de temperatura. Este proceso se repite dos veces para aumentar el rendimiento en la etapa de desorción utilizando el etanol recuperado en el rotavapor, obteniéndose de esta forma un extracto deshidratado.

El equipo utilizado para la eliminación de disolvente es un rotavapor que se compone de una unidad de movimiento de rotación y elevación, modelo Buchi R-200, un equipo de destilación de vidrio, y una bomba de vacío modelo Buchi V-700.

La experimentación de la purificación de compuestos de interés se ha realizado por triplicado.

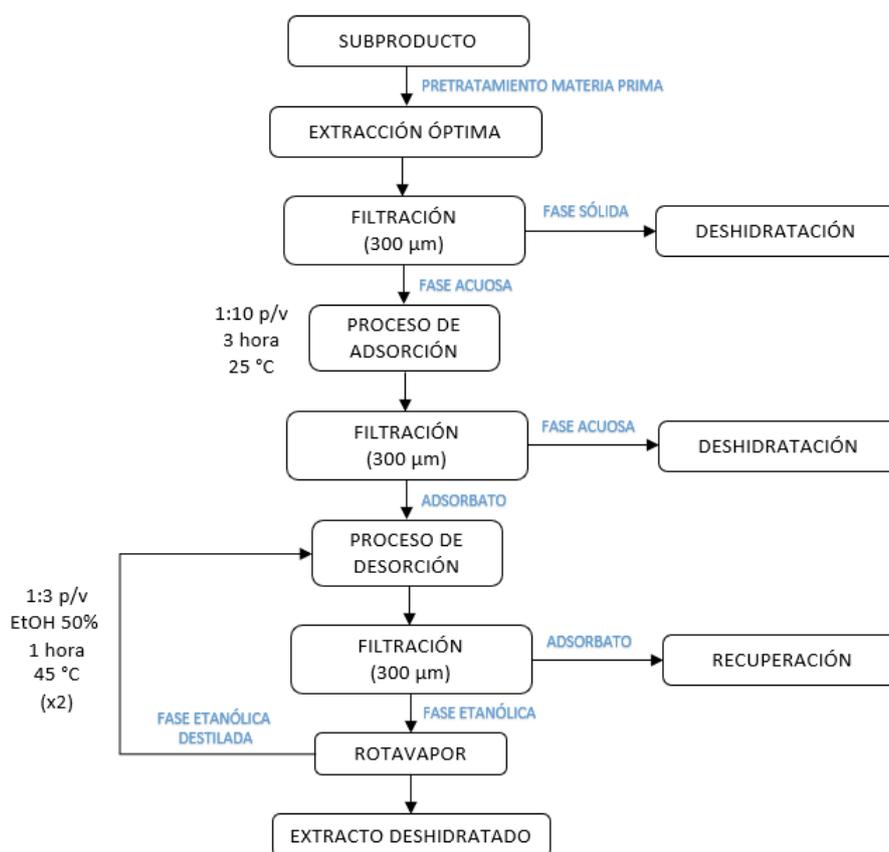


Figura 29. Diagrama purificación compuestos de interés de subproductos

Este método de purificación de compuestos de interés se ha realizado con diferentes materiales adsorbentes para su posterior comparativa, los adsorbatos utilizados han sido:

- **Resina PAD610** (Purolite, Hangzhou, China)
- **Resina PAD900** (Purolite, Hangzhou, China)
- **Resina PAD950** (Purolite, Hangzhou, China)
- **Carbón Activo Granular (CAG)** (Panreacapplichem, Barcelona, España)
- **Zeolita** (Zeocat, Barcelona, España)

En la siguiente tabla se resume las propiedades físicas de los diferentes adsorbentes utilizados.

Tabla 4. Propiedades físicas de los adsorbentes utilizados (información del proveedor).

Adsorbato	Matriz	*Área de superficie (m ² ·g ⁻¹)	*Diámetro de poro (Å)	*Volumen de poro (mg·L ⁻¹)	Densidad específica	Tamaño partícula (mm)	Hidrofobicidad
PAD610	PMC-DVB ¹	490	300	1.2	1.1	0.35-1.2	Moderada
PAD900	PDVB ²	850	220	1.9	1.02	0.35-1.2	Moderada
PAD950	Polimetacrílico	450	120	0.6	1.1	0.35-1.2	Moderada
ZEOLITA	Aluminosilicato	70-80	4-8	n.d	0.85	0.6-1.5	Baja
CAG	Carbono	n.d	n.d	n.d	n.d	0.5-3.13	Baja

*Medido por adsorción de nitrógeno

¹PMC-DVB: Polimetacrílicos reticulados con divinilbenceno

²PDVB: Polidivinilbenceno

n.d: no determinado

Cuantificación del porcentaje de adsorción y desorción de polifenoles totales de cada material adsorbente

Se ha realizado un estudio comparativo con el fin de establecer los rendimientos de adsorción-desorción del proceso en cuanto a compuestos polifenólicos se refiere para cada material adsorbente utilizado. Para realizar la cuantificación del proceso de adsorción-desorción para cada matriz adsorbente se ha partido de 1 litro de fase líquida obtenida del método de extracción óptimo.

Respecto a la etapa de adsorción, se ha cuantificado la concentración de polifenoles totales de la fase líquida antes ($P_{\text{iniciales}}$) y después ($P_{\text{líquido tras adsorción}}$) de haber sido tratada con la matriz adsorbente. La diferencia de estos corresponde a los polifenoles retenidos en la matriz ($P_{\text{retenidos}}$).

$$P_{\text{retenidos}} = P_{\text{iniciales}} - P_{\text{líquido tras adsorción}}$$

Ecuación 1. Cálculo de los polifenoles retenidos en matriz adsorbente.

$$\% \text{ Adsorción} = \frac{P_{\text{retenidos}}}{P_{\text{iniciales}}} \cdot 100$$

Ecuación 2. Cálculo del % de polifenoles retenidos en la matriz adsorbente.

Donde: $P_{\text{retenidos}}$ = Polifenoles retenidos en matriz adsorbente; $P_{\text{iniciales}}$ = Polifenoles de la fase líquida inicial; $P_{\text{líquido tras adsorción}}$ = Polifenoles en fase líquida tras ser tratada con la matriz adsorbente.

En cuanto a la etapa de desorción, se ha cuantificado la concentración de polifenoles en el disolvente utilizado para la desorción ($P_{\text{líquido tras desorción}}$), la diferencia de este valor con el valor de los polifenoles retenidos corresponde con los polifenoles desorbidos ($P_{\text{desorbidos}}$).

$$P_{\text{desorbidos}} = P_{\text{retenidos}} - P_{\text{líquido tras desorción}}$$

Ecuación 3. Cálculo de los polifenoles desorbidos de la matriz adsorbente.

$$\% \text{ Desorción} = \frac{P_{\text{desorbidos}}}{P_{\text{retenidos}}} \cdot 100$$

Ecuación 4. Cálculo del % de polifenoles desorbidos de la matriz.

Donde: $P_{\text{retenidos}}$ = Polifenoles retenidos en matriz adsorbente; $P_{\text{desorbidos}}$ = Polifenoles desorbidos de la matriz adsorbente.

3.5. Cuantificación de compuestos de interés

Tras la obtención de los extractos empleando las diferentes metodologías expuestas, se han determinado y analizado los compuestos de interés específicos de cada material vegetal. Los procedimientos llevados a cabo para realizar los análisis de estos compuestos se resumen a continuación:

3.5.1. Identificación y cuantificación de compuestos de interés de los extractos de limón

La preparación de la muestra para la identificación y cuantificación de compuestos de interés de limón se realizó mediante la extracción de 50 miligramos de cada muestra con 1 mL de metanol

y agua ácida (80:20 v/v) y se sonificó durante 90 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se centrifugaron a 13000g durante 15 min y a 4 °C de temperatura. Se recuperaron los sobrenadantes y el disolvente se evaporó utilizando un Speed Vacuum. El material seco obtenido se redisolvió en 0.25 mL de metanol y se filtró a través de un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.2 µm y se analizó mediante HPLC-ESI-UV-MS/MS.

Los análisis de las muestra se llevaron a cabo en un equipo HPLC Agilent serie 1200 (Agilent Technologies) equipado con una columna Agilent Zorbax C18 (4.6 × 100 mm, tamaño de partículas de 2.5 µm) y un detector UV-Vis de detección de matriz de diodos (DAD). El sistema de HPLC se acopló a Quadrupole-Time-of-Flight (micrOTOF-Q™, Bruker Daltonik GmbH), un espectrómetro de masas Q-TOF ortogonal acelerado, equipado con una fuente de ionización por electropulverización (ESI). Los parámetros de análisis se establecieron utilizando un modo de iones negativos con espectros adquiridos en un rango de masas de m/z 100 a 1000.

Se utilizaron como fases móviles A y B, respectivamente, agua acidificada (0,1 % de fórmico, v/v) y acetonitrilo fijando un caudal de 0.35 mL/min. El efluente de la columna de HPLC se dividió utilizando un divisor tipo T antes de colocarlo en el espectrómetro de masas (división = 1:3). Así, el flujo que llegó al detector ESI-Q-TOF-MS fue de 0.2 mL/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C y el volumen de inyección fue de 4 µL.

3.5.2. Identificación y cuantificación de compuestos de interés de extractos de alcachofa

La preparación de muestra para la identificación y cuantificación de compuestos de interés de alcachofa se realizó extrayendo 0.5 g de extracto de alcachofa liofilizado utilizando 10 mL de metanol/H₂O 80:20 (v/v) y se sonicó durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se centrifugó durante 15 min a 3800g y se recogieron los sobrenadantes. El disolvente se evaporó utilizando un Speed Vacuum y, el residuo seco se redisolvió en 0.5 mL de 80:20 (v/v) metanol/H₂O. Finalmente, el extracto se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.22 µm y se midió con HPLC-ESI-UV-MS/MS.

Los análisis de las muestra se llevaron a cabo en un quipo HPLC Agilent serie 1200 (Agilent Technologies) equipado con una columna Agilent Zorbax C18 (4.6 × 150 mm, tamaño de partículas de 1.8 µm) y un sistema de detección de matriz de diodos (DAD). El sistema de HPLC se acopló a Quadrupole-Time-of-Flight (micrOTOF-Q™, Bruker Daltonik GmbH), un espectrómetro de masas Q-TOF ortogonal acelerado, equipado con una fuente de ionización por electropulverización (ESI). Los parámetros de análisis se establecieron utilizando un modo de iones negativos con espectros adquiridos en un rango de masas de m/z 50 a 1100.

Se utilizaron como fases móviles A y B, respectivamente, agua acidificada (0.5 % de ácido acético, v/v) y acetonitrilo. El gradiente se programó de la siguiente manera: 0 min, 0% B; 10 min, 20% B; 15 min, 30% B; 20 min, 50% B; 25 min, 75% B; 30 min, 100% B; 37 min 0% B; y finalmente se mantuvieron las condiciones iniciales durante 3 minutos como paso de reequilibrio. El caudal se fijó en 0.80 ml/min durante todo el gradiente. El efluente de la columna de HPLC se dividió utilizando un divisor tipo T antes de colocarlo en el espectrómetro de masas (división = 1:3). Así, el flujo que llegó al detector ESI-Q-TOF-MS fue de 0.2 mL/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C y el volumen de inyección fue de 5 µL.

3.5.3. Identificación y cuantificación de compuestos de interés de extractos de granada

La preparación de muestra para la identificación y cuantificación de compuestos de interés de granada se realizó pesando 75 mg de polvo homogeneizado de las muestras de granada y se disolvió con 5 mL de una mezcla de metanol/DMSO/H₂O (40:40:20, v/v/v) que contenía 0.1% de HCl. Las muestras se agitaron en vórtex durante 10 min y se centrifugaron a 500 g (Eppendorf 5804R) durante 10 min. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.45 µm de Difluoruro de Polivinilideno (PVDF) (Millipore) y se midió con HPLC-ESI-UV-MS/MS.

Los análisis de las muestras se llevaron a cabo en un sistema Agilent serie 1200 (Agilent Technologies) equipado con una columna PursuitXR_sC18 de fase inversa (250 × 4 mm, tamaño de partículas de 5 µm) equipado con un detector fotodiodarray y un detector espectrómetro de masas de aniones (Agilent Technologies).

Las fases móviles fueron agua con un 1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo (B) siguiendo un perfil de gradiente de 0-20 min, 5-30% de B; 20-30 min, 30-55% de B; 30-38 min, 55-90% de B; 38-40 min, 90% de B; y después se volvió a las condiciones iniciales. Los cromatogramas UV se registraron a 280 y 360 nm con un ancho de banda de 8 nm. El espectrómetro de masas con trampa de iones (IT) se equipó con una interfaz de pulverización electrostática (ESI). Se utilizó nitrógeno como gas de secado con un flujo de 11 l/min a una temperatura de 350 °C y gas de nebulización a una presión de 65 psi. El voltaje capilar se fijó en 4 kV. Los espectros de barrido de masas (MS) y de diana (MS/MS) se registraron en modo negativo en un intervalo de m/z 100-1500.

3.5.4. Cuantificación de vitamina C

La preparación de la muestra se realizó mediante una dilución en agua de 1:2 (p/v), posteriormente se procedió a realizar una filtración con microfiltros de 0.45 µL y se inyectó directamente en el equipo de análisis.

El sistema cromatográfico utilizado es un cromatógrafo líquido tipo HP serie 1100 (USA 2002) con desgasificador de vacío, automuestreador, sistema de inyección automático, compartimento termostatado de columnas y detector UV-VIS de longitud de onda variable ó Diode Array (DAD).

Se utilizó un cartucho empacado C18 para HPLC, LiChroCART® 250-4 HPLC-Cartridge, LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm). Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: flujo de 1 mL/min, detección a una longitud de onda de 254 nm, volumen de inyección normal de 5 µL, temperatura del horno de 30 °C.

3.5.5. Cuantificación de los compuestos fenólicos totales método Folin Ciocalteu

Los polifenoles presentes en los extractos fueron cuantificados colorimétricamente mediante el método de Folin-Ciocalteu. Para lo cual se pesaron 2 gramos de muestra y se disolvieron en 5 mL de agua destilada; posteriormente, se centrifugó la mezcla (3000 rpm durante 10 minutos) y el sobrenadante se llevó a un matraz donde se enrasó a 10 ml de agua. Se tomó una alícuota de 200 µL de cada muestra diluida de extracto y se adicionaron 1000 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10) (Panreac Química S.A., Barcelona, España) y 800 µL de disolución de sodio carbonatado al 7.5% (p/v). Los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo de Folin-Ciocalteu,

lo que resulta en una coloración azul, la cual fue medida en un espectrofotómetro modelo UNICAM UV/Vis Spectrometer (Spectronic Unicam, Texas, Estados Unidos) a una longitud de onda de 765 nm tras 20 minutos de incubación. El contenido de compuestos fenólicos se calculó en base a una curva de calibrado realizada con ácido gálico, los resultados están expresados en g ácido gálico/kg de extracto.

3.5.6. Cuantificación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS

Para valorar la capacidad antioxidante de los extractos, se ha utilizado el método ABTS. Este método se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del ABTS⁺, que es reducido en presencia de antioxidantes. El ABTS⁺ es un cromóforo que absorbe luz a una longitud de onda de 734 nm. El catión se prepara mediante una solución de ABTS (7 mM) (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) y una disolución de persulfato potásico (2.45 mM) (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), después de la incubación a temperatura ambiente en la oscuridad 12 h. Posteriormente, la disolución de ABTS⁺ se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.700 (± 0.04 a una longitud de onda de 734 nm).

Las muestras de los diferentes tipos de extractos se diluyeron (1:100) y una parte alícuota de 10 μ L se mezcló con 1000 μ L de disolución de ABTS⁺. Esta mezcla se dejó en reposo, a temperatura ambiente y condiciones de oscuridad durante 4 minutos, e inmediatamente se midió la absorbancia a 734 nm. La capacidad antioxidante se calculó utilizando una curva de calibrado realizada con trolox (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), expresando los resultados como equivalentes de g trolox/kg de muestra.

3.5.7. Cuantificación de humedad

La determinación del contenido de humedad se realizó en un analizador halógeno. Este instrumento trabaja según el principio termogravimétrico. El equipo dispone de una balanza de precisión-integrada en el instrumento que mide el peso continuamente. Se pesaron 2 gramos de muestra en un portamuestras y se extendió lo máximo posible. Se introdujo en el equipo y se secó mediante un radiador halógeno hasta peso estable. El resultado se expresa en % o mg/100 g.

3.5.8. Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteínas totales se cuantificó por el método de Kjeldahl, calculada como nitrógeno Kjeldahl multiplicado por 6.25. En un matraz de digestión Kjeldahl se adicionó de 1 gramos de extracto y se añadieron 1 gramo de catalizador y 15 mL de H₂SO₄ concentrado. Se calentó suavemente al principio y enérgicamente cuando transcurrieron 15 minutos. Se hirvió hasta que la disolución se aclaró y quedó transparente. Se enfrió y se añadió agua desionizada hasta llegar a 100 mL.

El matraz se colocó en el destilador, se adicionaron 50 mL de hidróxido sódico al 30% para neutralizar, se destiló la mezcla hasta recoger el destilado en un matraz de 250 mL donde se añadieron 30 mL de ácido bórico al 2% con un 1% de indicador llevados a 100 mL aproximadamente con agua. Se consideró terminada la destilación cuando el volumen del Erlenmeyer fue de 200 mL. A continuación, se procedió a la valoración de la muestra con HCl 0.05N ó 0.1N.

Materiales y métodos

El resultado se expresa en g/100g de proteínas con dos cifras decimales y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Proteínas (g/100g)} = \frac{N \cdot 1,4 \cdot 6,25 \cdot (V - V_b)}{P_m}$$

Ecuación 5. Cálculo de la cantidad de proteínas extraídas.

Donde: N = normalidad del HCl empleado; V = volumen en mL de valorante consumido; V_b = volumen de mL consumido por un blanco que se hará con todos los reactivos, pero sin muestra; P_m = peso en gramos de la muestra.

El ensayo se realizó por triplicado y se aceptó el valor cuando la diferencia entre los resultados fue inferior al 5%.

3.5.9. Cuantificación de azúcares totales

La cuantificación de azúcares totales engloba el sumatorio de la concentración de fructosa, glucosa y sacarosa. Los reactivos necesarios para esta determinación fueron agua desionizada, estándar analítico de sacarosa 99.9% (Supelco 4-7289); estándar analítico de glucosa 99.9% (Supelco 4-7249) y estándar analítico de fructosa 99.6%, (Supelco 4-7247). Se prepara una solución madre de fructosa, glucosa y sacarosa en agua desionizada de aproximadamente 2 g/L. Con estas soluciones se realizó la curva de calibración.

Posteriormente, se llevó a cabo una extracción de la muestra a temperatura ambiente con agua desionizada y se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se filtró con microfiltros de 0.45 μm tipo Whatman NYL ó Millipore HATF y se inyectó en el equipo de análisis.

Las disoluciones se analizaron mediante un cromatógrafo líquido de alta resolución, modelo HP serie 1100 (EEUU) equipado con detector de índice de refracción y columna polimérica de iones calcio, el cual incluye el software apropiado para introducir la recta de calibración y obtener la concentración correspondiente de las muestras una vez registrada el área de cada pico. El equipo cuenta además con desgasificador de vacío, automuestreador-sistema de inyección automático y compartimento termostatado de columnas. La fase móvil fue agua desionizada, el flujo 0.5 mL/min y el volumen de inyección normal es de 20 μL .

Las concentraciones de los azúcares en la muestra problema, se calcularon por introducción de las áreas obtenidas en la recta de calibrado grabada en el software del ordenador que controla el equipo. En el cálculo final de los resultados, que se expresan en g/100 g o %, se tienen en cuenta los factores de dilución en la preparación de la muestra y se realizaron según la expresión:

$$\text{Concentración (g/L)} = C \cdot \frac{P_T}{P} \cdot 10^{-3}$$

Ecuación 6. Fórmula utilizada en el cálculo de la concentración de azúcares.

Donde: C = concentración que obtenemos al introducir el área problema en la calibración; P_T = peso total o final de la dilución; P = peso de muestra.

3.5.10. Cuantificación de fibra alimentaria

Para realizar la cuantificación de fibra alimentaria se incineraron los crisoles en la mufla a una temperatura de 520 ± 20 °C durante 1 hora, se enfriaron en el desecador y se pesaron (P_1).

Previamente a la pesada de la muestra, se extrajeron los azúcares y se desecó. Para ello se tomaron 10 g de muestra y se disolvieron en 150 mL de EtOH al 85%. Dicha disolución se agitó a 30-40 °C durante 10 minutos. Finalizado este tiempo, se decantó el líquido de la muestra y se añadieron 15 mL de EtOH al 96%, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. El sólido recogido se mantuvo en una estufa a 70 °C durante 24 horas. A continuación, se pesó 1 gramo de muestra con una resolución de 0.1 mg (P_m) en los frascos de incubación.

Se añadieron 40 mL de Tampón MES-TRIS y la mezcla se agitó en una placa para evitar la formación de grumos. Se adicionaron 100 μ L de α -amilasa mientras se agitaba despacio, se tapó con papel de aluminio, y se incubó durante 15 minutos a 95-100 °C en un baño termostatado con agitación. Tras enfriar a 60 °C y deshacer los grumos que se formaron lavando las paredes y la espátula con agua, se añadieron 100 μ L de proteasa y la mezcla se mantuvo durante 30 minutos a 60 °C en un baño termostatado con agitación. Pasados 30 minutos, se adicionaron 5 mL de HCl 0.561M y 100 μ L de amiloglucosidasa y se continuó con la agitación durante 30 minutos más a 60 °C.

Después, se pusieron los crisoles con el celite homogeneizándolo con 15 mL de etanol 78% en vacío y se colocaron en el equipo de fibra en la posición de filtración inferior. Se lavaron las paredes de los frascos con 225 mL de EtOH al 95% a 60 °C, se taparon y se dejó precipitar la muestra al menos 1 hora. Transcurrido este tiempo, se filtró usando 15 mL de etanol del 78% y 15 mL de etanol al 95%. Los crisoles se dejaron toda la noche a 105 °C en la estufa, y después se dejaron enfriar y se pesaron (P_2). El contenido de los crisoles se pasó a tubos Kjeldahl para determinar el residuo de proteína. El contenido en fibra de la muestra se expresa en % con una cifra decimal. Se calcula de la forma siguiente:

$$\text{Fibra Alimentaria (\%)} = \frac{\text{Residuo}_{\text{fibra}} - \text{Residuo}_{\text{proteína}}}{P_0} \cdot 100 \cdot f_c$$

Ecuación 7. Cálculo de la cantidad de fibra alimentaria.

Donde: P_0 = peso en gramos de muestra inicial; f_c = factor de corrección de la humedad y grasa.

$$\text{Residuo}_{\text{fibra}} \text{ (g)} = P_2 - P_1$$

Ecuación 8. Cálculo del residuo de fibra.

Donde: P_2 = peso en gramos del crisol con celite más fibra; P_1 = peso en gramos del crisol con celite.

$$\text{Residuo}_{\text{proteína}} \text{ (g)} = \frac{(V_g - V_{bl}) \cdot N \cdot 14,007 \cdot 6,25}{1000}$$

Ecuación 9. Cálculo residuo de proteína.

Donde: V_g = volumen gastado para la muestra; V_{bl} = volumen gastado para el blanco.

Cuando se desecó y/o se desgrasó la muestra, se corrigió el resultado, multiplicándolo por el siguiente factor de corrección:

$$f_c = \frac{100 - (\% \text{Humedad} + \% \text{Grasa} + \% \text{Azúcar})}{100}$$

Ecuación 10. Factor de corrección.

3.5.11. Medida de la capacidad antimicrobiana *in vivo* por impedancia eléctrica

La medida de capacidad antimicrobiana *in vivo* se ha realizado mediante aplicación directa de extractos en crecimiento de bacterias. Se utilizaron cepas de *Salmonella*, *Enterica subsp. Enterica*, serovar *Typhimurium* (CECT 4594) y *E. coli* (*Escherichia coli* CECT 515), de la Colección Española de Cultivos Tipo, con una concentración de 10^6 ufc/mL, utilizando como medio de cultivo 001A (Sy-Lab, Austria), realizando las medidas de impedancia a 30 °C.

La cepa liofilizada se introduce en TSB durante 24 h a 37 °C, medio en el que se alcanza una concentración aproximada de 10^9 ufc/mL. Tras ello, se adicionaron 8.9 mL de medio Sy-Lab001A a los tubos a introducir en el equipo BacTrac, inoculando a cada uno de ellos 0.1 mL de cepa a una concentración 10^6 ufc/mL y 1 mL del extracto antimicrobiano a ensayar en una concentración de 5 g/kg. Tras ello, los tubos se introdujeron en el equipo, y se dejaron incubar durante 24h a 37 °C.

Los cambios de impedancia o resistencia del medio de cultivo debido al crecimiento de microorganismos se midieron de forma automática con el equipo BacTrac 4300 (Gomensoro, España).

3.5.12. Medida de la capacidad antioxidante *in vivo* por impedancia eléctrica

El método utilizado se basa en medir el CO₂ desprendido por las células durante la respiración celular. Para medir la capacidad antioxidante por impedancia eléctrica, se utilizó el equipo BacTrac 4000 Series. Se utiliza un vial con electrodos en contacto con una solución de potasa (KOH), dentro de ese vial se deposita otro vial que contiene un cultivo de células de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), previamente sometidas a un tratamiento de estrés oxidativo poniéndolas en contacto con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Si el producto antioxidante objeto de estudio añadido es capaz de revertir el daño oxidativo provocado a las células, se produce CO₂ en la respiración celular, que colapsará la disolución de potasa en contacto con los electrodos, los cuales registrarán un cambios en la conductividad que serán interpretados como una curva de crecimiento.

El procedimiento consiste en someter a la célula a estrés oxidativo con H₂O₂ 1 mM, posteriormente se añade el agente antioxidante (extractos finales), dejando reposar una hora a temperatura ambiente para que la especie antioxidante contrarreste el efecto del peróxido. Transcurrida una hora, se adiciona 0.1 mL de cada uno de los viales a unas celdillas que contienen 3 mL de caldo nutritivo para levaduras. Los viales se introducen en las celdillas con electrodos que contienen que contienen 2 mL de KOH al 2%, detectando así el equipo los cambios en la conductividad en la disolución de potasa cuando reacciona con el CO₂ de la respiración celular.

Estas medidas se realizaron por triplicado en todos los casos, partiendo de un cultivo de levaduras (*Sacharomices Cerevisiae*) a una concentración de 10^6 ufc/mL.

- Vial 1: Control de cepa (800 μ L de cepa)
- Vial 2: Control estrés oxidativo (800 μ L de cepa + 100 μ L H₂O), sin antioxidante.
- Vial 3 de producto: Control de extracto antioxidante (800 μ L de cepa +100 μ L H₂O₂ + 100 μ L extracto con concentración 5 g/kg).

Además, en las celdillas de Bactrac, como control se añade un vial sólo con medio de cultivo para comprobar su esterilidad y otro solamente con potasa que se colapsa con el CO₂ atmosférico, comprobando así que la disolución de potasa está bien preparada.

3.5.13. Caracterización nutricional y toxicológica de los extractos

Además de la identificación y cuantificación de compuestos de interés, los productos finales liofilizados obtenidos se han caracterizado mediante análisis nutricional, plaguicidas y análisis microbiológico. Las técnicas de análisis utilizadas y las unidades de medida en las que se expresan los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 5. Técnicas de análisis y unidades de medida para las diferentes determinaciones realizadas a los productos finales obtenidos.

Determinación	Técnica de análisis	Unidad de medida
Determinación del análisis nutricional		
Fibra alimentaria	Gravimetría (digestión/desecación)	g/100g
Humedad	Gravimetría	g/100g
Grasa	Método Soxhlet	g/100g
Proteínas	Método Kjeldahl	g/100g
Hidratos de carbono	Cálculo	g/100g
Valor energético	Cálculo	kcal/100g / kJ/100g
Cloruro sódico	Cromatografía Iónica	g/100g
Cenizas totales	Gravimetría	g/100g
Azúcares totales	Cromatografía Líquida (HPLC)	g/100g
Ácidos grasos saturados	Cromatografía gases (CG- FID)	g/100g
Determinación de plaguicidas		
Multiresiduo	QuEChERS	mg/kg
Multilíquidos	QuEChERS	mg/kg
Determinación microbiológica		
Microbiología	Recuento	ufc/g

Los procedimientos empleados para el análisis de cada determinación se detallan en el *apartado ANEXO II Caracterización de productos: análisis nutricional, análisis toxicológico y análisis microbiológico*.

3.5.14. Tratamiento de los datos

Todos los ensayos experimentales se han realizado por triplicado, al igual que las determinaciones analíticas. Los valores presentados son los valores medios obtenidos junto con la desviación estándar calculados mediante el paquete Microsoft Office 365 y el programa de Excel versión 2306.

4. Resultados y discusión

4.1. Revalorización del subproducto de limón

La revalorización del subproducto de limón se ha realizado con residuos de limón de la variedad *Fino*, que constan de restos de corteza tras la etapa de exprimido y retirada de aceites esenciales en la elaboración de zumo. Este subproducto ha sido caracterizado mediante la determinación de los compuestos de interés hesperidina, limonina y vitamina C, azúcares totales, fibra alimentaria, y proteínas, así como los análisis nutricional, microbiológico y toxicológico.

Tabla 6. Caracterización del subproducto de limón variedad *Fino*. Los valores de determinación de los compuestos de interés corresponden a la media \pm desviación estándar de los análisis realizados por triplicado.

Determinación de los compuestos de interés (g/kg)	
Hesperidina	3.37 \pm 0.02
Limonina	0.13 \pm 0.03
Vitamina C	0.65 \pm 0.03
Determinación del análisis nutricional (g/100g)	
Azúcares totales	3.5 \pm 0.0
Fibra alimentaria	8.1 \pm 0.1
Humedad	83.8 \pm 0.8
Proteínas	0.9 \pm 0.0
Determinación toxicológica (mg/kg)	
Plaguicidas	<LQ
Determinación microbiológica	
Microbiología	Ausencia patógenos

La caracterización completa del subproducto de limón puede consultarse en el *apartado Anexo III Caracterización detallada de productos*. En el *Anexo I Ficha de los compuestos bioactivos* aparecen especificaciones de los compuestos de interés. Las incertidumbres de los ensayos nutricionales han sido calculadas de acuerdo con la guía “ILAC Guidelines for Measurement Uncertainty in Testing (ILAC-G17:01/2021)”.

En cuanto a los compuestos de interés del subproducto de limón, los mayoritarios son hesperidina y vitamina C, además de fibra alimentaria, azúcares y en menor cantidad proteínas. La materia analizada, tal y como muestra la Tabla 6, no presenta patógenos ni plaguicidas.

4.1.1. Optimización de extracción de los compuestos de interés del subproducto de limón a escala de laboratorio

La optimización de las diferentes técnicas de extracción está referida al poder extractivo de cada tratamiento en función de la capacidad de la técnica para recuperar compuestos polifenólicos del subproducto de limón.

Para poner a punto los protocolos y las diferentes técnicas de extracción, se ha seguido el protocolo descrito en el *apartado 3.2 de Materiales y Métodos*.

A continuación, se detallan los experimentos llevados a cabo con el fin de optimizar cada técnica de extracción, atendiendo a los parámetros de operación de cada tratamiento a escala de laboratorio.

4.1.1.1. Optimización de la extracción acuosa del subproducto de limón

La extracción acuosa se ha optimizado variando los siguientes parámetros de proceso, tal y como se describe en el apartado 3.2.1 de *Materiales y Métodos*.

- **Relación sólido:líquido**
- **Temperatura de extracción**
- **Tiempo de extracción**

Finalizadas las extracciones empleando las diferentes condiciones experimentales y utilizando como disolvente agua, se caracterizó la fase acuosa filtrada atendiendo al contenido de polifenoles totales como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 7. Optimización de las condiciones de la extracción acuosa (EAT) en el subproducto de limón. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar de tres réplicas.

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ratio subproducto: agua (p/v)	Polifenoles totales (g ácido gálico/L)
EAT-1	25	60	1:2	0.478 ± 0.007
EAT-2	25	60	1:3	0.489 ± 0.009
EAT-3	25	60	1:4	0.479 ± 0.007
EAT-4	50	60	1:3	0.541 ± 0.010
EAT-5	75	60	1:3	0.663 ± 0.005
EAT-6	98	60	1:3	1.030 ± 0.011
EAT-7	98	30	1:3	0.785 ± 0.006
EAT-8	98	90	1:3	1.014 ± 0.012

La relación sólido:líquido óptima corresponde a una ratio 1:3 p/v. Manteniendo constante este valor, cuando se aplica una temperatura de ebullición al tratamiento extractivo (cerca de los 98 °C), se constata que se obtiene la mayor concentración de polifenoles en la fase acuosa. El tiempo de extracción aplicando los parámetros óptimos constantes es de 60 minutos. En resumen, las condiciones experimentales óptimas, entre las ensayadas, corresponden a EAT-6.

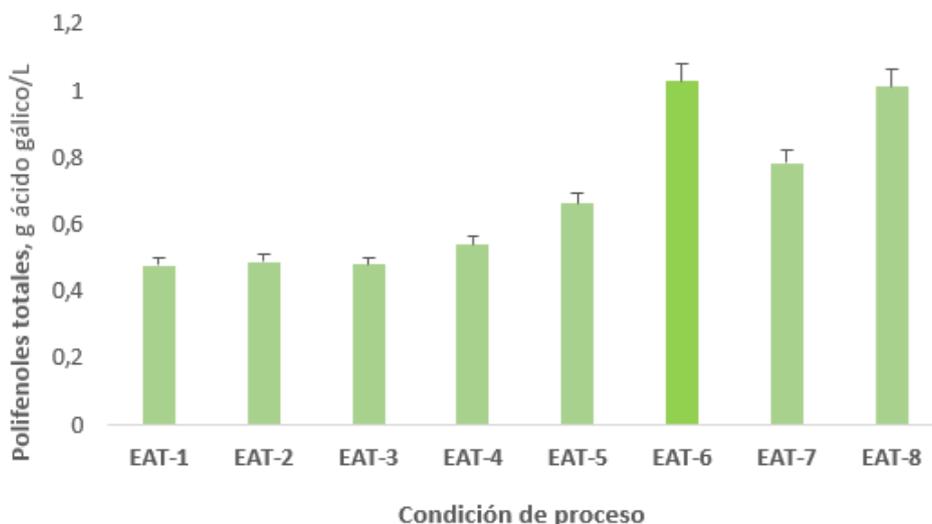


Figura 30. Cantidad de polifenoles totales según las condiciones experimentales para la optimización de la extracción acuosa del subproducto de limón. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de tres réplicas independientes.

Puesto que todas las extracciones se van a realizar con agua como disolvente, la ratio subproducto:agua que corresponde a los mejores resultados en la extracción, 1:3 p/v, es la que se tomará como referencia para el resto las técnicas extractivas estudiadas en esta Tesis. En cuanto al tiempo de extracción con este disolvente, el óptimo resultó ser de 60 minutos en condiciones de presión atmosférica, razón por la que en las técnicas de extracción enzimática y ultrasonidos, y dado que trabajan en las mismas condiciones de presión, se ha tomado como referencia este tiempo. Esto nos permitirá poder comparar la efectividad de las diferentes técnicas de extracción empleadas.

En las condiciones EAT-4 la extracción se llevó a cabo a 50 °C de temperatura debido a que esta es la temperatura de máxima efectividad de las enzimas, de esta forma se podrá comparar los resultados obtenidos en estos experimentos con los de la técnica de extracción enzimática.

En las condiciones EAT-5 se ha seleccionado 75 °C de temperatura debido a que esta ha sido la temperatura a la que llegaron las mezclas tratadas mediante ultrasonidos.

4.1.1.2. Optimización de la extracción enzimática del subproducto de limón

Como se avanzó antes, en la extracción enzimática se usarón algunos de los parámetros optimizados en la extracción acuosa debido a que se usa el mismo disolvente (agua) y las mismas condiciones de presión. Así pues, los siguientes parámetros se mantuvieron constantes.

- Relación sólido:líquido: **1:3 p/v**
- Tiempo de extracción: **60 minutos**

La temperatura y el pH para alcanzar la máxima efectividad de las enzimas recomendado por el proveedor son:

- Temperatura: **50 °C**
- pH: **3.5 – 5.0**

La extracción enzimática se ha optimizado evaluando el efecto que ejercen el tipo y concentración de enzima siguiendo el protocolo que se describe en el *apartado 3.2.2 de Materiales y Métodos*. Los resultados obtenidos corresponden pues a diferentes experimentos en los que se varía:

- **Tipo de enzima**
- **Concentración de enzima**

Finalizada la extracción con las diferentes condiciones, se caracterizó la fase acuosa filtrada atendiendo al contenido de polifenoles totales. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 8 Optimización de las condiciones de la extracción enzimática (EE) en el subproducto limón. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

Resultados y discusión

Condición	pH	Enzima Celulasa	Concentración de enzima (%)	Polifenoles totales (g ácido gálico/L)
EE-1	3,8	Naturzyme	0.01	0.519 ± 0.010
EE-2	3,8	Naturzyme	0.015	0.565 ± 0.012
EE-3	3,8	Naturzyme	0.02	0.499 ± 0.014
EE-4	3,8	Validase TRL	0.001	0.557 ± 0.009
EE-5	3,8	Validase TRL	0.005	0.580 ± 0.006
EE-6	3,8	Validase TRL	0.01	0.595 ± 0.008

La mayor concentración de polifenoles totales se se consiguió utilizando las condiciones EE-6, que corresponden a la enzima celulasa Validase TRL en una concentración de 0.01% de enzima respecto el peso del subproducto seco, manteniendo un ratio 1:3 p/v, una temperatura de 50 °C y un tiempo de extracción de 60 minutos.

Este estudio sobre la extracción enzimática demuestra, además, que la adición de enzima mejora ligeramente el rendimiento de extracción de polifenoles. Este resultado es evidente cuando se compara la cantidad de polifenoles de la extracción acuosa en las condiciones EAT-4 (0.541 g ácido gálico/L), correspondiente a la temperatura de mayor efectividad de las enzimas, con la cantidad obtenida en las experiencias EE-6 (0.595 g ácido gálico/L).

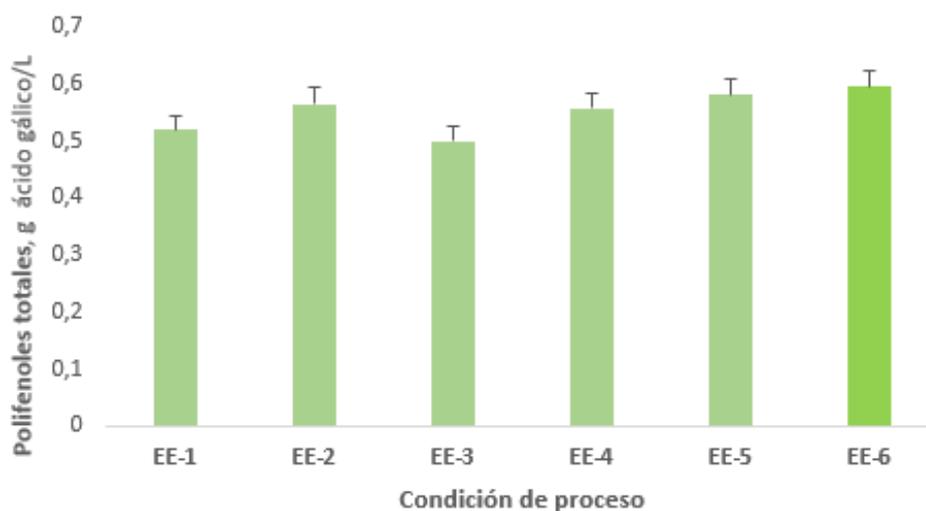


Figura 31. Cantidad de polifenoles totales según las condiciones experimentales para la optimización de la extracción enzimática en el subproducto de limón. Los datos muestran la media ± desviación estándar de tres réplicas independientes.

4.1.1.3. Optimización de la extracción asistida por ultrasonidos del subproducto de limón

En la extracción asistida por ultrasonidos se usarán algunos de los parámetros optimizados en la extracción acuosa debido a que, como en el caso anterior, también se usa el disolvente (agua). El extractor utilizado ha sido un equipo de ultrasonidos UIP500hDT (Hielscher).

- Relación sólido:líquido: **1:3 p/v**
- Tiempo de extracción: **60 minutos**

La extracción asistida por ultrasonidos se ha optimizado siguiendo los siguientes parámetros de proceso tal y como se describe en el *apartado 3.2.3 de Materiales y Métodos*:

- **Potencia de extracción**

Finalizada la extracción con diferentes potencias ultrasónicas, se caracterizó la fase acuosa atendiendo al contenido de polifenoles totales como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 9. Optimización de las condiciones de la extracción asistida por ultrasonidos (EUS) en subproducto limón. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de tres réplicas independientes. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

Condición	Potencia ultrasónica (W)	Polifenoles totales (g ácido gálico/L)
EUS-1	135	0.733 \pm 0.016
EUS-2	250	0.756 \pm 0.006
EUS-3	320	0.789 \pm 0.012

En todas experiencias la temperatura de la mezcla alcanzó unos 75 °C debido al choque de ondas sonoras. Como puede verse al analizar los datos de la tabla, manteniendo constantes el ratio 1:3 p/v subproducto:agua, y un tiempo de extracción de 60 minutos, la potencia ultrasónica que proporcionó mejores resultados fue de 320 W, la denominada como EUS-3.

La cantidad de polifenoles totales obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonidos en las condiciones EUS-3 (0.789 g ácido gálico/L) es mayor que la que rindió la extracción acuosa en las mismas condiciones de temperatura, tiempo y ratio subproducto:agua (0.663 g ácido gálico/L). En consecuencia, queda demostrado que la sonificación mejora el rendimiento de la extracción de polifenoles manteniendo los mismo valores para el resto de parámetros experimentales considerados.

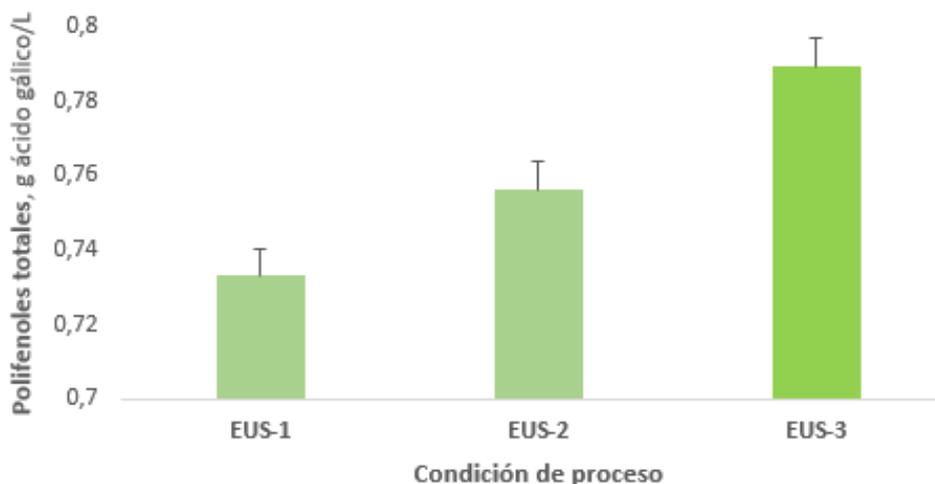


Figura 32. Cantidad de polifenoles totales según las condiciones experimentales para la optimización de la extracción asistida por ultrasonidos en subproducto de limón. Los datos muestran la media ± desviación estándar de tres réplicas independientes.

4.1.1.4. Optimización de la extracción con agua subcrítica del subproducto de limón

En la extracción con agua subcrítica se usarán algunos de los parámetros optimizados en la extracción acuosa debido a que se usa el mismo disolvente (agua). El extractor utilizado ha sido un equipo Thermo Scientific Dionex™ ASE™ 350, el cual tiene configurado una presión constante de operación en sus tratamientos extractivos de **150 bares**.

- Relación sólido:líquido: **1:3 p/v**
- Presión de extracción: **150 bares**

La extracción con agua subcrítica se ha optimizado siguiendo los siguientes parámetros de proceso tal y como se describe en el *apartado 3.2.4 de Materiales y Métodos*, debido a que las condiciones de presión cambian con respecto a las demás técnicas extractivas, se realizaron diversos experimentos con el fin de optimizar los siguientes parámetros:

- **Temperatura de extracción**
- **Tiempo de extracción**

Finalizada la extracción con las diferentes temperaturas, se caracterizó la fase acuosa atendiendo al contenido de polifenoles totales como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 10. Optimización de las condiciones de la extracción con agua subcrítica (EAS) en subproducto limón. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar de tres réplicas.

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Polifenoles totales (g ácido gálico/L)
EAS-1	80	5	0.951 ± 0.009
EAS-2	100	5	1.508 ± 0.017
EAS-3	120	5	1.612 ± 0.011
EAS-4	120	1	1.089 ± 0.019
EAS-5	120	10	1.506 ± 0.007

Como se desprende de los datos de la tabla anterior, la mayor concentración de polifenoles en la fase acuosa se obtiene cuando se aplica una temperatura de 120 °C y una presión de 150 bares durante un tiempo de extracción de 5 minutos.

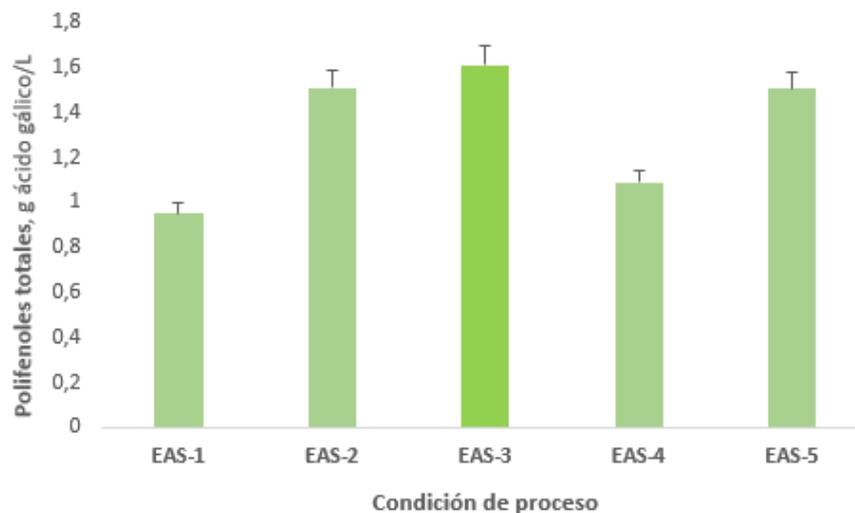


Figura 33. Cantidad de polifenoles totales según las condiciones experimentales para la optimización de la extracción con agua subcrítica en subproducto de limón. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de tres réplicas independientes.

4.1.2. Extracción y caracterización de los extractos de limón obtenidos a escala piloto

En este apartado se detalla la caracterización de extractos finales obtenidos en los siguientes tratamientos:

- **Extracción acuosa**
- **Extracción mediante tratamiento enzimático**
- **Extracción asistida por ultrasonidos**
- **Extracción con agua subcrítica**

Una vez realizado el pretratamiento al subproducto de limón, consistente en lavado y triturado, se somete al tratamiento de extracción. Pasado el tiempo de extracción, se separa la corriente sólida de la acuosa mediante un Decanter tal y como se describe en el *apartado 3.3 de Materiales y Métodos*. La corriente sólida obtenida se deshidrata a 70 °C durante 2 días en una estufa con control de humedad, obteniéndose un extracto aprovechable por su gran contenido en fibra alimentaria.

La fase acuosa se deshidrata mediante un proceso de concentración en una bola de vacío, posteriormente la fase acuosa concentrada se congela y se obtiene en polvo mediante un proceso de liofilización.

Una vez obtenida la fase acuosa liofilizada se procede a su caracterización atendiendo a:

- **Compuestos orgánicos de interés del producto**
- **Análisis nutricional**
- **Capacidad antimicrobiana y antioxidante**

Resultados y discusión

A continuación, se detalla la caracterización, mediante la determinación de compuestos de interés, análisis nutricional y rendimiento, de los extractos obtenidos empleando las diferentes técnicas de extracción al subproducto de limón.

Tabla 11. Caracterización extractos acuosos finales obtenidos del subproducto de limón con diferentes técnicas extractivas. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

	Extracción acuosa (EAT)	Extracción enzimática (EE)	Extracción ultrasonidos (EUS)	Extracción agua subcrítica (EAS)
				
Determinación de compuestos de interés (g/kg)				
Polifenoles totales, g ácido gálico/kg	23.94 \pm 0.25	59.61 \pm 0.43	22.82 \pm 0.24	106.08 \pm 0.75
Neohesperidina	19.39 \pm 0.05	19.09 \pm 0.04	19.15 \pm 0.12	29.23 \pm 0.07
Hesperidina	14.68 \pm 0.16	17.69 \pm 0.19	9.38 \pm 0.09	1.70 \pm 0.06
Vicenina-2	3.48 \pm 0.07	6.21 \pm 0.04	4.57 \pm 0.06	6.91 \pm 0.05
Crisoeriol 6,8-DI-C-glucósido	2.13 \pm 0.05	3.03 \pm 0.04	2.44 \pm 0.06	4.16 \pm 0.05
Ácido nomilínico	1.22 \pm 0.03	12.05 \pm 0.04	1.38 \pm 0.05	6.52 \pm 0.05
Luteolina-neohesperidosidasa	1.68 \pm 0.04	3.37 \pm 0.03	1.26 \pm 0.05	4.18 \pm 0.03
Narirutina	1.17 \pm 0.05	2.46 \pm 0.09	1.34 \pm 0.04	3.74 \pm 0.06
Limonina	2.13 \pm 0.03	1.71 \pm 0.03	2.23 \pm 0.04	0.54 \pm 0.03
Vitamina C	2.90 \pm 0.06	<LQ	0.09 \pm 0.02	<LQ
Diosmetina 8-C-glucósido	0.82 \pm 0.04	2.73 \pm 0.03	0.79 \pm 0.04	2.13 \pm 0.05
Capacidad antioxidante (g trolox/ kg extracto seco)				
ABTS	28.45 \pm 0.09	60.66 \pm 0.15	32.12 \pm 0.08	163.92 \pm 0.85
Determinación del análisis nutricional (g/100g)				
Azúcares totales	31.0 \pm 0.6	8.2 \pm 0.2	42.1 \pm 0.8	2.8 \pm 0.0
Fibra alimentaria	20.1 \pm 0.2	32.0 \pm 0.3	12.9 \pm 0.1	5.3 \pm 0.1
Humedad	21.9 \pm 0.2	1.4 \pm 0.0	10.5 \pm 0.1	4.2 \pm 0.0
Proteínas	4.4 \pm 0.1	7.0 \pm 0.2	11.1 \pm 0.3	13.4 \pm 0.4
Rendimiento (% respecto el peso de materia prima inicial)				
Rendimiento	2.1 \pm 0.2	5.1 \pm 0.1	4.3 \pm 0.3	1.7 \pm 0.2

La caracterización completa de extractos de limón se encuentra en el *apartado Anexo III Caracterización detallada de productos*. En el *Anexo I Ficha de los compuestos bioactivos* aparecen especificaciones de los compuestos de interés. Las incertidumbres de los ensayos nutricionales han sido calculadas de acuerdo con la guía "ILAC Guidelines for Measurement Uncertainty in Testing (ILAC-G17:01/2021)".

En cuanto a la determinación de compuestos de interés, la tecnología con agua subcrítica es la técnica extractiva con la que se obtiene un mayor contenido en polifenoles totales (106.08 g ácido gálico/kg), en proteínas (13.4 g/100g) siendo el extracto que mayor capacidad antioxidante presenta mediante el método ABTS en comparación con los obtenidos mediante las otras técnicas extractivas. Sin embargo, se obtiene menos hesperidina que en los demás extractos, esto se debe a que cuando este compuesto se somete a altas presiones tiende a degradarse transformándose en otros compuestos polifenólicos diferentes, resultados que

concuerdan con los publicados por Dong-Shin, que constataron la disminución de hesperidina al someter a cítricos a altas presiones para la extracción de flavonoides (Dong-Shin, K. et al., 2020).

En comparación con las otras técnicas empleadas, la extracción con agua subcrítica produce un extracto de mayor contenido polifenólico en tiempos de procesamiento más cortos. A pesar de todas las ventajas del agua subcrítica, consideramos que el elevado coste de esta tecnología es el principal inconveniente de su aplicación a gran escala. Una conclusión similar a la obtenida por otros estudios llevados a cabo en la optimización de este proceso. (Adetunji, L. R. et al., 2017).

El extracto con mayor concentración de hesperidina es el que se obtiene mediante extracción enzimática (17.69 g/kg), además de ser el que presenta mayor concentración en fibra alimentaria (un 32.0 g/100g). La tecnología enzimática es efectiva en la obtención de compuestos de interés, estudios como el de Nadar et al., afirman su potencial en el desarrollo de ingredientes nuevos y rentables enriquecidos con polifenoles. (Nadar, S. S. et al., 2018)

Por último, cuando se somete al subproducto de limón a un tratamiento con ultrasonidos se obtiene un extracto final con una gran concentración de azúcares (42.1 g/100g) y proteínas (11.1 g/100g).

4.1.3. Medida de la capacidad antimicrobiana y antioxidante *in vivo* de los extractos de limón obtenidos

Se ha realizado un estudio sobre la capacidad antimicrobiana y antioxidante mediante impedancia eléctrica *in vivo*. Con este objetivo, se realizaron dos controles. Por otra parte, y dado que la producción de extractos con las diferentes técnicas extractivas se llevó a cabo en periodos de tiempo diferentes, para las técnicas de extracción acuosa, enzimática y ultrasonidos se ha utilizado la cepa (1), y para la extracción con agua subcrítica la cepa (2). Los resultados obtenidos de este estudio se muestran en las siguientes figuras.

Resultados y discusión

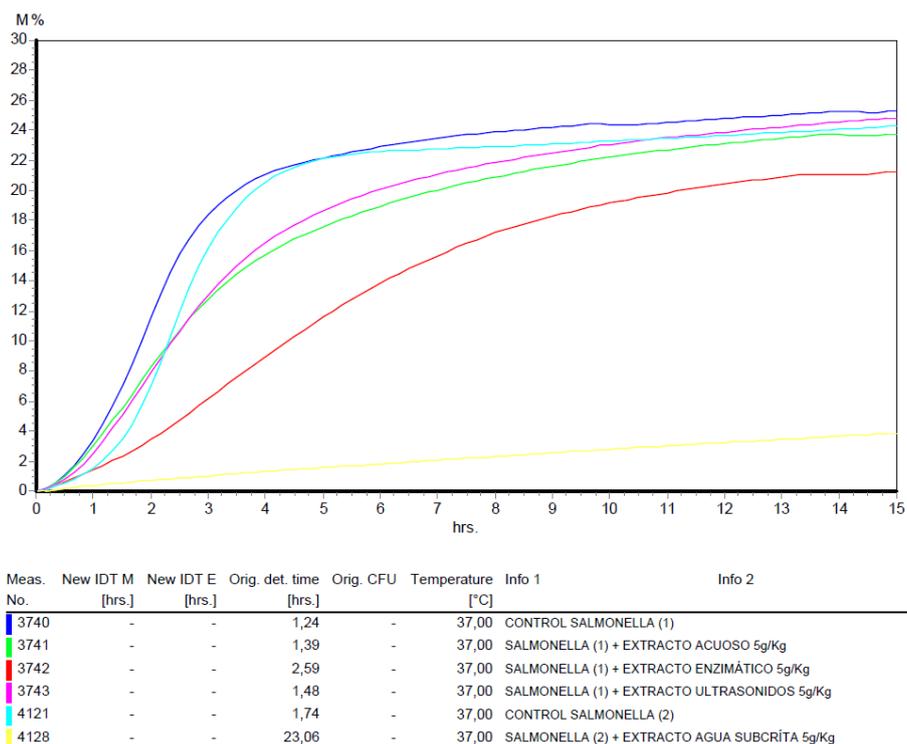


Figura 34. Capacidad antimicrobiana por impedancia eléctrica *in vivo* de extractos de limón obtenidos mediante las diferentes técnicas sostenibles utilizando como cepa *Salmonella*.

El tiempo de crecimiento de la cepa *Salmonella* (1) es de 1.24 horas, cuando se añade extracto de limón obtenido mediante extracción enzimática, el tiempo aumenta hasta 2.59 h, por lo que podemos asegurar que este extracto posee capacidad antimicrobiana frente a *Salmonella*.

Como se muestra en la gráfica de la siguiente figura, para cepa *Salmonella* (2) el tiempo de crecimiento es de 1.74 horas, y al añadir extracto de limón obtenido a través de la técnica de extracción con agua subcrítica, el crecimiento es mucho más lento, pasando a ser de 23.06 horas. Por tanto, el poder antimicrobiano frente a *Salmonella* de este extracto es mayor que cualquiera de diferentes extractos de limón obtenidos por las diferentes técnicas de extracción estudiadas.

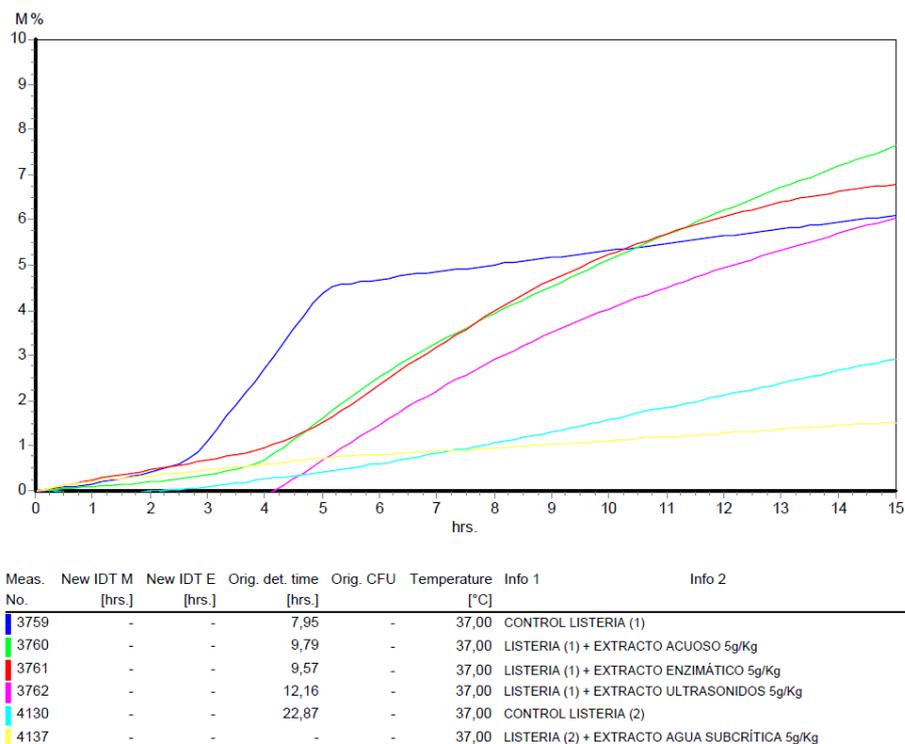


Figura 35. Capacidad antimicrobiana por impedancia eléctrica *in vivo* de extractos de limón obtenidos con diferentes técnicas sostenibles utilizando como cepa *Listeria*.

En cuanto a los resultados obtenidos sobre la capacidad antimicrobiana frente a la cepa de *Listeria* (1), su tiempo de crecimiento es de 7.95 horas. La adición de extracto de limón obtenido mediante extracción por ultrasonidos tiene como consecuencia un aumento de este tiempo hasta 12.16 horas. Los resultados obtenidos con los extractos acuoso y enzimático son peores, como pueden verse en la gráfica de la Figura 35. En consecuencia, el extracto de ultrasonidos posee una mayor capacidad antimicrobiana frente a *Listeria* que los resultantes de las técnicas de extracción acuosa y enzimática.

Para la cepa *Listeria* (2), el tiempo de crecimiento es de 22.87 horas. Al añadir extracto de limón obtenido mediante la técnica con agua subcrítica, se observa la inhibición del crecimiento de dicha cepa. Así pues, podemos asegurar que el poder antimicrobiano de este extracto frente a *Listeria* es el mayor de los diferentes extractos de limón obtenidos por las diferentes técnicas de extracción.

Por otra parte, la mayor o menor actividad antimicrobiana de estas muestras puede estar relacionada con las concentraciones de polifenoles totales, en concreto de polifenoles que se compongan de estructuras tipo flavanona, como la neoeriocitrina, que en el extracto con agua subcrítica están en concentraciones más elevadas que en el resto de los extractos. Los polifenoles aumentan el contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células, y causan estrés oxidativo endógeno en cepas bacterianas. Estos resultados están en concordancia con los estudios publicados por Xiong et al, que refirió la inhibición de crecimiento de *Escherichia Coli* utilizando polifenoles extraídos del té. (Xiong, L. G. et al., 2017)

Resultados y discusión

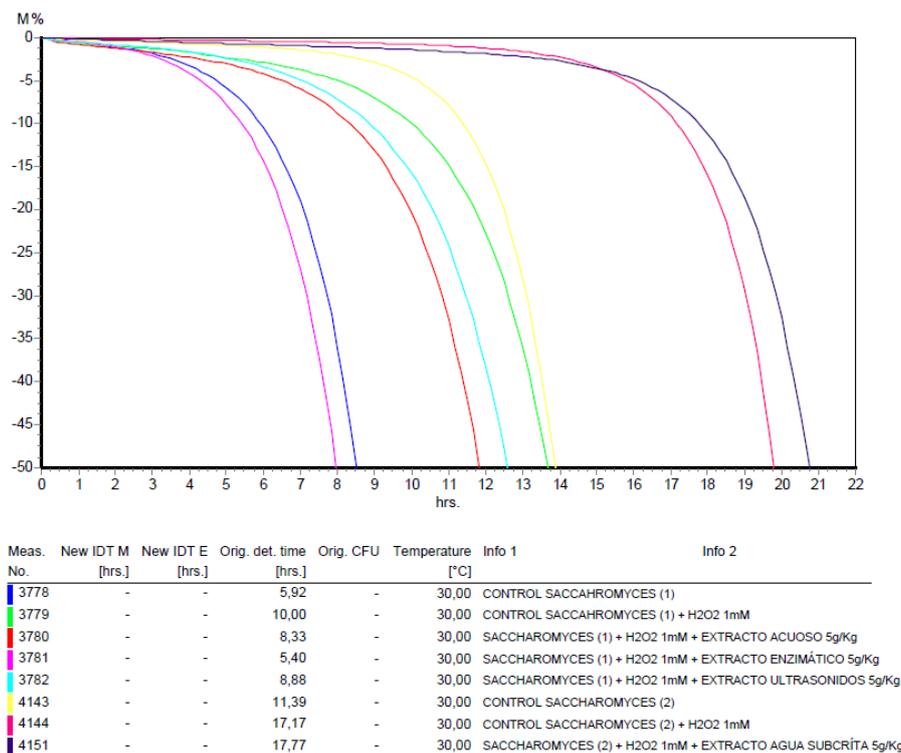


Figura 36. Capacidad antioxidante medida mediante impedancia eléctrica *in vivo* de extractos de limón obtenidos a través de las diferentes técnicas de extracción.

Cuando la cepa de *Saccharomyces* (1) se somete a estrés oxidativo con H_2O_2 , tiene un crecimiento de 10.00 horas, y si en estas condiciones añadimos el extracto de limón obtenido mediante la técnica de extracción enzimática, el tiempo que necesita para el crecimiento desciende a 5.40 horas. Es decir, se constata que el extracto tiene capacidad antioxidante. Dicho extracto posee la concentración más elevada de hesperidina, uno de los compuestos característicos con mayor capacidad antioxidante de los cítricos, seguido del extracto acuoso y el extracto obtenido mediante ultrasonidos, los cuales presentan menores concentraciones de esta sustancia.

Como muestran las curvas de la gráfica de la Figura 36, si se somete a estrés oxidativo la cepa de *Saccharomyces* (2), su tiempo de crecimiento es de 17.17 horas. Pero si en estas condiciones se adiciona extracto acuoso de limón liofilizado obtenido en la extracción con agua subcrítica, el crecimiento es de 17.77 horas; por tanto, no se observa capacidad antioxidante del extracto de limón obtenido mediante extracción con agua subcrítica. Este hecho se debe a la baja concentración de hesperidina que posee el extracto de agua subcrítica, que como se comentaba en el párrafo anterior, es el principal compuesto antioxidante cítrico tipo flavanona que se une a especies reactivas de oxígeno (ROS) para limitar la cantidad de radicales libres oxidantes.

Los resultados obtenidos sobre capacidad antioxidante mediante la medida colorimétrica ABTS no concuerdan en muchas ocasiones con la medida de la capacidad antioxidante *in vivo* mediante impedancia eléctrica. Esto es debido a que si el extracto posee capacidad antimicrobiana es un inhibidor de crecimiento de la cepa en cuestión, por lo que la ralentización del tiempo de crecimiento que se observa en los análisis de la capacidad antioxidante *in vivo* por

impedancia eléctrica, no sólo se debe a la capacidad antioxidante que ejerce el extracto sobre el H₂O₂, sino también a la inhibición de la cepa que ejerce el extracto por su poder antimicrobiano.

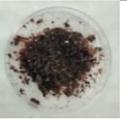
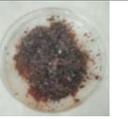
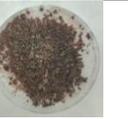
En el caso del extracto de agua subcrítica, el extracto tiene una concentración de 163.92 g trolox/kg extracto, en cambio, la medida de su capacidad antioxidante *in vivo* parece mostrar que no contrarresta el poder oxidante del H₂O₂. Esto se debe a que es un potente antimicrobiano, tal y como se infiere de su capacidad antimicrobiana *in vivo* medida por impedancia eléctrica.

4.1.4. Purificación de los compuestos de interés del subproducto de limón

Los métodos de adsorción-desorción se realizan sobre la fase líquida obtenida en el tratamiento de extracción. En esta investigación, se han llevado a cabo sobre la fase líquida procedente de la extracción enzimática debido a que es el extracto liofilizado con la mayor concentración de hesperidina que se ha obtenido (17.69 g/kg) y, además, por la facilidad de implantar esta técnica a escala industrial en comparación con la técnica de extracción con agua subcrítica.

Una vez obtenidos los extractos deshidratados mediante el protocolo descrito en el apartado 3.4 de *Materiales y Métodos*, se caracterizan atendiendo al contenido de compuestos bioactivos de interés y a la capacidad antioxidante mediante el método ABTS. Los resultados de estas experiencias se resumen a continuación.

Tabla 12. Caracterización de extractos del subproducto de limón purificado mediante tratamiento de adsorción-desorción con diferentes adsorbatos. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

	Extracción enzimática (EE)	Resina PAD610	Resina PAD900	Resina PAD950	Carbón activo (CAG)	Zeolita
						
Determinación de compuestos de interés (g/kg)						
Polifenoles totales, g ácido gálico/kg	59.61 \pm 0.43	136.67 \pm 0.71	152.62 \pm 0.78	142.73 \pm 0.77	28.72 \pm 0.30	61.75 \pm 0.62
Hesperidina	17.69 \pm 0.19	86.37 \pm 0.42	33.91 \pm 0.21	31.55 \pm 0.25	6.20 \pm 0.07	18.30 \pm 0.12
Limonina	1.71 \pm 0.03	2.62 \pm 0.03	3.71 \pm 0.09	2.28 \pm 0.04	0.12 \pm 0.04	10.60 \pm 0.18
Capacidad antioxidante (g trolox/ kg extracto seco)						
ABTS	60.66 \pm 0.15	199.46 \pm 0.71	288.85 \pm 1.02	298.45 \pm 1.22	50.83 \pm 0.62	125.68 \pm 0.69
Rendimiento respecto a gramos de extracto final obtenido por litro de extracto acuoso utilizado (%)						
Rendimiento	-	3.3 \pm 0.2	4.1 \pm 0.2	5.7 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1

En el *Anexo I Ficha de los compuestos bioactivos* aparecen especificaciones de los compuestos de interés.

Como puede constatarse al analizar la tabla anterior, el material adsorbente con mejores resultados para la obtención de un extracto rico en hesperidina fue la resina PAD610 (86.37

Resultados y discusión

g/kg), mientras que el mejor adsorbente para la obtención de un extracto con alta concentración de polifenoles totales fue la resina PAD900 (152.62 g/kg). El extracto con mayor capacidad antioxidante utilizando el método ABTS se ha obtenido utilizando la resina PAD950 (298.45 g trolox/kg extracto seco). También es el material adsorbente que conduce a mayores rendimientos.

Cuando se utilizan zeolita y CAG en el proceso de adsorción, se obtienen bajas concentraciones de hesperidina, limonina y polifenoles totales.

Además, se ha realizado un estudio comparativo con el fin de establecer los rendimientos de adsorción-desorción del proceso en cuanto a compuestos polifenólicos se refiere. Los resultados obtenidos de estos experimentos se muestran en el siguiente diagrama.

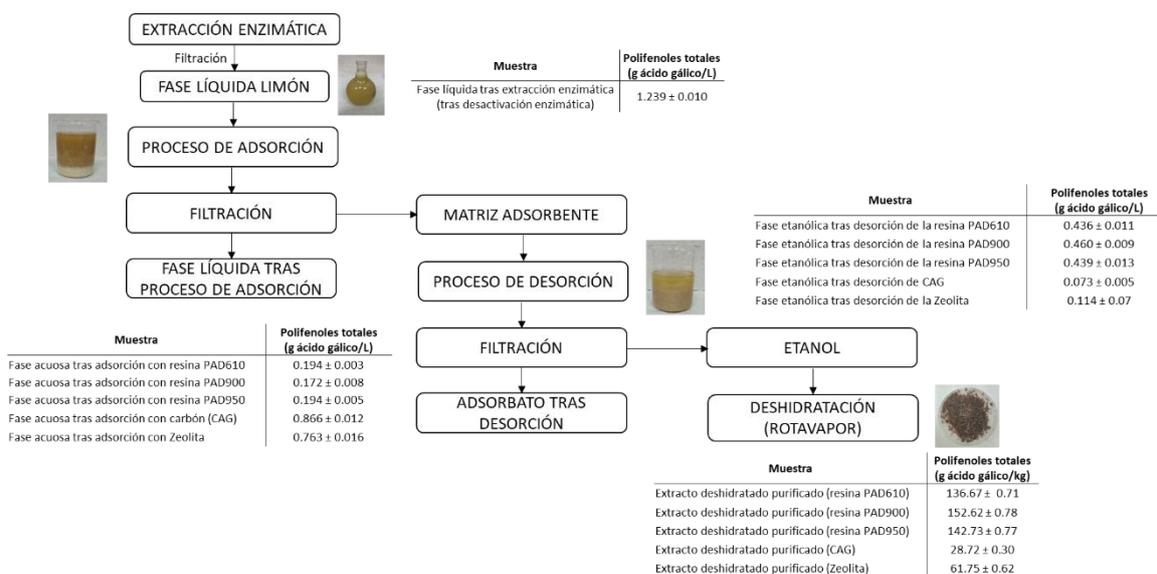


Figura 37. Diagrama purificación mediante procesos de adsorción-desorción polifenoles del subproducto de limón.

La fase líquida tras ser tratada con los diferentes adsorbentes fue analizada mediante el método Folin Ciocalteu para comprobar la concentración y capacidad de retención de polifenoles en los diferentes adsorbentes, también se realizó una cuantificación de la desorción de los polifenoles retenidos con etanol analizando los polifenoles totales de la fase etanólica. Los resultados obtenidos sobre la capacidad de adsorción-desorción según los adsorbentes estudiados se muestran en las gráficas de la siguiente figura.

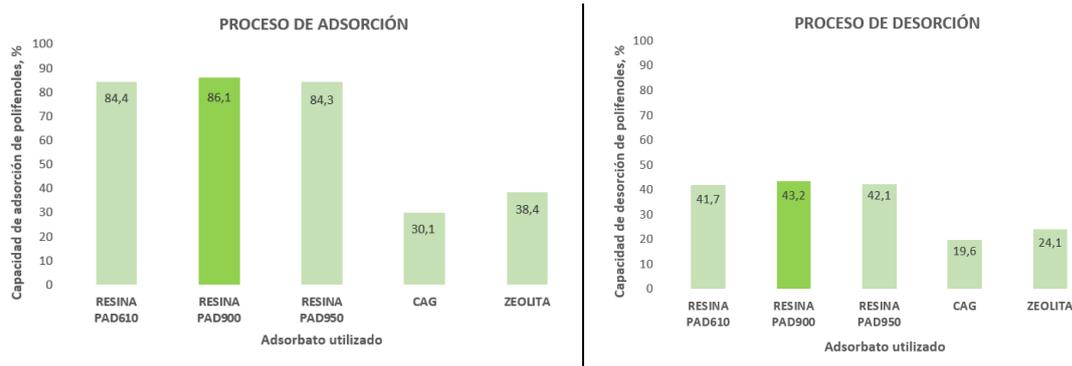


Figura 38. Capacidad de adsorción-desorción de polifenoles de limón de los diferentes adsorbatos

Tras este estudio sobre la capacidad de adsorción-desorción en las diferentes matrices adsorbentes, se concluye que la resina PAD900 es el adsorbato con mayor capacidad de retención de polifenoles, reteniendo el 86.1% de los polifenoles iniciales, mientras que el adsorbato que menos capacidad de adsorción de polifenoles mostró fue el carbón activo granular (CAG), que retuvo solamente el 30.1%.

Por otro lado, el adsorbato que posee mayor facilidad de desorción de los polifenoles retenidos es la resina PAD900, recuperando el 43.2% de los polifenoles que habían quedado adsorbidos en la resina. Por el contrario, el adsorbato que mayor dificultad de desorción ha mostrado ha sido el carbón activo granular (CAG), recuperándose sólo un 19.6% de los polifenoles que habían quedado en este adsorbato.

Así pues, este estudio demuestra que el mejor adsorbente para obtener un extracto con una alta concentración de polifenoles totales es la resina PAD900. Este resultado puede deberse a la mayor afinidad de los polifenoles por la superficie de esta resina. Cifuentes-Cabezas et al. investigaron la aplicación de resina PAD900, resina PAD950 y otras resinas comerciales para la retención de polifenoles en aguas residuales de almazara y encontraron que la resina con la que se obtuvo mayor concentración de polifenoles era precisamente la resina PAD900, seguida de la resina PAD950. (Cifuentes-Cabezas et al., 2022)

El material adsorbente con mejor rendimiento para la obtención de extracto rico en hesperidina fue la resina PAD610. Este resultado era esperable puesto que esta resina es la que presenta el mayor tamaño de poro (300 Å de diámetro de poro) entre las estudiadas y, por tanto, resulta más eficiente para la adsorción de compuestos con estructura grande como la hesperidina. Cuando se utilizaron zeolita y CAG en los procesos de adsorción, las concentraciones obtenidas de hesperidina y polifenoles totales fueron bajas en ambos casos. La razón es que los polifenoles de los cítricos presentan una gran hidrofilia, que es incompatible con la baja hidrofobicidad de estos dos adsorbatos.

Debido a que el extracto obtenido con la resina PAD950 es el de mayor capacidad antioxidante, y el que se obtiene con mayor rendimiento final y, por otra parte, esta resina es más económica que las resinas PAD610 y PAD900, se realizó una caracterización completa de los compuestos de interés obtenidos con esta resina. Los resultados se han resumido en la tabla que se presenta a continuación.

Tabla 13. Caracterización del extracto de limón purificado con resina PAD950 y comparativa con el extracto enzimático. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

Resultados y discusión

	Extracción Enzimática (EE)	Resina PAD950
		
Determinación de compuestos de interés (g/kg)		
Polifenoles totales, g ácido gálico/kg	59.61 ± 0.43	142.73 ± 0.77
Neohesperidina	19.09 ± 0.04	49.33 ± 0.44
Hesperidina	17.69 ± 0.19	31.55 ± 0.25
Vicenina-2	6.21 ± 0.04	12.94 ± 0.15
Crisoeriol 6,8-DI-C-glucósido	3.03 ± 0.04	11.05 ± 0.14
Ácido nomilínico	12.05 ± 0.04	12.88 ± 0.53
Luteolina-neohesperidosidasa	3.37 ± 0.03	8.24 ± 0.17
Narirutina	2.46 ± 0.09	12.43 ± 0.19
Limonina	1.71 ± 0.03	2.28 ± 0.04
Capacidad antioxidante (g trolox/ kg extracto seco)		
ABTS	60.66 ± 0.15	298.45 ± 1.22

En el *Anexo I Ficha de los compuestos bioactivos* aparecen especificaciones de los compuestos de interés.

Con el fin de comparar el contenido en productos de interés de los extractos obtenidos en nuestras investigaciones con los productos que se comercializan, se ha realizado una búsqueda bibliográfica y de proveedores que venden ingredientes naturales y extractos obtenidos a partir de materiales vegetales. La empresa Euromed comercializa un extracto de limón en polvo (LEMON FRUIT DRY EXTRACT - WELLEMON®) obtenido a partir de la fruta de Limón, en cuya composición se encuentra maltodextrina y sílice coloidal anhidra, cuyas concentraciones en el producto final son de aproximadamente del 10% y del 2% respectivamente. Este producto de limón es un polvo fino de color marrón verdoso, el cual posee una concentración de polifenoles de aproximadamente 100 g ácido gálico/kg. Una de las ventajas de los extractos obtenidos en esta investigación es que no han necesitado de materiales de apoyo como maltodextrina y sílice coloidal anhidra para su extracción. Además, nuestros extractos poseen una alta concentración de polifenoles, como en el caso del extracto enzimático, que contiene un 59.61 g ácido gálico/kg. Y esta concentración de polifenoles es superado por los extractos de limón purificados con resinas, obteniéndose con la resina PAD900 152.62 g ácido gálico/kg y con la resina PAD950 142.73 g ácido gálico/kg.

4.2. Revalorización del subproducto de alcachofa

El subproducto con el que se han realizado las investigaciones ha sido brácteas y tallos de alcachofa de la variedad *Blanca de Tudela*, recogido tras ser descartado en las líneas de producción. Este subproducto se ha caracterizado mediante la determinación de compuestos de interés, y análisis nutricional, microbiológico y toxicológico. Los datos más relevantes se recogen en la Tabla 14, mientras que la caracterización completa de este subproducto de alcachofa se encuentra en el *apartado Anexo III Caracterización detallada de productos*.

Tabla 14. Caracterización del subproducto de alcachofa variedad *Blanca de Tudela*. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de los análisis realizados por triplicado.

Determinación de compuestos de interés (g/kg)	
Ácido clorogénico	0.07 \pm 0.01
Cinarina	0.02 \pm 0.01
Ácido cafeico	0.003 \pm 0.001
Vitamina C	<LQ
Determinación del análisis nutricional (g/100g)	
Azúcares totales	1.0 \pm 0.0
Fibra alimentaria	8.1 \pm 0.1
Humedad	87.0 \pm 0.9
Proteínas	2.2 \pm 0.1
Determinación toxicológica (mg/kg)	
Plaguicidas	Presencia
Determinación microbiológica	
Microbiología	Ausencia patógenos

La caracterización completa del subproducto de alcachofa puede consultarse en el *apartado Anexo III Caracterización detallada de productos*. En el *Anexo I Ficha de los compuestos bioactivos* aparecen especificaciones de los compuestos de interés. Las incertidumbres de los ensayos nutricionales han sido calculadas de acuerdo con la guía “ILAC Guidelines for Measurement Uncertainty in Testing (ILAC-G17:01/2021)”.

Este subproducto de alcachofa presenta diferentes compuestos de interés, entre ellos, ácido cafeico, ácido clorogénico y cinarina, además de fibra alimentaria, proteínas y en menor cantidad azúcares. La materia analizada no presenta patógenos, pero se detecta la presencia de plaguicidas en concentraciones bajas.

4.2.1. Optimización de la extracción de los compuestos de interés del subproducto de alcachofa a escala de laboratorio

La optimización de las diferentes técnicas de extracción se ha referido al poder extractivo de cada tratamiento en función de la capacidad de la técnica para recuperar compuestos polifenólicos del subproducto de alcachofa.

Para poner a punto los protocolos de extracción y llevar a cabo los diferentes experimentos asociados a cada una de las técnicas de extracción investigadas, se ha seguido el protocolo descrito en el *apartado 3.2 de Materiales y Métodos*.

Resultados y discusión

A continuación, se detallan las experiencias realizadas para optimizar cada técnica de extracción atendiendo a los parámetros de operación de cada tratamiento a escala laboratorio.

4.2.1.1. Optimización de la extracción acuosa del subproducto de alcachofa

La extracción acuosa se ha optimizado variando los siguientes parámetros de proceso, tal y como se describe en el apartado 3.2.1 de *Materiales y Métodos*.

- **Relación sólido:líquido**
- **Temperatura de extracción**
- **Tiempo de extracción**

Finalizados los experimentos de extracción empleando las diferentes condiciones experimentales, se caracterizó la fase acuosa filtrada atendiendo al contenido de polifenoles totales, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 15. Optimización de las condiciones de la extracción acuosa (EAT) en el subproducto alcachofa. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ratio subproducto: agua (p/v)	Polifenoles totales (g ácido gálico/L)
EAT-1	25	60	1:2	0.636 \pm 0.005
EAT-2	25	60	1:3	0.664 \pm 0.003
EAT-3	25	60	1:4	0.663 \pm 0.002
EAT-4	50	60	1:3	0.722 \pm 0.010
EAT-5	75	60	1:3	0.746 \pm 0.004
EAT-6	98	60	1:3	1.179 \pm 0.010
EAT-7	98	30	1:3	0.908 \pm 0.009
EAT-8	98	90	1:3	1.022 \pm 0.011

La relación sólido:líquido óptima corresponde a una ratio 1:3 p/v. Manteniendo constante este parámetro, se han realizado ensayos de extracción a diferentes temperaturas, desde temperatura ambiente hasta 98 °C. Así, se ha realizado la extracción a 50 °C, las condiciones EAT-4, debido a que esta es la temperatura de máxima efectividad de las enzimas, de esta forma se podrán comparar los resultados de la extracción acuosa con los obtenidos con la técnica de extracción enzimática.

Por otra parte, las condiciones EAT-5 corresponden a una temperatura de 75 °C, debido a que esta es la temperatura a las que llegaron las mezclas tratadas mediante ultrasonidos.

Tras realizar todas estas experiencias, pudimos concluir que es cuando se aplica una temperatura de ebullición al tratamiento extractivo, cerca de los 98 °C, es cuando mayor concentración de polifenoles presenta la fase acuosa.

Después, se llevaron a cabo tres experiencias más para medir la influencia del tiempo de reacción, a 30, 60 y 90 minutos, aplicando los valores óptimos para la ratio sólido:líquido y la temperatura de extracción, con lo que pudimos establecer que los mejores resultados se obtienen con un tiempo de extracción de 60 minutos.

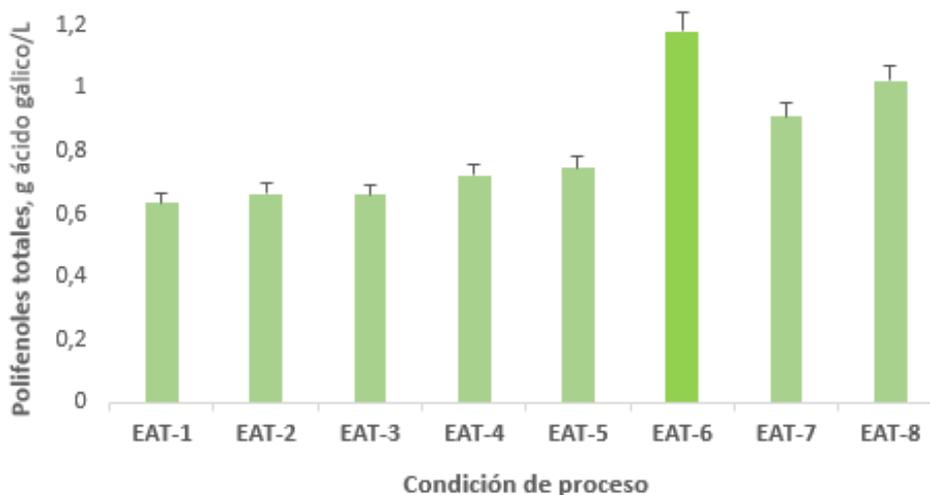


Figura 39. Cantidad de polifenoles totales en función de las diferentes condiciones de extracción empleadas en la optimización de la extracción acuosa del subproducto de alcachofa. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de tres réplicas independientes.

Puesto que el resto de las extracciones se realizarían con el mismo disolvente, agua, y la ratio subproducto:agua óptima en las experiencias referidas es 1:3 p/v, este mismo valor se tomó como referencia para los demás ensayos correspondientes a cada una de las técnicas extractivas. De este modo se podrán comparar los resultados de las diferentes técnicas entre sí. En cuanto al tiempo de extracción con este disolvente, como ya se ha mencionado, el óptimo resultó ser de 60 minutos en condiciones de presión atmosférica, por lo que en las extracciones enzimática y de ultrasonidos, debido a que trabajan en las mismas condiciones de presión, se han llevado a cabo con este mismo valor.

4.2.1.2. Optimización de la extracción enzimática del subproducto de alcachofa

En la extracción enzimática se usaron algunos de los parámetros optimizados en la extracción acuosa debido a que se también se usa agua como disolvente. Así, estos experimentos se realizaron fijando las siguientes condiciones.

- Relación sólido:líquido: **1:3 p/v**
- Tiempo de extracción: **60 minutos**

La temperatura y el pH para alcanzar la máxima efectividad de las enzimas recomendado por el proveedor son:

- Temperatura: **50 °C**
- pH: **3.5 – 5.0**

En consecuencia, la extracción enzimática se ha optimizado manteniendo constantes la relación sólido:líquido, la temperatura a 50 °C, el pH a 4.8, y el tiempo de extracción en 60 minutos, y se han variado los siguientes parámetros de proceso tal y como se describe en el *apartado 3.2.2 de Materiales y Métodos*.

- **Tipo de enzima**
- **Concentración de enzima**

Resultados y discusión

Finalizada la extracción con las diferentes condiciones, se caracterizó la fase acuosa filtrada atendiendo al contenido de polifenoles totales, obteniéndose los resultados que se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 16. Optimización de condiciones de la extracción enzimática (EE) en el subproducto alcachofa. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de tres réplicas independientes.

Condición	Enzima Celulasa	Concentración de enzima (%)	Polifenoles totales (g ácido gálico/L)
EE-1	Naturzyme	0.01	0.752 \pm 0.006
EE-2	Naturzyme	0.015	0.809 \pm 0.004
EE-3	Naturzyme	0.02	0.720 \pm 0.003
EE-4	Validase TRL	0.001	0.774 \pm 0.008
EE-5	Validase TRL	0.005	0.795 \pm 0.010
EE-6	Validase TRL	0.01	0.839 \pm 0.004

Las experiencias de extracción enzimática tienen como objetivo, lógicamente, comprobar si la presencia de enzima mejora el rendimiento de la extracción de polifenoles. Es por ello que, con fines comparativos, en los experimentos de extracción acuosa se incluyó la experiencia EAT-4, en la que la temperatura (50 °C) corresponde a la de máxima efectividad de las enzimas. En este caso se obtuvo una concentración de polifenoles totales en la fase acuosa de 0.722 ácido gálico/L, mientras que en la experiencia análoga EE-6 de extracción enzimática se ha obtenido mayor concentración de estos compuestos polifenólicos. Confirmándose, una vez más, su mayor capacidad de extracción de polifenoles frente a la extracción acuosa.

Las condiciones de extracción óptimas corresponden a las denominadas como EE-6, esto es, cuando se utiliza la enzima celulasa Validase TRL en una concentración de 0.01% de enzima respecto el peso del subproducto seco, manteniendo un ratio 1:3 p/v, una temperatura de 50 °C y un tiempo de extracción de 60 minutos.

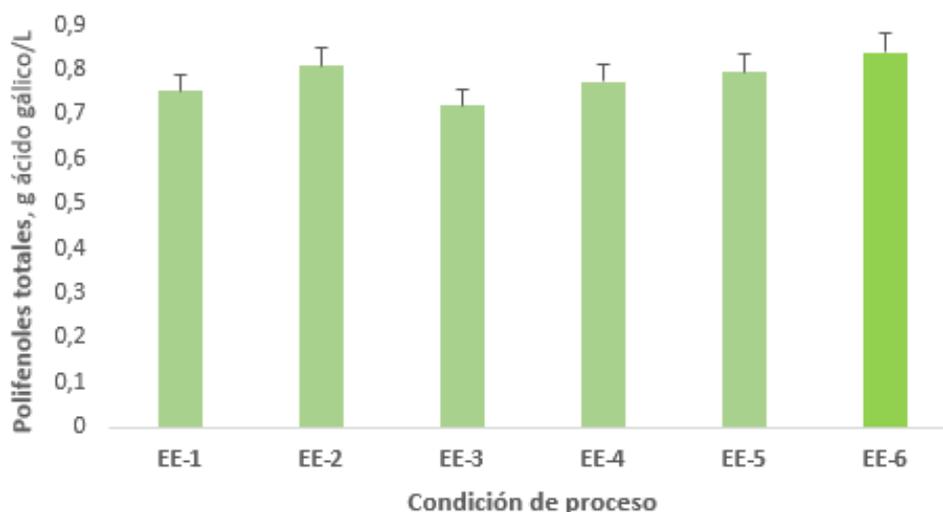


Figura 40. Resumen de la optimización de las condiciones de proceso para la extracción enzimática en el subproducto de alcachofa. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de tres réplicas independientes.

4.2.1.3. Optimización de la extracción asistida por ultrasonidos del subproducto de alcachofa

En la extracción asistida por ultrasonidos se usaron algunos de los parámetros optimizados en la extracción acuosa debido a que, como en el caso anterior, también se usa el disolvente (agua). El extractor utilizado ha sido un equipo de ultrasonidos UIP500hDT (Hielscher).

- Relación sólido:líquido: **1:3 p/v**
- Tiempo de extracción: **60 minutos**

Con el fin de optimizar la extracción asistida por ultrasonidos se llevaron a diversos experimentos siguiendo los parámetros de proceso tal y como se describe en el *apartado 3.2.3 de Materiales y Métodos*.

▪ Potencia de extracción

Finalizada la extracción con diferentes potencias ultrasónicas, se caracterizó la fase acuosa atendiendo al contenido de polifenoles totales, obteniéndose los resultados que se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 17. Optimización de las condiciones de la extracción asistida por ultrasonidos (EUS) en el subproducto alcachofa.

Condición	Potencia ultrasónica (W)	Polifenoles totales (g ácido gálico/L)
EUS-1	135	0.342 \pm 0.002
EUS-2	250	0.368 \pm 0.004
EUS-3	320	0.402 \pm 0.004

Si comparamos los resultados de la experiencia de extracción acuosa EAT-5, realizada a la misma temperatura que se alcanza en las diferentes experiencias de extracción por ultrasonidos, 75 °C, con los datos de la tabla anterior, se concluye que la sonicación (manteniendo los parámetros de tiempo y ratio constantes) es menos eficaz que la acuosa en la extracción de polifenoles. Así, en la extracción acuosa EAT-5 se obtuvo una concentración de polifenoles totales de 0.746 g ácido gálico/L, mientras que en cualquiera de los experimentos de extracción ultrasónica se ha obtenido menor concentración de estos compuestos polifenólicos.

Como se comentaba antes, debido al choque de ondas sonoras la temperatura en la mezcla llegó alrededor de unos 75 °C en todas las experiencias. La potencia ultrasónica óptima fue de 320 W, con un ratio 1:3 p/v subproducto:agua, y un tiempo de extracción de 60 minutos.

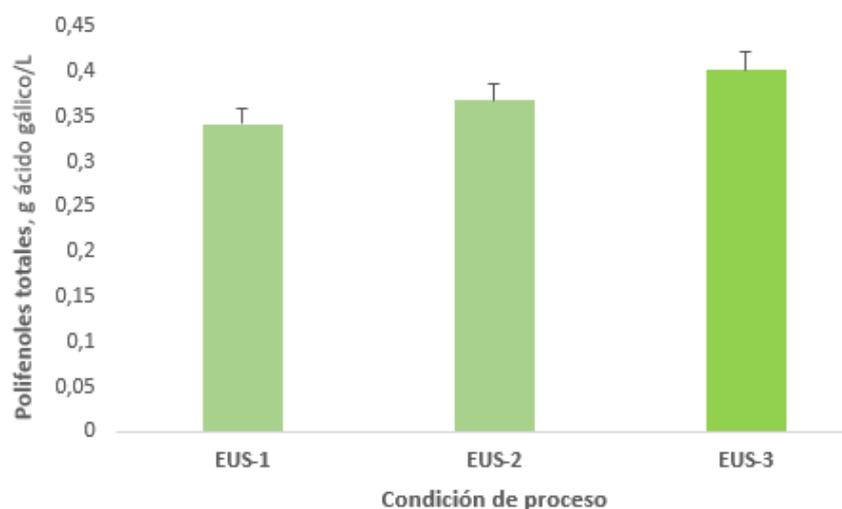


Figura 41. Cantidad de polifenoles totales en la optimización de las condiciones de proceso para la extracción asistida por ultrasonidos en el subproducto de alcachofa. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de tres réplicas independientes.

4.2.1.4. Optimización de la extracción con agua subcrítica del subproducto de alcachofa

En la extracción con agua subcrítica se fijaron algunos de los parámetros que ya habían sido optimizados en la extracción acuosa, dado que se usa el mismo disolvente (agua). El extractor utilizado ha sido un equipo Thermo Scientific Dionex™ ASE™ 350, el cual tiene configurado una presión constante de operación en sus tratamientos extractivos de **150 bares**.

- Relación sólido:líquido: **1:3 p/v**
- Presión de extracción: **150 bares**

Los estudios de extracción con agua subcrítica se han realizado siguiendo parámetros de proceso tal y como se describe en el *apartado 3.2.4 de Materiales y Métodos*. Además, debido a que las condiciones de presión cambian con respecto a las demás técnicas de extracción estudiadas en este trabajo de investigación, se evaluó la influencia de los siguientes parámetros en la eficacia de la extracción.

- **Temperatura de extracción**
- **Tiempo de extracción**

Finalizadas las diferentes experiencias de extracción, se caracterizó la fase acuosa atendiendo al contenido de polifenoles totales como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 18. Optimización de las condiciones de la extracción con agua subcrítica (EAS) en el subproducto alcachofa. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Polifenoles totales (g ácido gálico/L)
EAS-1	80	5	0.552 \pm 0.005
EAS-2	100	5	0.621 \pm 0.004
EAS-3	120	5	0.725 \pm 0.010
EAS-4	120	1	0.590 \pm 0.003
EAS-5	120	10	0.673 \pm 0.009

La mayor concentración de polifenoles en la fase acuosa se obtiene cuando se aplica una temperatura de 120 °C y una presión de 150 bares durante un tiempo de extracción de 5 minutos, lo que corresponde a la experiencia EAS-3.

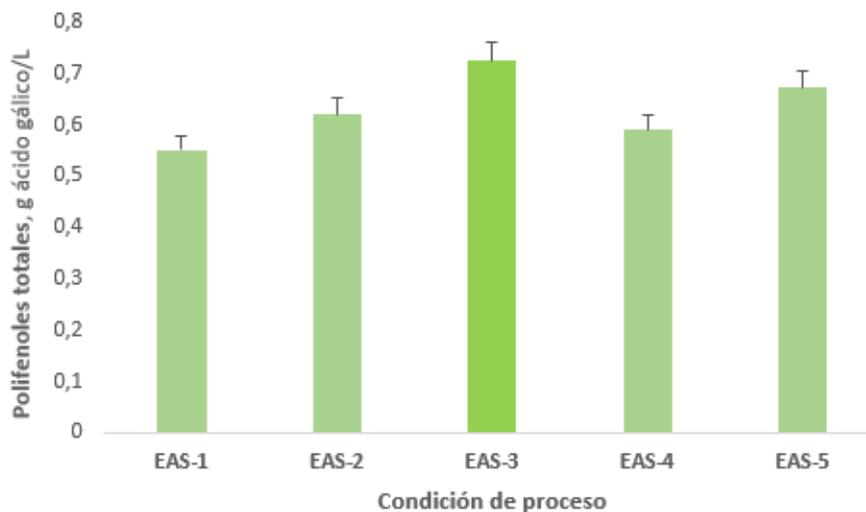


Figura 42. Cantidad de polifenoles totales obtenidos en la optimización de las condiciones de proceso para la extracción con agua subcrítica en el subproducto de alcachofa. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

4.2.2. Extracción y caracterización de los extractos de alcachofa obtenidos a escala piloto

En este apartado se detalla la caracterización de los extractos finales obtenidos en los siguientes tratamientos.

- **Extracción acuosa**
- **Extracción mediante tratamiento enzimático**
- **Extracción asistida por ultrasonidos**
- **Extracción con agua subcrítica**

Una vez realizado el pretratamiento al subproducto de alcachofa (lavado y triturado), se somete al tratamiento de extracción. Pasado el tiempo de extracción, se separa la corriente sólida de la acuosa mediante un Decanter tal y como se describe en el *apartado 3.3 de Materiales y Métodos*. La corriente sólida obtenida se deshidrata a 70 °C durante 2 días en una estufa con control de humedad obteniendo un extracto aprovechable por su gran contenido en fibra alimentaria.

La fase acuosa se deshidrata mediante un proceso de concentración en una bola de vacío, posteriormente, el concentrado obtenido se congela y se obtiene en polvo mediante un proceso de liofilización.

Una vez obtenida la fase acuosa liofilizada se procede a caracterizarla según las siguientes variables.

- **Compuestos orgánicos de interés del producto**
- **Análisis nutricional**
- **Capacidad antimicrobiana y antioxidante**

Los resultados de estos estudios, correspondientes a las diferentes técnicas extractivas, se recogen en la tabla siguiente, junto con el rendimiento de cada extracto.

Tabla 19. Caracterización extractos sólidos finales obtenidos del subproducto de alcachofa mediante las diferentes técnicas extractivas. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

	Extracción acuosa (EAT)	Extracción enzimática (EE)	Extracción ultrasonidos (EUS)	Extracción agua subcrítica (EAS)
				
Determinación de compuestos de interés (g/kg)				
Polifenoles totales, g ácido gálico/kg	70.59 \pm 0.19	77.92 \pm 0.22	25.76 \pm 0.34	42.58 \pm 0.28
Ácido clorogénico	32.88 \pm 0.23	28.46 \pm 0.14	0.47 \pm 0.02	0.29 \pm 0.04
Cinarina	6.93 \pm 0.07	12.02 \pm 0.06	0.08 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01
Ácido cafeico	0.55 \pm 0.03	1.43 \pm 0.05	1.09 \pm 0.09	<LQ
Vitamina C	0.47 \pm 0.04	1.36 \pm 0.09	<LQ	<LQ
Capacidad antioxidante (g trolox/ kg extracto seco)				
ABTS	92.84 \pm 0.51	118.71 \pm 0.63	41.16 \pm 0.39	69.14 \pm 0.46
Determinación del análisis nutricional (g/100g)				
Azúcares totales	17.3 \pm 2.0	15.4 \pm 2.0	17.1 \pm 2.0	<LQ

Fibra alimentaria	48.8 ± 0.5	24.4 ± 0.2	15.8 ± 0.16	16.5 ± 0.17
Humedad	3.4 ± 0.0	4.2 ± 0.0	4.0 ± 0.0	5.1 ± 0.0
Proteínas	15.7 ± 0.5	15.5 ± 0.5	21.7 ± 0.7	12.2 ± 0.4
Rendimiento (% respecto el peso de materia prima inicial)				
Rendimiento	3.6 ± 0.2	4.9 ± 0.7	2.8 ± 0.3	3.2 ± 0.5

La caracterización completa de los extractos de alcachofa se encuentra en el *apartado Anexo III Caracterización detallada de productos*. En el *Anexo I Ficha de los compuestos bioactivos* aparecen especificaciones de los compuestos de interés. Las incertidumbres de los ensayos nutricionales han sido calculadas de acuerdo con la guía “ILAC Guidelines for Measurement Uncertainty in Testing (ILAC-G17:01/2021)”.

En cuanto a la determinación de compuestos de interés, la tecnología enzimática es la técnica extractiva con la que se obtiene un mayor contenido en polifenoles totales (77.92 g ácido gálico/kg), siendo el extracto que presenta mayor capacidad antioxidante, medido mediante el método ABTS, entre las cuatro técnicas extractivas estudiadas.

Las extracciones con ultrasonidos y con agua subcrítica son las menos eficaces, obteniéndose menos contenido en compuestos de interés como ácido cafeico, ácido clorogénico y cinarina; esto se debe a que estos compuestos cuando son sometidos a potentes frecuencias o a altas presiones tienden a la degradación. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Wianowska et al, en el que investigaron la estabilidad del ácido clorogénico en condiciones de líquidos presurizados, concluyendo que temperaturas y presiones de extracción elevadas provocan degradación de estos compuestos, y en consecuencia su baja obtención. (Wianowska et al, 2015)

El extracto con mayor concentración de ácido clorogénico es el que se obtiene mediante una extracción acuosa (32.88 g/kg), además de ser el que mayor concentración en fibra alimentaria (48.8 g/100g) y azúcares (17.3 g/100g) presenta.

Cuando el subproducto de alcachofa se somete a tratamiento ultrasónico se obtiene un extracto final con mayor contenido en proteína (21.7 g/100g), en comparación con las diferentes técnicas de extracción.

4.2.3. Medida de la capacidad antimicrobiana y antioxidante *in vivo* de los extractos de alcachofa obtenidos

Se ha realizado un estudio sobre la capacidad antioxidante y antimicrobiana mediante impedancia eléctrica *in vivo*. Dado que la producción de extractos con las diferentes técnicas extractivas se llevó a cabo en periodos de tiempo diferentes, se realizaron dos controles, para las técnicas de extracción acuosa, enzimática y ultrasonidos se ha utilizado la cepa (1), y para la extracción con agua subcrítica la cepa (2). Los resultados obtenidos de este estudio se muestran en las siguientes figuras.

Resultados y discusión

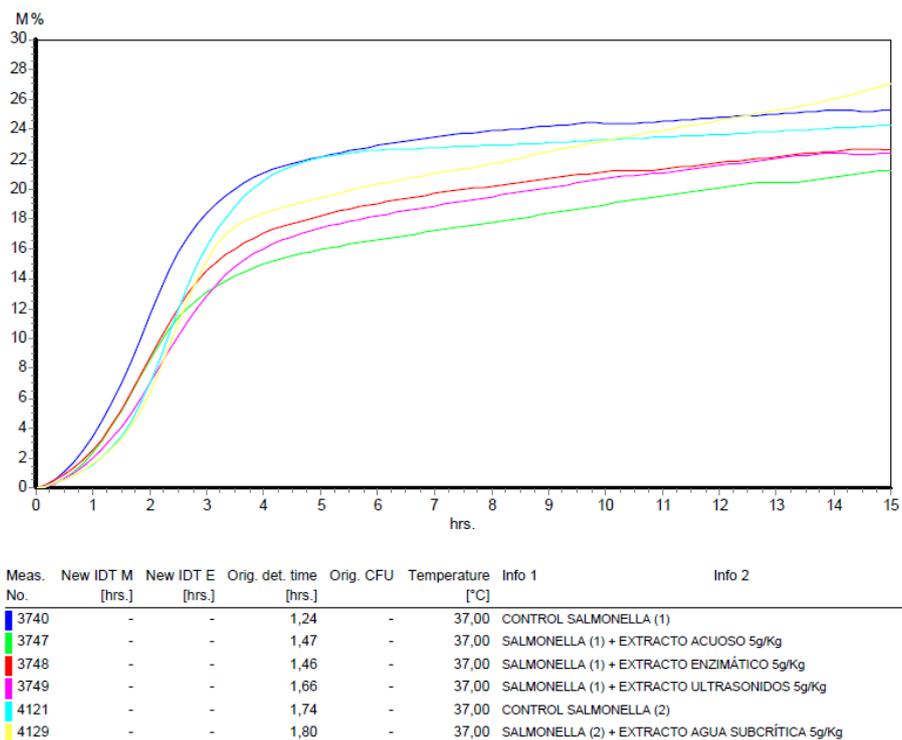


Figura 43. Capacidad antimicrobiana medida por impedancia eléctrica *in vivo* de extractos de alcachofa obtenidos mediante las diferentes técnicas sostenibles utilizando como cepa *Salmonella*.

El tiempo de crecimiento de la cepa *Salmonella* (1) es de 1.24 horas, cuando se añade extracto de alcachofa obtenido mediante extracción con ultrasonidos, este crecimiento se ralentiza a 1.66 horas. El tiempo de crecimiento de la cepa *Salmonella* (2) es de 1.74 horas, cuando se añade extracto de alcachofa obtenido mediante extracción con agua subcrítica, se ralentiza el crecimiento a 1.80 horas, por lo que se puede concluir que los extractos de alcachofa no poseen capacidad antimicrobiana significativa frente a *Salmonella*.

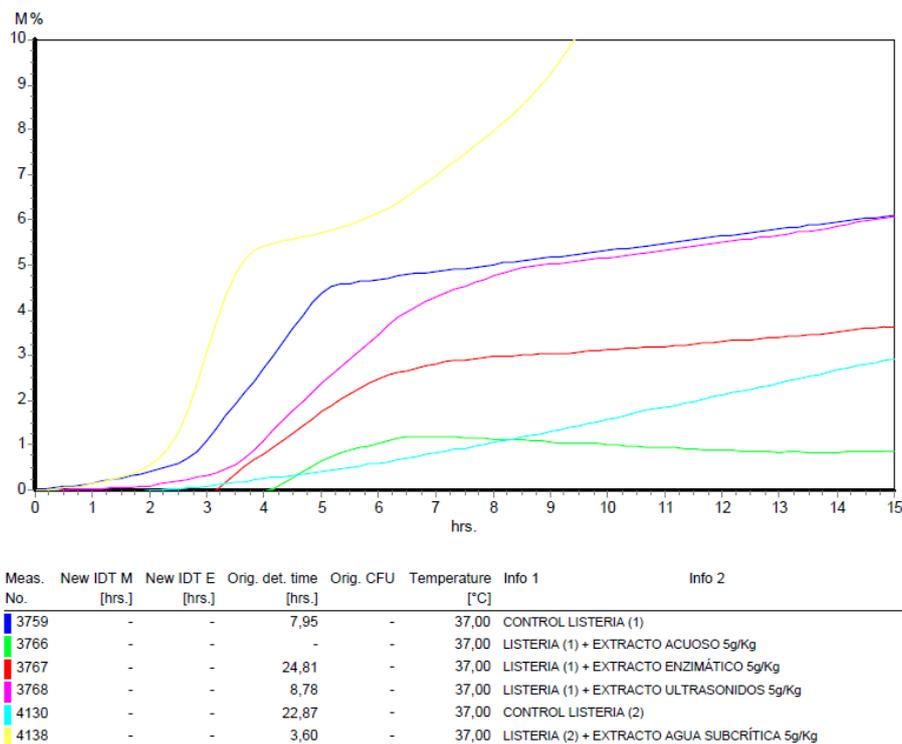


Figura 44. Capacidad antimicrobiana por impedancia eléctrica *in vivo* de extractos de alcachofa obtenidos mediante las diferentes técnicas extractivas utilizando como cepa *Listeria*.

El tiempo de crecimiento de la cepa de *Listeria* (1) es de 7.95 horas, cuando se añade extracto de alcachofa obtenido mediante la extracción enzimática, se ralentiza este crecimiento a 24.81 horas, y cuando se añade extracto acuoso se inhibe el crecimiento de la cepa, por lo que podemos asegurar que estos extractos poseen capacidad antimicrobiana frente a *Listeria*, siendo el extracto acuoso el de mayor poder antimicrobiano frente a esta bacteria. El tiempo de crecimiento de la cepa *Listeria* (2) es de 22.87 horas, cuando se añade extracto de alcachofa obtenido por extracción con agua subcrítica la cepa crece en 3.60 horas, por lo que este extracto no posee capacidad antimicrobiana frente a *Listeria*.

La actividad antimicrobiana del extracto acuoso y del extracto enzimático se debe a la alta concentración de polifenoles que posee, en concreto la alta concentración de ácido clorogénico, siendo mayor en el extracto acuoso. Estudios experimentales, como el realizado por Zaixiang Lou et al. respecto a la actividad antimicrobiana del ácido clorogénico obtenido de hojas de bardana (*Arctium lappa*), concluyeron que el ácido clorogénico muestra una fuerte actividad antimicrobiana, ya que es capaz de unirse y penetrar en la membrana bacteriana, provocando daño a la integridad de la membrana y resultando en muerte bacteriana. En este estudio se observó que este compuesto actúa con mayor intensidad sobre bacteria Gram Positivas como la *Listeria* y con menos intensidad sobre las bacterias Gram Negativas como la *Salmonella* (Lou, Z. et al, 2011).

Por otra parte, cuando se somete a estrés oxidativo las cepas de *Saccharomyces* (1) y *Saccharomyces* (2) obtenemos un crecimiento de 10.00 horas y 17.17 horas respectivamente, si en estas condiciones añadimos extracto de alcachofa obtenido mediante extracción por ultrasonidos y extracto obtenido con agua subcrítica, observamos que el crecimiento es de 7.75

Resultados y discusión

horas y 12.79 horas respectivamente, esto es, se observa una capacidad antioxidante de estos dos extractos.

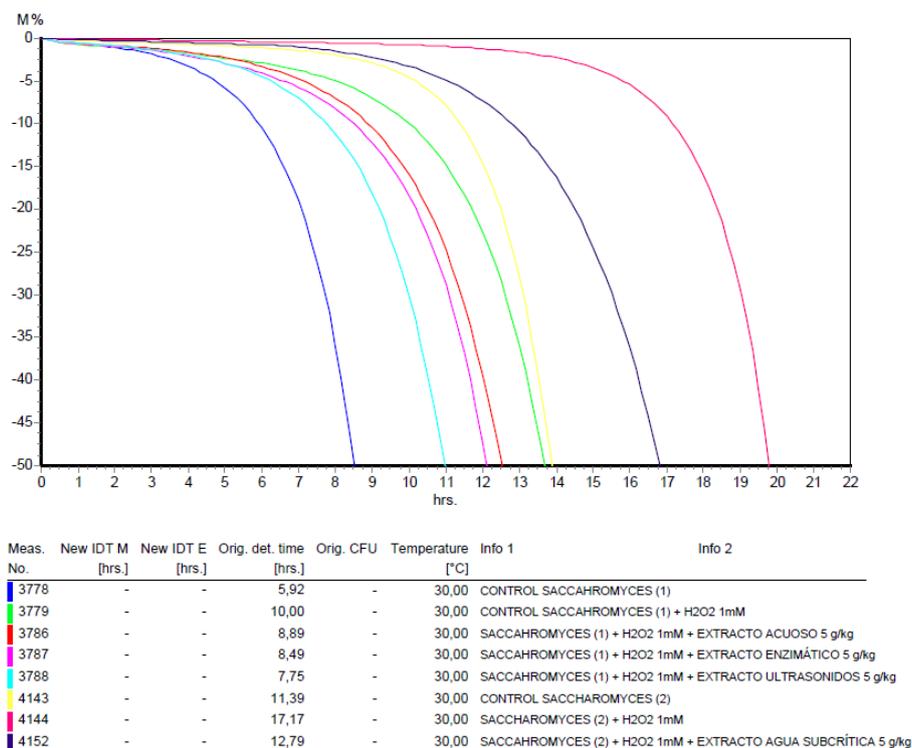


Figura 45. Capacidad antioxidante medida por impedancia eléctrica *in vivo* de extractos de alcachofa obtenidos con las diferentes técnicas de extracción.

Los resultados de la capacidad antioxidante mediante la medida colorimétrica ABTS no concuerdan en muchas ocasiones con la medida de la capacidad antioxidante *in vivo* mediante impedancia eléctrica. En los extractos de alcachofa, las tecnologías acuosa y enzimática son los que más concentración de polifenoles totales y ABTS presentan, esto se debe a que si el extracto posee capacidad antimicrobiana es un inhibidor de crecimiento de la cepa en cuestión, por lo que el tiempo ralentizado de crecimiento que se observa, cuando se mide la capacidad antioxidante *in vivo* por impedancia eléctrica, no solo se debe a la capacidad antioxidante que ejerce el extracto sobre el H₂O₂, sino que también se trata de la inhibición de la cepa que ejerce el extracto debido a su poder antimicrobiano.

En este caso, el extracto obtenido por ultrasonidos y por agua subcrítica, al tener una baja concentración de polifenoles no posee características antimicrobianas como observamos al medir por impedancia eléctrica los extractos de alcachofa, por lo que no es un inhibidor de crecimiento de la cepa en cuestión como el extracto acuoso o el extracto enzimático, viéndose de este modo, en la medida antioxidante *in vivo*, el efecto que ejercen los extractos de ultrasonidos y agua subcrítica sobre el agente oxidante H₂O₂.

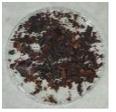
4.2.4. Purificación de compuestos de interés del subproducto de alcachofa

Los métodos de adsorción-desorción se han realizado sobre la fase líquida obtenida en el tratamiento de extracción. En concreto, se han llevado a cabo sobre la fase líquida obtenida de

la extracción enzimática, debido a que es el extracto liofilizado con la mayor concentración de polifenoles totales (76.92 g/kg) y cinarina (12.02 g/kg) que se ha obtenido.

Una vez obtenidos los extractos purificados deshidratados mediante el protocolo descrito con diferentes matrices adsorbentes en el *apartado 3.4 de Materiales y Métodos*, se caracterizan en base a los compuestos bioactivos de interés que contienen y a la capacidad antioxidante mediante el método ABTS. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla que se presenta a continuación.

Tabla 19. Caracterización de extractos polifenólicos del subproducto de alcachofa purificado mediante tratamiento de adsorción-desorción con diferentes adsorbatos. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

	Extracción enzimática (EE)	Resina PAD610	Resina PAD900	Resina PAD950	Carbón activo (CAG)	Zeolita natural
						
Determinación de compuestos de interés (g/kg)						
Polifenoles totales, g ácido gálico/kg	77.92 \pm 0.22	150.42 \pm 0.58	161.03 \pm 0.41	169.95 \pm 0.35	18.50 \pm 0.20	96.14 \pm 0.42
Ácido clorogénico	28.46 \pm 0.14	99.29 \pm 0.30	33.52 \pm 0.15	89.71 \pm 0.22	9.13 \pm 0.24	70.61 \pm 0.35
Cinarina	12.02 \pm 0.06	36.17 \pm 0.14	35.31 \pm 0.19	43.15 \pm 0.23	3.26 \pm 0.09	15.77 \pm 0.04
Ácido cafeico	1.43 \pm 0.05	2.77 \pm 0.04	2.34 \pm 0.06	2.20 \pm 0.08	0.09 \pm 0.02	7.12 \pm 0.11
Capacidad antioxidante (g trolox/ kg extracto seco)						
ABTS	118.71 \pm 0.63	176.47 \pm 0.85	179.28 \pm 0.68	198.75 \pm 1.16	31.45 \pm 0.44	125.39 \pm 0.55
Rendimiento respecto a gramos de extracto final obtenido por litro de extracto acuoso utilizado						
Rendimiento	-	4.1 \pm 0.2	3.9 \pm 0.1	5.7 \pm 0.4	0.9 \pm 0.2	1.9 \pm 0.2

En el *Anexo I Ficha de los compuestos bioactivos* aparecen especificaciones de los compuestos de interés.

El material adsorbente con mejores resultados para la obtención de un extracto rico en ácido clorogénico y cinarina fue la resina PAD610 (99.29 g/kg y 36.17 g/kg, respectivamente) y la resina PAD950 (89.71 g/kg y 43.15 g/kg, respectivamente). El extracto con mayor concentración de polifenoles (169.95 g ácido gálico/kg extracto seco) y mayor capacidad antioxidante (198.75 g trolox/ kg extracto seco) ha sido el obtenido con la resina PAD950. La zeolita natural ha demostrado que es un buen adsorbente de ácido clorogénico (70.61 g/kg).

Cuando se utiliza CAG en el proceso de adsorción, se obtienen bajas concentraciones de ácido cafeico, ácido clorogénico, cinarina y polifenoles totales.

Con el fin de evaluar los rendimientos los rendimientos de adsorción-desorción del proceso en cuanto a compuestos polifenólicos se refiere, se realizó un estudio comparativo cuyos resultados más relevantes se muestran en el siguiente diagrama.

Resultados y discusión

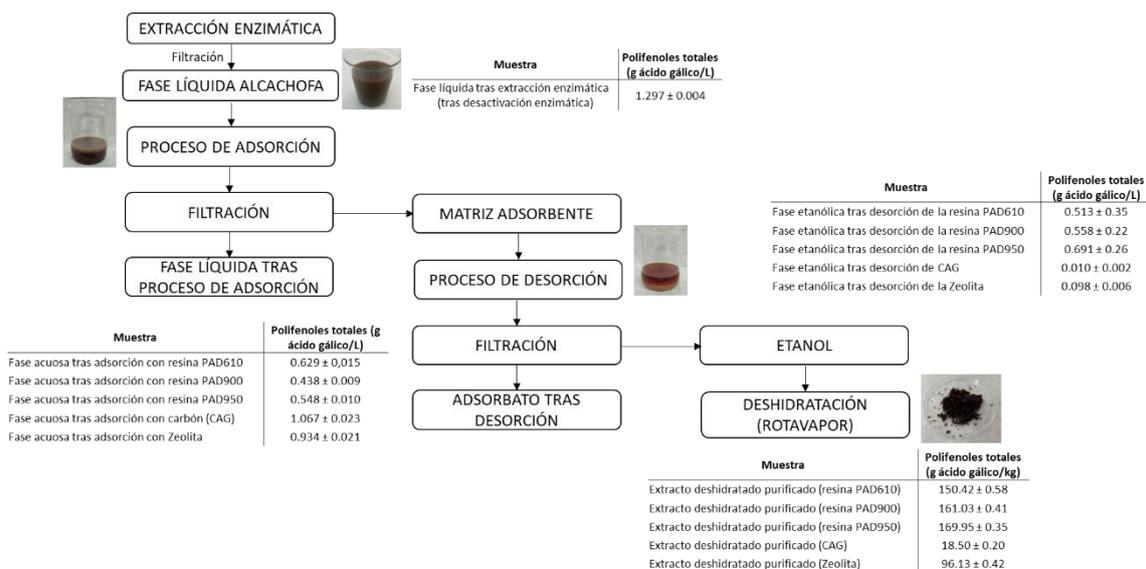


Figura 46. Diagrama purificación mediante procesos de adsorción-desorción de compuestos de interés del subproducto de alcachofa.

La fase líquida tras ser tratada con los diferentes adsorbatos fue analizada mediante el método Folin Ciocalteu para comprobar la concentración y capacidad de retención de polifenoles en los diferentes adsorbatos. Además, también se realizó una cuantificación de la desorción de los polifenoles retenidos con etanol analizando los polifenoles totales de la fase etanólica. Los resultados se recogen en la siguiente gráfica.

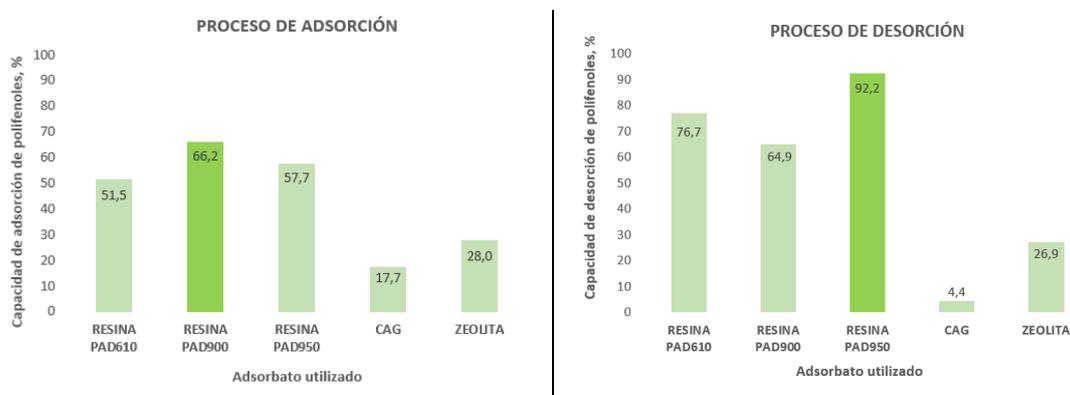


Figura 47. Capacidad de adsorción-desorción de polifenoles de alcachofa de los diferentes adsorbatos

Tras realizar el estudio de adsorción-desorción en las diferentes matrices adsorbentes se concluye que la resina PAD900 es el adsorbato con mayor capacidad de retención de polifenoles, ya que retiene el 66.2% de los polifenoles iniciales, mientras que el adsorbato que menor capacidad de adsorción presenta de estos compuestos es el carbón activo granular (CAG) solamente el 17.7%. Por otro lado, el adsorbato con mayor facilidad de desorción de los polifenoles retenidos es la resina PAD950, pudiéndose recuperar el 92.2% de los polifenoles que habían quedado adsorbidos en la resina. En contraste, el adsorbato que mayor dificultad de

desorción ha mostrado es el carbón activo granular (CAG), recuperándose sólo un 4.4% de los polifenoles que habían quedado en este adsorbato.

La menor capacidad de adsorción de la resina PAD950 (un 57.7% de los polifenoles) con respecto a la resina PAD900 se debe al diámetro de poro de cada resina, el diámetro de poro de la resina la primera es 120 Å, bastante menor que el de la resina PAD900, que es 220 Å. Investigaciones realizadas como la de Buran et al, establecieron que el tamaño de poro es crucial para la adsorción de algunos polifenoles como por ejemplo los polifenoles característicos en arándanos, observando que cuanto mayor es el tamaño de poro, más polifenoles se retienen en la superficie de la resina (Buran T. J. et al, 2014).

Debido a que el extracto obtenido con la resina PAD950 es el extracto con mayor capacidad antioxidante y mayor concentración ha mostrado en compuestos de interés como la cinarina y polifenoles totales, se realizó una caracterización completa de sus compuestos de interés, los resultados obtenidos se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 20. Caracterización completa del extracto de alcachofa purificado con resina PAD950 y comparativa con extracto enzimático. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

	Extracción enzimática (EE)	Resina PAD950
		
Determinación de compuestos de interés (g/kg)		
Polifenoles totales	77.92 \pm 0.22	169.95 \pm 0.35
Ácido clorogénico	28.46 \pm 0.14	89.71 \pm 0.22
Cinarina	12.02 \pm 0.06	43.15 \pm 0.23
Ácido cafeico	1.43 \pm 0.05	2.20 \pm 0.08
Capacidad antioxidante (g trolox/ kg extracto seco)		
ABTS	118.71 \pm 0.63	198.75 \pm 1.16

En el *Anexo I Ficha de los compuestos bioactivos* aparecen especificaciones de los compuestos de interés.

Con el objetivo de evaluar nuestros resultados sobre los extractos de alcachofa obtenidos, se ha realizado una búsqueda bibliográfica y de proveedores que comercializan ingredientes naturales y extractos obtenidos a partir de materiales vegetales. La empresa Euromed comercializa un extracto de alcachofa en polvo (EXTR. CYNARAE SCOL. SICC. ARTICHOKE DRY EXTRACT) obtenido a partir de partes de alcachofa de *Cynara Scolymus L.*, en cuya composición se encuentra aproximadamente un 25% de maltodextrina, 9.5% de celulosa microcristalina, 5% de fosfato de calcio, 3% de sílice coloidal anhidra y 1.5% de estearato de magnesio. Este producto de alcachofa es un polvo fino de color marrón claro con tonalidades verdes e higroscópico, cuya concentración de polifenoles es aproximadamente de 100 g ácido gálico/kg. Los extractos obtenidos mediante tecnologías sostenibles en esta investigación tienen concentraciones de polifenoles elevadas, como el extracto enzimático con 77.92 g ácido gálico/kg y el extracto purificado con resina PAD950 con un 169.95 g ácido gálico/kg de polifenoles totales de los cuales 89.71 g/kg es ácido clorogénico.

Resultados y discusión

Otro producto en polvo de alcachofa que ha desarrollado la empresa Euromed es EXTR. CYNARAE SCOL. AQUOS. SICCOM - ARTICHOKE DRY EXTRACT obtenido a partir de la hoja de alcachofa, seca de *Cynara cardunculus* L. (*Syn. C. Scolymus* L.), entera o cortada. El aspecto de este producto es un polvo fino de color marrón y un olor característico a alcachofa cocida cuya concentración de cinarina es alrededor de 25 g/kg. Los extractos obtenidos en esta investigación, además de poseer en el caso del extracto enzimático 12.02 g/kg de cinarina y en el caso de los extractos de alcachofa purificados con resina PAD950 43.15 g/kg de cinarina, valor bastante superior al comercial y, además, elaborado a partir de un residuo agroalimentario.

La empresa AQP ingredients comercializa un producto de alcachofa (FDbt.H.Cs – Ingrediente obtenido de hojas de alcachofera (*Cynara scolymus*)), que es un producto natural sin aditivos ni ingrediente añadidos. Este producto tiene un 0.6 g/kg de cinarina y 15.4 g/kg de ácido clorogénico, valores inferiores a los obtenidos en esta investigación. Con propiedades, por tanto, inferiores a nuestros extractos.

4.3. Revalorización del subproducto de granada

El subproducto con el que se han realizado la investigación han sido cortezas de granada de la variedad *Mollar*, recogido tras la extracción de las semillas de su interior. Este subproducto se ha caracterizado mediante determinación de compuestos de interés, nutricional y análisis microbiológico y toxicológico.

Tabla 21. Caracterización del subproducto de granada variedad *Mollar*. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de los análisis realizados por triplicado.

Determinación de compuestos de interés (g/kg)	
Punicalagina	28.78 \pm 0.04
Ácido elágico	7.19 \pm 0.02
Determinación del análisis nutricional (g/100g)	
Azúcares totales	12.0 \pm 0.2
Fibra Alimentaria	12.4 \pm 0.1
Humedad	65.3 \pm 0.7
Proteínas	1.5 \pm 0.0
Determinación toxicológica (mg/kg)	
Plaguicidas	Presencia
Determinación microbiológica	
Microbiología	Ausencia patógenos

La caracterización completa del subproducto de granada se encuentra en el *apartado Anexo III Caracterización detallada de productos*. En el *Anexo I Ficha de los compuestos bioactivos* aparecen especificaciones de los compuestos de interés. Las incertidumbres de los ensayos nutricionales han sido calculadas de acuerdo con la guía "ILAC Guidelines for Measurement Uncertainty in Testing (ILAC-G17:01/2021)".

Este subproducto de granada presenta diferentes compuestos de interés, entre ellos, ácido elágico y punicalagina, además de fibra alimentaria, azúcares y en menor cantidad proteínas. La materia analizada no presenta patógenos, existe presencia de plaguicidas en bajas concentraciones.

4.3.1. Optimización de la extracción de los compuestos de interés del subproducto de granada a escala laboratorio

La optimización de las diferentes técnicas de extracción se ha referido al poder extractivo de cada tratamiento en función de la capacidad de la técnica para recuperar compuestos polifenólicos del subproducto de granada.

Para poner a punto los protocolos de extracción y poner en marcha las diferentes técnicas de extracción, se ha seguido el protocolo descrito en el *apartado 3.2 de Materiales y Métodos*.

A continuación, se detalla la optimización de cada técnica de extracción atendiendo a los parámetros de operación de cada tratamiento a escala laboratorio.

4.3.1.1. Optimización de la extracción acuosa del subproducto de granada

La extracción acuosa se ha optimizado siguiendo los siguientes parámetros de proceso tal y como se describe en el *apartado 3.2.1 de Materiales y Métodos*, evaluando el efecto que producen las siguientes variables.

Resultados y discusión

- **Relación sólido:líquido**
- **Temperatura de extracción**
- **Tiempo de extracción**

Finalizada la extracción con las diferentes condiciones de extracción, se caracterizó la fase acuosa filtrada atendiendo al contenido de polifenoles totales. Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 22. Optimización de las condiciones de la extracción acuosa (EAT) en el subproducto granada. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ratio subproducto: agua (p/v)	Polifenoles totales (g ácido gálico/L)
EAT-1	25	60	1:2	9.045 \pm 0.009
EAT-2	25	60	1:3	9.713 \pm 0.011
EAT-3	25	60	1:4	9.537 \pm 0.06
EAT-4	50	60	1:3	10.179 \pm 0.012
EAT-5	75	60	1:3	10.935 \pm 0.015
EAT-6	98	60	1:3	11.825 \pm 0.019
EAT-7	98	30	1:3	11.121 \pm 0.022
EAT-8	98	90	1:3	11.741 \pm 0.019

Tal y como se refleja en la tabla anterior, la relación sólido:líquido óptima corresponde a una ratio 1:3 p/v. Manteniendo constante esta ratio, es cuando el tratamiento extractivo se realiza a temperatura de ebullición (cerca de los 98 °C) cuando mayor concentración de polifenoles presenta la fase acuosa. En cuanto al tiempo de extracción, aplicando los dos anteriores parámetros óptimos constantes, los mejores resultados correspondieron a un tiempo de 60 minutos.

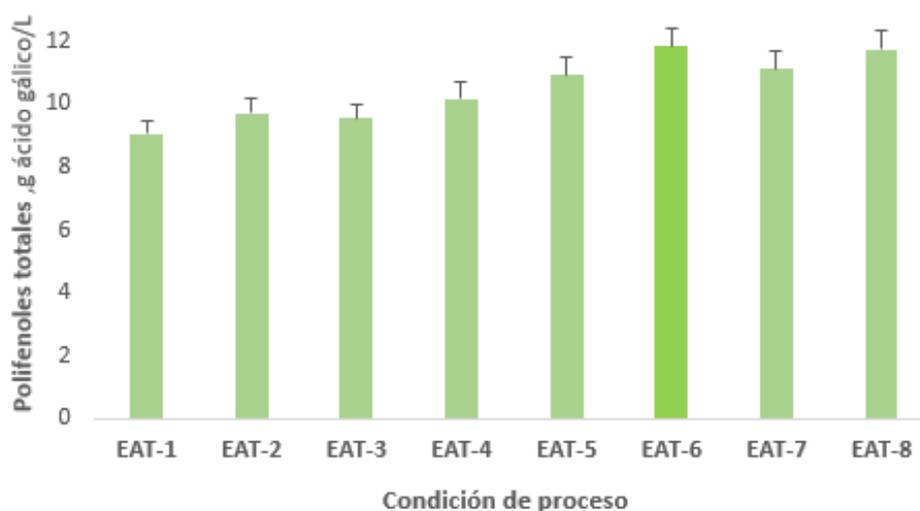


Figura 48. Cantidad de polifenoles totales obtenidos en la optimización de las condiciones de proceso para la extracción acuosa en subproducto de granada. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de tres réplicas independientes.

Puesto que todas las extracciones de este estudio se realizan con agua como disolvente, y la ratio subproducto:agua optimizada es 1:3 p/v, será este valor el que se tomará como referencia para el resto de experimentos, y poder comparar los resultados de las diferentes técnicas extractivas posteriormente. En cuanto al tiempo de extracción, el óptimo resultó ser de 60 minutos en condiciones de presión atmosférica, por ello, en las extracciones enzimática y de ultrasonidos, que se llevan a cabo en las mismas condiciones de presión, se han realizado con el mismo tiempo. Ello nos permitirá después realizar la comparativa apropiada de los resultados obtenidos de las diferentes extracciones.

En las condiciones EAT-4 la temperatura de trabajo fue de 50 °C, debido a que esta es la temperatura de máxima efectividad de las enzimas y así podremos comparar los resultados con los que se obtengan de la extracción enzimática.

En las condiciones EAT-5 se ha seleccionado 75 °C de temperatura debido a que esta ha sido la temperatura a la que llegaron las mezclas tratadas mediante ultrasonidos.

4.3.1.2. Optimización de la extracción enzimática del subproducto de granada

En la extracción enzimática se usarán algunos de los parámetros optimizados en la extracción acuosa debido a que se usa el mismo disolvente (agua) y las mismas condiciones de presión. Así pues, los siguientes parámetros se mantuvieron constantes.

- Relación sólido:líquido: **1:3 p/v**
- Tiempo de extracción: **60 minutos**

La temperatura y el pH para alcanzar la máxima efectividad de las enzimas recomendado por el proveedor son:

- Temperatura: **50 °C**
- pH: **3.5 – 5.0**

La extracción enzimática se ha optimizado evaluando el efecto que ejercen el tipo y concentración de enzima siguiendo el protocolo que se describe en el apartado 3.2.2 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos corresponden pues a diferentes experimentos en los que se varía:

- **Tipo de enzima**
- **Concentración de enzima**

Finalizados los experimentos de extracción empleando las diferentes condiciones, se caracterizó la fase acuosa filtrada atendiendo al contenido de polifenoles totales. En la siguiente tabla se resumen los resultados más relevantes.

Tabla 23. Optimización de condiciones de la extracción enzimática (EE) en subproducto granada. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de tres réplicas independientes.

Condición	pH	Enzima celulasa	Concentración de enzima (%)	Polifenoles totales (g ácido gálico/L)
EE-1	4,3	Naturzyme	0,01	10.395 \pm 0.020
EE-2	4,3	Naturzyme	0,015	10.180 \pm 0.019

Resultados y discusión

EE-3	4,3	Naturzyme	0,02	9.926 ± 0.015
EE-4	4,3	Validase TRL	0,001	10.277 ± 0.015
EE-5	4,3	Validase TRL	0,005	10.353 ± 0.044
EE-6	4,3	Validase TRL	0,01	10.658 ± 0.036

Con estos experimentos se ha comprobado que añadir enzima mejora el rendimiento de extracción de polifenoles, ya que manteniendo los parámetros de tiempo y ratio constantes, la experiencia EAT-4, realizada a la temperatura de mayor efectividad de ambas enzimas, se obtuvo una concentración de polifenoles totales en la fase acuosa de 10.179 g ácido gálico/L, mientras que en la experiencia EE-6 se ha obtenido mayor concentración de estos compuestos polifenólicos.

La concentración de enzima óptima corresponde a las condiciones EE-6, esto es, cuando se utiliza la enzima celulasa Validase TRL en una concentración de 0.01% de enzima respecto al peso del subproducto seco, manteniendo constantes una ratio 1:3 p/v, una temperatura de 50 °C y un tiempo de extracción de 60 minutos.

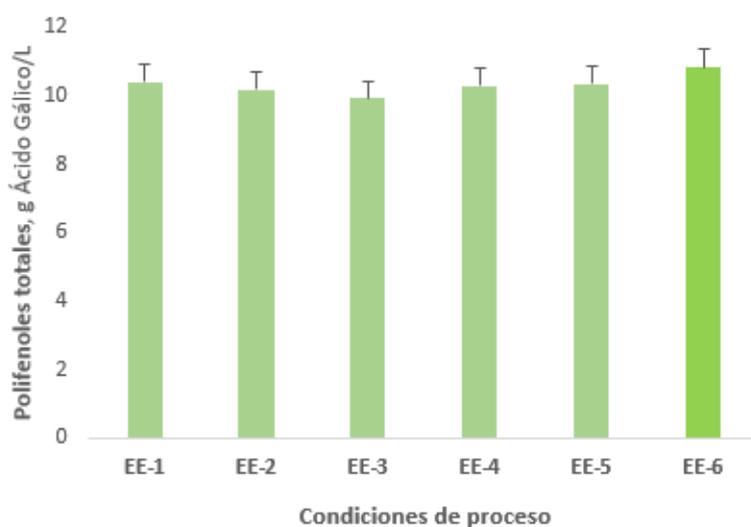


Figura 49. Cantidad de polifenoles totales obtenidos en la optimización de las condiciones de proceso para la extracción enzimática en subproducto de granada. Los datos muestran la media ± desviación estándar de tres réplicas independientes.

4.3.1.3. Optimización de la extracción asistida por ultrasonidos del subproducto de granada

En la extracción asistida por ultrasonidos también se mantuvieron fijos algunos de los parámetros optimizados en la extracción acuosa, ya que se usa el mismo disolvente (agua). El extractor utilizado ha sido un equipo de ultrasonidos UIP500hDT (Hielscher).

- Relación sólido:líquido: **1:3 p/v**
- Tiempo de extracción: **60 minutos**

La extracción asistida por ultrasonidos se ha optimizado siguiendo los siguientes parámetros de proceso tal y como se describe en el apartado 3.2.3 de *Materiales y Métodos*.

- **Potencia de extracción**

Finalizada la extracción empleando diferentes potencias ultrasónicas, se caracterizó la fase acuosa atendiendo al contenido de polifenoles totales, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 24. Optimización de condiciones de la extracción asistida por ultrasonidos (EUS) en subproducto granada.

Condición	Potencia ultrasónica (W)	Polifenoles totales (g ácido gálico/L)
EUS-1	135	11.016 ± 0.029
EUS-2	250	11.259 ± 0.041
EUS-3	320	13.017 ± 0.023

Nuestros experimentos demuestran que la extracción asistida por ultrasonidos mejora el rendimiento del proceso de extracción de polifenoles. Esta afirmación puede inferirse comparando los resultados de la experiencia EAT-5, realizada a 75 °C, la misma temperatura que se alcanza en las experiencias de sonificación, manteniendo los parámetros de tiempo y ratio constantes. En este caso se obtuvo una concentración de polifenoles totales en la fase acuosa de 10.935 g ácido gálico/L., mientras que todas la extracciones ultrasónicas conducen a extractos con mayor concentración de estos compuestos polifenólicos.

Como se ha mencionado, la temperatura en todas las experiencias de extracción ultrasónica, debido al choque de ondas sonoras en la mezcla, alcanzó unos 75 °C de temperatura. Los mejores resultados se obtuvieron con las condiciones EUS-3, esto es, una potencia ultrasónica de 320 W, una ratio 1:3 p/v subproducto:agua, y un tiempo de extracción de 60 minutos.

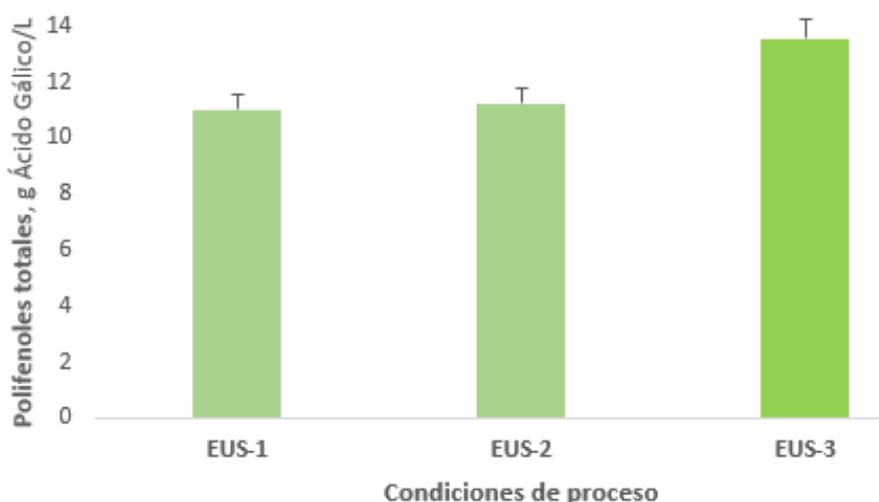


Figura 50. Cantidad de polifenoles totales obtenidos en la optimización de las condiciones de proceso para la extracción asistida por ultrasonidos en el subproducto de granada. Los datos muestran la media ± desviación estándar de tres réplicas independientes.

4.3.1.4. Optimización de la extracción con agua subcrítica del subproducto de granada

Resultados y discusión

Como en apartados anteriores, en la extracción con agua subcrítica se emplearon algunos de los parámetros ya optimizados en la extracción acuosa. El extractor utilizado consistió en un equipo Thermo Scientific Dionex™ ASE™ 350, el cual tiene configurado una presión constante de operación en sus tratamientos extractivos de **150 bares**.

- Relación sólido:líquido: **1:3 p/v**
- Presión de extracción: **150 bares**

Dado que las condiciones de presión cambian con respecto a las demás tecnologías, las condiciones de extracción con agua subcrítica se han optimizado operando sobre los siguientes parámetros de proceso, tal y como se describe en el *apartado 3.2.4 de Materiales y Métodos*.

- **Temperatura de extracción**
- **Tiempo de extracción**

Finalizados los diferentes experimentos de extracción, se caracterizó la fase acuosa atendiendo al contenido de polifenoles totales, tal y como se resume en la siguiente tabla.

Tabla 25. Optimización de condiciones de la extracción con agua subcrítica (EAS) en subproducto granada. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Polifenoles totales (g ácido gálico/L)
EAS-1	80	5	11.095 \pm 0.032
EAS-2	100	5	11.703 \pm 0.015
EAS-3	120	5	12.923 \pm 0.034
EAS-4	120	1	10.782 \pm 0.011
EAS-5	120	10	12.818 \pm 0.045

Los mejores resultados se obtuvieron al aplicar una temperatura de 120 °C y una presión de 150 bares durante un tiempo de extracción de 5 minutos (EAS-3), ya que condujeron a una mayor concentración de polifenoles en la fase acuosa.

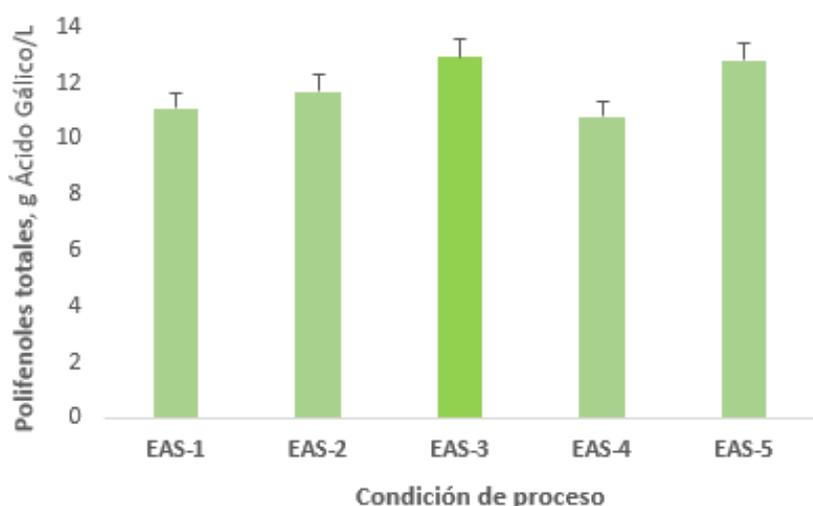


Figura 51. Cantidad de polifenoles totales obtenidos en la optimización de las condiciones de proceso para la extracción con agua subcrítica del subproducto de granada. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

4.3.2. Extracción y caracterización de los extractos de granada obtenidos a escala piloto

En este apartado se detalla la caracterización de extractos finales para la revalorización del subproducto de granada, obtenidos mediante las diferentes técnicas de extracción que se listan a continuación, como se resume en el *apartado 3.3 de Materiales y Métodos*.

- **Extracción acuosa**
- **Extracción mediante tratamiento enzimático**
- **Extracción asistida por ultrasonidos**
- **Extracción con agua subcrítica**

Una vez realizado el pretratamiento al subproducto de granada (lavado y triturado), se somete al tratamiento de extracción. Pasado el tiempo de extracción, se separa la corriente sólida de la acuosa mediante un Decanter. La corriente sólida obtenida se deshidrata a 70 °C durante 2 días en una estufa con control de humedad obteniendo un extracto aprovechable por su gran contenido en fibra alimentaria.

La fase acuosa se deshidrata mediante un proceso de concentración en una bola de vacío, posteriormente la fase acuosa concentrada se congela y se obtiene en polvo mediante un proceso de liofilización.

Una vez obtenida la fase acuosa liofilizada se procede a caracterizarlas atendiendo a:

- **Compuestos orgánicos de interés del producto**
- **Análisis nutricional**
- **Capacidad antimicrobiana y antioxidante**

En la siguiente tabla se detalla la caracterización de dichos extractos procedentes de las diferentes técnicas sostenibles de extracción del subproducto de granada.

Tabla 26. Caracterización extractos sólidos finales obtenidos del subproducto de granada con diferentes técnicas extractivas. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

	Extracción acuosa (EAT)	Extracción enzimática (EE)	Extracción ultrasonidos (EUS)	Extracción agua subcrítica (EAS)
				
Determinación de compuestos de interés (g/kg)				
Polifenoles totales, g ácido gálico/kg	196.24 \pm 1.54	218.33 \pm 1.48	231.67 \pm 1.95	159.56 \pm 0.87
Punicalagína	151.43 \pm 1.02	163.26 \pm 0.83	174.09 \pm 2.12	78.53 \pm 0.53
Ácido elágico	8.58 \pm 0.05	19.53 \pm 0,11	19.07 \pm 0.21	17.44 \pm 0.15
Punicalina	5.56 \pm 0.02	3.86 \pm 0.03	9.57 \pm 0.10	5.05 \pm 0.09
Pedunculagína	1.22 \pm 0.04	1.22 \pm 0.05	7.39 \pm 0.15	1.96 \pm 0.06
Elagitanina	1.13 \pm 0.09	0.89 \pm 0.02	7.62 \pm 0.09	1.20 \pm 0.17
Capacidad antioxidante (g trolox/ kg extracto seco)				
ABTS	584.62 \pm 3.89	684.9 \pm 4.13	724.31 \pm 4.06	615.78 \pm 4.61

Resultados y discusión

Determinación del análisis nutricional (g/100g)				
Azúcares totales	47.8 ± 0.9	45.6 ± 0.9	55.8 ± 1.1	46.0 ± 0.9
Fibra alimentaria	8.3 ± 0.1	16.4 ± 0.2	10.2 ± 0.1	12.2 ± 0.1
Humedad	5.0 ± 0.0	4.4 ± 0.0	3.9 ± 0.0	7.5 ± 0.1
Proteínas	5.2 ± 0.2	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	4.6 ± 0.1
Rendimiento (% respecto el peso de materia prima inicial)				
Rendimiento	5.1 ± 0.3	5.9 ± 0.3	6.4 ± 0.2	4.7 ± 0.5

La caracterización completa de los extractos de granada se encuentra en el *apartado Anexo III Caracterización detallada de productos*. En el *Anexo I Ficha de los compuestos bioactivos* aparecen especificaciones de los compuestos de interés. Las incertidumbres de los ensayos nutricionales han sido calculadas de acuerdo con la guía "ILAC Guidelines for Measurement Uncertainty in Testing (ILAC-G17:01/2021)".

En cuanto a la determinación de compuestos de interés, la tecnología asistida por ultrasonidos es la técnica extractiva con la que se obtiene un mayor contenido en punicalagina (174.09 g/kg) y polifenoles totales (231.67 g ácido gálico/kg extracto seco), siendo el extracto que presenta mayor capacidad antioxidante mediante el método ABTS en comparación con los obtenidos tras las otras técnicas extractivas.

Por otra parte, incrementos elevados de temperatura y presión, como cuando se aplica la técnica de agua subcrítica, provoca la inestabilidad y degradación de compuestos como la punicalagina, por este motivo, el extracto obtenido con agua subcrítica es el que menos concentración en este compuesto presenta. Estos resultados concuerdan con la investigación que realizaron Yan et al, sobre la extracción con agua subcrítica a escala laboratorio de polifenoles en el fruto de granada, ya que constataron una disminución de la concentración de punicalagina cuando se sometía la extracción a altas presiones. (Yan, L. et al, 2017)

En cuanto a la fibra alimentaria, el extracto de mayor concentración se obtiene mediante extracción enzimática (un 16.4 g/100g en fibra alimentaria), mientras que cuando la extracción se lleva a cabo utilizando ultrasonidos, se obtiene un extracto con la concentración en azúcares más alta (55.8 g/100g).

4.3.3. Medida de la capacidad antimicrobiana y antioxidante *in vivo* de los extractos de granada obtenidos

Además, se ha realizado un estudio sobre la capacidad antimicrobiana y antioxidante mediante impedancia eléctrica *in vivo*. Con este fin, se han realizado tres controles, para la extracción acuosa se han utilizado las cepas (1), para las tecnologías de extracción enzimática y ultrasonidos se ha utilizado las cepas (2) y para la extracción con agua subcrítica la cepa (3) debido a que la producción de extractos con las diferentes técnicas extractivas se ha realizado en periodos de tiempo diferentes. Los resultados obtenidos de este estudio se muestran en las siguientes figuras.

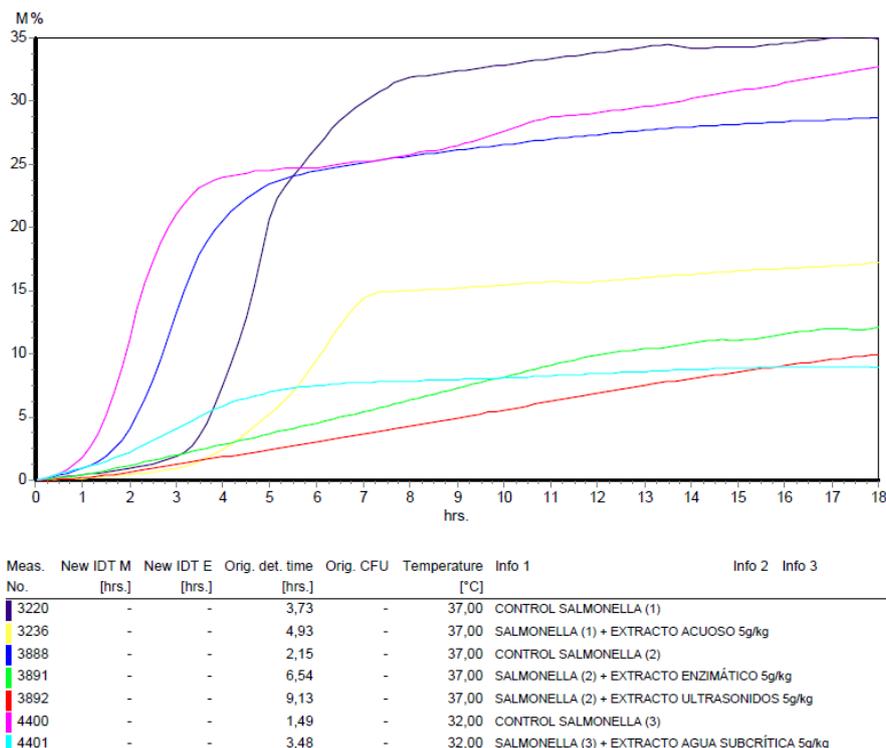


Figura 52. Capacidad antimicrobiana por impedancia eléctrica *in vivo* de extractos de granada obtenidos con las diferentes técnicas de extracción utilizando como cepa *Salmonella*.

Como se desprende del análisis de la gráfica anterior, el tiempo de crecimiento de la cepa *Salmonella* (1) es de 3.73 horas, cuando se añade extracto de granada obtenido mediante extracción acuosa se ralentiza este crecimiento a 4.93 horas. El tiempo de crecimiento de la cepa *Salmonella* (2) es de 2.15 horas, cuando se añade extracto de granada obtenido mediante extracciones enzimática y ultrasónica se ralentiza el crecimiento a 6.54 y 9.13 horas, respectivamente. El tiempo de crecimiento de la cepa *Salmonella* (3) es de 1.49 horas, pero al añadir extracto de granada obtenido mediante extracción con agua subcrítica se ralentiza este crecimiento a 3.48 horas. Por lo que se puede concluir que el extracto de granada obtenido mediante extracción por ultrasonidos es el que presenta una mayor capacidad antimicrobiana frente a *Salmonella*.

Resultados y discusión

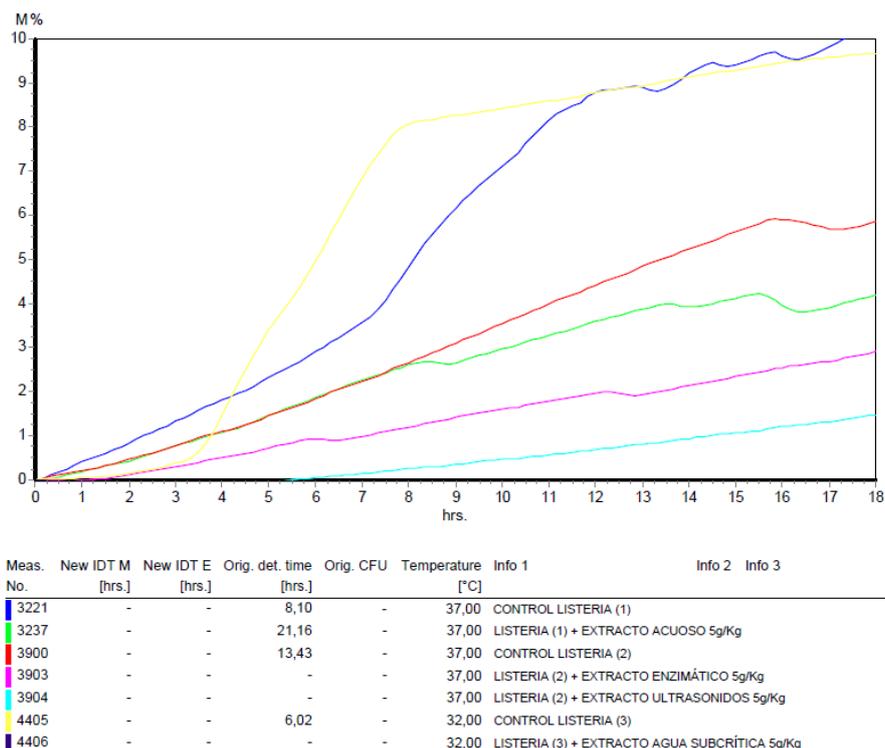


Figura 53. Capacidad antimicrobiana por impedancia eléctrica *in vivo* de los extractos de granada obtenidos con diferentes tecnologías sostenibles utilizando como cepa *Listeria*.

En este caso, el tiempo de crecimiento de la cepa *Listeria* (1) es de 8.10 horas. Sin embargo, cuando se añade extracto de granada obtenido por extracción acuosa se ralentiza a 21.16 horas. Por otra parte, el tiempo de crecimiento de la cepa *Listeria* (2) es de 13.43 horas, y cuando se añade extracto de granada obtenido mediante extracciones enzimática y ultrasónica se inhibe en su totalidad su crecimiento. El tiempo de crecimiento de la cepa *Listeria* (3) es de 6.02 horas, pero se inhibe su crecimiento al añadir extracto de granada obtenido mediante extracción con agua subcrítica. De todos estos resultados se puede concluir que los extractos de granada obtenidos presentan una gran capacidad antimicrobiana frente a *Listeria*.

El poder antimicrobiano de estos extractos se debe a las grandes concentraciones de polifenoles que presentan, en concreto de punicalagina, siendo el extracto obtenido con ultrasonidos el que presenta mayor concentración de esta especie y también decompuestos polifenólicos. Por esta razón, es el que mayor poder antimicrobiano ejerce frente a cepas como *Salmonella* y *Listeria*. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos del estudio de Gosset-Erard et al, en el cual identificaron a la punicalagina como principal compuesto bioactivo responsable de la capacidad antimicrobiana de la granada (*Punica granatum L.*). (Gosset-Erard, C. et al, 2021)

Además, en un estudio de Abdullah et al se investigó el efecto antibacteriano de la granada frente a bacterias Gram positivas (*Listeria*) y Gram negativas (*Salmonella*), demostrando que su actividad sobre las bacterias Gram positivas es mayor que sobre las Gram negativas. Dichos resultados concuerdan también con los obtenidos en nuestra investigación, y puede deberse a que la pared celular de las bacterias Gram negativas (*Salmonella*) contiene lipopolisacáridos, que

quizá impidan que los componentes activos lleguen a la membrana citoplasmática (Abdullah A. H. et al, 2014).

En cuanto a la capacidad antioxidante de los extractos, los resultados se resumen en la figura siguiente.

Cuando se somete a estrés oxidativo con H_2O_2 la cepa de *Saccharomyces* (3) su crecimiento alcanza un valor de 12.23 horas, y si añadimos a estas condiciones extracto de granada obtenido mediante extracción con agua subcrítica el crecimiento es de 8.76 horas.

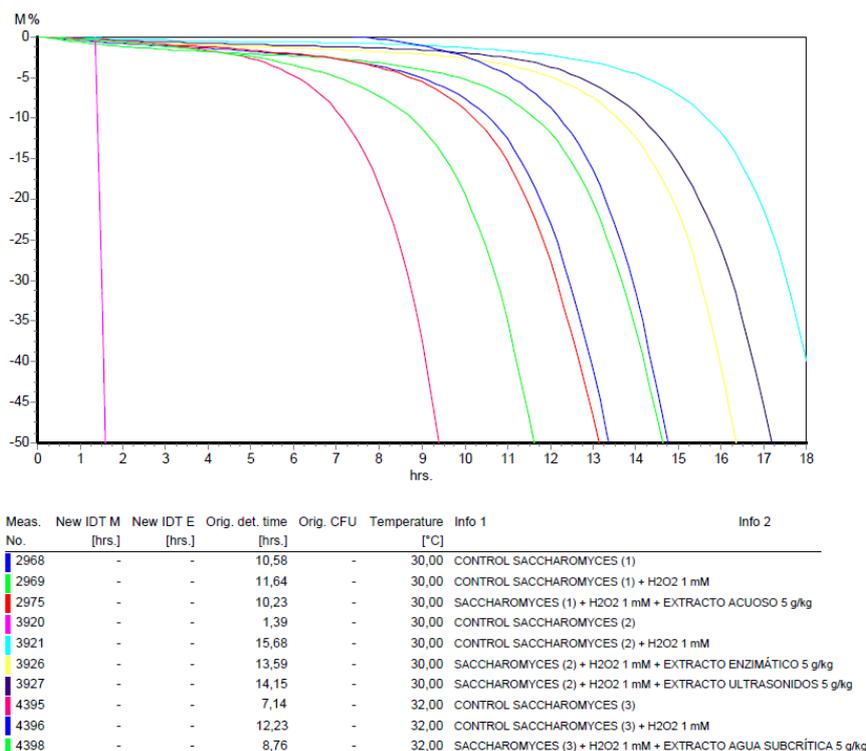


Figura 54. Capacidad antioxidante medida por impedancia eléctrica *in vivo* de extractos de granada obtenidos con diferentes tecnologías sostenibles.

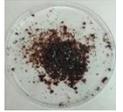
Como sucedía en los estudios de la capacidad antioxidante de los diversos extractos de subproductos alimentarios mostrados en anteriores apartados, los resultados de la capacidad antioxidante mediante la medida colorimétrica ABTS no concuerdan en muchas ocasiones con la medida de la capacidad antioxidante *in vivo* por impedancia eléctrica. Como antes, esto se debe a que, si los extractos poseen una gran capacidad antimicrobiana, como ocurre con los de granada, son un inhibidor de crecimiento de la cepa en cuestión, por lo que, en la medida de la capacidad antioxidante por impedancia eléctrica, el tiempo ralentizado de crecimiento observado no solo se debe a la capacidad antioxidante que ejerce el extracto sobre el H_2O_2 , sino también a la inhibición de la cepa debido a su poder antimicrobiano.

4.3.4. Purificación de compuestos de interés del subproducto de granada

Los diferentes métodos de adsorción-desorción considerados en este estudio se han aplicado a la fase líquida obtenida tras el tratamiento de extracción asistido por ultrasonidos, debido a que es el extracto liofilizado con la mayor concentración de punicalagina y polifenoles totales que se ha obtenido (174.09 g/kg y 231.67 g ácido gálico/kg extracto seco, respectivamente).

Una vez obtenidos los extractos purificados deshidratados mediante el protocolo descrito con diferentes matrices adsorbentes en el apartado 3.4 de *Materiales y Métodos*, se caracterizan atendiendo a sus compuestos bioactivos de interés y a la capacidad antioxidante mediante el método ABTS. Los resultados obtenidos se resumen a continuación.

Tabla 26. Caracterización extractos polifenólicos de subproducto de granada purificado mediante tratamiento de adsorción-desorción con diferentes adsorbatos. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

	Extracción ultrasonidos (EUS)	Resina PAD610	Resina PAD900	Resina PAD950	Carbón activo (CAG)	Zeolita
						
Determinación de compuestos de interés (g/kg)						
Polifenoles totales, g ácido gálico/kg	231.67 \pm 1.95	315.79 \pm 2.28	297.13 \pm 1.57	308.52 \pm 2.45	97.18 \pm 1.01	227.11 \pm 2.33
Punicalagina	174.09 \pm 2.12	223.22 \pm 2.20	199.97 \pm 2.06	220.46 \pm 1.43	64.07 \pm 0.90	215.39 \pm 2.86
Ácido elágico	19.07 \pm 0.21	20.50 \pm 0.44	19.89 \pm 0.31	18.85 \pm 0.16	0.90 \pm 0.08	5.65 \pm 0.12
Capacidad antioxidante (g trolox/ kg extracto seco)						
ABTS	724.31 \pm 4.06	1475.94 \pm 8.98	1463.58 \pm 9.10	1541.13 \pm 9.85	141.3 \pm 2.01	717.48 \pm 4.59
Rendimiento respecto a gramos de extracto final obtenido por litro de extracto acuoso utilizado						
Rendimiento	-	5.4 \pm 0.2	5.6 \pm 0.1	6.2 \pm 0.3	2.3 \pm 0.2	3.6 \pm 0.5

En el *Anexo I Ficha de los compuestos bioactivos* aparecen especificaciones de los compuestos de interés.

El material adsorbente con mejores resultados para la obtención de un extracto rico en punicalagina y polifenoles han sido la resina PAD610 (223.22 g/kg y 315.79 g ácido gálico/kg extracto seco, respectivamente) y la resina PAD950 (220.46 g/kg y 308.52 g ácido gálico/kg extracto seco, respectivamente).

El extracto con mayor capacidad antioxidante (1541.13 g trolox/ kg extracto seco) ha sido el obtenido con la resina PAD950. La Zeolita natural ha mostrado ser un buen adsorbente de punicalagina (215.39 g/kg).

Cuando se utiliza CAG en el proceso de adsorción, se obtienen bajas concentraciones de ácido elágico, punicalagina y polifenoles totales.

Se ha realizado un estudio para ver los rendimientos de adsorción-desorción del proceso en cuanto a compuestos polifenólicos, los resultados se muestran en el siguiente diagrama.

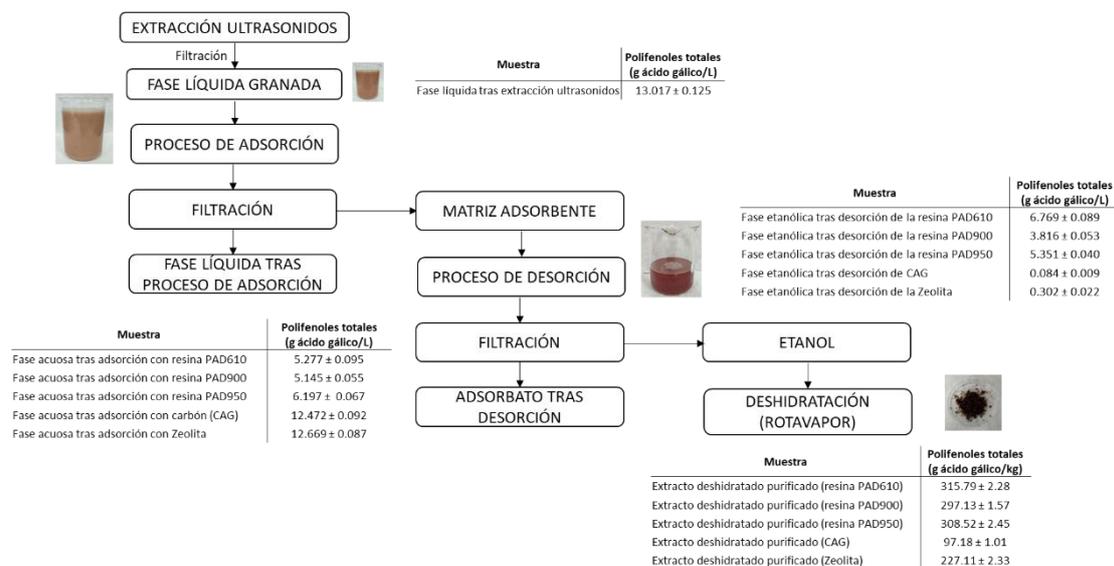


Figura 55. Diagrama purificación mediante procesos de adsorción-desorción de compuestos de interés de subproducto de granada.

La fase líquida tras ser tratada con los diferentes adsorbatos fue analizada mediante el método Folin Ciocalteu para comprobar la concentración y capacidad de retención de polifenoles en los diferentes adsorbatos. Además, también se realizó una cuantificación de la desorción de los polifenoles retenidos con etanol analizando los polifenoles totales de la fase etanólica, los resultados se muestran en la siguiente figura.

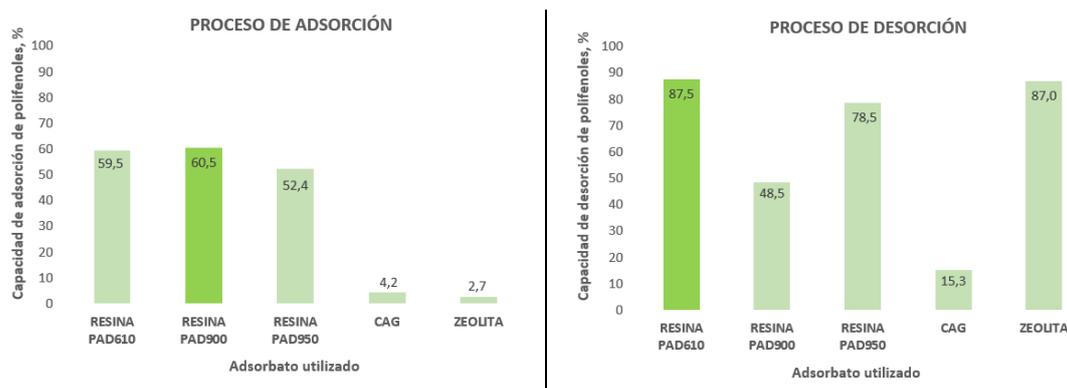


Figura 56. Capacidad de adsorción-desorción de polifenoles de granada de los diferentes adsorbatos

Tras realizar el estudio de adsorción-desorción en las diferentes matrices adsorbentes se concluye que la resina PAD900 es el adsorbato con mayor capacidad de retención de polifenoles, reteniendo el 60.5% de los polifenoles iniciales, mientras que el adsorbato que menos capacidad de adsorción de estos compuestos es la zeolita natural, reteniendo solamente el 2.7%.

Resultados y discusión

Por otro lado, el adsorbato con mayor facilidad de desorción de los polifenoles retenidos es la resina PAD610, recuperando el 87.5%, seguida de la zeolita natural con un 87.0% de los polifenoles que habían quedado adsorbidos en los adsorbatos.

El adsorbato que mayor dificultad de desorción ha mostrado es el carbón activo granular (CAG), recuperando un 15.3% de los polifenoles que habían quedado en este adsorbato. La menor capacidad de adsorción de la resina PAD950 con respecto a la resina PAD900 se debe al diámetro de poro de cada resina, el diámetro de poro de la resina PAD950 es 120 Å, bastante menor que en la resina PAD900, cuyo diámetro de poro es 220 Å. (Buran T. J. et al, 2014)

Debido a que el extracto obtenido con la Resina PAD950 es el extracto con mayor capacidad antioxidante y mayor viabilidad económica presenta para recuperar compuestos de interés como la punicalagina y polifenoles totales, se realizó una caracterización completa de sus compuestos de interés, los resultados obtenidos se resumen a continuación.

Tabla 27. Caracterización completa extracto de granada purificado con resina PAD950 y comparativa con extracto ultrasonidos. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

	Extracción Ultrasonidos (EUS)	Resina PAD950
		
Determinación de compuestos de interés (g/kg)		
Polifenoles totales, g ácido gálico/kg	231.67 \pm 1.95	308.52 \pm 2.45
Punicalagina	174.09 \pm 2.12	220.46 \pm 1.43
Ácido elágico	19.07 \pm 0.21	18.85 \pm 0.16
Punicalina	9.57 \pm 0.10	19.37 \pm 0.21
Pedunculagina	7.39 \pm 0.15	12.12 \pm 0.15
Elagitanina	7.62 \pm 0.09	2.86 \pm 0.08
Capacidad antioxidante (g trolox/ kg extracto seco)		
ABTS	724.31 \pm 4.06	1541.13 \pm 9.85

En el *Anexo I Ficha de los compuestos bioactivos* aparecen especificaciones de los compuestos de interés.

Con el fin de evaluar la calidad de los extractos de granada obtenidos en nuestros estudios, se ha realizado una búsqueda bibliográfica y de proveedores que comercializan ingredientes naturales y extractos obtenidos a partir de materiales vegetales. La empresa Euromed comercializa un extracto de granada en polvo (EXTR. PUNICAE GRANATI SICCU M POMANOX® P20) obtenido a partir de partes de la fruta de granada *Punica granatum L.*, en la composición de este producto encontramos aproximadamente un 20% de maltodextrina. Este producto es un polvo fino de color marrón amarillento, cuya concentración en punicalagina es de aproximadamente 200 g/kg. El extracto de granada que hemos obtenido por tratamiento por ultrasonidos tiene 174.09 g/kg de punicalagina, y el extracto purificado con resina PAD950 un 220.46 g/kg.

La empresa AQP ingredients comercializa un producto de granada (FDbt.F.Pg – Ingrediente obtenido de granada entera ecológica (*Punica granatum*)), es un producto natural sin aditivos ni ingredientes añadidos, con alto contenido en compuestos fenólicos estables durante largo

tiempo. Este producto tiene un 6.9 g ácido gálico/kg de compuestos polifenólicos, valor muy inferior a los obtenidos como fruto de nuestra investigación.

5. Conclusiones

Las conclusiones alcanzadas en esta tesis son:

1. La técnica de extracción con agua en condiciones subcríticas de compuestos polifenólicos de los subproductos de limón, ha sido la que aporta extractos con mayor concentración y capacidad antimicrobiana de entre las aquí estudiadas. Sin embargo, debido a los caudales de producción necesarios, y a los elevados costes de adquisición del equipo, esta tecnología no está suficientemente desarrollada para su implantación industrial. Resultados como los obtenidos en esta tesis promueven que las empresas del sector, sigan trabajando en el desarrollo de esta novedosa tecnología de extracción para su implantación industrial.
2. La extracción enzimática con celulasa, seguida de un proceso de adsorción con resinas poliméricas, ha resultado ser el proceso que alcanza mayores rendimientos de extracción para la obtención de compuestos polifenólicos a partir de los subproductos industriales de limón y de alcachofa, con unas concentraciones superiores comparados con los extractos comerciales y con probada actividad antioxidante. Además, esta técnica es escalable industrialmente, ya que se basa en tecnologías maduras en el tejido empresarial.
3. Mediante la técnica de extracción asistida por ultrasonidos, seguida de un proceso de purificación por adsorción con resinas poliméricas, se ha conseguido un extracto con una concentración en polifenoles de granada superior a los que se comercializan en la actualidad y con probada capacidad antioxidante. Cabe resaltar que se trata de una tecnología muy económica y que se utiliza a nivel industrial en numerosos procesos alimentarios con altos caudales de producción.
4. Las técnicas de extracción aquí optimizadas y desarrolladas para la obtención y purificación de compuestos polifenólicos provenientes de los subproductos industriales de limón, alcachofa y granada, son escalables a nivel industrial desde un punto de vista tecnológico, ya que el equipamiento utilizado a nivel de planta piloto se usa en la industria para otras aplicaciones, distintas de las desarrolladas en esta tesis.
5. La cantidad de residuos que generan las industrias procesadoras de limón, alcachofa y granada, y su contenido en compuestos de interés para la salud humana, hacen viable su potencial revalorización mediante técnicas de extracción sostenibles sin el uso de disolventes orgánicos, demostrando el beneficio medioambiental que supone dar un valor añadido a los residuos y buscar fuentes naturales de ingredientes saludables.

6. Bibliografía

- Abbas, M.; Saeed, F.; Anjum, F. M.; Afzaal, M.; Tufail, T.; Bashir, M. S.; Ishtiaq, A.; Hussain, S.; Suleria, H. A. R. Natural polyphenols: An overview. *Int. J. Food Prop.* **2017.** 20, 1689-1699.
- Abu-Reidah, I. M.; Arraez-Roman, D.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chem.* **2013.** 141, 2269–2277.
- Aceituno, L. R.; García-Sarrió, M. J.; Alonso-Rodríguez, B.; Ramos, L.; Sanz, M. L. Extraction of bioactive carbohydrates from artichoke (*Cynara scolymus* L.) external bracts using microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction. *Food Chem.* **2016.** 196, 1156–1162.
- Adetunji, L. R.; Adekunle, A.; Orsat, V.; Raghavan, V. Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: a review. *Food Hydrocoll.* **2017.** 62, 239–250.
- Ailimpo (Asociación Interprofesional de Limón y Pomelo), Informe **2020.**
- Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D. y Sestili, P. Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. *Food Chem.* **2014.** 174, 417-425.
- Ali, M.; El-Aty, A.; Badawy, M.; Ali, R. Removal of pharmaceutical pollutants from synthetic wastewater using chemically modified biomass of green alga *Scenedesmus obliquus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018.** 151, 144-152.
- Almowallad, S.; Huwait, E.; Al-Massabi, R.; Saddeek, S.; Gauthaman, K.; Prola, A. Punicalagin Regulates Key Processes Associated with Atherosclerosis in THP-1 Cellular Model. *Pharmaceuticals.* **2020.** 13, 372.
- Andrade, M. A., Lima, V., Sanches-Silva, A., Vilarinho, F., Castilho, M. C., Khwaldia, K., Ramos, F. Pomegranate and grape by-products and their active compounds: Are they a valuable source for food applications?. *Trends Food Sci Technol.* **2019.** 86, 68-84.
- Arapitsas, P.; Turner, C. Pressurized solvent extraction and monolithic column-HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage. *Talanta.* **2008.** 74, 5, 1218-1223.
- Ayuso, L. M.; Gómez, A.; Morales, A. B. Subproductos del sector agroalimentario. Fuente de compuestos bioactivos para la salud. *Revista Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación.* **2014.**
- Bajić, A.; Pezo, L. L.; Stupar, A.; Filipčev, B.; Cvetković, B. R.; Horecki, A. T.; Mastilović, J. Application of lyophilized plum pomace as a functional ingredient in a plum spread: Optimizing texture, colour and phenol antioxidants by ANN modelling. *LWT.* **2020.** 130, 109588.
- Barreca, D.; Bellocco, E.; Caristi, C.; Leuzzi, U.; Gattuso, G. Flavonoid Composition and Antioxidant Activity of Juices from Chinotto (*Citrus × myrtifolia* Raf.) Fruits at Different Ripening Stages. *J. Agric. Food Chem.* **2010.** 58, 3031-3036.
- Bellesia, A.; Verzelloni, E.; Tagliazucchi, D. Pomegranate ellagitannins inhibit α -glucosidase activity in vitro and reduce starch digestibility under simulated gastro-intestinal conditions. *Int J Food Sci Nutr.* **2015.** 66, 85-92.

Bibliografía

- Bialonska D., P. Ramnani, S. G. Kasimsetty. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *Int. J. Food Microbiol.* **2010.** 140, 175-182.
- Buran, T. J.; Sandhu, A. K.; Li, Z.; Rock, C. R.; Yang, W. W.; Gu, L. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins. *J. Food. Eng.* **2014.** 128, 167-173.
- Cao, Y.; Chen, J.; Ren, G.; Zhang, Y.; Tan, X.; Yang, L. Punicalagin Prevents Inflammation in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages by Inhibiting FoxO3a/Autophagy Signaling Pathway. *Nutrients.* **2019.** 11, 2794.
- Carvalho, J. d. S.; Ramadan, D.; de Paiva Goncalves, V.; Maquera-Huacho, P. M.; Assis, R. P.; Lima, T. F. O.; Brunetti, I. L.; Spolidorio, D. M. P.; Cesar, T.; Manthey, J. A.; Spolidorio, L. C. Impact of citrus flavonoid supplementation on inflammation in lipopolysaccharide-induced periodontal disease in mice. *Food Funct.* **2021.** 12, 5007-5017.
- Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. de L.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vida, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **2009.** 113, 859—871.
- Cifuentes-Cabezas, M.; Sanchez-Arévalo, C. M.; Mendoza-Roca, J. A.; Vincent-Vela, M. C.; Álvarez-Blanco, S. Recovery of phenolic compounds from olive oil washing wastewater by adsorption/desorption process. *Sep. Purif. Technol.* **2022.** 298, 121562.
- do Carmo, S. N.; Merib, J.; Dias, A. N.; Stolberg, J.; Budziak, D.; Carasek, E. A low-cost biosorbent-based coating for the highly sensitive determination of organochlorine pesticides by solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *J. Chromatogr. A.* **2017.** 1525, 23-31.
- Dong-Shin, K.; Sang-Bin, L. Kinetic study of subcritical water extraction of flavonoids from citrus unshiu peel. *Sep. Purif. Technol.* **2020.** 250, 117259.
- Durazzo, A.; Caiazzo, E.; Lucarini, M.; Cicala, C.; Izzo, A.A.; Novellino, E.; Santini, A. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phyther. Res.* **2019.** 33, 2221—2243.
- Dzah, C. S.; Duan, Y.; Zhang, H.; Wen, CH.; Zhang, J.; Chen, G.; Ma, H. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Biosci.* **2020.** 35, 100547.
- El-Mesallamy, A. M. D.; Abdel-Hamid, N.; Srour, L.; Hussein, S. A. M. Identification of polyphenolic compounds and hepatoprotective activity of artichoke (*Cynara scolymus L.*) edible part extracts in rats. *Egypt. J. Chem.* **2020.** 63, 2273—2285.
- El-Shamy, S.; Farag, M. Novel trends in extraction and optimization methods of bioactives recovery from pomegranate fruit biowastes: Valorization purposes for industrial applications. *Food Chem.* **2021.** 365, 130465.
- European Commission. Circular economy action plan. **2023.**
(https://environment.ec.europa.eu/strategy/circular-economy-action-plan_en)

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), **2020**.
- Fernandes de Araújo, F.; De Paulo Farias, D.; Neri-Numa, I. A.; Pastore, G. M. Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chem.* **2021**. 338, 127535.
- Fernández-López, J.; Fernández-Ginés, J. M.; Aleson-Carbonell, L.; Sendra, E.; Sayas-Barberá, E.; Pérez-Alvarez, J. A. Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**. 15, 3–4, 176-185.
- Finegold S. M, Summanen, P. H., Corbett, K. Pomegranate extract exhibits in vitro activity against *Clostridium difficile*. *Nutrition.* **2014**. 10, 1210-1212.
- Fратиани, F.; Marina, T.; De Palma, M.; Rosa, P.; Filomena, N. Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Food Chem.* **2007**. 104, 1282-1286.
- Functional Ingredients Market Size & Share. Functional Ingredients Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Probiotics, Rice Protein), By Application (Food & Beverages, Pharmaceuticals), By Region, And Segment Forecasts, 2023 – 2030. **2023**.
- Gandhi, G. R.; Vasconcelos, A. B. S.; Wu, D. T.; Li, H. B.; Antony, P. J.; Li, H.; Geng, F.; Gurgel, R. Q.; Narain, N.; Gan, R. Y. Citrus flavonoids as promising phytochemicals targeting diabetes and related complications: a systematic review of in vitro and in vivo studies. *Nutrients.* **2020**. 12, 2907.
- Garambone, E.; Rosa, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. In *Alimentos e Nutrição Araraquara*. **2007**. 229–235.
- Gligor. O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crişan, G., Ferreira, I.C.F.R. Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. *Trends Food Sci Technol.* **2019**. 88, 302-315.
- Gómez-Caravaca, A. M.; Verardo, V., Toselli, M.; Segura-Carretero, A. Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC-DAD-ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2013**. 61, 5328-5337.
- Gupta, A.; Kumar, R.; Ganguly, R.; Singh, A. K.; Rana, H. K.; Pandey, A. K. Antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective activities of *Terminalia bellirica* and its bioactive component ellagic acid against diclofenac induced oxidative stress and hepatotoxicity. *Toxicol. Rep.* **2021**. 8, 44–52.
- Harasym, J., Oledzki, R. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutrition.* **2014**. 30, 511-517.
- He, L.; Zhang, X.; Xu, H.; Xu, C.; Yuan, F.; Knez, Ž. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS⁺ assay. *FBP.* **2012**. 90, 215–223.
- Heber, D. Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Lett.* **2008**. 269, 262-268.

Bibliografia

- Herrero, M.; Plaza, M.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E. Extraction Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Food: In Comprehensive Sampling and Sample Preparation. *Food And Beverage*. **2012**. 4, 159-180.
- Horowitz, R.M.; Gentili, B. Flavonoids of citrus—VI: The structure of neohesperidose. *Tetrahedron Lett*. **1963**. 19, 5, 773-782.
- Hynes, M. J.; O'coinceanainn, W. The kinetics and mechanisms of reactions of iron (III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *J. Inorg. Biochem*. **2004**. 98, 1457-1464.
- Ignat, I., Volf, V. I. Popa. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem*. **2011**. 126, 1821-1835.
- Kamiloglu, S.; Tomas, M.; Capanoglu, E. *Dietary Flavonols and O-Glycosides*. **2020**. ISBN 9789811317453.
- Khandare, R. D., Tomke, P. D., Rathod, V. K. Kinetic modeling and process intensification of ultrasound-assisted extraction of d-limonene using citrus industry waste. *Chem. Eng. Process*. **2020**. 159, 108181.
- Kharchoufi, S.; Licciardello, F.; Siracusa, L.; Muratore, G.; Hamdi, M.; Restuccia, C. Antimicrobial and antioxidant features of 'Gabsi' pomegranate peel extracts. *Ind. Crops Prod*. **2018**. 111, 345-352.
- Kikuchi, H.; Harata, K.; Madhyastha, H.; Kuribayashi, F. Ellagic acid and its fermentative derivative urolithin A show reverse effects on the gp91-phox gene expression, resulting in opposite alterations in all-trans retinoic acid-induced superoxide generating activity of U937 cells. *Biochem. Biophys. Rep*. **2021**. 25, 100891.
- Kim, D. S.; Lim, S. B. Kinetic study of subcritical water extraction of flavonoids from citrus unshiu peel. *Sep. Purif. Technol*. **2020**. 250, 117259.
- Kong, J.; Wang, J.; Gong, X.; Zheng, X.; Chen, T. Punicalagin Inhibits Tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Apoptosis and Extracellular Matrix Degradation in Chondrocytes by Activating Autophagy and Ameliorates Murine Osteoarthritis. *Drug Des. Devel. Ther*. **2020**. 14, 5521-5533.
- Koolaji, N.; Shammugasamy, B.; Schindeler, A.; Dong, Q.; Dehghani, F.; Valtchev, P. Citrus peel flavonoids as potential cancer prevention agents. *Curr. Dev. Nutr*. **2020**. 4, 5, nzaa025.
- Kozłowska, A.; Dzierzanowski, P. Targeting information by Anthocyanins as the Novel Therapeutic Potential for Chronic Diseases: An Update. *Molecules*. **2021**. 26, 4380.
- Kumar, E. K.; Ajay, A.; Vardhini, K. H.; Vemu, R.; Padmanabham, A. A. Residual Edge Attention in U-Net for Brain Tumour Segmentation. *Int. J. Recent. Innov. Trends Comput. Commun*. **2023**. 11, 324–340.
- Kumar, N.; Goel, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising; therapeutic applications. *Biotechnol. Reports*. **2019**. 24, e00370.

- Lachos-Perez, D.; Andressa, M. B.; Mayanga-Torres P. C.; Maróstica M. R.; Rostagno, M. A.; Martínez J.; Forster-Carneiro, T. Subcritical water extraction of flavanones from defatted orange peel. *J. Supercrit. Fluids*. **2018**. 138, 7-16.
- Lattanzio, V.; Kroon, P. A.; Linsalata, V.; Cardinali, A. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *J. Funct. Foods*. **2009**. 1, 131–144.
- Liu, Y.; Benohoud, M.; Yamdeu, J. H.; Gong, Y. Y.; Orfila, C. Green extraction of polyphenols from citrus peel by-products and their antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Food Chem*. **2021**. 12, 100144.
- Lou, Z.; Wang, H.; Zhu, S.; Ma, C.; Wang, Z. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *J. Food Sci*. **2011**. 76, 6, 8-10.
- Lu, S.Y.; Chu, Y. L.; Sridhar, K.; Tsai, P. J. Effect of ultrasound, high-pressure processing, and enzymatic hydrolysis on carbohydrate hydrolyzing enzymes and antioxidant activity of lemon (*Citrus limon*) flavedo. *LWT*. **2020**. 110511.
- Lykkesfeldt, J. On the effect of vitamin C intake on human health_ How to (mis)interpret the clinical evidence. *Redox Biol*. **2020**. 101532.
- Marín, F. R.; Soler-Rivas, C.; Benavente-García, O.; Castillo, J.; Pérez-Alvarez, J. A. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chem*. **2007**. 100, 2, 736-741.
- Mariño-Cortegoso, S.; Stanzione, M.; Andrade, M. A.; Restuccia, C.; Rodríguez-Bernaldo, A.; Buonocore, G. G.; Barbosa, C. H.; Vilarinho, F.; Silva, A. S.; Ramos, F.; Khwaldia, K.; Sendón, R.; Barbosa-Pereira, L. Development of active films utilizing antioxidant compounds obtained from tomato and lemon by-products for use in food packaging. *Food Control*. **2022**. 140, 109128.
- Mármol, I.; Quero, J.; Jiménez-Moreno, N.; Rodríguez-Yoldi, M. J.; Ancín-Azpilicueta, C. A. Systematic review of the potential uses of pine bark in food industry and health care. *Trends Food Sci. Technol*. **2019**. 88, 558–566.
- Marsoul, M.; Ijjaali, I.; Oumous, B.; Bennani, A.; Boukir, A. Determination of polyphenol contents in *Papaver rhoeas* L. flowers extracts (Soxhlet, maceration), antioxidant and antibacterial evaluation. *Mater. Today: Proc*. **2020**. 31, 1, S183-S189.
- Martino, V.; Morales, J.; Martínez-Irujo, J. J.; Font, M.; Momge, A.; Coussio, J. Two ellagitannins from the leaves of *Terminalia triflora* with inhibitory activity on HIV-1 reverse transcriptase. *Phytother. Res*. **2004**. 18, 667-669.
- Mateen, F.; Javed, I.; Rafique, U.; Tabassum, N.; Sarfraz, M.; Safi, S. Z.; Yusoff, I.; Asrhaf, M. New method for the adsorption of organic pollutants using natural zeolite incinerator ash (ZIA) and its application as an environmentally friendly and costeffective adsorbent. *Desalin. Water Treat*. **2016**. 57, 6230-6238.
- Mendoza-Isaza, N. A.; Hoyos-Arbeláez, J. A.; Peláez-Jaramillo, C. A. Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales de extractos de tallo de *Stevia rebaudiana* en varios modelos in vitro. *EIA*. **2020**. 17.

Bibliografia

- Misra, S.; Pandey, P.; Mishra H. N. Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**. 109, 340-351.
- Motilva, M. J.; Serra, A.; Macia, A. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *J. Chromatogr. A.* **2013**. 1292, 66-82.
- Murray J. C.; Burch J. A.; Streilein, R. D.; Lannacchione, M. A.; Hall, R. P.; Pinnel, S. R. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2008**. 59, 418-425.
- Nadar, S. S.; Rao, P.; Rathod, V. K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Res. Int.* **2018**. 108, 309–330.
- Nag, S.; Sit, N. Optimization of ultrasound assisted enzymatic extraction of polyphenols from pomegranate peels based on phytochemical content and antioxidant property. *J. Food Meas. Charact.* **2018**. 12, 1734–1743.
- Olas, B. A review of in vitro studies of the anti-platelet potential of citrus fruit flavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **2021**. 150, 112090.
- Orlovskaya, T.V.; Luneva, I.L.; Chelombit'Ko, V.A. Chemical composition of *Cynara scolymus* leaves. *Chem. Nat. Compd.* **2007**. 43, 239–240.
- Pandino, G.; Lombardo, S.; Mauromicale, G. Globe artichoke leaves and floral stems as a source of bioactive compounds. *Ind. Crop. Prod.* **2013**. 44, 44–49.
- Pei-Hsin, S.; Horng-Liang, L. Component analysis and antioxidant activity of Citrus limon. *Acad. J. Med. Plants.* **2013**. 1, 49-58.
- Pereira, J. C.; Paulino, C. L. de A.; Granja, B. da S.; Santana, A. E. G.; Endres, L.; Souza, R. C. Potencial alelopático e identificação dos metabólitos secundários em extratos de *Canavalia ensiformis* L. *Ceres.* **2018**. 65, 243–252.
- Peterson, J. J.; Beecher, G. R.; Bhagwat, S. A.; Dwyer, J. T.; Gebhardt, S. E.; Haytowitz, D. B.; Holden, J. M. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *J. Food Compos. Anal.* **2006**. 19, S74-S80.
- Portela, J. L.; Soares, D.; Rosa, H.; Roos, D. H.; Pinton, S.; Ávila, D. S.; Puntel, R. L. *Ilex paraguariensis* crude extract acts on protection and reversion from damage induced by t-butyl hydroperoxide in human erythrocytes: A comparative study with isolated caffeic and/or chlorogenic acids. *J. Sci. Food Agric.* **2017**. 97, 2007-2014.
- Rashmi, H. B.; Negi, P. S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Res. Int.* **2020**. 136, 109298.
- Rasouli, H.; Farzaei, M. H.; Khodarahmi, R. Polyphenols and their benefits: A review. *Int. J. Food Prop.* **2017**. 20, 1700-1741.

- Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.* **2007**. 73, 461-467.
- Rejeb, I. B.; Dhen, N.; Gargouri, M.; Boulila, A. Chemical Composition, Antioxidant Potential and Enzymes Inhibitory Properties of Globe Artichoke By-Products. *Chem. Biodivers.* **2020**. 17, e2000073.
- Roleira F. M.; Tavares-da-Silva, E. J., Varela, C.L., Costa, S.C., Silva, T., Garrido, J.; Borges, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *Food Chem.* **2015**. 183, 235-258.
- Sabater, C.; Corzo, N.; Olano, A.; Montilla, A. Enzymatic extraction of pectin from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products using Celluclast® 1.5L. *Carbohydr. Polym.* **2018**. 190, 43–49.
- Saffarzadeh-Matin, S.; Masoudi-Khosrowshahi, F. Simultaneous separation and concentration of polyphenols from pomegranate industrial waste by multistage counter-current system; comparing with ultrafiltration concentration. *Sep. Purif. Technol.* **2018**. 204, 261-275.
- Sahu, O.; Singh, N. The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology. *J. Text. Inst.* **2019**. 568, 13, 367-416.
- Saini A.; Panesar P. S.; Bera M. Comparative study on the extraction and quantification of polyphenols from citrus peels using maceration and ultrasonic technique. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* **2019**. 7, 678–685.
- Sanchez-Rabameda, F.; Jauregui, O.; Lamuela-Raventos, R.M. Identification of phenolic compounds in artichoke waste by highperformance liquid chromatography—Tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2003**. 1008, 57–72.
- Sarangi, P. K.; Vivekanand, V.; Mohanakrishna, G.; Pattnaik, B.; Muddapur, U. M.; Aminabhavi, T. M. Production of bioactive phenolic compounds from agricultural by-products towards bioeconomic perspectives. *J. Clean. Prod.* **2023**. 414, 137460.
- Scorsatto, M.; Pimentel, A. de C.; Silva, A. J. R. da; Sabally, K.; Rosa, G.; Oliveira, G. M. M. de. Assessment of Bioactive Compounds, Physicochemical Composition, and In Vitro Antioxidant Activity of Eggplant Flour. *Int J Cardiovasc Sci.* **2017**. 30, 235–242.
- Sepulveda, L.; Ascacio, A.; Rodriguez-Herrera, R.; Aguilera-Carbo, A.; Aguilar, C. Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**. 10, 4518-4523.
- Shallan, M. A.; Ali, M. A.; Meshrf, W. A.; Marrez, D. A. In vitro antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) bracts and receptacles ethanolic extract. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**. 29, 101774.
- Silva, R. M.; Pereira, L. D.; Vêras, J. H.; do Vale, C. R.; Chen-Chen, L.; da Costa Santos, S. Protective effect and induction of DNA repair by *Myrciaria cauliflora* seed extract and pedunculagin on cyclophosphamide-induced genotoxicity. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2016**. 810, 40-47.

Bibliografía

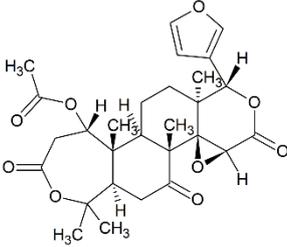
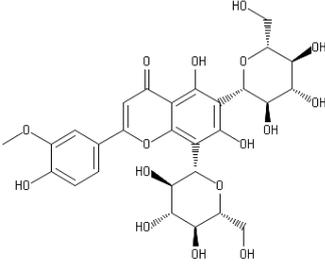
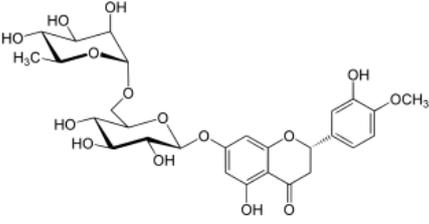
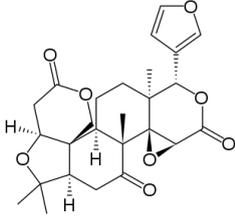
- Singh, A.; Holvoet, S.; Mercenier, A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clin. Exp. Allergy*. **2011**. 41, 1346-1359.
- Singh, Y. D.; Das, D.; Das, S.; Swain, K. D.; Pradhan, S.; Babu, P. J. Pharmacological activities of limonin from Khasi Mandarin as therapeutic applications. *Pharmacol. Res. - Mod. Chin. Med.* **2022**. 5, 100181.
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* **1999**. 299, 152-178.
- Sonnante, G.; Pignone, D.; Hammer, K. The Domestication of Artichoke and Cardoon: From Roman Times to the Genomic Age. *Ann. Bot.* **2007**. 100, 1095–1100.
- Specialty Food Ingredients Market by Ingredient. Global Trends & Forecast to 2020. *Markets and Markets*. **2015**.
- Stumpf, B.; Künne, M.; Ma, L.; Xu, M.; Yan, F.; Piepho, H. P.; Honermeier, B. Optimization of the extraction procedure for the determination of phenolic acids and flavonoids in the leaves of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*L.). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**. 177, 112879.
- Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J. O.; Dommès, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* **2009**. 113, 1226-1233.
- Teucher, B.; Olivares, M.; Cori, H. Enhancers of iron absorption: Ascorbic acid and other organic acids. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2004**. 74, 403-419.
- Trigueros, E.; Alonso-Riaño, P.; Ramos, C.; Diop, C. I. K.; Beltrán, S.; Sanz, M. T. Kinetic study of the semi-continuous extraction/hydrolysis of the protein and polysaccharide fraction of the industrial solid residue from red macroalgae by subcritical water. *J. Environ. Chem. Eng.* **2021**. 9, 6, 106768.
- Tzulker, R.; Glazer, I.; Ilan, I. B.; Holland, D.; Aviram, M.; Amir, R. Antioxidant Activity, Polyphenol Content, and Related Compounds in Different Fruit Juices and Homogenates Prepared from 29 Different Pomegranate Accessions. *J. Agric. Food Chem.* **2007**. 55, 9559-9570.
- Vázquez-Ovando, A.; Ovando-Medina, I.; Adriano-Anaya, L.; Betancur-Ancona, D.; Salvador-Figueroa, M. Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *ALAN*. **2016**. 66, 3, 239-254.
- Vekiari, S. A.; Gordon, M.; García-Macías, P.; Labrinea, H. Extraction and determination of ellagic acid content in chestnut bark and fruit. *Food Chem.* **2008**. 110, 1007-1011.
- Wang G., Z. Lei, Q. Zhong, W. Wu, H. Zhang, T. Min, H. Wu, F. Lai. Enrichment of caffeic acid in peanut sprouts and evaluation of its in vitro effectiveness against oxidative stress-induced erythrocyte hemolysis. *Food Chem.* **2017**. 217, 332-341.
- Wang, Y.; Liu, X. J.; Chen, J.; Cao, P.; Li, X.; Sun, C. D. Citrus flavonoids and their antioxidant evaluation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**. 3833-3854

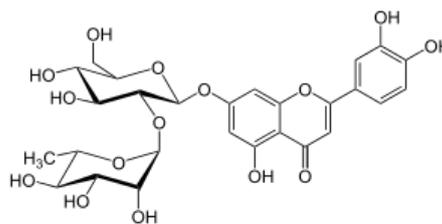
- Wang, Y.; Zhang, H.; Liang, H.; Yuan, Q. Purification, antioxidant activity and protein-precipitating capacity of punicalin from pomegranate husk. *Food Chem.* **2013.** 138, 1, 437-443.
- Wianowska, D.; Typek, R.; Dawidowicz, A. L. Chlorogenic Acid Stability in Pressurized Liquid Extraction Conditions. *J. AOAC Int.* **2015.** 98, 2, 415–421.
- Xiong, L. G.; Chen, Y. J.; Tong, J. W.; Huang, J. A.; Li, J.; Gong, Y. S. Tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits *Escherichia coli* by increasing endogenous oxidative stress. *Food Chem.* **2017.** 217, 196-204.
- Yamada Y., H. Yasui, H. Sakurai. Suppressive effect of caffeic acid and its derivatives on the generation of UVA-induced reactive oxygen species in the skin of hairless mice and pharmacokinetic analysis on organ distribution of caffeic acid in ddY mice. *Photochem. Photobiol.* **2006.** 82, 1668-1676.
- Yan, L.; Cao, Y.; Zheng, G. Optimization of subcritical water extraction of phenolic antioxidants from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel by response surface methodology. *Anal. Methods.* **2017.** 9, 4647–4656.
- Yang, M.; Sun, F.; Zhou, Y.; He, M.; Yao, P.; Peng, Y. Preventive effect of lemon seed flavonoids on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *RSC Adv.* **2020.** 10, 12800-12809.
- Yu, Q.; Fan, L.; Li, J. A novel process for asparagus polyphenols utilization by ultrasound assisted adsorption and desorption using resins. *Ultrason. Sonochem.* **2020.** 63, 104920.
- Zaixiang, L.; Hongxin, W.; Song Z.; Chaoyang, M.; Zhouping, W. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *J. Food Sci.* **2011.** 76, 6, X-VIII.
- Zeb, A. Ellagic acid in suppressing in vivo and in vitro oxidative stresses. *Mol. Cell. Biochem.* **2018.** 448, 27-41.
- Zheng, G.; Yang, X.; Chen, B.; Chao, Y.; Hu, P.; Cai, Y. Identification and determination of chemical constituents of *Citrus reticulata* semen through ultra high performance liquid chromatography combined with Q Exactive Orbitrap tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2020.** 43, 438-451.
- Zheng, M.; Lu, S.; Xing, J. Enhanced antioxidant, anti-inflammatory and α -glucosidase inhibitory activities of citrus hesperidin by acid-catalyzed hydrolysis. *Food Chem.* **2021.** 336, 127539.
- Živković, J.; Šavikin, K.; Janković, T.; Čujić, N.; Menković, N. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.* **2018.** 194, 40-47.

7. Anexo

7.1. Anexo I. Ficha de los compuestos bioactivos

Tabla 1. Ficha de especificaciones de compuestos bioactivos en cuanto a su fórmula, peso y estructura molecular.

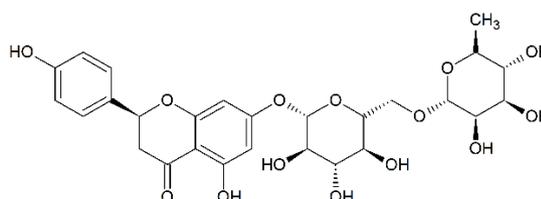
Compuesto	Fórmula	Peso molecular (g/mol)	Estructura molecular
Compuestos de interés de subproducto de limón			
Ácido nomilínico	$C_{28}H_{36}O_{10}$	532	
Crisoeriol 6,8-DI-C-glucósido	$C_{28}H_{32}O_{16}$	624	
Hesperidina	$C_{28}H_{34}O_{15}$	610	
Limonina	$C_{26}H_{30}O_8$	470	
Luteolina-neohesperidosida	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594	



Narirutina

$C_{27}H_{32}O_{14}$

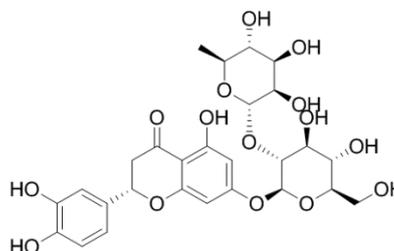
580



Neeriocitrina

$C_{27}H_{32}O_{15}$

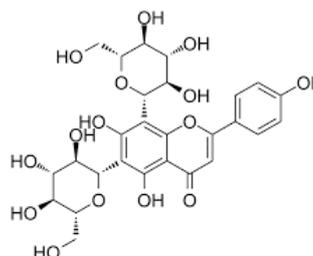
596



Vicenina-2

$C_{27}H_{30}O_{15}$

594

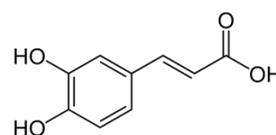


Compuestos de interés de subproductos de alcachofa

Ácido cafeico

$C_9H_8O_4$

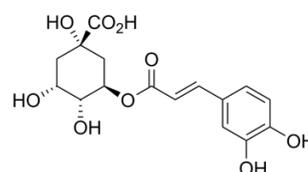
180



Ácido clorogénico

$C_{16}H_{18}O_9$

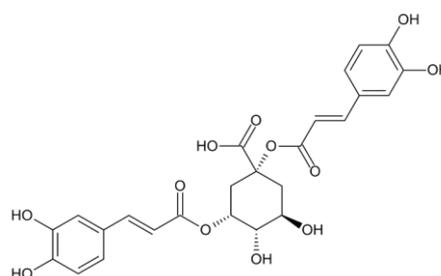
354



Címarina

 $C_{25}H_{24}O_{12}$

516

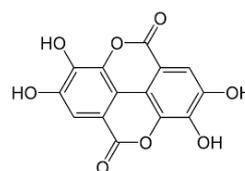


Compuestos de interés de subproductos de granada

Ácido elágico

 $C_{14}H_6O_8$

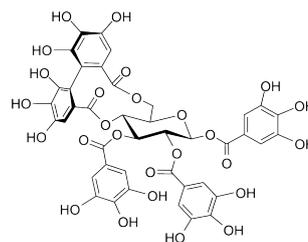
302



Elagitanina

 $C_{36}H_{20}O_{22}$

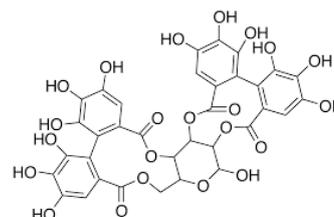
799



Pedunculagina

 $C_{34}H_{24}O_{22}$

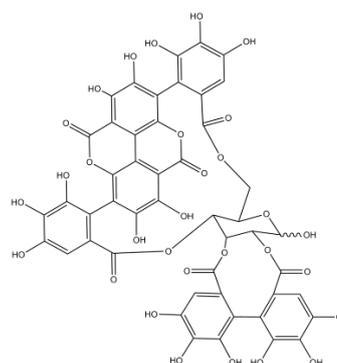
784



Punicalagina

 $C_{48}H_{28}O_{30}$

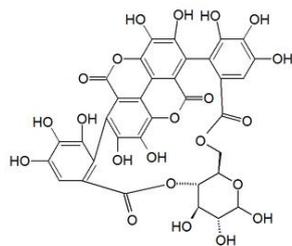
1084



Punicalina

$C_{34}H_{22}O_{22}$

782



7.2. Anexo II. Caracterización de productos: análisis nutricional, análisis toxicológico y análisis microbiológico.

Análisis nutricional

Cuantificación de cenizas totales

La determinación del contenido de cenizas totales se realizó por gravimetría después de la calcinación de la muestra en un horno de mufla. Se incineró la cápsula de porcelana en la mufla a 50 °C durante una hora. Se dejó enfriar en el desecador y seguidamente se pesó. Se pesaron entre 5 y 10 g de muestra en la cápsula. Se colocó la cápsula sobre la placa calefactora dentro de la campana de extracción de humos y se calentó hasta que la mayor parte de los compuestos orgánicos se hubieron quemado, permaneció en la placa encendida hasta que dejó de desprender humo, después se apagó la placa y la cápsula se dejó reposar unos minutos.

Se pasó la cápsula a la mufla caliente, se calcinó hasta que los componentes orgánicos desaparecieron totalmente y quedó un residuo libre de restos negros de carbón. Se puso la cápsula con el residuo en el desecador para que se enfríe y se pesó seguidamente.

El resultado se expresa en % con dos cifras decimales según la ecuación 1 que sigue:

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{P_f - P_c}{P_m} \cdot 100$$

Ecuación 1. Cálculo del contenido en cenizas.

Donde: P_f = peso de la cápsula conteniendo las cenizas; P_c = peso de la cápsula; P_m = peso de la muestra.

Cuantificación de grasa

La cuantificación de grasa se realizó utilizando el método de extracción Soxhlet, para ello, se desecaron los vasos en la estufa a 105 ± 2 °C durante una hora, se dejó enfriar en el desecador y se pesaron.

Posteriormente, se colocó un poco de algodón en el fondo del cartucho (encajado en el adaptador magnético sobre el dedal). Se taró todo el conjunto, se pesaron de 2 a 5 g de muestra (según el contenido en grasa esperado) en el cartucho y se tapó la muestra con algodón.

Con la ayuda de los soportes de dedales y la gradilla niveladora se introdujo cada dedal de extracción provisto del adaptador magnético en una columna de destilación de la unidad de extracción. Se abrió el circuito de refrigeración y se adicionaron 60 mL de éter dietílico por la parte superior de cada columna de extracción. Se puso en marcha la unidad de calefacción. Después de 1 hora de extracción los cartuchos fueron elevados sobre el nivel del disolvente en ebullición de forma que el condensado caiga sobre la muestra produciendo el arrastre de la grasa remanente. Mantener así durante 2 horas.

Se cerró la válvula de recuperación. El condensado quedó retenido por ésta y en unos 5 minutos todo el disolvente fue recuperado. Para favorecer la total eliminación del disolvente de los vasos se agita en el sentido inverso a las agujas del reloj y a la vez introduce aire en la unidad de

calefacción. A continuación, se apagó la calefacción y se elevó la batería de columnas de destilación desbloqueando y accionando la unidad de extracción. Se retiraron los vasos y desecó en la estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$; se dejó enfriar en el desecador y se pesó.

El contenido en grasa bruta de la muestra se calcula de la forma siguiente:

$$\text{Grasa bruta (\%)} = \frac{P_f - P_0}{P_m} \cdot 100$$

Ecuación 2. Cálculo del contenido en grasa.

Donde: P_f = peso final del vaso con la grasa extraída; P_0 = peso inicial del vaso vacío; P_m = peso de la muestra.

Cuantificación de hidratos de carbono

Los hidratos de carbono los constituyen principalmente dos grupos de sustancias:

- Los azúcares simples, monosacáridos y disacáridos: glucosa, sacarosa, fructosa, lactosa.
- Polisacáridos como el almidón.

Se usa el término “hidratos de carbono por diferencia” o “hidratos de carbono totales” para referirnos al valor obtenido restando de 100 la suma de los porcentajes de la grasa, la proteína, las cenizas y la humedad. La cuantificación de hidratos de carbono se realiza mediante cálculo con la siguiente ecuación:

$$\text{Hidratos de carbono (\%)} = 100 - \% \text{Grasa} - \% \text{Proteína} - \% \text{Cenizas} - \% \text{Humedad}$$

Ecuación 3. Cálculo del contenido en hidratos de carbono.

Cuantificación de cloruro sódico

La determinación de sodio en alimentos por Cromatografía Iónica (rango 20 -20000 mg/Kg) usando una fase móvil ácido Nítrico/ Éter 18-corona-6, una columna de separación de cationes de alcohol polivinílico con grupos carboxilo para separar en función del tamaño y carga, y un detector de conductividad.

La muestra a analizar se trituró y homogeneizó previamente. Una vez triturada se llevó a cabo el proceso de extracción. Para la extracción, se pesó una cantidad de muestra triturada y se llevó a un vaso de precipitados con 80 mL de agua desionizada a 80°C durante media hora, en una placa calefactora con agitación.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se llevó a un matraz aforado de 100 ml el cual se enrasó con agua desionizada. En este punto, la muestra debe ser filtrada con un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ para poder proceder a su medida en el cromatógrafo iónico.

Se pesó 10 g de muestra y se enrasó con agua desionizada a un volumen final de 100 ml, obteniendo de este modo una dilución 1:10.

A partir de la solución patrón de concentración definida (aproximadamente 1000 mg/L), se procedió a la elaboración de la curva de calibrado.

El sistema cromatográfico utilizado fue un cromatógrafo iónico Metrohm MIC-2 Advanced, automuestreador con sistema de ultrafiltración in-line – sistema de inyección automático, y detector de conductividad dentro de una caja de aislamiento térmico y electromagnético. Las condiciones de trabajo fueron: Flujo: 0.80 mL/min, temperatura: 25 °C, presión del Sistema: 8.0 – 12.0 MPa y volumen de inyección: 20 µL

El equipo también tuvo en cuenta el factor de dilución a la hora de dar el resultado final y se calcula de la siguiente manera:

$$F_d = \frac{V_f}{V_m}$$

Ecuación 4. Cálculo del factor de dilución.

Donde: F_d = Factor de dilución; V_f = Volumen final en mL; V_m = Volumen de la muestra en mL.

Los resultados se expresan en mg/Kg y para expresarlo como cloruro sódico (sal), se multiplicó el dato del sodio por el factor 2,54.

Cuantificación del valor energético

El valor energético se define como la cantidad de energía que se origina cuando el alimento es totalmente oxidado o metabolizado, este valor se expresa por 100 g de producto y se calculó mediante los siguientes factores de conversión que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Factor de conversión para el cálculo del valor energético.

	Kcal/g	KJ/g
Hidratos de carbono	4	17
Proteínas	4	17
Grasas	9	37

Los cálculos se realizaron de la siguiente forma:

$$\frac{\text{kcal}}{100\text{g}} = \left(\frac{\text{Proteínas}}{100\text{g}} + \frac{\text{Hidratos de carbono}}{100\text{g}} \right) \cdot 4 + \left(\frac{\text{Grasa}}{100\text{g}} \right) \cdot 9$$

$$\frac{\text{kJ}}{100\text{g}} = \left(\frac{\text{Proteínas}}{100\text{g}} + \frac{\text{Hidratos de carbono}}{100\text{g}} \right) \cdot 17 + \left(\frac{\text{Grasa}}{100\text{g}} \right) \cdot 37$$

Ecuación 5. Cálculo de los KJ Y Kcal.

Análisis toxicológico

Determinación de multiresiduos de plaguicidas

Se realiza la determinación de plaguicidas por la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador triple cuadrupolo LC-MS/MS QQQ (Método QuEChERS). El rango de aplicación se establece entre el límite de cuantificación (0.01 mg/Kg).

Para la cuantificación de plaguicidas se preparó dos disoluciones madre de cada uno de los plaguicidas especificados a partir de materias activas certificadas comerciales codificadas por el laboratorio, utilizando como disolvente acetonitrilo.

Se preparó un estándar interno (ISTD), Trifenil fosfato, a partir de su materia activa certificada comercial, codificada también por el laboratorio, utilizando de igual modo acetonitrilo como disolvente. A partir de este patrón madre, se prepara uno de concentración 1 ppm, que será el que se añade a cada una de las diluciones de la recta de calibrado, para tener una concentración constante de ISTD de 0.05 ppm en cada uno de los puntos de la recta.

A partir de dichas disoluciones madre se prepararán dos multipatrones en acetonitrilo, cuyos analitos se encontrarán a una concentración de 1 ppm.

Con uno de los multipatrones se prepararán diluciones con matriz blanca extraída en acetonitrilo, de donde obtendremos la recta de calibrado. Su preparación se hará de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla 3. Patrones de calibración para la cuantificación de plaguicidas.3

Patrones de calibración	1	2	3	4	5
Volumen patrón 1 ppm (µL)	50	100	250	500	1000
Volumen ISTD 1 ppm (µL)	500	500	500	500	500
Concentración final (ppb)	5	10	25	50	100
Volumen final (mL)	10	10	10	10	10

El rango lineal de medida absoluto es de 0.005 a 0.1 mg/Kg. El segundo multipatrón se utilizó para la preparación de patrones de verificación y muestras fortificadas. Para asegurar que la preparación de un nuevo multipatrón es correcta, se procedió a la realización de tres medidas del multipatrón antiguo y tres del nuevo a una concentración igual a uno de los puntos de la recta. Con las seis medidas obtenidas se calculó el coeficiente de variación., que debe ser menor o igual al 10% (para las materias activas que se degradan con facilidad se admite un 15%). Se aceptó la linealidad de respuesta entre las concentraciones inyectadas siempre y cuando el coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.995$.

Se calculó el factor de respuesta (FR) de cada punto de la función, según la siguiente expresión:

$$FR = \frac{A_{\text{plaguicida}}/A_{\text{ISTD}}}{C_{\text{plaguicida}}/C_{\text{ISTD}}}$$

Ecuación 6. Ecuación del cálculo del factor de respuesta.

A continuación, se calculó la media y coeficiente de variación de los factores de respuesta obtenidos.

Tanto la recta de calibrado como el coeficiente de correlación, r , los FR, media y coeficiente de variación de dichos factores de respuesta han sido calculados por el software del equipo, Agilent Mass Hunter Workstation.

Las concentraciones de los plaguicidas en la muestra problema fueron calculadas introduciendo la relación de áreas entre la materia activa y el ISTD detectada en la muestra, en la recta de calibrado. Este proceso lo realizó automáticamente el software del equipo, Agilent Mass Hunter Workstation.

Se considerará como resultado positivo, todo aquel analito que después de identificarse y confirmarse, el resultado obtenido al cuantificarse fuese >LQ (límite de cuantificación).

El resultado se dará con tres cifras significativas para valores iguales o superiores a 10 mg/Kg o ppm y con dos cifras significativas para los inferiores a 10 mg/Kg o ppm.

Cuando los resultados estén por debajo del LQ aparecerán como: <LQ.

EL sistema cromatográfico líquido acoplado a espectrómetro de masas con analizador triple cuadrupolo 6410B Agilent Technologies se compone de:

a) Sistema cromatográfico con volumen de inyección es 5 μ L y el gas N_2 será calidad 5.0, Cromatógrafo líquido Agilent Technologies 1200 Infinity Series desgasificador de vacío, sistema de bombeo binario, automuestreador sistema de inyección automático y compartimento termostatado de columna. Las condiciones de trabajo son:

Fase móvil A: Acetonitrilo 0.1% Ácido fórmico; Fase móvil B: Agua 2mM Formiato Amónico y 0.1% Ácido fórmico; Flujo: 0.6 mL/min; Temperatura: 40 °C; Programa de inyección: 5 μ l Muestra + 95 μ l Fase Móvil (20% F.M. A + 80% F.M. B); Tiempo de análisis: 17 minutos; Post-Time: 5 minutos; Columna: EC-C18, 3.0 x 100mm 2.7 μ m, por ejemplo, del tipo Poroshell 120.

b) Espectrómetro de Masas con Analizador Triple Cuadrupolo Tipo de Scan:

Dynamic MRMDelta EMV: 400. Cycle Time: 500 ms.

Análisis microbiológico

Determinación de *Listeria monocytogenes*

Para la determinación de *Listeria* mediante el equipo mini-VIDAS SLM, se tomaron 25 ± 0.5 gramos de muestra, se cortaron en pequeñas porciones y se diluyeron con 225 ± 4.5 mililitros de medio de cultivo Fraser (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) en una bolsa estéril de Stomacher (BagPage S 400, BagSystem, Interscience, St-Nom-la-Breteche, France), incubándolas a 30 ± 1 °C durante 24 ± 2 horas tras la homogeneización. Tras ello, se hizo un segundo enriquecimiento inoculando 0,1 mL del caldo de pre-enriquecimiento en 10 mL de caldo Fraser, incubando a 37 ± 1 °C durante 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se homogeneizó los tubos y se transfirió 1 mL de cada tubo a un solo tubo. A continuación, se calentó el tubo en baño maría (95-100 °C) durante 15 ± 1 minutos. Tras enfriar el tubo, se mezcló el caldo y se transfieren 0,5 mL al pocillo de la muestra del cartucho VIDAS (que contiene los

inmunorreactivos), que para este patógeno es mini-VIDAS LMO (bioMérieux), completándose el ensayo en 45 minutos. El rendimiento de fluorescencia en el equipo VIDAS indica la presencia presuntiva de *Listeria monocytogenes*, confirmando los posibles positivos por cultivo, mediante siembra en agar Palcam y Oxford (Oxoid, Cambridge, Reino Unido). Para su confirmación se tomó al menos una colonia considerada como típica o sospechosa presente en la placa correspondiente a cada medio selectivo y luego, otras cuatro colonias si la primera es negativa. A partir de las colonias típicas aisladas, se tomó una colonia característica y bien definida para realizar la confirmación bioquímica empleando el kit de identificación de *Listeria* Microgen Listeria ID o cualquier otro kit de identificación validado. El kit contiene las pruebas de hidrólisis de la esculina, fermentación de azúcares y hemólisis, permitiendo diferenciar *Listeria monocytogenes* y el resto de las especies de *Listeria*. Se dará un resultado positivo para *Listeria monocytogenes* en aquellas muestras que hayan dado resultado positivo en el equipo miniVIDAS y den colonias típicas en los medios selectivos, confirmadas mediante pruebas bioquímicas incluidas en el Kit de identificación. El resultado se expresará como Ausencia o Presencia de *Listeria monocytogenes*.

Determinación de *Salmonella*

Para la detección de *Salmonella* se utilizó el equipo mini-VIDAS (Biomérieux, Francia). Para ello, se tomó 25 ± 0.5 gramos de muestra y se cortó en pequeñas porciones y se diluyó con 225 ± 4.5 mililitros de agua de peptona tamponada en una bolsa estéril de Stomacher (BagPage S 400, BagSystem, Interscience, St-Nom-la-Breteche, France), incubándolas a 37 ± 1 °C durante 18 ± 2 horas tras la homogeneización. Tras ello, se transfirió 0.1 mL del caldo de pre-enriquecimiento a 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis soja (Biomerieux, Francia), incubando a 41.5 ± 1 °C durante 6-8 horas. Paralelamente, se transfiere 1 mL de caldo de pre-enriquecimiento a 10 mL de caldo Muller-Kauffmann (Biomerieux, Francia) con tetracionato y novobiocina (MKTTn), incubando a 37 ± 1 °C durante 6-8 horas. Tras incubar los caldos de enriquecimiento, se transfirió 0.1 mL del caldo MKTTn a 10 mL de caldo M y 1 mL del caldo Rappaport Vassiliadis soja, RVS (Biomerieux, Francia) a otros 10 mL del caldo M (Biomerieux, Francia). A continuación, se volvió a incubar los caldos MKTTn y RVS a sus respectivas temperaturas durante 16-20 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se homogeneizó los tubos de caldo M y se transfiere 1 mL de cada tubo a un solo tubo. A continuación, se calienta el tubo en baño maría ($95-100$ °C) durante 15 ± 1 minutos. Tras enfriar el tubo, se mezcló el caldo y se transfirió 0.5 mL al pocillo de la muestra del cartucho mini-VIDAS SLM (que contiene los inmunorreactivos), completándose el ensayo en 45 minutos. El rendimiento de fluorescencia en el equipo VIDAS indica la presencia presuntiva de *Salmonella spp.*, confirmando los posibles positivos por cultivo, mediante siembra en agar Hecktoen Enteric (Scharlau, Barcelona, España) y XLD (Biokar, Francia). Para su confirmación se toma al menos una colonia considerada como típica o sospechosa presente en la placa correspondiente a cada medio selectivo y luego, otras cuatro colonias si la primera es negativa. Se aisló las colonias seleccionadas en la superficie de las placas de agar nutritivo (PCA), de manera que se obtengan colonias bien aisladas. Las placas sembradas se incubaron a 37 ± 1 °C durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. A partir de las colonias en agar nutritivo, se realizó la confirmación bioquímica empleando un Kit comercial de incubación de Enterobacterias (Biokar, Francia). Se da un resultado positivo para *Salmonella* en aquellas muestras que hayan dado resultado positivo en el equipo miniVIDAS y den colonias típicas en los medios selectivos,

confirmadas mediante pruebas bioquímicas incluidas en el Kit de identificación. El resultado se expresa como Ausencia o Presencia de *Salmonella*.

Determinación de *Escherichia Coli*

Para la determinación de *E. coli*, en condiciones estériles, se pesaron aproximadamente 10 g de cada muestra en una bolsa de plástico especial para homogeneizadores, añadiendo 90 mL de agua de peptona (Biorad, Francia), obteniendo así una dilución 1/10. Ambas operaciones se realizaron en un equipo de alta precisión, que permite la pesada de la muestra y el cálculo automático de la cantidad de diluyente necesaria para obtener la dilución deseada (Delta dilutor, España) y a continuación se introdujo la bolsa en un homogeneizador (Stomacker, España) durante 30 segundos. A partir de la primera dilución (dilución madre), se tomó 1 mL de ésta y se pasó a un tubo con 9 mL de agua de peptona (dilución 1/100). Tras esta operación, se procedió a la siembra en placa Petri por duplicado, depositando 1 mL en cada una de ellas y entre 15-20 mL aproximadamente de agar cromogénico Rapid *E. coli* 2™ (Biorad, Francia), licuado y atemperado en cada placa. El PCA contiene 5 g/L de peptona de caseína, 2.5 g/L de extracto de levadura, 1.0 g/L D (+) glucosa y 14 g/L de agar-agar. Tras ello, se mezclaron en la placa el medio y el inóculo, con movimientos circulares a favor y en contra de las agujas del reloj, evitando que el medio de cultivo impregne la tapa, manteniendo las placas en superficie horizontal hasta que se solidifique el agar completamente. Una vez solidificado el agar, se invirtió las placas y se introdujeron en la estufa evitando que se apilen en exceso, incubando a 37 °C durante 48 horas.

Tras el periodo de incubación, se cuentan las placas que presentan entre 30 y 300 colonias aisladas. Las colonias de *E. coli* presentarán una coloración azul y las de *Coliformes* mostrarán una coloración rosada. A continuación, se halla la media y se multiplica por el factor de la dilución de la placa elegida, expresando los resultados en unidades formadoras de colonias por gramo.

7.3. Anexo III. Caracterización detallada de productos

Caracterización de subproductos alimentarios

Subproducto de limón



Imagen 1. Subproducto de limón de variedad *Fino*.

Tabla 2. Caracterización del subproducto de limón variedad *Fino*. Los valores de determinación de los compuestos de interés corresponden a la media \pm desviación estándar de los análisis realizados por triplicado.

Determinación de los compuestos de interés (g/kg)	
Hesperidina	3.37 \pm 0.02
Limonina	0.13 \pm 0.03
Vitamina C	0.65 \pm 0.03
Determinación del análisis nutricional (g/100g)	
Fibra alimentaria	8.1 \pm 0.1
Humedad	83.8 \pm 0.8
Grasa	0.4 \pm 0.0
Proteínas	0.9 \pm 0.0
Valor energético, kcal/100g	48 \pm 2
Hidratos de carbono	6.2 \pm 0.2
Valor energético, kJ/100g	200 \pm 6
Cloruro sódico	<LQ
Cenizas totales	0.6 \pm 0.0
Azúcares totales	3.5 \pm 0.0
Ácidos grasos saturados	0.1 \pm 0.0
Determinación toxicológica (mg/kg)	
Plaguicidas	<LQ
Determinación microbiológica	
<i>Escherichia coli</i> β glucuronidasa + (24 horas), ufc/g	<LQ
<i>Listeria monocytogenes</i>, /25g	No detectado
<i>Salmonella</i>, /25g	No detectado

Subproducto de alcachofa



Imagen 2. Subproducto de alcachofa de variedad *Blanca de Tudela*.

Tabla 3. Caracterización del subproducto de alcachofa variedad *Blanca de Tudela*. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de los análisis realizados por triplicado.

Determinación de compuestos de interés (g/kg)	
Ácido clorogénico	0.07 \pm 0.01
Cinarina	0.02 \pm 0.01
Ácido cafeico	0.003 \pm 0.001
Vitamina C	<LQ
Determinación del análisis nutricional (g/100g)	
Fibra alimentaria	8.1 \pm 0.1
Humedad	87.0 \pm 0.9
Grasa	0.2 \pm 0.0
Proteínas	2.2 \pm 0.1
Valor energético, kcal/100g	33 \pm 2
Hidratos de carbono	1.6 \pm 0.1
Valor energético, kJ/100g	137 \pm 4
Cloruro sódico	0.1 \pm 0.0
Cenizas totales	0.9 \pm 0.0
Azúcares totales	1.0 \pm 0.0
Ácidos grasos saturados	<LQ
Determinación toxicológica (mg/kg)	
Plaguicidas	Presencia
Acetamiprid	0.068 \pm 0.005
Azoxistobina	0.040 \pm 0.004
Cipermetrina	0.023 \pm 0.008
Difenoconazol	0.010 \pm 0.009
Indoxacarbo	0.012 \pm 0.003
Tau-fluvalinato	0.014 \pm 0.003
Tetraconazol	0.016 \pm 0.005
Determinación microbiológica	
<i>Escherichia coli</i> β glucuronidasa + (24 horas), ufc/g	<LQ
<i>Listeria monocytogenes</i> , /25g	No detectado
<i>Salmonella</i> , /25g	No detectado

Subproducto de granada



Imagen 3. Subproducto de granada de variedad *Mollar*.

Tabla 4. Caracterización del subproducto de granada variedad *Mollar*. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de los análisis realizados por triplicado.

Determinación de compuestos de interés (g/kg)	
Punicalagina	28.78 \pm 0.04
Ácido elágico	7.19 \pm 0.02
Determinación del análisis nutricional (g/100g)	
Fibra alimentaria	12.4 \pm 0.1
Humedad	65.3 \pm 0.7
Grasa	0.2 \pm 0.0
Proteínas	1.5 \pm 0.0
Valor energético, kcal/100g	111 \pm 6
Hidratos de carbono	19.5 \pm 0.8
Valor energético, kJ/100g	464 \pm 14
Cloruro sódico	0.1 \pm 0.0
Cenizas totales	1.1 \pm 0.0
Azúcares totales	12.0 \pm 0.2
Ácidos grasos saturados	<LQ
Determinación toxicológica (mg/kg)	
Plaguicidas	Presencia
Imazalil	9.30 \pm 0.05
Pirimetanil	0.35 \pm 0.01
Piriproxifen	0.36 \pm 0.02
Spirotetramat	0.11 \pm 0.01
Determinación microbiológica	
<i>Escherichia coli</i> β glucuronidasa + (24 horas), ufc/g	<LQ
<i>Listeria monocytogenes</i>, /25g	No detectado
<i>Salmonella</i>, /25g	No detectado

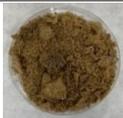
Caracterización de los extractos de limón

Tabla 5. Caracterización extractos acuosos finales obtenidos del subproducto de limón con diferentes técnicas extractivas. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

	Extracción acuosa (EAT)	Extracción enzimática (EE)	Extracción ultrasonidos (EUS)	Extracción agua subcrítica (EAS)
				
Determinación de compuestos de interés (g/kg)				
Polifenoles totales, g ácido gálico/kg	23.94 \pm 0.25	59.61 \pm 0.43	22.82 \pm 0.24	106.08 \pm 0.75
Neohesperidina	19.39 \pm 0.05	19.09 \pm 0.04	19.15 \pm 0.12	29.23 \pm 0.07
Hesperidina	14.68 \pm 0.16	17.69 \pm 0.19	9.38 \pm 0.09	1.70 \pm 0.06
Vicenina-2	3.48 \pm 0.07	6.21 \pm 0.04	4.57 \pm 0.06	6.91 \pm 0.05
Crisoeriol 6,8-DI-C-glucósido	2.13 \pm 0.05	3.03 \pm 0.04	2.44 \pm 0.06	4.16 \pm 0.05
Ácido nomilínico	1.22 \pm 0.03	12.05 \pm 0.04	1.38 \pm 0.05	6.52 \pm 0.05
Luteolina-neohesperidosidasa	1.68 \pm 0.04	3.37 \pm 0.03	1.26 \pm 0.05	4.18 \pm 0.03
Narirutina	1.17 \pm 0.05	2.46 \pm 0.09	1.34 \pm 0.04	3.74 \pm 0.06
Limonina	2.13 \pm 0.03	1.71 \pm 0.03	2.23 \pm 0.04	0.54 \pm 0.03
Vitamina C	2.90 \pm 0.06	<LQ	0.09 \pm 0.02	<LQ
Diosmetina 8-C-glucósido	0.82 \pm 0.04	2.73 \pm 0.03	0.79 \pm 0.04	2.13 \pm 0.05
Capacidad antioxidante (g trolox/ kg extracto seco)				
ABTS	28.45 \pm 0.09	60.66 \pm 0.15	32.12 \pm 0.08	163.92 \pm 0.85
Determinación del análisis nutricional (g/100g)				
Fibra alimentaria	20.1 \pm 0.2	32.0 \pm 0.3	12.9 \pm 0.1	5.3 \pm 0.1
Humedad	21.9 \pm 0.2	1.4 \pm 0.0	10.5 \pm 0.1	4.2 \pm 0.0
Grasa	0.8 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
Proteínas	4.4 \pm 0.1	7.0 \pm 0.2	11.1 \pm 0.3	13.4 \pm 0.4
Valor energético, kcal/100g	304 \pm 15	307 \pm 15	317 \pm 16	354 \pm 18
Hidratos de carbono	69.8 \pm 2.7	52.9 \pm 2.1	60.3 \pm 2.4	74.8 \pm 2.9
Valor energético, kJ/100g	1291 \pm 39	1289 \pm 38	1339 \pm 40	1503 \pm 45
Cloruro sódico	0.28 \pm 0.0	0.46 \pm 0.0	0.51 \pm 0.0	0.66 \pm 0.0
Cenizas totales	3.1 \pm 0.0	6.3 \pm 0.1	4.6 \pm 0.1	7.5 \pm 0.2
Azúcares totales	31.0 \pm 0.6	8.2 \pm 0.2	42.1 \pm 0.8	2.8 \pm 0.0
Ácidos grasos saturados	0.2 \pm 0.0	<LQ	<LQ	<LQ
Determinación toxicológica (mg/kg)				
Plaguicidas	<LQ	Presencia	Presencia	<LQ
Dodina	<LQ	0.063 \pm 0.002	<LQ	<LQ
Imazalil	<LQ	<LQ	0.016 \pm 0.001	<LQ
Pirimetanil	<LQ	<LQ	0.022 \pm 0.002	<LQ
Determinación microbiológica				
<i>Escherichia coli</i> β glucuronidasa + (24 horas), ufc/g	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<i>Listeria monocytogenes</i>, /25g	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
<i>Salmonella</i>, /25g	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
Rendimiento (% respecto el peso de materia prima inicial)				
Rendimiento	2.1 \pm 0.2	5.1 \pm 0.1	4.3 \pm 0.3	1.7 \pm 0.2

Caracterización de los extractos de alcachofa

Tabla 6. Caracterización extractos sólidos finales obtenidos del subproducto de alcachofa mediante las diferentes técnicas extractivas. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

	Extracción acuosa (EAT)	Extracción enzimática (EE)	Extracción ultrasonidos (EUS)	Extracción agua subcrítica (EAS)
				
Determinación de compuestos de interés (g/kg)				
Polifenoles totales, g ácido gálico/kg	70.59 \pm 0.19	77.92 \pm 0.22	25.76 \pm 0.34	42.58 \pm 0.28
Ácido clorogénico	32.88 \pm 0.23	28.46 \pm 0.14	0.47 \pm 0.02	0.29 \pm 0.04
Cinarina	6.93 \pm 0.07	12.02 \pm 0.06	0.08 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01
Ácido cafeico	0.55 \pm 0.03	1.43 \pm 0.05	1.09 \pm 0.09	<LQ
Vitamina C	0.47 \pm 0.04	1.36 \pm 0.09	<LQ	<LQ
Capacidad antioxidante (g trolox/ kg extracto seco)				
ABTS	92.84 \pm 0.51	118.71 \pm 0.63	41.16 \pm 0.39	69.14 \pm 0.46
Determinación del análisis nutricional (g/100g)				
Fibra alimentaria	48.8 \pm 0.5	24.4 \pm 0.2	15.8 \pm 0.16	16.5 \pm 0.17
Humedad	3.4 \pm 0.0	4.2 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	5.1 \pm 0.0
Grasa	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0
Proteínas	15.7 \pm 0.5	15.5 \pm 0.5	21.7 \pm 0.7	12.2 \pm 0.4
Valor energético, kcal/100g	238 \pm 12	285 \pm 14	302 \pm 15	259 \pm 13
Hidratos de carbono	18.4 \pm 0.7	42.6 \pm 1.7	44.2 \pm 1.8	43.7 \pm 1.7
Valor energético, kJ/100g	985 \pm 30	1198 \pm 36	1273 \pm 38	1093 \pm 33
Cloruro sódico	2.3 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1
Cenizas totales	13.3 \pm 0.3	12.9 \pm 0.2	13.6 \pm 0.3	22.2 \pm 0.4
Azúcares totales	17.3 \pm 2.0	15.4 \pm 2.0	17.1 \pm 2.0	<LQ
Ácidos grasos saturados	<LQ	<LQ	0.2 \pm 0.0	<LQ
Determinación toxicológica (mg/kg)				
Plaguicidas	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
2-fenilfenol	<LQ	<LQ	0.011 \pm 0.002	<LQ
Acetamiprid	0.200 \pm 0.034	0.240 \pm 0.036	0.120 \pm 0.036	0.150 \pm 0.025
Azoxistrobina	0.030 \pm 0.005	0.053 \pm 0.015	<LQ	<LQ
Cipermetrina	0.089 \pm 0.009	0.016 \pm 0.003	0.048 \pm 0.007	0.030 \pm 0.009
Deltametrin	0.027 \pm 0.004	0.011 \pm 0.002	0.015 \pm 0.003	<LQ
Difenoconazol	0.017 \pm 0.003	0.025 \pm 0.006	<LQ	<LQ
Fluxapirosad	0.070 \pm 0.012	0.096 \pm 0.011	0.023 \pm 0.005	0.080 \pm 0.011
Imazalil	0.058 \pm 0.009	0.110 \pm 0.023	<LQ	<LQ
Imidacloprid	0.026 \pm 0.005	0.042 \pm 0.006	0.014 \pm 0.002	<LQ
Indoxacarbo	0.042 \pm 0.006	0.011 \pm 0.003	0.042 \pm 0.006	0.030 \pm 0.005
Lambda-cihalotrina	0.033 \pm 0.005	<LQ	0.014 \pm 0.002	<LQ
Metalaxilo	<LQ	0.015 \pm 0.003	<LQ	<LQ
Miclobutanil	0.042 \pm 0.06	0.053 \pm 0.0015	0.036 \pm 0.005	0.040 \pm 0.005
Tau-fluvalinato	0.054 \pm 0.012	0.023 \pm 0.004	0.042 \pm 0.006	<LQ
Tetraconazol	0.140 \pm 0.025	0.110 \pm 0.024	0.190 \pm 0.021	0.090 \pm 0.012
Determinación microbiológica				
<i>Escherichia coli</i> β glucuronidasa + (24 horas), ufc/g	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

<i>Listeria monocytogenes</i> , /25g	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
<i>Salmonella</i> , /25g	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
Rendimiento (% respecto el peso de materia prima inicial)				
Rendimiento	3.6 ± 0.2	4.9 ± 0.7	2.8 ± 0.3	3.2 ± 0.5

Caracterización de los extractos de granada

Tabla 7. Caracterización extractos sólidos finales obtenidos del subproducto de granada con diferentes técnicas extractivas. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

	Extracción acuosa (EAT)	Extracción enzimática (EE)	Extracción ultrasonidos (EUS)	Extracción agua subcrítica (EAS)
				
Determinación de compuestos de interés (g/kg)				
Polifenoles totales, g ácido gálico/kg	196.24 \pm 1.54	218.33 \pm 1.48	231.67 \pm 1.95	159.56 \pm 0.87
Punicalagina	151.43 \pm 1.02	163.26 \pm 0.83	174.09 \pm 2.12	78.53 \pm 0.53
Ácido elágico	8.58 \pm 0.05	19.53 \pm 0.11	19.07 \pm 0.21	17.44 \pm 0.15
Punicalina	5.56 \pm 0.02	3.86 \pm 0.03	9.57 \pm 0.10	5.05 \pm 0.09
Pedunculagina	1.22 \pm 0.04	1.22 \pm 0.05	7.39 \pm 0.15	1.96 \pm 0.06
Elagitanina	1.13 \pm 0.09	0.89 \pm 0.02	7.62 \pm 0.09	1.20 \pm 0.17
Capacidad antioxidante (g trolox/ kg extracto seco)				
ABTS	584.62 \pm 3.89	684.9 \pm 4.13	724.31 \pm 4.06	615.78 \pm 4.61
Determinación del análisis nutricional (g/100g)				
Fibra alimentaria	8.3 \pm 0.1	16.4 \pm 0.2	10.2 \pm 0.1	12.2 \pm 0.1
Humedad	5.0 \pm 0.0	4.4 \pm 0.0	3.9 \pm 0.0	7.5 \pm 0.1
Grasa	2.2 \pm 0.0	1.6 \pm 0.0	1.4 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0
Proteínas	5.2 \pm 0.2	2.0 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	4.6 \pm 0.1
Valor energético, kcal/100g	357 \pm 18	341 \pm 17	352 \pm 18	335 \pm 17
Hidratos de carbono	74.9 \pm 3.0	71.5 \pm 2.8	77.9 \pm 3.1	70.1 \pm 2.8
Valor energético, kJ/100g	1510 \pm 45	1440 \pm 43	1490 \pm 44	1416 \pm 42
Cloruro sódico	0.2 \pm 0.0	0.27 \pm 0.0	0.16 \pm 0.0	0.35 \pm 0.0
Cenizas totales	4.4 \pm 0.1	4.1 \pm 0.1	4.7 \pm 0.1	4.3 \pm 0.1
Azúcares totales	47.8 \pm 0.9	45.6 \pm 0.9	55.8 \pm 1.1	46.0 \pm 0.9
Ácidos grasos saturados	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	<LQ
Determinación toxicológica (mg/kg)				
Plaguicidas	<LQ	Presencia	Presencia	Presencia
Fludioxonil	<LQ	0.058 \pm 0.006	0.036 \pm 0.005	<LQ
Spirotetramat	<LQ	0.031 \pm 0.004	0.062 \pm 0.008	0.21 \pm 0.003
Determinación microbiológica				
<i>Escherichia coli</i> β glucuronidasa + (24 horas), ufc/g	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<i>Listeria monocytogenes</i>, /25g	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
<i>Salmonella</i>, /25g	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
Rendimiento (% respecto el peso de materia prima inicial)				
Rendimiento	5.1 \pm 0.3	5.9 \pm 0.3	6.4 \pm 0.2	4.7 \pm 0.5

