



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo A.C.**

**EXTRACTO DE CÁSCARA DE GRANADA COMO
ANTIMICROBIANO Y POTENCIADOR ANTIOXIDANTE EN
GERMINADOS DE ALFALFA**

POR:

ROSA ESTHER AYALA SOTO

**TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL**

Como requisito parcial para obtener el grado de

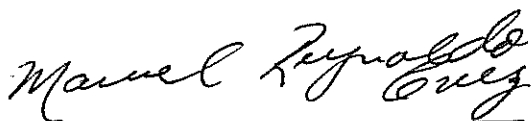
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora


Septiembre del 2014

APROBACIÓN

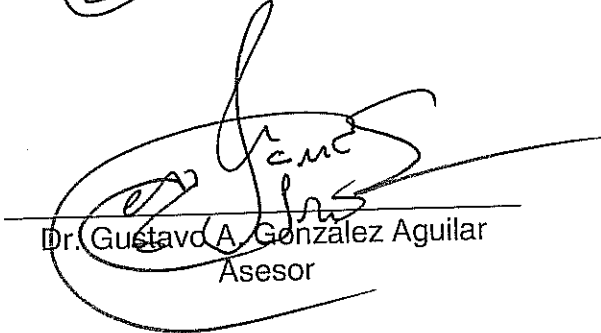
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de I.B. Rosa Esther Ayala Soto, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias



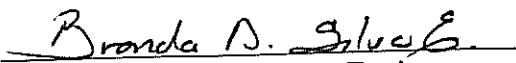
M.C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela
Director de Tesis



Dr. J. Fernando Ayala Zavala
Asesor



Dr. Gustavo A. González Aguilar
Asesor

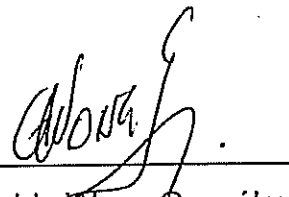


M.C. Brenda A. Silva Espinoza
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis confines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director general

AGRADECIMIENTOS

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.** por permitirme realizar mis estudios de maestría y poder alcanzar una meta importante en mi formación.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

A la **Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV)**, por darme la oportunidad de realizar mí proyecto de investigación en esta área, facilitándome sus equipos e instalaciones, así mismo para el personal que labora en esta coordinación.

A mi director de tesis el **M.C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela**, por su gran apoyo y disposición para la realización de este proyecto.

A los miembros de mi comité integrado por el **Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala, Dr. Gustavo A. Gonzáles Aguilar y M.C. Brenda A. Silva Espinoza**, por su apoyo y asesoría en el transcurso de este trabajo.

A la **Dra. Olga Martín Belloso y al Dr. Robert Soliva Fortuny**, por el apoyo brindado durante mi estancia en la Universidad de Lleida, de la ciudad de Lleida, Cataluña, España.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la oportunidad de seguir este camino acompañándome en cada momento de mi vida.

A mis padres **Eleazar Ayala Álvarez y Esther Soto Soto**, por siempre estar pendientes de mí, por apoyarme siempre en mis proyectos, por su apoyo incondicional, por ser la luz de mi camino, por sus enseñanzas, por luchar a mi lado hasta verme lograr esta meta e inculcarme los valores que me hacen una persona de bien, gracias. Siempre los amare.

A mis hermanos, **Juan Guillermo Ayala Soto y Eleazar Ayala Soto**, por tantas alegrías compartidas, por haber crecido juntos, por brindarme siempre su apoyo y por siempre desearme lo mejor, los quiero mucho hermanos.

A mi familia: **Ayala Álvarez y Soto Soto**, Abuela Rosa, mis tíos y primos, por siempre luchar por ser una familia de éxitos, por la unión, y el apoyo que me han dado. Gracias.

A mi esposo **Federico Gaona García**: mi confidente y cómplice de muchas aventuras, porque me enseñas cada día que se puede ser feliz en la vida sin muchas complicaciones, me acompañas en cada momento apoyándome y dándome ánimos, te agradezco de todo corazón, por siempre estar a mi lado, por eso y más, Te Amo.

A mis compañeros de laboratorio, **Luis, Thalía, Javier, Juan, Isela, Dalila, Melissa y Melvin** por tantas alegrías compartidas, a mis compañeros de clases, a todas las personas que formaron parte por alguna razón en este momento de mi vida.

† Dedico en especial este trabajo a mi hermano **Eleazar Ayala Soto (05/Ago/1982-23/Feb/2014)** no tengo más que agradecerte todo el tiempo que estuviste con nosotros, siempre mostrándonos el lado divertido de la vida, tu siempre sonriendo y alegre, gracias por dejarnos esas alegrías en nuestros corazones, que siempre las recordaremos con la presencia de tus más grandes regalos, tus hijos. Hermano te recordare por siempre, que en paz descansa.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURA.....	ix
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	4
Los Germinados de Alfalfa Como un Producto Fresco y Natural	4
Propiedades Nutricionales de los Germinados de Alfalfa.....	5
Fuentes de Contaminación Microbiana	6
La Aplicación de Extractos Bioactivos en Germinados.....	9
Propiedades Bioactivas de Subproductos de la Granada	11
Compuestos Bioactivos de la Cáscara de Granada.....	12
Capacidad Antimicrobiana.....	13
Capacidad Antioxidante	17
HIPOTESIS.....	20
OBJETIVOS	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Obtención del Material Vegetal	22
Etapa 1.....	22
Preparación de los Extractos de Cáscara de Granada	22
Contenido de Fenoles Totales.....	23
Contenido de Flavonoides Totales	23

Identificación y Cuantificación de los Compuestos Fenólicos por UPLC....	24
Actividad Antimicrobiana in vitro de los Extractos de Cáscara de Granada.	25
Método Inhibición del Radical Estable (DPPH*)	26
Método Capacidad Antioxidante Equivalentes Trolox (TEAC)	26
Análisis Estadístico	27
Etapa 2.....	27
Aplicación del Extracto de Cáscara de Granada a Germinados de Alfalfa.	27
Caracterización Fisicoquímica de los Germinados de Alfalfa.....	28
Análisis microbiológicos de los germinados de alfalfa.....	28
Capacidad Antioxidante en los Germinados de Alfalfa.....	30
Análisis Estadístico	30
RESULTADOS Y DISCUSIONES	31
Etapa 1.- Obtención de los Extracto de Cáscara de Granada Ricos en Compuestos Fenólicos con Capacidad Antimicrobiana y Antioxidante. 31	
Contenido de Compuestos Fenólicos de los Extractos de Cáscara de Granada	31
Identificación y Cuantificación de Compuestos Fenólicos Presentes en los Extractos	33
Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del Extracto Acuoso y Etanólico de Cáscara de Granada.....	37
Capacidad Antioxidante de los Extractos Acuoso y Etanólico de Cáscara de Granada	44
Conclusión Etapa 1	46
Etapa 2.- Aplicación del extracto acuoso de cáscara de granada sobre los germinados de alfalfa.....	46
Capacidad Antimicrobiana.....	46
Capacidad antioxidante	49

Conclusión Etapa 2 52
CONCLUSIONES 53
REFERENCIAS 55

LISTA DE FIGURA

Figura	Página
1. Mecanismo de acción antimicrobiano de los compuestos fenólicos que afectan la funcionalidad de enzimas y de la membrana microbiana.....	15
2. Capacidad de los compuestos fenólicos para neutralizar radicales libres mediante la donación de electrones y proteger biomoléculas del daño oxidativo.	18
3. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos del extracto acuoso de cáscara de granada. 1) Ácido gálico, 2) ácido cloregénico, 3) catequina, 4) rutina y 5) ácido ferúlico. *No Detectado.....	34
4. Identificación y cuantificación del contenido de compuestos fenólicos en el extracto etanólico de cáscara de granada, 1) ácido gálico, 2) ácido cloregénico, 3) catequina, 4) ácido cafeico y 5) ácido cumárico. *No Detectado.	35
5. Efecto de las CMI de los extractos de cáscara de granada acuoso y etanólico sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> A) y <i>S. Typhimurium</i> B).	41
6. Efecto de la CMI de los extractos de cáscara de granada acuoso y etanólico sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Candida tropicalis</i>	42
7. Capacidad antioxidante de los germinados de alfalfa, tratados extractos de cáscara de granada y otros tratamientos. Inhibición de A) radical DPPH, B) radical ABTS.	50

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Brotes reportados de intoxicación alimentaria asociados al consumo de diferentes tipos de germinados.....	7
2. Caracterización fisicoquímica del germinado de alfalfa utilizado en este estudio.....	29
3. Contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos de cáscara de granada.	32
4. Contenido de compuestos fenólicos identificados en el extracto acuoso y etanólico de cáscara de granada.....	36
5. CMI de extractos de cáscara de granada probados <i>in vitro</i> contra patógenos alimentarios.....	39
6. Efecto de los extractos de cáscara de granada acuoso y etanólico, sobre los parámetros de crecimiento evaluados frente a diferentes microorganismos patógenos.....	43
7. Capacidad antioxidante de los extractos acuoso y etanólico de cáscara de granada.	45
8. Efecto del extracto acuoso de cáscara de granada en la reducción de coliformes totales y psicrófilos (UFC/g) en germinados de alfalfa.	48

RESUMEN

Los germinados de alfalfa son buena fuente de nutrientes, sin embargo, su consumo ha causado enfermedades atribuidas a la presencia de bacterias; además, el consumidor demanda productos con más antioxidantes y conservados de manera natural. Una de las alternativas para solucionar esta problemática es el uso de extractos de plantas, tal es el caso de la cáscara de granada, obtenida como sub-producto de su procesamiento, que podría ser una fuente de compuestos fenólicos, con propiedades antimicrobianas y antioxidantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los extractos de cáscara de granada sobre el crecimiento microbiano y la capacidad antioxidante de germinados de alfalfa. Se obtuvieron dos tipos de extractos de la cáscara: acuoso y etanólico, siendo el extracto acuoso el que presentó mayor contenido de fenoles: 153.43 mg equivalentes de ácido gálico /g peso seco (p.s.), flavonoides: 45.74 mg equivalentes de quercetina /g p.s. Para este extracto se encontraron concentraciones mínimas inhibitorias de 19 mg/mL para *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium, y de 30 mg/mL para *Candida tropicalis*; además, su capacidad antioxidante para inhibir el radical libre DPPH a una concentración de 0.04 mg/mL fue de 86% y de 767.17 mg equivalentes trolox (ET) /g p.s. para inhibir el radical ABTS. Los germinados tratados con 25 mg/mL del extracto acuoso, redujeron 1.12 Log UFC/g de psicrófilos, 1.23 Log UFC/g de coliformes totales en comparación con el testigo. Adicionalmente, este tratamiento aumentó la capacidad antioxidante en DPPH de 55.13 μ mol ET/100g y en ABTS de 126.56 μ mol ET/100 g, comparado con el testigo. Esto es un indicador de que el extracto acuoso de cáscara de granada incrementó la capacidad antioxidante y disminuyó la carga microbiana de germinados de alfalfa.

Palabras claves: subproductos de granada, compuestos fenólicos, germinados.

ABSTRACT

Alfalfa sprouts are a good source of nutrients, however, has caused consumption attributed to the presence of bacterial diseases; addition, consumers demand products with antioxidants and naturally preserved. One alternative to solve this problem is the use of plant extracts, such is the case pomegranate peel, obtained as a by-product of processing, which could be a source of phenolic compounds with antimicrobial and antioxidant properties. The aim of this study was to evaluate the effect of pomegranate peel extracts on microbial growth and antioxidant capacity of alfalfa sprouts. Two types of peel extracts were obtained: aqueous and ethanol, with the aqueous extract presented the highest content of phenols: 153.43 mg gallic equivalents / g dry weight (d.w.) acid, flavonoids: 45.74 mg quercetin equivalents / g d.w. To this extract minimum inhibitory concentrations of 19 mg / mL for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium were found, and 30 mg / mL for *Candida tropicalis*; moreover, its antioxidant capacity to inhibit free radical DPPH in a concentration of 0.04 mg / mL was 86% and 767.17 mg trolox equivalent (TE) / g d.w. to inhibit the radical ABTS. The sprouts treated with 25 mg / mL of the aqueous extract, reduced 1.12 log CFU / g of psychrophilic, 1.23 log CFU / g of total coliforms compared with the control. Additionally, this treatment increased the antioxidant capacity DPPH of 55.13 μ mol TE / 100g and ABTS 126.56 μ mol TE / 100 g, compared with the control. This is an indication that the aqueous extract of pomegranate peel shell increased antioxidant capacity and decreased the microbial load of alfalfa sprouts.

Keywords: products of pomegranate, phenolic compounds, sprouted.

INTRODUCCIÓN

Las ventas en el mercado de productos listos para el consumo han aumentado rápidamente en los últimos años, como cambio en las actitudes de los consumidores (Rico *et al.*, 2007). Este aumento se debe en gran parte a los nuevos hábitos de compra y una mayor conciencia sobre la importancia de consumir productos sanos, frescos, bajos en calorías, sin aditivos e higiénicamente seguros. Lo que el consumidor busca es un producto inocuo y de buena calidad listo para su consumo (Aguayo Giménez *et al.*, 2010).

Los productos vegetales son organismos vivos que mantienen procesos fisiológicos luego de la cosecha. Las hortalizas en general, por su elevada actividad metabólica y su gran sensibilidad al desarrollo de microorganismos, son productos de corta vida útil (Recasens *et al.*, 2012). Otros inconvenientes se deben a las heridas que sufren los vegetales durante el proceso, lo que provoca una drástica disminución de su vida útil. Además, se produce el aumento de la actividad respiratoria y transpiratoria, actividad enzimática, proliferación microbiana y aumento en la emisión de etileno a causa de los cortes, provocando que la senescencia se acelere (Del Nobile *et al.*, 2007). Para prolongar la vida útil de estos productos se debe regular la temperatura, la atmósfera, la humedad relativa y el saneamiento (Ayala-Zavala, J., Del-Toro-Sánchez, *et al.*, 2008), además de utilizar materias primas con óptima calidad.

Los germinados de alfalfa son bajos en grasas saturadas, sodio y colesterol. Son buena fuente de proteínas, vitamina A, tiamina, ácido pantoténico, calcio y hierro; es muy rico en fibra, vitamina C, vitamina K, riboflavina, folato, magnesio, fósforo, zinc, cobre y manganeso (USDA, 2012). Además han adquirido mayor

atención debido a su alto contenido de fitoquímicos involucrados en la protección contra enfermedades degenerativas (Fahey & Stephenson, 2006). He ahí el interés de consumir germinados de alfalfa, pues aportan un beneficio a la salud.

El interés de algunos grupos de investigación se ha centrado en la búsqueda de fuentes naturales de antioxidantes y antimicrobianos, así como en la evaluación de sus propiedades, para preservar la calidad de los alimentos. Esto se debe, al incremento en los riesgos potenciales para la salud, asociados con el consumo de antioxidantes y antimicrobianos sintéticos (Seneviratne & Kotuwagedara, 2009). En muchas investigaciones los extractos de cáscara de granada han sido estudiados por su alto contenido de compuestos fenólicos, como un potenciador antioxidante y antimicrobiano de algunos alimentos.

Para disminuir la carga microbiana inicial en hortalizas, se realiza comúnmente un tratamiento de sanitización, que consiste en un lavado con hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones de 100- 150 ppm a un pH de 6.5. Sin embargo, genera productos secundarios como cloraminas y trihalometanos, perjudiciales para el ser humano (Artés-Calero *et al.*, 2009). Lo que el consumidor quiere son alimentos de buena calidad y no utilizar sanitizantes químicos que pueden traer consecuencias a la salud.

La cáscara de granada obtenida como sub-producto en el proceso para obtener jugo se puede considerar una buena fuente de compuestos naturales con actividad antimicrobiana y antioxidante. Diferentes estudios han demostrado una disminución en la carga bacteriana en diferentes alimentos. Al-Zoreky, N. S. (2009b) aplicó extractos de cáscara de granada en pescado, Hayrapetyan *et al.* (2012) lo aplicaron en carnes listas para consumir y disminuir así a *Listeria monocytogenes*. Es por esto, que podría ser adecuado para aplicaciones en la

industria alimentaria como ingrediente potencial para los productos alimenticios y así conservar su vida útil. El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar el efecto de los extractos de cáscara de granada (*Punica granatum*), ricos en compuestos fenólicos, sobre el crecimiento microbiano y la capacidad antioxidante en germinados de alfalfa.

ANTECEDENTES

Los Germinados de Alfalfa Como un Producto Fresco y Natural

Las Semillas han hecho una contribución significativa a la dieta humana desde tiempos remotos. En muchos países, hay un aumento en el consumo de frutas y vegetales frescos, producidos por sus beneficios para la salud, debido a los importantes cambios de estilo de vida de los consumidores que cada vez consumen más alimentos naturales y frescos. Los germinados vegetales son valiosos alimentos dietéticos y naturales que se han vuelto muy populares entre los consumidores conscientes de su salud (Jung, W. Y. *et al.*, 2009b). Los germinados son de bajo costo y una buena fuente en la dieta, generalmente contienen ricos nutrientes, incluyendo proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (Waje *et al.*, 2009). Entre los más populares están los de alfalfa (*Medicago sativa* L.), lenteja (*Lens culinaris* L.), frijol mungo (*Vigna radiata* L.), soya (*Glycine max* L.), frijol pinto (*Phaseolus vulgaris* L.) y garbanzo (*Cicer arietinum* L.), que han tenido fuertes ventas en el mercado los últimos años.

La alfalfa (*Medicago sativa* L.), es una planta herbácea de la familia de las Fabáceas que florece en primavera. Es originaria de Asia y África del Norte, aunque en la actualidad se cultiva en países de clima templado de todo el mundo. Es una planta con alta concentración de sales, gracias a las características de sus raíces, que son capaces de asimilar los minerales del suelo en mayor proporción que otras plantas. Los brotes son pequeñas plantas consumidas poco después de la germinación, se producen a partir de semillas vegetales. La madurez de la cosecha está regulada principalmente por las

condiciones fijadas para la germinación (inducción de brote) (Maureira Espinosa, 2012). La longitud del brote deseada es el índice de madurez principal y la cosecha se hace en un número relativamente fijo de días después de la aparición de la radícula. Dependiendo del tipo de semilla, la cosecha ocurre generalmente de 3 a 8 días después de la germinación. En el caso de los germinados de alfalfa la longitud para la madurez de cosecha es de 26 a 38 mm.

Los germinados en general, tienen la ventaja, de requerir corto tiempo de cultivo, una muy pequeña infraestructura, y no requerir grandes extensiones de tierra, puesto que su cultivo se realiza hidropónicamente. Todo esto, da al productor la ventaja competitiva de tener una alta rotación del mismo cultivo. Adicionalmente, los germinados tienen la particularidad de no tener el aspecto común de los vegetales, por ende más fácil de consumir y que en una pequeña porción pueden suministrar los mismos o mayores beneficios a la salud.

Propiedades Nutricionales de los Germinados de Alfalfa.

La germinación provoca cambios importantes en las características bioquímicas, nutricionales y sensoriales en semillas. Las grasas y carbohidratos se descomponen y la digestibilidad del almidón se incrementa, la fibra dietética aumenta, y se forman vitaminas y compuestos secundarios, considerados beneficiosos como antioxidantes, que a menudo cambian dramáticamente durante la germinación (Vidal-Valverde *et al.*, 2002).

Los brotes de alfalfa son populares para el consumo humano en ensaladas, sándwiches y la cocina oriental. Contienen vitamina C, E, K, B9 o ácido fólico, pro-vitamina A y sus minerales más abundantes son el potasio, magnesio, calcio, hierro y zinc. Las condiciones de crecimiento durante el proceso de germinación pueden tener efectos importantes en la composición de metabolitos secundarios de importancia nutricional (Kuo *et al.*, 2004). Los

extractos de los germinados de alfalfa, hojas y raíces se ha indicado que pueden ser útiles en la reducción de los niveles de colesterol en animales y humanos. Además, los germinados de alfalfa o las hojas se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de los problemas renales y la artritis (Hong *et al.*, 2009). Esta leguminosa puede reducir el daño al ADN disminuyendo el peróxido de hidrogeno (H₂O₂), lo que puede reducir el riesgo de algunos tipos de cáncer (Marton *et al.*, 2010). Las dietas basadas en vegetales ricos en fitoquímicos, pueden disminuir las enfermedades crónicas degenerativas, como las cardiovasculares y varios tipos de cáncer.

Fuentes de Contaminación Microbiana

En los últimos años, ha aumentado la popularidad de las semillas germinadas debido a su valor nutricional y beneficios a la salud. Sin embargo, los informes de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, asociados con dichos productos vegetales crudos, ha aumentado la preocupación de los organismos de salud pública y de los consumidores (FAO 2013). Los germinados son señalados como una fuente de enfermedades transmitidas por los alimentos en muchas partes del mundo. La Administración de Drogas y Alimentos de los EUA (FDA) clasifica los germinados crudos como un alimento potencialmente peligroso (Penas *et al.*, 2008). Se ha reportado que en el periodo 2007-2011, el número de brotes por enfermedades han aumentado drásticamente (**cuadro 1**), debido a los alimentos que estaban relacionados con semillas germinadas (Safety, 2013).

Los germinados pueden ser contaminados por diferentes tipos de microorganismos a partir de una gran variedad de fuentes, incluyendo el suelo en el que las semillas se cultivan y el agua utilizada en el proceso de producción (Peñas *et al.*, 2010). Varios patógenos, incluida la *Salmonella* spp, *E. coli* O157: H7 (Charkowski *et al.*, 2002), *L. monocytogenes* y *Bacillus cereus* son relacionados con graves causas por el consumo de germinados

Cuadro 1. Brotes reportados de intoxicación alimentaria asociados al consumo de diferentes tipos de germinados.

Año	Tipos de germinados	Número de casos	Microorganismo			
2011	-Alfalfa	21	S. Enteritis			
2010	-Alfalfa	191	<i>Salmonella</i> Spp			
	-Rábano		S. Newport S. Typhimurium			
2009	-Alfalfa	257	S. Cubana S. Saintpaul S. Typhimurium			
			2008	-Alfalfa	51	<i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> O157:H7
						2007
2006	-Frijol	4	S. Braenderup			
2005	-Frijol mungo	2	S. Braenderup			

(Safety, 2013)

contaminados (Jung, W. Y. *et al.*, 2009b). Además, los germinados se consumen generalmente como un producto, sin ningún intento de controlar los microorganismos. Por lo tanto, los riesgos potenciales son altos para el desarrollo de enfermedades graves.

Las hortalizas mínimamente procesadas tienen una carga microbiana inicial relativamente alta que va de 3 a 6 log UFC/g. El uso de un agente de descontaminación en el agua de lavado, se aplica con frecuencia en el proceso de producción, para asegurar la inocuidad y prolongar la vida útil de estos productos (Vandekinderen *et al.*, 2009). Numerosos tratamientos con sustancias químicas en solución, se han evaluado para analizar su efectividad en la destrucción de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en brotes de alfalfa. El hipoclorito de sodio, dióxido de cloro, (Nei *et al.*, 2012) ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, etanol, (Goyal & Siddiqui, 2012) entre otros, han mostrado diferentes rangos de eficacia frente a estos patógenos.

Varios métodos han sido evaluados para la mejora de la seguridad de las semillas, incluyendo el tratamiento térmico (Weiss & Hammes, 2003), la exposición a la radiación ionizante (Yun *et al.*, 2012), ozonólisis (Crowe *et al.*, 2012) y desinfectantes comerciales. Algunos de estos métodos pueden afectar a la germinación de las semillas. Ariefdjohan *et al.* (2004) aplicaron una alta presión hidrostática en semilla de alfalfa como una técnica de descontaminación, dando por resultado una disminución de la carga microbiana de *E. coli* O157 y *L. monocytogenes*, donde las semillas tratadas tomaron más tiempo para germinar y solo se logró el 34% de tasa de germinación.

Jung, W. Y. *et al.* (2009b), utilizaron dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) junto con la temperatura y el tiempo para descontaminar *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* en semillas de alfalfa germinadas. Los resultados demuestran que el tratamiento con presiones de SC-CO₂, temperaturas y tiempos prolongados, obtuvo reducciones microbianas mayores que los tratamientos a presiones, temperaturas bajas y tiempos de tratamiento más cortos. Sin embargo, se observó un deterioro de la capacidad de

germinación de las semillas. Igual es el caso de Peñas *et al.* (2009), donde el porcentaje de germinación disminuyó a medida que la presión y la concentración de carvacrol aumentaba, mientras que la concentración de hipoclorito de calcio no tuvo un impacto significativo sobre la viabilidad de la semilla.

Una ligera reducción en el nivel de contaminación bacteriana se observó después de lavar los brotes con agua antes de su almacenamiento, lo que indica las mejoras en el protocolo de lavado actual, o bien otros métodos de intervención eficaces. Tomados en cuenta, estos resultados sugieren que el control de mejora de la higiene durante la producción y el procesamiento necesitan un ambiente más sanitario (Kim, S. A. *et al.*, 2013). La mayoría de estos tratamientos se han aplicado a las semillas para prevenir la proliferación de microbios patógenos. Sin embargo, hay poca información en la literatura acerca de los tratamientos destinados a reducir la elevada carga microbiana de las semillas, con el fin de aumentar la vida útil de los germinados y también la reducción de patógenos preservando al mismo tiempo la viabilidad de la semilla.

La Aplicación de Extractos Bioactivos en Germinados.

Hoy en día, se presentan dos tendencias muy importantes en el ámbito alimentario, mantener la productibilidad de los cultivos empleando tecnologías ambientales sustentables, y la necesidad de los consumidores de mantener y mejorar su salud empleando alternativas naturales. Es por ello que surge el interés de diferentes investigadores por desarrollar fuentes naturales como desinfectantes en diferentes procesos. Lee *et al.* (2011) evaluaron el efecto de tratamientos con microalgas como fuente nutritiva, sobre el contenido de compuestos fitoquímicos funcionales en germinados de brócoli. Sus resultados indican que las soluciones de microalgas mejoran el contenido de compuestos funcionales en germinados de brócoli y el contenido de sustancias fitoquímicas.

La alelopatía es un fenómeno biológico por el cual un organismo produce uno o más compuestos bioquímicos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos. Por lo que, se evaluó el potencial alelopático de diferentes concentraciones de extractos de girasol (*Helianthus annuus*, L.), maíz (*Zea mays*, L.), frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) y boniato (*Ipomoea batata*, L.) sobre el crecimiento y desarrollo inicial del frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.). Los resultados indicaron un efecto negativo de estos extractos sobre la germinación, supervivencia y longitud del tallo de los germinados obtenidos (Blanco, 2012).

El ácido caprílico y monocaprilina, se ha utilizado en diferentes investigaciones como antimicrobiano. Chang *et al.* (2010) aplicaron extractos de ácido caprílico y monocaprilina para la reducción de *E. coli* O157: H7 y *Salmonella* spp. Los resultados mostraron que monocaprilina a concentraciones de 75 mM se puede utilizar para reducir *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. En semillas de alfalfa, sin comprometer la viabilidad de la semilla. Podría ser una buena fuente natural para la desinfección de las semillas listas para germinar.

La flor de Jamaica se considera que tiene propiedades antihipertensivas, se ha usado en la medicina popular como un diurético, laxante suave y el tratamiento para las enfermedades cardíacas, nerviosas y cáncer. Jaroni y Ravishankar (2012) estudiaron el efecto de extractos de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) contra varios patógenos, *E. coli* O157: H7, *Salmonella enterica* y la supervivencia de *L. monocytogenes* en germinados de alfalfa, donde se encontró que a las 24 h, a 4, 8 y 25 °C, se inhibió *E. coli* O157: H7, *Salmonella enterica* y *L. monocytogenes*, por lo que sugieren utilizar la aplicación de extractos de flor de Jamaica como antimicrobianos potenciales en los alimentos.

Propiedades Bioactivas de Subproductos de la Granada

El fruto de las Granada (*Punica granatum* L.) pertenece a la familia Punicácea. El cultivo de la granada es originario de Oriente Medio y más tarde fue conocido en el Mediterráneo. El fruto de Granada crece bien en climas subtropicales, semiárido y templado, donde el aire es seco, los veranos son calurosos y los inviernos son fríos, tales como Afganistán, Irán, India, China, Japón, Estados Unidos (California), España, Egipto, Turquía, Grecia, Rusia y México (Vahid Akbarpour, 2009). La producción en México durante el 2012 alcanzó 4051.87 toneladas obtenidas de 600.60 hectáreas, donde los principales productores son Oaxaca, Hidalgo, Guanajuato y Sonora (SIAP, 2013). Tiene gran popularidad actualmente en Norteamérica, Europa y los países árabes. Es uno de los frutos comestibles más antiguos y que popularmente se consume como fruta fresca, en bebidas y como producto alimenticio.

La parte comestible de la fruta de la granada (50%) se compone de 40% arilos y 10% de las semillas, el otro 50% se compone de las membranas y la cáscara. Los arilos contienen 85% de agua, 10% de azúcares; fructosa y glucosa principalmente, 1.5% de pectina y ácidos orgánicos; como ácido ascórbico, ácido cítrico y ácido málico, compuestos bioactivos; como compuestos fenólicos y antocianinas (Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, *et al.*, 2010). Las membranas y las cáscaras son desechadas y no son aprovechadas, principalmente la cáscara contiene diferentes compuestos bioactivos que pudieran ser aprovechados.

El estudio de los componentes bioactivos de la granada y sus efectos benéficos en la salud humana, es un campo de investigación de gran interés (Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, *et al.*, 2010). Se ha comprobado mediante numerosos estudios científicos que tanto la granada como sus productos derivados, contienen numerosos componentes que pueden servir para la prevención de enfermedades.

Compuestos Bioactivos de la Cáscara de Granada.

La fruta de granada, y sus subproductos (cáscara o semillas) son una fuente de carbohidratos, minerales, fibra y diversos compuestos bioactivos, tales como la vitamina C, y ciertos compuestos fenólicos como punicalagina, ácido elálgico, galotaninos y antocianinas, que son conocidos por sus usos terapéuticos (Noda *et al.*, 2001). Los polifenoles son un grupo importante de fitoquímicos en la granada, que actúan como antioxidantes naturales relacionados con beneficios potenciales para la salud (Alighourchi & Barzegar, 2009; Naz, S. *et al.*, 2007b) ya que es consumida como fruta fresca, jugos de frutas, concentrado de jugo de frutas, mermelada, vino o licor.

Las antocianinas son compuestos polifenólicos que son responsables de los colores rojo, azul y púrpura de la mayoría de las flores y frutas que se clasifican como flavonoides (da Costa *et al.*, 2000). El atractivo color es una de las características sensoriales más importantes de los productos de granada. El color rojo del jugo de la granada se asocia principalmente con el pigmento de la antocianina presente en la granada.

Fischer *et al.* (2011), estudiaron los compuestos fenólicos extraídos de cáscara, mesocarpio y arilos de granada, entre los cuales se detectaron; 9 antocianinas, 2 galotaninos, 22 elagitaninos, 4 ácidos hidroxibenzoicos, 7 ácidos hidroxicinámicos y 1 dihidroflavonol. Alighourchi *et al.* (2008) detectaron las antocianinas principales en 15 variedades estudiadas: delphinidina 3-glucósido (2.19 a 16.29 mg/L), delphinidina 3,5-diglucósido (2.36 a 63.07 mg/L), pelargonidin 3-glucósido (0.26 a 1.36 mg/L), pelargonidin 3,5-diglucósido (0.01 a 8.11 mg/L), cianidina 3-glucósido (5.78 a 30.38 mg/L), y cianidina 3,5-diglucósido (4.39 hasta 166.32 mg/L). Las principales antocianinas obtenidas a partir de varios cultivares se han aislado e identificado como delphinidina, cianidina, y pelargonidina 3-glucósidos y 3,5-diglucósidos (Miguel *et al.*, 2004).

Entre las diferentes plantas de granada, el contenido de antocianinas totales puede variar considerablemente, afectado por la genética, luz, temperatura y factores agronómicos.

El bagazo de granada obtenido como sub-producto en el proceso para obtener jugo se puede considerar una buena fuente de compuestos naturales con actividad antioxidante significativa. Como un subproducto, la cáscara de granada es rica en elagitaninos, tales como la punicalagina (15.7%) y sus isómeros, así como de pequeñas cantidades de punicalina (2%), ácido gálico, ácido elágico (3%) y oligómeros (77%) (Aguilar *et al.*, 2008). Lo que podría ser adecuado para aplicaciones en la industria alimentaria como ingrediente potencial en sus productos (Viuda-Martos, M. *et al.*, 2011) y sustituir a los compuestos sintéticos.

Capacidad Antimicrobiana

Las enfermedades transmitidas por alimentos siguen siendo una preocupación importante para los consumidores, la industria y las autoridades de seguridad alimentaria. Mientras tanto, los consumidores han estado cuestionando la seguridad de los conservadores sintéticos de los alimentos (Kher *et al.*, 2012). La expansión mundial de patógenos resistentes a antibióticos como la meticilina, tales como *Staphylococcus aureus* han reactivado la búsqueda de compuestos antimicrobianos de origen natural, incluyendo las plantas (Picazo *et al.*, 2011). Especies y hierbas han sido añadidos a los alimentos desde la antigüedad, no sólo como agentes aromatizantes, sino también como medicina popular y conservadores alimentarios (Ayala-Zavala, J Fernando, Oms-Oliu, *et al.*, 2008). Los extractos de cáscara de granada presentan inhibición antimicrobiana en diferentes tipos de alimentos, frente al deterioro causado por microorganismos; se ha relacionado esto con el contenido de fenoles totales.

Pocos estudios han sugerido el mecanismo involucrado en la inhibición de microorganismos por parte de los compuestos fenólicos (**figura 1**). Se supone que hay una interacción de compuestos fenólicos con proteínas microbianas en la membrana celular con los grupos sulfhidrilo, produciendo cambios en la funcionalidad de las proteínas y la muerte celular (Naz, S *et al.*, 2007a), además pueden causar cambios en la membrana celular a través de la interacción con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas embebidas alterando la permeabilidad. Por otro lado, los ácidos fenólicos y flavonoides pueden quelar metales importantes para la actividad enzimática metabólica y presentar efectos negativos en la síntesis del material genético y de proteínas de los microorganismos (Negi, 2012). Lo cual promueve una alteración del pH y potencial eléctrico, provocando una salida del contenido citoplasmático, afectando la viabilidad celular (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009).

La cáscara de granada rica en taninos son subproductos de la industria alimentaria, y en algunos casos se utilizan en la alimentación animal o simplemente son desechadas. De hecho, la actividad antimicrobiana de la cáscara se ha manifestado contra bacterias patógenas (Reddy *et al.*, 2007; Shan *et al.*, 2007). La actividad antimicrobiana de extractos de cáscaras de granada (ECG) se evaluó contra algunos patógenos transmitidos por los alimentos por varios métodos, tanto *in vitro* (difusión en agar) e *in situ* (la comida). El ECG metanólico al 80% fue un potente inhibidor de la *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* y *Yersinia enterocolitica*. La concentración mínima inhibitoria (MIC) de ECG contra *Salmonella enteritidis* fue de 4 mg/ml. El ECG disminuyó a *L. monocytogenes* en pescado durante el almacenamiento a 4 °C (Al-Zoreky, N. S., 2009b). El análisis fitoquímico reveló la presencia de inhibidores activos en la cáscara, incluyendo compuestos fenólicos y flavonoides.

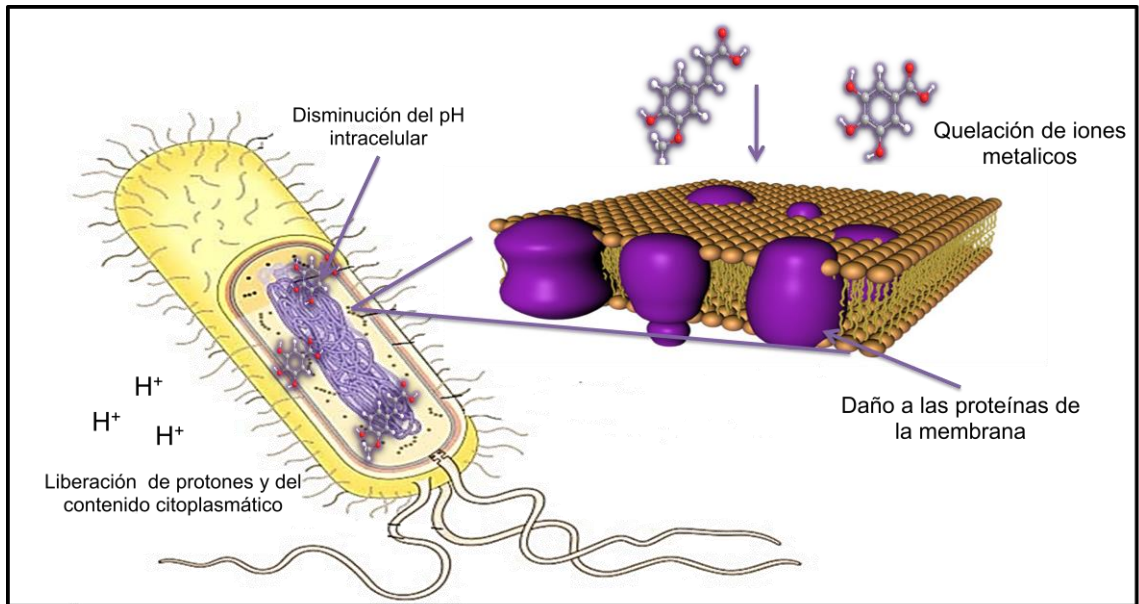


Figura 1. Mecanismo de acción antimicrobiano de los compuestos fenólicos que afectan la funcionalidad de enzimas y de la membrana microbiana.

L. monocytogenes se ha convertido en un importante problema de salud pública, el Centro de Control de Enfermedades (CDC) estima que cerca de 1600 personas se enferman gravemente con listeriosis cada año en los Estados Unidos, y mueren cerca de 260 (Muñoz *et al.*, 2013). Es por eso, la importancia de investigar sobre la inhibición de *L. monocytogenes*, pues es un problema grave para la salud.

Hay pocos datos disponibles sobre la actividad inhibidora de la granada hacia *L. monocytogenes*, sin embargo, en una investigación Hayrapetyan *et al.* (2012) evaluaron el ECG para ser utilizado como un conservador natural en carnes listas para consumir a distintas temperaturas, no fueron detectadas células viables de *L. monocytogenes* después de la incubación en presencia de ECG a 24.7 mg/mL, esta misma concentración se probó frente a *L. monocytogenes* en paté de carne a diferentes temperaturas: A 4 °C durante 46 días, el extracto inhibió 4.1 log UFC / g. La sensibilidad de *L. monocytogenes* a diferentes temperaturas, puede ser atribuida a los cambios en la fluidez de la membrana que provocaron estos compuestos (Jie Li, 2002). Los resultados indicaron que el ECG tiene un potencial para ser utilizado como un conservador natural en los productos cárnicos.

Karabiyikli y Kislá (2012), utilizaron una “salsa agria tradicional de granada” muy popular en Turquía, para dar sabor a varios alimentos como ensaladas y aperitivos. Es un producto alimenticio amargo, producido por la clarificación y evaporación de los jugos de frutas que se han obtenido por prensado de los frutos de granada. Evaluaron su efecto inhibidor sobre *Staphylococcus aureus* y *E. coli* O157: H7 en lechuga, cebollín y perejil. Los resultados mostraron que ésta, tenía un efecto antimicrobiano sobre la microflora bacteriana de lechuga, cebollín y perejil, se encontró que el tiempo de aplicación era un parámetro crucial para la reducción bacteriana.

Los microorganismos tales como hongos son uno de los factores más importantes que causan los procesos de deterioro durante la etapa de poscosecha. En un estudio se evaluaron los subproductos de granada como un

potente antifúngico en hongos *Penicillium italicum*, *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinérea in vitro*, causantes del deterioro poscosecha. Los resultados demostraron que subproductos como la cáscara y la semilla de granada tienen un efecto inhibitorio sobre los hongos, (Tehranifar *et al.*, 2011) esto es debido al contenido de compuestos fenólicos presentes.

Capacidad Antioxidante

Los informes de las cualidades terapéuticas de la granada han hecho eco a lo largo de los siglos. Tanto estudios *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que esta fruta actúa como antioxidante, antidiabético, hipolipidémico y muestra actividades antibacterianas, antiinflamatorias, antivirales y anticancerígenas. La fruta también mejora la salud cardiovascular. Estos efectos fisiológicos beneficiosos, también pueden tener aplicaciones preventivas en una variedad de patologías. Los beneficios para la salud de la granada se han atribuido a su amplia gama de fitoquímicos, que son predominantemente polifenoles, incluyendo principalmente elagitaninos hidrolizables, antocianinas, y otros polifenoles (Viuda-Martos, M, Fernández-López, *et al.*, 2010).

A los compuestos fenólicos se les han atribuido propiedades antioxidantes debido a su capacidad para inhibir radicales libres que pueden causar reacciones de oxidación y daños a moléculas importantes. Los antioxidantes pueden neutralizar, inhibir la formación o propagación de radicales libres y quelar metales importantes para enzimas de oxidación (**figura 2**). Los compuestos polifenólicos tienen la capacidad de estabilizar radicales libres vía donación de hidrógeno o de electrón y su actividad antioxidante está dada por el número y localización de sus grupos hidroxilos en el anillo aromático (Sánchez *et al.*, 2007).

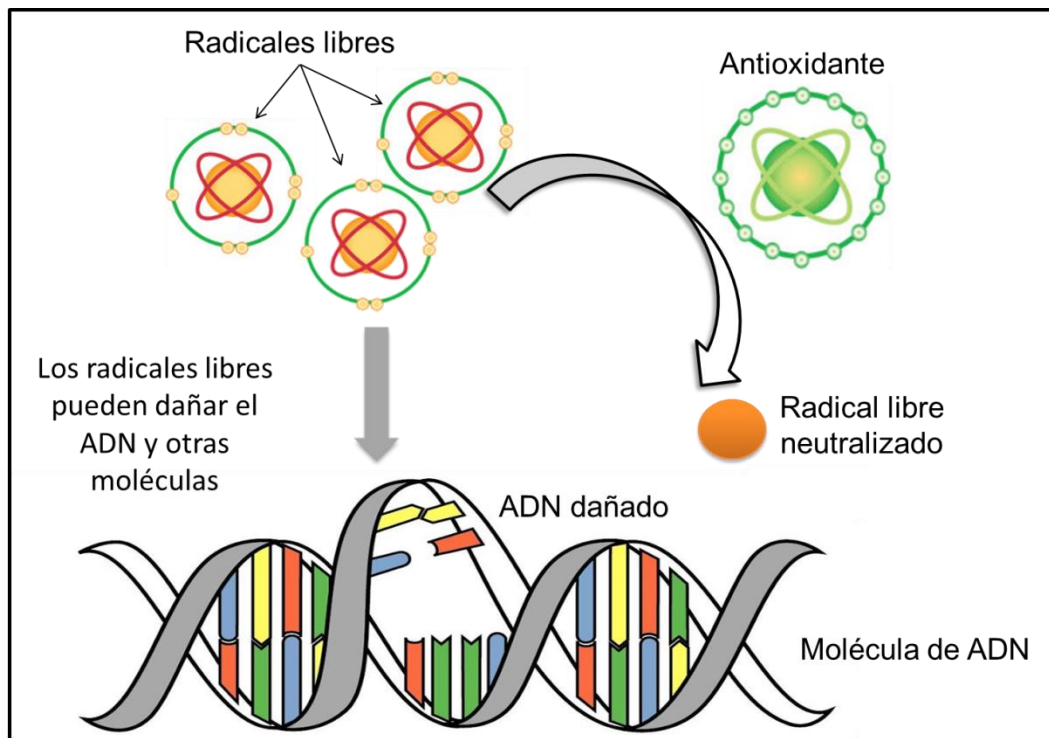


Figura 2. Capacidad de los compuestos fenólicos para neutralizar radicales libres mediante la donación de electrones y proteger biomoléculas del daño oxidativo.

Parmar y Kar (2007) informaron que la administración de 200 mg/kg de ECG, normalizaron todos los cambios adversos inducidos por aloxano, un compuesto ampliamente utilizado para la inducción de la diabetes mellitus. Este compuesto incrementa los niveles séricos de glucosa de la actividad α -amilasa y la peroxidación lipídica, hepática, cardíaca y en los tejidos renales. Lo que subraya el potencial antidiabético y antiperoxidativo de los ECG.

La actividad antioxidante de la granada dependen de la parte de la fruta empleada, estudios han confirmado que la actividad antioxidante de los extractos de plantas depende de la concentración de compuestos fenólicos. El poder antioxidante de los fenoles del ECG se ha encontrado que aumenta en comparación con extractos de otros tejidos de la granada. Se ha reportado que el extracto metanólico de la cáscara de granada, tuvo mucho mayor capacidad antioxidante que el de las semillas (Singh *et al.*, 2002). La cáscara de granada tuvo la actividad antioxidante más alta entre las fracciones de hoja, pulpa y semilla de 28 clases de granada consumidas comúnmente en China (Guo *et al.*, 2003). Por lo tanto, los ECG tienen un gran potencial como un suplemento para la salud rico en antioxidantes naturales (Li *et al.*, 2006).

HIPOTESIS

Extractos de cáscara de granada, ricos en compuestos fenólicos, reducen la carga microbiana y aumentan la capacidad antioxidante en germinados de alfalfa

OBJETIVOS

Objetivo General

Reducir la carga microbiana y aumentar la capacidad antioxidante de germinados de alfalfa mediante la aplicación de extracto de cáscara de granada rico en compuestos fenólicos.

Objetivos Específicos

- Obtener un extracto de cáscara de granada rico en compuestos fenólicos con capacidad antimicrobiana y antioxidante.
- Valorar el efecto antimicrobiano y antioxidante de la adición de extractos de cáscara de granada sobre germinados de alfalfa..

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del Material Vegetal

El material vegetal del fruto de granada se obtuvo de la población de San Pedro, Hermosillo, Sonora. El fruto fue procesado retirando la cáscara manualmente, se cortó en trozos pequeños y se dividió para realizar dos extracciones (acuosa y etanólica).

Etapa 1

Preparación de los Extractos de Cáscara de Granada

Se realizaron dos extracciones de la cáscara de granada, una acuosa y una etanólica, para la extracción etanólica se pesaron 10 g de cáscara de granada y se colocaron en recipientes conteniendo 100 mL de etanol: agua (7:3 v/v). Las muestras se dejaron macerar en la oscuridad por 10 días a 25°C. Después de este tiempo, los extractos fueron filtrados y el etanol fue evaporado a sequedad usando un rotavapor a 63 rpm, a presión reducida y a 45°C. A la fracción obtenida se le realizó una hidrólisis alcalina (10 mL de NaOH 4 M), durante 4 h en oscuridad. Posteriormente se le realizó una hidrólisis ácida con HCl 4 M, hasta alcanzar un pH de 2. La solución de la hidrólisis fue vaciada en viales de

50 mL (30 mL de solución) y fueron congeladas a -20°C para ser liofilizadas. A partir del material liofilizado se realizaron los análisis del extracto etanólico. Por otro lado, la extracción acuosa se realizó pesando 1 g de cáscara de granada seca y triturada, se mezclaron en 40 mL de agua destilada. La mezcla se llevó a baño de agua (100°C) por 30 min. Se filtró y se almacenó a -35°C para su posterior uso (Ayala-Zavala, Jesus Fernando *et al.*, 2012). Se calculó el porcentaje de recuperación de cada extracto.

Contenido de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales de los extractos se determinó de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) con algunas modificaciones. En un pozo de una microplaca se agregaron 75 μL de reactivo de Folin (1:10), 15 μL del extracto y por último, 60 μL de Na_2CO_3 al 7.5 %. Esta mezcla se dejó reposar en la oscuridad durante 30 min, las mediciones se realizaron en un lector de microplacas (FLUOstar omega-BMG LABTECH) a 748 nm. Se preparó una curva de calibración de ácido gálico, reportando los resultados como mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto (mg EAG/g p.s.).

Contenido de Flavonoides Totales

La determinación de flavonoides totales se realizó por el método descrito por Zhishen y col. (1999) con algunas modificaciones. En viales de 2 mL se agregaron 100 μL de la muestra y se mezclaron con 430 μL de la solución A (1.8 mL de NaNO_2 al 5% con 24 mL de agua destilada) y se dejó reposar durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 30 μL de AlCl_3 al 10% y se dejó reposar por 1 min. Finalmente se agregaron 440 μL de la solución B (12 mL de

NaOH 1M con 14.4 mL de agua destilada). De esta reacción se tomaron 150 μ L y se colocaron en pozos de la microplaca para leer la absorbancia a 496 nm en el lector de microplacas. La absorbancia se comparó con una curva estándar de quercetina. Los resultados fueron expresados como mg de equivalentes de quercetina por gramo de muestra en peso seco (mg EQ/g p.s).

Identificación y Cuantificación de los Compuestos Fenólicos por UPLC

Se realizó una identificación de los principales compuestos fenólicos en los extractos de cáscara de granada, se utilizó cromatografía líquida de ultra-desempeño (UPLC), los análisis se llevaron a cabo mediante el uso de un sistema de la marca Waters vinculados simultáneamente a un detector de matriz de fotodiodos (PDA 2996). La longitud de onda de detección ultravioleta se fijó en el software Empower (Waters) fue usado para el control de los instrumentos, así como para la adquisición y procesamiento de datos. El análisis se realizó a 30 ° C utilizando una columna de fase inversa (BEH C18, 1.7 mm, 2.1 x 100 mm; Waters). La fase móvil consistió en disolvente A (7.5 mM de ácido acético) y el disolvente B (acetonitrilo) a una velocidad de flujo de 250 mL/min (Fратиanni *et al.*, 2011; Gruz *et al.*, 2008). La elución en gradiente se utilizó a partir de 5% de disolvente B durante 0.8 min, B 5-20% de disolvente para 5.2 min, 20% de disolvente B isocrático durante 0.5 min, disolvente B 20-30% durante 1 min, 30% de disolvente B isocrático durante 0.2 min, 30-50% de disolvente B durante 2.3 min, 50-100% de disolvente B durante 1 min, 100% de disolvente B isocrático durante 1 min, y finalmente 100-5% de disolvente B durante 0.5 min. Al final de esta secuencia, la columna se equilibró en las condiciones iniciales durante 2.5 min. La presión oscila desde 6.000 a 8.000 psi durante la ejecución de la cromatografía. El efluente se introdujo a un detector de cromatografía líquida (el alcance de detección, 210 a 400 nm, la resolución, de 1.2 nm). El volumen de inyección fue de 5 o 10 μ L. La identificación se realizó por la comparación de espectros UV, utilizando una base de datos

previamente realizada con sustancias de referencia. La cuantificación se realizó utilizando curvas estándar de los compuestos correspondientes y se reportó como mg del compuesto/g de peso seco.

Actividad Antimicrobiana *in vitro* de los Extractos de Cáscara de Granada.

La capacidad antimicrobiana de los extractos de cáscara de granada se probó contra la bacteria Gram positiva *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, la bacteria Gram negativa *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 y la levadura *Candida tropicalis* ATCC 1369. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó empleando la técnica de microdilución en caldo, para la preparación de los inóculos se tomó una azada de cada bacteria y levadura, se inoculó en caldo Mueller Hinton y PDA, incubándose durante 19 h a 37°C para las bacterias y 5 días a 25°C para la levadura. Posteriormente, la densidad óptica fue comparada con un tubo de 0.5 sobre la escala de McFarland (108 UFC/mL) para cada microorganismo. En una microplaca se añadieron 5 µL del inóculo microbiano y 295 µL del extracto antimicrobiano (diluido en agar Difco Mueller Hinton y/o Caldo PDA) a diferentes concentraciones, se dejó incubando durante 24 h a 37 °C y 5 días a 25°C. La concentración más baja de cada uno de los extractos en mostrar una zona clara de inhibición se tomó como la CMI. Una vez encontradas las CMIs de los extractos para cada microorganismo, se realizaron por triplicado curvas de sensibilidad del crecimiento microbiano al ser expuestos al extracto utilizando el lector de microplacas a 37 °C para bacterias y 25 °C para la levadura, la absorbancia se estableció en el modo de lectura a 600 nm con agitación orbital durante 30 s antes de cada lectura. Esto fue programado para realizar mediciones individuales durante un periodo de 24 h para las bacterias y de 120 h para la levadura. Los datos del crecimiento de cada microorganismo fueron procesados utilizando la función de Baranyi *et al.* (1993) en un programa computacional, utilizando los parámetros cinéticos de crecimiento como el

tiempo de duración de la fase Lag (h), La tasa de crecimiento exponencial (μ_{max}), y el crecimiento máximo en la fase estacionaria (Y_{max}).

Método Inhibición del Radical Estable (DPPH*)

Para determinar la capacidad antioxidante de los extractos de cáscara de granada, en un pozo de la microplaca se añadieron 10 μ L de cada extracto y posteriormente se agregó 140 μ L del DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazilo) ajustado. La solución se dejó reposar 30 min en la oscuridad, para posteriormente, leer la absorbancia de las muestras a 518 nm (González-Aguilar *et al.*, 2007). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del radical.

Método Capacidad Antioxidante Equivalentes Trolox (TEAC)

Se preparó una solución stock del radical donde se disuelven 19.3 mg del radical ABTS en 5 mL de agua destilada, y por separado, se preparó una solución de $K_2S_2O_8$ (37.8 mg en 1 mL de agua destilada). Posteriormente se tomaron 88 μ L de la solución de persulfato y se añadieron a los 5 mL de la solución de ABTS. Esta mezcla se dejó reposar durante 16 h en la oscuridad, la cual es estable durante una semana. Para la preparación de la solución de trabajo se tomaron 0.5 mL de la solución stock y se adicionaron a 35 mL de etanol puro, y se ajustó la absorbancia a 0.7, leyendo a 754 nm. Posteriormente en una microplaca se adicionaron 5 μ L de extracto y 245 μ L del radical previamente ajustado, se dejó reposar en la oscuridad 5 min y se midió la absorbancia a 754 nm. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes Trolox (ET)/g del extracto (Re *et al.*, 1999).

Análisis Estadístico

Se realizó un diseño experimental completamente al azar. Donde los factores a analizar fueron los dos tipos de extractos (acuoso y etanólico) y las variables de respuesta fueron el contenido de fenoles totales y flavonoides, la actividad antimicrobiana (MICs de los extractos contra *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, y *C. tropicalis*), los parámetros cinéticos de los microorganismos, capacidad antioxidante (DPPH y TEAC) y el porcentaje de recuperación (peso inicial menos el peso final entre el peso inicial). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para estimar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos y se aplicó la prueba de comparación de medias por el método de Tukey-Kramer. En el paquete estadístico NCSS (2007).

Etapa 2

Aplicación del Extracto de Cáscara de Granada a Germinados de Alfalfa.

Los germinados de alfalfa elaborado por Poder Germinado S.A. de C.V. (marca: Cultivos Naturales San Francisco) fueron adquiridos por un distribuidor local. Para evaluar el efecto antibacteriano y capacidad antioxidante, los germinados de alfalfa se pesaron en muestras de 10 g (por triplicado para cada tratamiento), estos fueron sumergidos por 5 min en diferentes tratamientos: un testigo sin desinfección, lavado con agua, desinfección a 200 ppm de hipoclorito de sodio y las dos concentraciones del extracto acuoso de cáscara de granada (25 mg/mL y 50 mg/mL).

Caracterización Fisicoquímica de los Germinados de Alfalfa

Se realizaron pruebas fisicoquímicas acides titulable (AT), pH y sólidos solubles totales (SST) (AOAC, 1990) en los germinados de alfalfa. La AT (% ácido cítrico) y el pH se determinó a partir de 10 g de muestra homogenizada en 50 mL de agua destilada, utilizando un titulador automático Mettler (Modelo DL21) los resultados se expresaron como pH y mg de ácido cítrico por peso fresco. Los SST fueron medidos con un refractómetro digital Abbé y los resultados se expresaron como % de sólidos solubles totales.

Análisis microbiológicos de los germinados de alfalfa

Para evaluar el efecto de los tratamientos aplicados sobre el crecimiento microbiano, se tomaron 10 g de muestra de los germinados de alfalfa, se realizaron diluciones 1:9 en una solución de agua peptonada y se homogenizó por 10 min, posteriormente se realizaron diluciones decimales por triplicado para evaluar diferentes microorganismos. El conteo de psicrófilos se realizó incubando las placas de agar cuenta total inoculadas durante 7 días a 4-5°C. Los coliformes totales se realizaron en un medio selectivo (agar rojo violeta bilis), se incubaron a 35°C por 24 h. Los hongos y levaduras se incubaron durante 5 días a 25°C utilizando agar dextrosa de papa. Transcurrido el tiempo se contaron las colonias y se reportaron como Log unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g).

Cuadro 2. Caracterización fisicoquímica del germinado de alfalfa utilizado en este estudio.

Parámetros	Valores
Acidez titulable (% ácido cítrico)	0.260 ± 0.001*
Sólidos solubles totales (°Brix)	5.16 ± 0.057
pH	6.11 ± 0.020

* Media de tres determinaciones ± error estándar ($P \leq 0.05$).

Capacidad Antioxidante en los Germinados de Alfalfa

Para determinar la capacidad antioxidante en los germinados de alfalfa con el extracto de cáscara de granada, primero se tomaron 10 g de muestra de cada tratamiento, se homogenizó en 20 mL de metanol al 80%. EL homogenizado se sometió a sonicado (Branson 2510R-DTH) por 30 min sin calor (1°C) y centrifugado (centrifuga Beckman Coulter, Allegra 64R) a 1200 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se filtró con papel Whatman No 1. El mismo procedimiento se realizó dos veces con un volumen de 10 mL de metanol al 80%, el volumen de los sobrenadantes se juntó y filtró, se llevaron a un volumen de 50 mL con metanol al 80%. A este extracto se le evaluó la capacidad antioxidante por los métodos descritos anteriormente (DPPH y TEAC).

Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar. Donde los factores a analizar fueron los tratamientos (Testigo, agua, cloro, ECG 25 y 50 mg/mL) sobre la carga microbiana (análisis microbiológicos) y antioxidante (DPPH y TEAC). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para estimar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos y se aplicó la prueba de comparación de medias por el método de Tukey-Kramer. En el paquete estadístico NCSS (2007).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Etapa 1.- Obtención de los Extracto de Cáscara de Granada Ricos en Compuestos Fenólicos con Capacidad Antimicrobiana y Antioxidante.

Contenido de Compuestos Fenólicos de los Extractos de Cáscara de Granada

En el **cuadro 3** se muestra el contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto acuoso y etanólico de cáscara de granada. Se puede observar que en fenoles totales presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$), el extracto acuoso presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos con 154.53 mg EAG/g p.s. y para el extracto etanólico 111.81 mg EAG/g p.s., no así para flavonoides totales donde los valores no muestran diferencias ($P > 0.05$) para los extractos acuoso y etanólico, con 45.74 y 50.45 mg EQ/g p.s.

Para contrastar nuestros datos Rajan y col., (2011) evaluaron el contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto acuoso y etanólico de cáscara de granada obteniendo 176 mg EAG/g y 81.3 mg EQ/g para el extracto acuoso y 122.33 mg EAG/g y 135.33 mg EQ/g para el extracto etanólico, estos valores son similares a los obtenidos en nuestro estudio. Saad y col. (2012), reportan el contenido de fenoles totales de 174.5 mg EAG/g para el extracto acuoso y 6.48 mg EAG/g para el extracto etanólico de cáscara de granada. Al igual que Al-Zoreky (2009a) reporta el contenido de compuestos fenólicos de extractos de

Cuadro 3. Contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos de cáscara de granada.

Tipo de extracto	Fenoles totales (mg EAG/g p.s.)	Flavonoides totales (mg EQ/g p.s.)
Acuoso	154.53 ±1.72*	45.74 ±4.76
Etanólico	111.81 ±3.66	50.45 ±4.87

* Diferencia significativa entre los extractos ($p \leq 0.05$).

-Los valores son la media de tres repeticiones ± desviación estándar (DE).

cáscara de granada, fue de 82.5 mg EAG/g para el extracto acuoso y 6.2 mg EAG/g para el extracto etanólico, similar a nuestros resultados, donde el extracto acuoso presentó mayor contenido de fenoles totales respecto al extracto etanólico.

Los datos reportados en nuestro estudio del contenido de fenoles y flavonoides totales, son mayores a los reportados en otros estudios con diferentes subproductos de otras frutas como la cáscara de mango (70.1 mg EAG/g y 21.2 mg EQ/g) (Kim, H. *et al.*, 2010) y cáscara de papaya (63.59 mg EAG/g y 23.45 mg EQ/g) (Vuong *et al.*, 2013). Como se pudo observar los resultados de compuestos fenólicos y flavonoides totales para los extractos de cáscara de granada se encuentran dentro de los rangos reportados para el mismo tipo de subproducto y son superiores para subproductos de otro tipo de frutos.

Identificación y Cuantificación de Compuestos Fenólicos Presentes en los Extractos

En la **figura 3** se muestra el cromatograma correspondiente al extracto acuoso de cáscara de granada. Se identificaron 5 compuestos, ácido gálico, ácido clorogénico, catequina, rutina y ácido ferúlico. Los componentes mayoritarios identificados en el extracto acuoso fueron el ácido clorogénico, con una concentración de 2990.89 $\mu\text{g/g}$ de extracto y la rutina con 514.19 $\mu\text{g/g}$. otros compuestos minoritarios identificados en este extracto fueron el ácido gálico con 318.47 $\mu\text{g/g}$, catequina con 98.18 $\mu\text{g/g}$ y ácido ferulico con 67.41 $\mu\text{g/g}$. En la **figura 4** se muestra el cromatograma correspondiente al extracto etanólico de cáscara de granada, donde se identificaron 5 compuestos, el ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido cumárico y catequina. Los componentes mayoritarios identificados en el extracto etanólico fueron el ácido clorogénico con 1540.31 $\mu\text{g/g}$ y el ácido cafeico con 399.37 $\mu\text{g/g}$. otros compuestos minoritarios identificados en este extracto fueron el ácido gálico

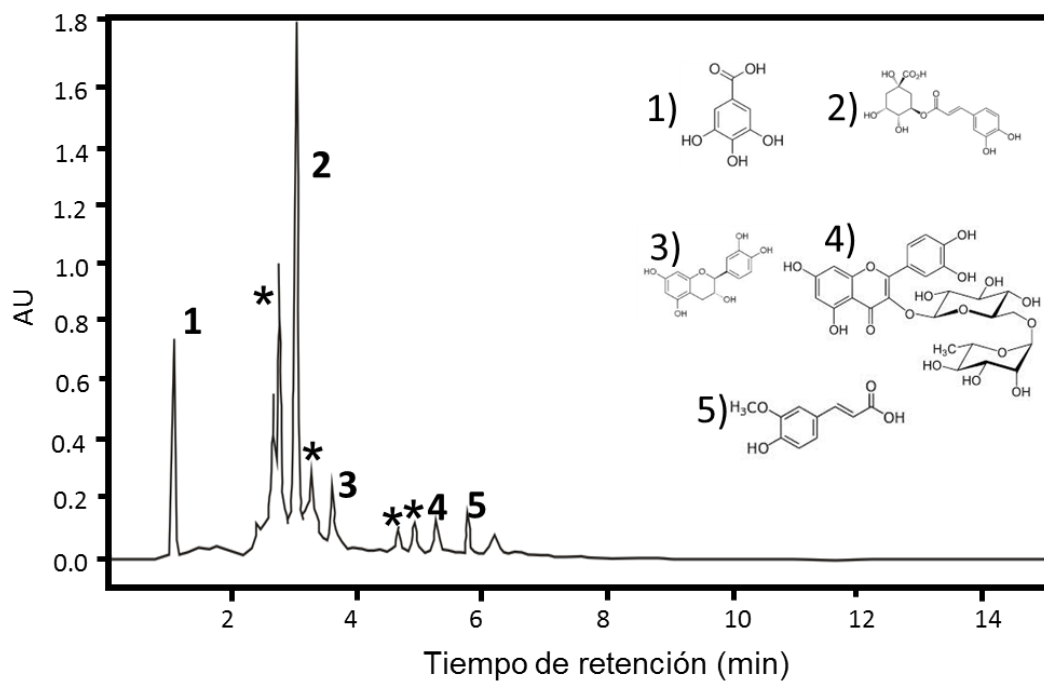


Figura 3. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos del extracto acuoso de cáscara de granada. 1) Ácido gálico, 2) ácido clorogénico, 3) catequina, 4) rutina y 5) ácido ferúlico. *No Detectado.

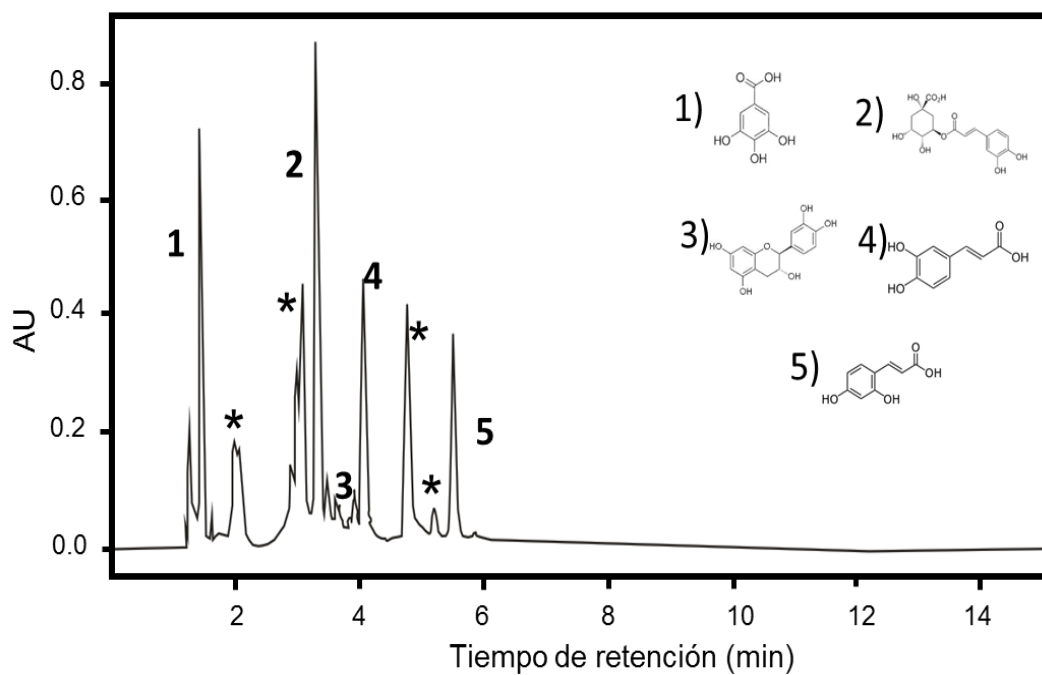


Figura 4. Identificación y cuantificación del contenido de compuestos fenólicos en el extracto etanólico de cáscara de granada, 1) ácido gálico, 2) ácido clorogénico, 3) catequina, 4) ácido cafeico y 5) ácido cumárico. *No Detectado.

Cuadro 4. Contenido de compuestos fenólicos identificados en el extracto acuoso y etanólico de cáscara de granada.

Compuestos	Tipo de extracto ($\mu\text{g/g}$)	
	Acuoso	Etanólico
Ácido gálico	318.47	280.56
Ácido clorogénico	2990.89	1540.31
Catequina	98.18	72.37
Ácido cafeico	ND	399.37
Ácido cumárico	ND	82.17
Rutina	514.19	ND
Ácido ferúlico	67.41	ND

-Los valores son la media de tres repeticiones. *Diferencia significativa entre los extractos ($p \leq 0.05$). ND= No Detectado

con 280.56 µg/g, ácido cumárico con 82.17 µg/g y catequina con 72.37 µg/g. Sin embargo, algunos compuestos presentes en ambos extractos no fueron identificados. Comparando ambos extractos con los compuestos identificados encontramos más compuestos fenólicos en el extracto acuoso.

Estudios previos analizaron diferentes tipos de extractos del fruto de granada (cáscara, pulpa, semilla y hojas) (Fischer *et al.*, 2011), encontrando diferentes compuestos fenólicos. En total se

detectaron 48 compuestos, entre los que se identificaron principalmente antocianinas, galotaninos, elagitaninos, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, dihidroflavonol y algunos compuestos no identificados. Otros estudios demuestran la presencia de compuestos fenólicos, como el ácido gálico, ácido elágico y la punicalagina como principales componentes de la cáscara (Qu *et al.*, 2012). Las diferencias en composición presentadas entre los extractos reportados por la literatura y el del presente estudio pueden deberse a la variedad y estado de madurez del fruto analizado.

Algunos factores a considerar en la extracción de compuestos fenólicos son el tipo de solvente utilizado, ya que pueden extraer diferentes compuestos en diferentes cantidades, debido al tipo de polaridad que estos poseen (Bimakr *et al.*, 2011), así como la hidrólisis con ácidos y bases (Cardenas-Toro *et al.*, 2014), debido que los compuestos complejos son hidrolizados durante la obtención del extracto a compuestos más sencillos y esta composición puede afectar las propiedades bioactivas del extracto en cuestión.

Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del Extracto Acuoso y Etanólico de Cáscara de Granada

En el **cuadro 5** se muestran los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos acuoso y etanólico

de cáscara de granada. Ambos extractos presentaron efectividad contra los microorganismos evaluados, siendo el extracto acuoso el que mostró mayor actividad para inhibir el crecimiento de éstos. Se encontraron CMI del extracto acuoso de 19 mg/mL para *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, y de 30 mg/mL para *C. tropicalis*. Las concentraciones utilizadas por el extracto etanólico fueron mayores a las del extracto acuoso, inhibiendo a *L. monocytogenes* con 24 mg/mL, *S. Typhimurium* 27 mg/mL y *C. tropicalis* con 30 mg/mL.

Aun cuando la sensibilidad mostrada por las bacterias frente al extracto acuoso no presentó una relación con respecto al estatus Gram de éstas, este efecto si se observó al aplicar el extracto etanólico que fue más efectivo para inhibir a la bacteria Gram positiva. Esta sensibilidad puede ser atribuida a que las bacterias Gram positivas presentan en su estructura una membrana lipídica. Por el contrario, las bacterias Gram negativas presentan en su estructura además otra membrana lipídica externa que cubre toda la célula. Esta característica de doble membrana, es un factor importante en la resistencia de bacterias Gram negativas a la presencia de agentes antibacterianos (Poole, 2001).

El efecto antimicrobiano y antifúngico de extractos de cáscara de granada se ha evaluado en estudios previos (Ullah *et al.*, 2012). Por ejemplo, Hayrapetyan y col. (2012) evaluaron la inhibición de *L. monocytogenes* con el extracto de cáscara de granada y encontraron una CMI de 16.5 mg/mL. La cual es ligeramente menor a los 19 mg/mL que encontramos en nuestro estudio. Como se pudo observar el extracto acuoso presento el mayor contenido de compuestos fenólicos y eficacia antimicrobiana, lo cual coincide con el hecho de que estos compuestos son los principales agentes bioactivos de los extractos de plantas, estos han mostrado actividad para inactivar patógenos alimenticios de manera *in vitro* (Tehraniifar *et al.*, 2011) y en alguna matriz alimentaria (Karabiyikli & Kislá, 2012).

Las figuras 5 y 6 muestran las curvas de crecimiento para los micoorganismos expuestos. Además, mediante la función de Baranyi (1993) se determinaron los

Cuadro 5. CMI de extractos de cáscara de granada probados *in vitro* contra patógenos alimentarios

Extractos	CMI (mg/mL)		
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S.Typhimurium</i>	<i>C. tropicalis</i>
Acuoso	19*	19*	30
Etanólico	24	27	30

-Los valores son la media de tres repeticiones. * Diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

cambios en los parámetros cinéticos de fase lag (λ), μ_{max} , y y_{max} (**Cuadro 6**) para cada bacteria y levadura expuesta a los distintos extractos de cáscara de granada. La fase lag es la etapa de adaptación de los microorganismos a su medio ambiente, por lo que una extensión de dicho tiempo, significa que en la presencia del extracto dificulta tal adaptación. Tal como se observó para el extracto acuoso de cáscara de granada que logró extender la fase lag en *L. monocytogenes* 3.53 h, *S. Typhimurium* 4.59 h y en *C. tropicalis* 41.2 h con respecto al testigo.

Se observó que el extracto acuoso fue el que tuvo mejores resultados en el aumento de la fase lag para *S. Typhimurium* y *C. tropicalis*. Sin embargo, en *L. monocytogenes* no se encontró diferencia significativa al exponerla a los dos extractos.

Por otro lado, la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) también se vio afectada por efecto de la adición de los extractos, la cual indica el mayor crecimiento obtenido durante las 24 h de incubación y corresponde al final de la fase exponencial, en el extracto acuoso se logró una reducción de 93% para *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* presentó una reducción del 83% y en *C. tropicalis* una reducción del 98% de la tasa máxima de crecimiento con respecto al testigo de cada microorganismo. Para el extracto etanólico se presentó una reducción del 74% para *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* presentó una reducción del 33% y en *C. tropicalis* una reducción del 82% con respecto al testigo de cada microorganismo. Se observó que el extracto acuoso fue el que logró una mayor reducción en comparación con el extracto etanólico, capaz de afectar la capacidad de reproducción de la bacteria y levadura inhibiendo posiblemente la actividad y producción de enzimas necesarias para su reproducción.

Y_{max} indica el crecimiento máximo obtenido de los microorganismos, el cual se encuentra al término de la fase exponencial, para el extracto acuoso se logró una reducción del 84% para *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* presentó una reducción del 80% y en *C. tropicalis* una reducción del 98% con respecto al

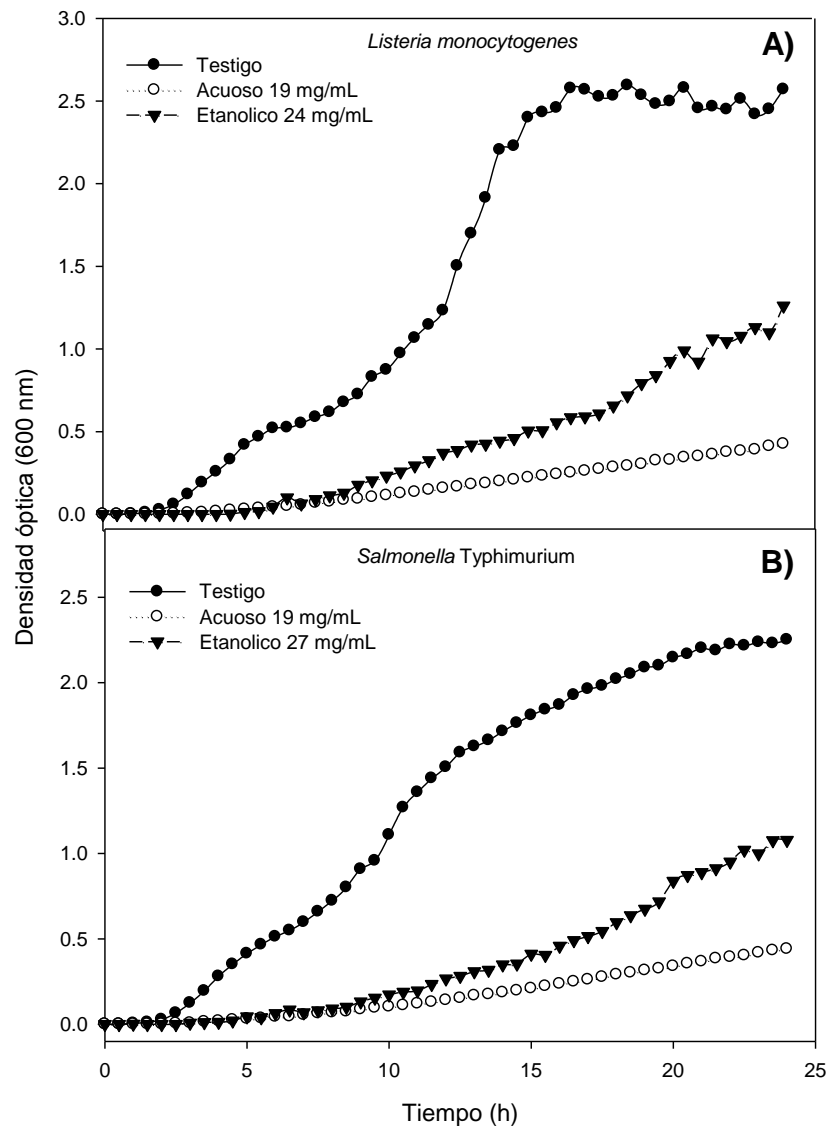


Figura 5. Efecto de las CMI de los extractos de cáscara de granada acuoso y etanólico sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de *L. monocytogenes* A) y *S. Typhimurium* B).

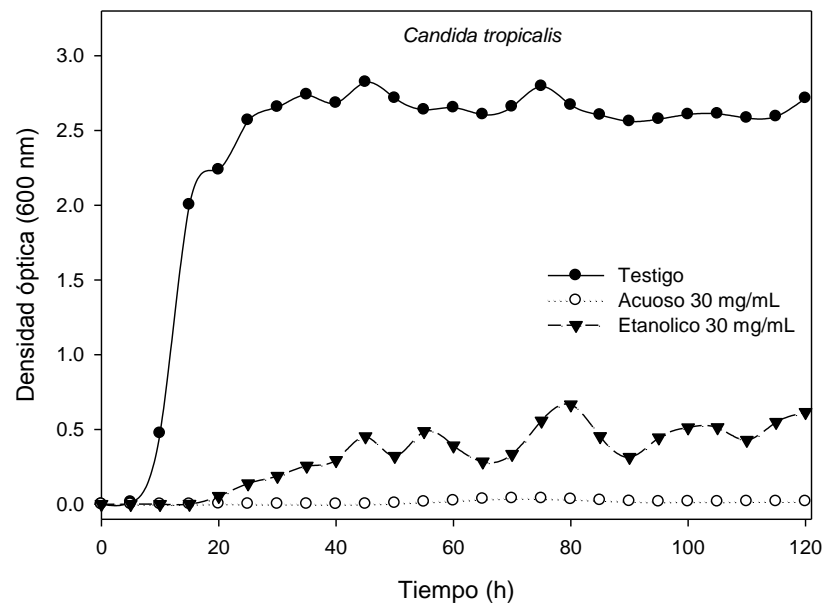


Figura 6. Efecto de la CMI de los extractos de cáscara de granada acuoso y etanólico sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de *Candida tropicalis*.

Cuadro 6. Efecto de los extractos de cáscara de granada acuoso y etanólico, sobre los parámetros de crecimiento evaluados frente a diferentes microorganismos patógenos.

Microorganismo	Extracto	Lag(h)	$\mu_{max}(h^{-1})$	Ymax
<i>L. monocytogenes</i>	Testigo	2.89 ^{c*} ± 0.49	0.32 ^c ± 0.034	2.51 ^c ± 0.19
	EA 19 mg/mL	6.42 ^a ± 0.65	0.022 ^a ± 0.001	0.39 ^a ± 0.022
	EE 24 mg/mL	5.23 ^a ± 0.37	0.082 ^b ± 0.004	0.8 ^b ± 0.061
<i>S.Typhimurium</i>	Testigo	2.44 ^c ± 0.79	0.155 ^c ± 0.019	2.18 ^c ± 0.227
	EA 19 mg/mL	7.03 ^a ± 0.33	0.025 ^a ± 0.003	0.43 ^a ± 0.03
	EE 27 mg/mL	5.23 ^b ± 0.31	0.076 ^b ± 0.007	0.92 ^b ± 0.023
<i>C. Tropicalis</i>	Testigo	5.63 ^c ± 0.22	0.22 ^c ± 0.013	2.64 ^c ± 0.069
	EA 30 mg/mL	46.83 ^a ± 2.58	0.0023 ^a ± 0.001	0.048 ^a ± 0.006
	EE 30 mg/mL	17.29 ^b ± 5.30	0.039 ^b ± 0.007	0.61 ^b ± 0.15

*Los valores son la media de tres repeticiones ± DE. Distintas literales indican diferencias significativa ($p \leq 0.05$). EA=Extracto Acuoso. EE=Extracto Etanólico.

testigo de cada microorganismo. Para el extracto etanólico se presentó una reducción del 68% para *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* presentó una reducción del 57% y en *C. tropicalis* una reducción del 76% con respecto al testigo de cada microorganismo. Se observó que el extracto acuoso fue el que logró una mayor reducción en comparación con el extracto etanólico.

Lo anterior demuestra la efectividad del extracto acuoso de cáscara de granada para afectar las diferentes fases de crecimiento microbiano. Un aumento en la fase lag podría indicar que el extracto es capaz de afectar la capacidad de adaptación de la bacteria al medio, el cual podría estar dañando a la membrana ya sea inhibiendo la absorción de los nutrientes, afectando algunas enzimas o proteínas de membrana indispensables para su crecimiento celular.

Capacidad Antioxidante de los Extractos Acuoso y Etanólico de Cáscara de Granada

EL **cuadro 7** muestra la capacidad antioxidante evaluada de los extractos acuoso y etanólico de cáscara de granada, por los métodos de DPPH y TEAC. Los resultados obtenidos muestran un mayor % de inhibición del radical DPPH para el extracto acuoso con 86.12% (1204.3 mg ET/g) y menor para el extracto etanólico con un 76.24% (930.93 mg ET/g), al utilizar 0.4 mg/mL de extracto. No así para el método de TEAC donde el extracto etanólico resulto mayor con 958.21 mg ET/g que el extracto acuoso con 767.17 mg ET/g, esto se puede deber que ambos extracto fueron extraídos con métodos diferentes y por lo tanto contienen diferente contenido de compuestos fenólicos y pueden actuar diferente. Adicionalmente, la estereoquímica de los radicales utilizados es diferente, es decir puede haber compuestos fenólicos cuyo arreglo estérico pueda ser más afín para donar el electrón al radical libre en cuestión. Diferentes estudios demuestran que el fruto y subproductos de la granada poseen actividad antioxidante (Bopitiya & Madhujith, 2012; Jing *et al.*, 2012). Se

Cuadro 7. Capacidad antioxidante de los extractos acuoso y etanólico de cáscara de granada.

Tipo de extracto	DPPH (%inhibición) 0.4 mg/mL	TEAC (mg ET/g p.s.)
Acuoso	86.12 ± 0.58*	767.17 ± 16.94*
Etanólico	76.24 ± 0.41	958.21 ± 20.21

* Diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).
-Los valores son la media de tres repeticiones ± DE.

encontró que los subproductos, principalmente la cáscara presenta el mayor contenido antioxidante. Esto puede deberse a que la función de la cáscara es proteger al fruto, razón por la cual, es necesaria una mayor concentración de compuestos fenólicos en este tejido (Tehranifar *et al.*, 2011). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que actúan como sistema de defensa ante factores de estrés (condiciones ambientales desfavorables), a los cuales puede verse sometida la cáscara durante la etapa de desarrollo del fruto.a3

Conclusión Etapa 1

Haciendo un análisis global de los resultados se puede concluir que el extracto que mostró el mayor número de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana fue el extracto acuoso obtenido de la cáscara de granada. Por lo tanto, es el que se aplicó como tratamiento a los germinados de alfalfa.

Etapa 2.- Aplicación del extracto acuoso de cáscara de granada sobre los germinados de alfalfa.

Capacidad Antimicrobiana

Los resultados del efecto antimicrobiano de los diferentes tratamientos (un testigo sin desinfección, lavado con agua, desinfección a 200 ppm de hipoclorito de sodio, 25 y 50 mg/mL extracto acuoso de cáscara de granada) sobre los

germinados de alfalfa se muestran en el **cuadro 8**. Se encontró efecto significativo ($p < 0.05$) entre cada uno de los tratamientos sobre el crecimiento de coliformes totales y psicrófilos, no se detectó crecimiento de hongos y levaduras. El testigo mostró las poblaciones más altas del crecimiento de estos microorganismos, siendo estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al resto de los tratamientos. Los germinados de alfalfa tratados con el extracto acuoso de cáscara de granada con una concentración de 50 mg/mL, mostraron una reducción de 1.16 log UFC/g para coliformes totales y 1.58 log UFC/g para psicrófilos, mientras que a una concentración menor de 25 mg/mL del extracto acuoso presentó una menor reducción de 1.23 log UFC/g para coliformes y 1.12 log UFC/g para psicrófilos. Los lavados con el agua e hipoclorito de sodio obtuvieron una reducción menor a 1 log UFC/g, por lo que los extractos de cáscara de granada a las concentraciones utilizadas fueron más efectivos para reducir la microflora de los germinados.

En el mercado existen un sin número de productos químicos como desinfectantes y diferentes tecnologías propuestas para reducir la carga microbiana de estos vegetales, varios métodos han sido evaluados para mejorar la seguridad de las semillas y los germinados (Peñas *et al.*, 2009). Estos incluyen el tratamiento con calor, la exposición a la radiación ionizante, tratamientos químicos, tales como cloro o hipoclorito (Phua *et al.*, 2014) y dióxido de carbono supercrítico (Jung, W. *et al.*, 2009a). Estos tratamientos pueden afectar negativamente a la calidad organoléptica de los germinados y la viabilidad de las semillas. Fett (2002), utilizó como agua de riego H_2O_2 , Acido peroxi acético +peróxido de hidrogeno, $NaClO_2$ acidificado, Na_2PO_4 y $NaOCl$, a diferentes concentraciones, para desinfectar germinados de alfalfa, demostrando una reducción no mayor a 1 log UFC/g de coliformes totales y mesofilos aerobios.

Existen pocos trabajos que demuestran la aplicación de antimicrobianos de subproductos naturales como desinfectante en los germinados de alfalfa. Sin embargo, en un estudio, se utilizó una infusión acuosa de flor de jamaica

Cuadro 8. Efecto del extracto acuoso de cáscara de granada en la reducción de coliformes totales y psicrófilos (UFC/g) en germinados de alfalfa.

	Coliformes totales		Psicrófilos	
	Log	Reducción	Log	Reducción
	UFC/g	Log	UFC/g	Log
Testigo	5.72	-	5.98	-
Agua	4.77*	0.94	5.69*	0.28
Cloro	4.95	0.76	4.91	1.07
25 mg/mL	4.60	1.12	4.75	1.23
50 mg/mL	4.55	1.16	4.39	1.58

* Diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). Los valores son la media de tres repeticiones

(*Hibiscus sabdariffa*) para reducir la carga de patógenos en lechuga y germinados de alfalfa, reduciendo 1 log UFC/g (Jaroni & Ravishankar, 2012). Así mismo, Taban *et al.* (2013) utilizaron el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Satureja khuzistanica* en la reducción de *E. coli* O157:H7 en las semillas de alfalfa, ya que el aceite es rico en carvacrol, mostro una reducción significativa de 2.59 a 3.07 log sin afectar la viabilidad de las semillas. Por lo tanto, se evidencia la efectividad de extractos naturales para reducir la carga microbiana en alimentos de origen vegetal (Seneviratne & Kotuwagedara, 2009).

El extracto acuoso de cáscara de granada se ha utilizado en diferentes matrices alimentarias como un antimicrobiano natural, este fue utilizado como un conservador natural en carnes listas para consumir utilizando 24.7 mg/mL del ECG, esta misma concentración se probó frente a *L. monocytogenes* en paté de carne a diferentes temperaturas, a 4 °C durante 46 días el extracto inhibió 4.1 log UFC/g. Es importante señalar que hasta el momento no existen normas en México que establezcan límites de tolerancia de estos microorganismos para el caso de frutos y vegetales frescos cortados. Según las normas de la unión europea, los límites máximos establecidos para que un vegetal fresco cortado sea apto para su consumo son de 5×10^7 y 1×10^6 UFC/g para mesofilos aerobios y coliformes totales, respectivamente (Ruíz-Cruz *et al.*, 2007). Encontrándose en este estudio a los germinados de alfalfa tratado con extracto acuoso de cáscara de granada por debajo de estos límites establecidos. Por lo que el extracto estudiado podría ser un buen conservador natural para otro tipo de productos.

Capacidad antioxidante

Se encontró un efecto significativo ($P < 0.05$) de los tratamientos sobre la capacidad antioxidante de los germinados de alfalfa (**figura 7**). Los germinados

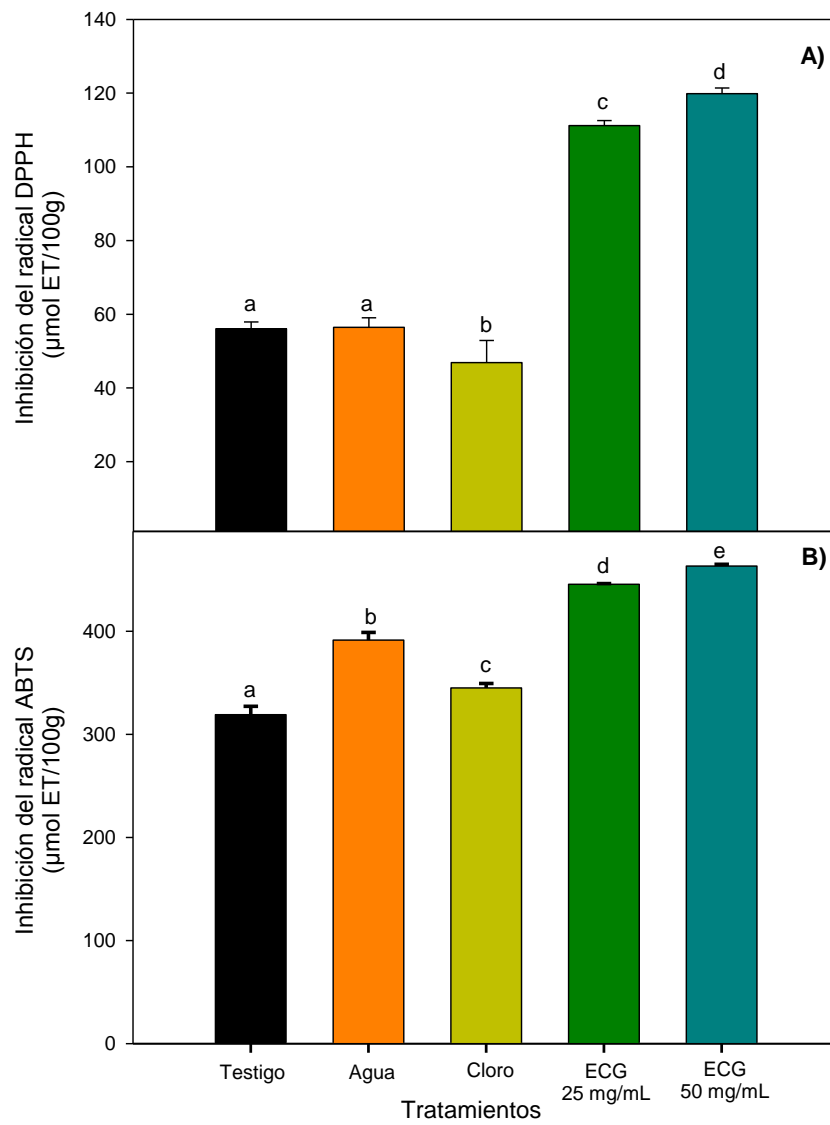


Figura 7. Capacidad antioxidante de los germinados de alfalfa, tratados extractos de cáscara de granada y otros tratamientos. Inhibición de A) radical DPPH, B) radical ABTS.

desinfectados con hipoclorito de sodio presentaron la menor capacidad antioxidante (46.8 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$) para inhibir el radical DPPH. No se observó diferencia significativa entre los germinados testigos (56.05 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$) y los lavados con agua (56.4 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$), los germinados tratados con el ECG presentaron los valores más altos de capacidad antioxidante con valores de 111.1 y 119.8 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$, para las concentraciones de 25 y 50 mg/mL de extracto aplicado, respectivamente. Para el caso de la inhibición del radical ABTS se observa un efecto similar, donde los tratamientos con el extracto acuoso presentaron la capacidad antioxidante más alta; sin embargo, para la inhibición de este radical no se observaron diferencias entre los germinados testigo y los desinfectados con hipoclorito de sodio, que presentaron valores más bajos que los lavados con agua. Esto es un indicador de que el extracto obtenido de la cáscara de granada puede incrementar la capacidad antioxidante de los germinados de alfalfa, además de reducir la carga microbiana.

El uso de extractos bioactivos como aditivos para la conservación de frutas representa una alternativa a los conservadores químicos y ayuda a satisfacer la demanda del consumidor por frutos y vegetales frescos, nutritivos, seguros y libres de compuestos sintéticos. Algunos extractos de subproductos del procesamiento de frutas han sido utilizados en la conservación de la calidad de frutos frescos como el extracto de semilla de naranja adicionada a gajos de esta fruta. La fruta tratada mostro aumentó en el contenido de fenoles totales, de flavonoides totales y la capacidad antioxidante con respecto al control (Cruz–Valenzuela *et al.*, 2013). Fresas tratadas con aceite esencial de hoja de canela (5 mg/mL) al día 9 de almacenamiento a 10 °C presentaron un mayor contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante medida por los métodos DPPH^{*}, TEAC y ORAC comparados con el control (Ortega-Ramírez, 2011).

El aumento en la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles en los germinados tratados con el extracto de cáscara de granada o sus componentes, genera un alimento funcional con propiedades extras que son benéficas a la

salud. El extracto de cáscara de granada posee gran cantidad de compuestos bioactivos como polifenoles, los cuales han sido asociados con beneficios a la salud o prevención de enfermedades debido a su capacidad antioxidante. Los compuestos fenólicos tienen la capacidad de inhibir la oxidación de células causada por radicales libres, pueden detener la peroxidación lipídica, proteger lípidos de membranas celulares, prevenir el daño oxidativo del ADN, quelar metales involucrados en ciertas patologías, neutralizar radicales libres formando productos más estables y pueden reparar antioxidantes oxidados para continuar con su efecto benéfico. Algunos compuestos presentes en la cáscara de granada como el ácido gálico ha mostrado a través de estudios *in vivo* e *in vitro* tener actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimutagénica y anticancerígena. Igualmente, se ha encontrado que el ácido elágico inhibe la formación de aductos de ADN y la unión de N-nitrosobenzilmetilamina en cultivos de esófago de rata, puede prevenir tumorigénesis pulmonar en ratones, tiene actividad antimutagénica, antioxidante y antiviral (Masibo y He, 2008).

Conclusión Etapa 2

El extracto acuoso redujo la carga microbiana de coliformes totales y psicrófilos, y aumentó la capacidad antioxidante a los germinados de alfalfa tratados con el extracto acuoso de cáscara de granada.

CONCLUSIONES

Los descubrimientos del presente estudio demostraron el potencial antimicrobiano y antioxidante de la cáscara de granada, como una fuente natural para el desarrollo de un aditivo alimentario en el tratamiento de germinados de alfalfa.

RECOMENDACIONES

- Identificar el total de compuestos fenólicos en los extractos y germinados tratados
- Evaluar el impacto sensorial de los tratamientos sobre los germinados de alfalfa.
- Estudiar la aplicación de dicho extracto en otros sistemas alimenticios para aprovechar las ventajas antioxidantes y antimicrobianas que presenta.

REFERENCIAS

- Aguayo Giménez, E., Artés Calero, F., Artés Hernández, F., Barreiro Elorza, P., Demerutis, C., Durzano, E., Escalona Contreras, V. H., Flores Cantillano, F., Gómez di Marco, P., & Infante Espiñeira, R. (2010). *Detección de problemas asociados a la calidad: frutas y hortalizas* (Vol. 1). Madrid, España.: UPM-CYTED.
- Aguilar, C. N., Aguilera-Carbo, A., Robledo, A., Ventura, J., Belmares, R., Martinez, D., Rodríguez-Herrera, R., & Contreras, J. (2008). Production of antioxidant nutraceuticals by solid-state cultures of pomegranate (*Punica granatum*) peel and creosote bush (*Larrea tridentata*) leaves. *Food Technology and Biotechnology*, 46(2), 218-222.
- Al-Zoreky, N. (2009a). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 244-248.
- Al-Zoreky, N. S. (2009b). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 244-248. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.002
- Alighourchi, H., & Barzegar, M. (2009). Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 179-185. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2008.06.019
- Alighourchi, H., Barzegar, M., & Abbasi, S. (2008). Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *European Food Research and Technology*, 227(3), 881-887. doi: 10.1007/s00217-007-0799-1

- AOAC. (1990). *Official methods of Analysis of the AOAC*. (Vol. 2). De Washington D.C., U.S.A.: Association of Official Analytical Chemists Inc.
- Ariefdjohan, M. W., Nelson, P. E., Singh, R. K., Bhunia, A. K., Balasubramaniam, V. M., & Singh, N. (2004). Efficacy of high hydrostatic pressure treatment in reducing *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in alfalfa seeds. *Journal of Food Science*, 69(5), M117-M120. doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb10718.x
- Artés-Calero, F., Aguayo, E., Gómez, P., & Artes-Hernández, F. (2009). Productos vegetales mínimamente procesados o de la cuarta gama. *Horticultura Internacional*, 69, 52-59.
- Ayala-Zavala, J., Del-Toro-Sánchez, L., Alvarez-Parrilla, E., & González-Aguilar, G. (2008). High relative humidity In-package of fresh-cut fruits and vegetables: advantage or disadvantage considering microbiological problems and antimicrobial delivering systems? *Journal of Food Science*, 73(4), R41-R47.
- Ayala-Zavala, J. F., Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., González-Aguilar, G. A., Álvarez-Parrilla, E., & Martín-Belloso, O. (2008). Bio-preservation of fresh-cut tomatoes using natural antimicrobials. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1047-1055.
- Ayala-Zavala, J. F., Perez-Carlon, J. J., Esqueda, M., Gonzalez-Aguilar, G. A., Leyva, J. M., Cruz-Valenzuela, M. R., & Moctezuma, E. (2012). Polar fractionation affects the antioxidant properties of methanolic extracts from species of genus *Phellinus* Quel. (Higher Basidiomycetes). 14(6), 563-573. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v14.i6.40
- Baranyi, J., Roberts, T. A., & McClure, P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food microbiology*, 10(1), 43-59. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/fmic.1993.1005>
- Bimakr, M., Rahman, R. A., Taip, F. S., Ganjloo, A., Salleh, L. M., Selamat, J., Hamid, A., & Zaidul, I. (2011). Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing*, 89(1), 67-72.

- Blanco, Y. (2012). Potencial alelopático de diferentes concentraciones de extractos de girasol (*Helianthus annuus*, L.), maíz (*Zea mays* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) y boniato (*Ipomoea batata*, L.) sobre el desarrollo y crecimiento inicial del frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*, 28(3), 5-9.
- Bopitiya, D., & Madhujith, T. (2012). Antioxidant potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research*, 24(1), 71-81.
- Cardenas-Toro, F. P., Forster-Carneiro, T., Rostagno, M. A., Petenate, A. J., Maugeri Filho, F., & Meireles, M. A. A. (2014). Integrated supercritical fluid extraction and subcritical water hydrolysis for the recovery of bioactive compounds from pressed palm fiber. *The Journal of Supercritical Fluids*.
- Crowe, K. M., Bushway, A., & Davis-Dentici, K. (2012). Impact of postharvest treatments, chlorine and ozone, coupled with low-temperature frozen storage on the antimicrobial quality of lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium*). *LWT-Food Science and Technology*, 47(1), 213-215.
- Cruz-Valenzuela, M. R., Carrasco-Lugo, D. K., Vega-Vega, V., Gonzalez-Aguilar, G. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2013). Fresh-cut orange treated with its own seed by-products presented higher antioxidant capacity and lower microbial growth. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation*, 3(1), 13-27.
- Chang, S., Redondo-Solano, M., & Thippareddi, H. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. on alfalfa seeds by caprylic acid and monocaprylin. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 141-146.
- Charkowski, A., Barak, J., Sarreal, C., & Mandrell, R. (2002). Differences in growth of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157: H7 on alfalfa sprouts. *Applied and environmental microbiology*, 68(6), 3114-3120.
- da Costa, C. T., Horton, D., & Margolis, S. A. (2000). Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 403-410. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00328-9

- Del Nobile, M., Licciardello, F., Scrocco, C., Muratore, G., & Zappa, M. (2007). Design of plastic packages for minimally processed fruits. *Journal of Food Engineering*, 79(1), 217-224.
- Fahey, J. W., & Stephenson, K. K. (2006). Can fresh vegetable sprouts be produced for human consumption in areas with poor water quality?(a pilot study).
- Fett, W. F. (2002). Reduction of the native microflora on alfalfa sprouts during propagation by addition of antimicrobial compounds to the irrigation water. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1–2), 13-18. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00730-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00730-9)
- Fischer, U. A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. *Food Chemistry*, 127(2), 807-821. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.156
- Fратиanni, F., Coppola, R., & Nazzaro, F. (2011). Phenolic composition and antimicrobial and antiquorum sensing activity of an ethanolic extract of peels from the apple cultivar Annurca. *Journal of medicinal food*, 14(9), 957-963.
- González-Aguilar, G. A., Villegas-Ochoa, M. A., Martínez-Téllez, M. A., Gardea, A. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2007). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *Journal of Food Science*, 72(3), S197-S202. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00295.x
- Goyal, A., & Siddiqui, S. (2012). Effects of ultraviolet irradiation, pulsed electric field, hot water dip and ethanol vapours treatment on keeping and sensory quality of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) sprouts. *Journal of Food Science and Technology*, 1-7.
- Gruz, J., Novák, O., & Strnad, M. (2008). Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, 111(3), 789-794.
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23(12), 1719-1726.

- Hayrapetyan, H., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. *Food Control*, 23(1), 66-72. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.06.012
- Hong, Y.-H., Chao, W.-W., Chen, M.-L., & Lin, B.-F. (2009). Ethyl acetate extracts of alfalfa (*Medicago sativa* L.) sprouts inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Sci*, 16, 64.
- Jaroni, D., & Ravishankar, S. (2012). Bactericidal effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) against foodborne pathogens *in vitro* and on romaine lettuce and alfalfa sprouts. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 4(1), 33-40.
- Jie Li, M. L. C., Richard D. Ludescher and Thomas J. Montville. (2002). Temperature and surfactant induced membrane modifications that alter *Listeria monocytogenes* nisin sensitivity by different mechanisms. *Applied and environmental microbiology*, 68(12), 5904-5910.
- Jing, P., Ye, T., Shi, H., Sheng, Y., Slavin, M., Gao, B., Liu, L., & Yu, L. L. (2012). Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds. *Food Chemistry*, 132(3), 1457-1464.
- Jung, W., Choi, Y., & Rhee, M. (2009a). Potential use of supercritical carbon dioxide to decontaminate *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium in alfalfa sprouted seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), 66-70.
- Jung, W. Y., Choi, Y. M., & Rhee, M. S. (2009b). Potential use of supercritical carbon dioxide to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium in alfalfa sprouted seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), 66-70. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.014
- Karabiyikli, S., & Kislá, D. (2012). Inhibitory effect of sour pomegranate sauces on some green vegetables and kisir. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 211-216. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.006

- Kher, S. V., De Jonge, J., Wentholt, M. T. A., Deliza, R., de Andrade, J. C., Cnossen, H. J., Luijckx, N. B. L., & Frewer, L. J. (2012). Consumer perceptions of risks of chemical and microbiological contaminants associated with food chains: a cross-national study. *International Journal of Consumer Studies*, 37(1), 73- 83. doi: 10.1111/j.1470-6431.2011.01054.x
- Kim, H., Moon, J. Y., Kim, H., Lee, D.-S., Cho, M., Choi, H.-K., Kim, Y. S., Mosaddik, A., & Cho, S. K. (2010). Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. *Food Chemistry*, 121(2), 429-436. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.060>
- Kim, S. A., Kim, O. M., & Rhee, M. S. (2013). Changes in microbial contamination levels and prevalence of foodborne pathogens in alfalfa (*Medicago sativa*) and rapeseed (*Brassica napus*) during sprout production in manufacturing plants. *Letters in Applied Microbiology*, 56(1), 30-36. doi: 10.1111/lam.12009
- Kuo, Y.-H., Rozan, P., Lambein, F., Frias, J., & Vidal-Valverde, C. (2004). Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. *Food Chemistry*, 86(4), 537-545. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.042>
- Lee, C., Lin, T., & González Nariño, G. E. (2011). *Efecto de la aplicación de soluciones de Chlorella vulgaris y Scenedesmus obliquus sobre el contenido de compuestos funcionales en germinados de brócoli*. Universidad de la Sabana.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254-260. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.02.033
- Marton, M., Mándoki, Z., Csapó-Kiss, Z., & Csapó, J. (2010). The role of sprouts in human nutrition. A review. *Acta Univ. Sapientiae*, 3, 81-117.
- Maureira Espinosa, Y. (2012). *Aplicación de sanitizantes en brotes de alfalfa (Medicago sativa L.) conservados bajo atmósfera modificada*. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

- Miguel, G., Dandlen, S., Antunes, D., Neves, A., & Martins, D. (2004). The effect of two methods of Pomegranate (*Punica granatum* L.) juice extraction on quality during storage at 4°C. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 332-337. doi: 10.1155/s1110724304403064
- Muñoz, Á. B., Chaves, J. A., Rodríguez, E. C., & Realpe, M. E. (2013). *Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria. *Biomédica*, 33(2), 283-291.
- Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S., & Sayeed, S. (2007a). Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science*, 72(9), M341-M345.
- Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S. A., & Sayeed, S. A. (2007b). Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science*, 72(9), M341-M345. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00533.x
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 7-17.
- Nei, D., Bari, M. L., & Enomoto, K. (2012). Validation of hot water and chlorine treatments to inactivate pathogens inoculated on mung bean seeds: Influence of the seed production area. *Food Control*, 32(1), 185-189.
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., & Packer, L. (2001). Antioxidant activities of Pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: Delphinidin, Cyanidin, and Pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 166-171. doi: 10.1021/jf0108765
- Ortega-Ramírez, L. E. (2011). *Enriquecimiento antioxidante y protección antifúngica de frutos de fresa mediante el tratamiento con aceite de hoja de canela*. Tesis de Licenciatura, CIAD, AC.
- Parmar, H. S., & Kar, A. (2007). Antidiabetic potential of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel extracts in alloxan treated male mice. *Biofactors*, 31(1), 17-24.

- Penas, E., Gomez, R., Frias, J., & Vidal-Valverde, C. (2008). Application of high-pressure treatment on alfalfa (*Medicago sativa*) and mung bean (*Vigna radiata*) seeds to enhance the microbiological safety of their sprouts. [Article]. *Food Control*, 19(7), 698-705. doi: 10.1016/j.foodcont.2007.07.010
- Peñas, E., Gómez, R., Frías, J., & Vidal-Valverde, C. (2009). Efficacy of combinations of high pressure treatment, temperature and antimicrobial compounds to improve the microbiological quality of alfalfa seeds for sprout production. *Food Control*, 20(1), 31-39. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.01.012>
- Peñas, E., Gómez, R., Frías, J., & Vidal-Valverde, C. (2010). Effects of combined treatments of high pressure, temperature and antimicrobial products on germination of mung bean seeds and microbial quality of sprouts. *Food Control*, 21(1), 82-88.
- Phua, L. K., Neo, S. Y., Khoo, G. H., & Yuk, H.-G. (2014). Comparison of the efficacy of various sanitizers and hot water treatment in inactivating inoculated foodborne pathogens and natural microflora on mung bean sprouts. *Food Control*, 42(0), 270-276. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.013>
- Picazo, J. J., Betriu, C., Culebras, E., Rodríguez Avial, I., López Fabal, F., & Gómez, M. (2011). *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina: sensibilidad a la daptomicina a lo largo de un periodo de 10 años (2001-2010). *Revista Española de Quimioterapia*, 24(2), 107-111.
- Poole, K. (2001). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 500-508. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00242-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00242-3)
- Qu, W., Breksa III, A. P., Pan, Z., & Ma, H. (2012). Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Food Chemistry*, 132(3), 1585-1591.
- Rajan, S., Mahalakshmi, S., Deepa, V., Sathya, K., Shajitha, S., & Thirunalasundari, T. (2011). Antioxidant potentials of *Punica Granatum* fruit rind extracts. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 3(3).

- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 157-180.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Recasens, I., Graell, J., & Echeverría, G. (2012). Avances en poscosecha de frutas y hortalizas.
- Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., & Ferreira, D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med*, 73(EFirst), 461-467. doi: 10.1055/s-2007-967167
- Rico, D., Martín-Diana, A. B., Barat, J., & Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(7), 373-386.
- Ruíz-Cruz, S., Acedo-Félix, E., Díaz-Cinco, M., Islas-Osuna, M. A., & González-Aguilar, G. A. (2007). Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. *Food Control*, 18(11), 1383-1390.
- Saad, H., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., Rode, K., Charrier, B., & Ayed, N. (2012). Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial Crops and Products*, 40, 239-246.
- Safety, F. (2013). Outbreaks Alert Center for science in the public interest Retrieved 12 de mayo, 2013, from http://www.cspinet.org/foodsafety/outbreak_report.html
- Sánchez, M. R., Gorinstein, S., Belloso, O. M., García, H. A., Aguilar, G. G., & Valenzuela, R. C. (2007). Frutos tropicales mínimamente procesados: Potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 32(4), 227-232.

- Seneviratne, K., & Kotuwegedara, R. (2009). Antioxidant activities of the phenolic extracts of seed oils and seed hulls of five plant species. *Food Science and Technology International*, 15(5), 419-425.
- Shan, B., Cai, Y.-Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1), 112-119. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.003
- SIAP. (2013). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Retrieved Abril 2013 <http://www.siap.gob.mx/>
- Singh, R., Murthy, K. N. C., & Jayaprakasha, G. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 81-86.
- Singleton, V., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Taban, A., Rahimi, M. J., Saharkhiz, M. J., Hadian, J., & Zomorodian, K. (2013). The Efficacy of Satureja khuzistanica Essential Oil Treatment in Reducing Escherichia coli O157: H7 Load on Alfalfa Seeds Prior to Sprouting. *Journal of Food Safety*, 33(2), 121-127.
- TehraniFar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M., & Bakhsh, V. J. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1523-1527.
- Ullah, N., Ali, J., Khan, F. A., Khurram, M., & Hussain, A. (2012). Proximate composition, minerals content, antibacterial and antifungal activity evaluation of Pomegranate (*Punica granatum* L.) peels powder. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 11(3), 396-401.
- USDA. (2012). nutrition facts and analysis for alfalfa seed, sprouted, raw. Retrieved 28/Marzo/2013 <http://nutritiondata.self.com/facts/vegetables-and-vegetable-products/2302/2>

- Vahid Akbarpour, K. H., Mehdi Sharifani. (2009). Physical and chemical properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit in maturation stage. *American-Eurasian J. Agric. & Environ.*, 6(4), 411-416.
- Vandekinderen, I., Devlieghere, F., Van Camp, J., Kerkaert, B., Cucu, T., Ragaert, P., De Bruyne, J., & De Meulenaer, B. (2009). Effects of food composition on the inactivation of foodborne microorganisms by chlorine dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2), 138-144.
- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Sierra, I., Blazquez, I., Lambein, F., & Kuo, Y.-H. (2002). New functional legume foods by germination: effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. *European Food Research and Technology*, 215(6), 472-477.
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635-654.
- Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, J., & Perez-Alvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635-654. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 44(5), 1217-1223.
- Vuong, Q. V., Hirun, S., Roach, P. D., Bowyer, M. C., Phillips, P. A., & Scarlett, C. J. (2013). Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts. *Journal of Herbal Medicine*, 3(3), 104-111.
- Waje, C. K., Jun, S. Y., Lee, Y. X., Kim, B. N., Han, D. H., Jo, C., & Kwon, J. H. (2009). Microbial quality assessment and pathogen inactivation by electron beam and gamma irradiation of commercial seed sprouts. *Food Control*, 20(3), 200-204. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.04.005

- Weiss, A., & Hammes, W. P. (2003). Thermal seed treatment to improve the food safety status of sprouts. *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik*, 77(5-6), 152-155.
- Yun, J., Li, X., Fan, X., Li, W., & Jiang, Y. (2012). Growth and quality of soybean sprouts (*Glycine max* L. Merrill) as affected by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559. doi: 10.1016/s0308-8146(98)00102-2