



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**  
**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**CONSERVACIÓN DE HAMBURGUESAS DE CARNE DE  
CORDERO CON EXTRACTO CRUDO DE *Pimenta dioica* L.**

**T E S I S**

Para obtener el Grado de:  
**MAESTRA EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS**

**PRESENTA**

**I.Q. Adriana Sánchez Zárate**

**DIRECTOR:**

**Dr. Alfonso Juventino Chay Canul**

**CO-DIRECTOR:**

**Dr. José Rodolfo Velázquez Martínez**

**ASESOR:**

**Dr. Armando Gómez Vázquez**

**Villahermosa, Tabasco, febrero de 2019**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**ASUNTO:** El que se indica.

**OFICIO:** DACA-036

Villahermosa, Tabasco, a 07 de febrero de 2019

**C. ADRIANA SÁNCHEZ ZÁRATE  
EGRESADA DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
PRESENTE**

Por este conducto y de acuerdo a su solicitud de autorización de impresión de Tesis, informo a usted que sobre la base del Artículo 26 del reglamento de Posgrado de esta Universidad, esta Dirección a mi cargo, le **autoriza la impresión de su trabajo recepcional** bajo la modalidad de Tesis titulada "**Conservación de hamburguesas de carne de cordero con extracto crudo de *Pimenta dioica* L.**"

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

**ATENTAMENTE**

**U.J.A.T.**



**PHD. ROBERTO ANTONIO CANTÚ GARZA  
DIRECTOR**

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS  
DIRECCIÓN**

C.c.p.- Archivo.

Miembro CUMEX desde 2008  
**Consortio de  
Universidades  
Mexicanas**  
UNA ALIANZA DE CALIDAD PARA LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Km 25, Carret. Villahermosa-Teapa  
Ra. La Huasteca, 2ª sección, 86298, Centro, Tabasco, México  
Tel. (+52 993) 358-15-85 y 142-9150

Correos electrónicos: [direccion.daca@ujat.mx](mailto:direccion.daca@ujat.mx), [daca.direccion@gmail.com](mailto:daca.direccion@gmail.com)

[www.ujat.mx](http://www.ujat.mx)  
[www.facebook.com/ujat.mx](https://www.facebook.com/ujat.mx) | [www.twitter.com/ujat](https://www.twitter.com/ujat) | [www.youtube.com/UJATmx](https://www.youtube.com/UJATmx)

## CARTA AUTORIZACIÓN

La que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada "**Conservación de hamburguesas de carne de cordero con extracto crudo de *Pimenta dioica* L.**", de la cual soy autora y titular de los derechos de autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitada para subirla a la red abierta de bibliotecas digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la universidad tenga relación institucional.

Por lo antes mencionado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 11 días del mes de febrero del año 2019.

**Autoriza**

Adriana Sánchez Zárate



Nombre y firma

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado durante estos dos años, el cual fue indispensable para poder realizar mis estudios de maestría.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) a través de la División Académica de Ciencias Agropecuarias (DACA), por permitirme formar parte de su programa de posgrado y darme la oportunidad de llevar a cabo mis estudios de maestría para poder cumplir un objetivo más en mi formación académica.

A mi Director de Tesis, Dr. Alfonso J. Chay Canul, por haberme permitido ser parte del *#TeamChay*, por sus aportaciones al trabajo de investigación, por sus consejos, apoyo y amistad, pero sobre todo, por la confianza y honestidad.

A mi codirector, Dr. José Rodolfo Velázquez Martínez, por su valiosa contribución al trabajo de investigación, gracias por el tiempo invertido, orientación, consejos, confianza y apoyo. Por compartir su experiencia que contribuyó a mi crecimiento científico.

Al Dr. Armando Gómez Vázquez por la asesoría y sugerencias brindadas a este trabajo.

Al Dr. Víctor Moo Huchin por la asesoría técnica y contribuciones a este trabajo de investigación, por el tiempo invertido, apoyo brindado y consejos durante la realización de mi estancia.

Al comité de revisores por su compromiso y aportaciones durante el proceso de aprobación de este trabajo.

A todos y cada uno de los profesores y profesoras que, de una u otra manera, brindaron su apoyo durante la realización de la maestría. Gracias a las maestras Dora y Judith por su incondicional apoyo, cariño y guía durante mis estudios.

Al Laboratorio de Instrumentación Analítica del Instituto Tecnológico de Mérida, al Dr. Enrique Sauri por su amabilidad, apoyo y consejos y por permitirme realizar parte de mi experimentación durante la estancia. A cada una de las personas que me apoyaron durante la realización de los análisis, muchísimas gracias al Dr. Víctor Toledo, a Angélica, Nidi, Nitmar, Diego, Abraham, gracias por su apoyo y amistad.

A cada integrante del #TeamChay, porque siempre estuvieron dispuestos a apoyarme, especial agradecimiento a Alondra, Diana, Martha, Gloria, Marquesa y Emmanuel.

Al grupo de consumidores que desinteresadamente participaron en la evaluación sensorial de las hamburguesas, muchas gracias a todas y todos.

Al Ing. Gerardo Velázquez por su apoyo y por compartir su experiencia, porque ha estado conmigo desde ya hace años acompañándome en mi formación y ofreciendo su amistad.

A Dafne, Anita, Amelio y Ana María, por su apoyo, consejos, paciencia, por estar siempre dispuestos a escucharme.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## DEDICATORIA

A Tristán y Jonathan por su apoyo, comprensión, cuidado y aliento. Gracias por la confianza.

A mi mamá y papá y a mis hermanos, gracias por estar siempre para mí, por su cariño y apoyo, por los ánimos que siempre recibo cada vez que los visito.

A la señora Ixta por todo su apoyo y motivación para que estudiara la maestría y por el cuidado y cariño hacia Tris, especialmente durante la estancia en Mérida.

A doña Fina por darme la motivación para que iniciara este proyecto, por todo su cariño y consejos.

A mi amiga Claudia por su inmenso apoyo, cariño, comprensión, consejos, por sus porras para que me levante y ánimos para seguir luchando.

*“A todas las mujeres del mundo: sueñen en grande, aspiren a más, luchen con fuerza y, ante la duda, recuerden esto: lo están haciendo bien”. CBNPNR.*

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE CUADROS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. JUSTIFICACIÓN .....	3
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	5
3.1 Objetivo General .....	5
3.2 Objetivos específicos .....	5
3.3 Hipótesis .....	5
IV. REVISIÓN DE LITERATURA .....	6
4.1 Concepto y composición nutricional de la carne .....	6
4.1.1 Carne para hamburguesa .....	8
4.2 Causas de deterioro de la carne .....	8
4.2.1 Oxidación lipídica .....	9
4.2.2 Deterioro microbiano .....	9
4.3 Conservación de la carne .....	10
4.4 Uso de conservadores químicos: antioxidantes y antimicrobianos .....	10
4.5 Obtención de extractos naturales para la conservación de la carne .....	12
4.6 Efecto antioxidante y antimicrobiano de los extractos naturales en la carne .....	13
4.6.1 Residuos agroindustriales como fuente de extractos naturales .....	15
4.7 Evaluación sensorial de productos cárnicos con extractos naturales .....	15
V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
5.1 Ubicación .....	17
5.2 Recolección y acondicionamiento de las hojas .....	17
5.3 Obtención de los extractos crudos y contenido total de fenoles .....	17
5.3.1 Obtención de extractos .....	17

5.3.2	Contenido total de fenoles (CTF) .....	18
5.4	Actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos crudos de hoja de <i>P. dioica</i> .....	18
5.4.1	Actividad antioxidante .....	18
5.4.1.1	Captación de radicales por DPPH.....	18
5.4.1.2	Captación de radicales por ABTS .....	19
5.4.1.3	Poder de reducción antioxidante del ion férrico .....	19
5.4.2	Actividad antimicrobiana de los extractos crudos.....	19
5.4.2.1	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	19
5.4.2.2	Difusión en agar .....	20
5.4.2.3	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB).....	20
5.5	Determinación de la concentración del extracto.....	22
5.5.1	Preparación de las hamburguesas.....	22
5.5.2	Evaluación sensorial .....	23
5.6	Evaluación <i>in situ</i> del EHP adicionado a hamburguesas de carne de cordero .....	23
5.6.1	Efecto antioxidante del EHP en las hamburguesas de carne de cordero .....	24
5.6.1.2	Medición del pH.....	24
5.6.1.2	Medición del color .....	24
5.6.1.3	Análisis de la oxidación de lípidos.....	24
5.6.2	Efecto antimicrobiano del extracto en las hamburguesas de carne de cordero .....	25
5.6.2.1	Análisis microbiológico .....	25
5.7	Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	25
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
6.1	Evaluación de los extractos crudos de hoja de <i>P. dioica in vitro</i> .....	27
6.1.1	Rendimiento de extracción, contenido total de fenoles y actividad antioxidante de la hoja de <i>P. dioica</i> .....	27
6.1.2	Actividad antioxidante .....	29



6.1.2.1	Captación de radicales por DPPH.....	29
6.1.2.2	Captación del radical ABTS <sup>·+</sup> .....	30
6.1.2.3	Poder de reducción antioxidante del ión férrico (FRAP).....	30
6.1.2.4	Relación entre la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles	31
6.1.3	Actividad antimicrobiana .....	32
6.2	Determinación de la dosis del extracto y evaluación sensorial.....	33
6.3	Efecto antioxidante del EHP en las hamburguesas de carne de cordero .....	34
6.3.1	Medición del pH.....	34
6.3.2	Medición del color .....	35
6.3.3	Oxidación de lípidos .....	37
6.4	Efecto antimicrobiano del extracto en las hamburguesas de carne de cordero .....	38
VII.	CONCLUSIONES.....	41
VIII.	RECOMENDACIONES .....	42
IX.	LITERATURA CITADA.....	43
X.	ANEXOS .....	60

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 1. Composición nutricional promedio por cada 100 g para los principales tipos de carne .....	7
Cuadro 2. Composición de aminoácidos, ácidos grasos, minerales y vitaminas para los principales tipos de carne.....	7
Cuadro 3. Fenoles totales y rendimiento en extractos de hoja de <i>P. dioica</i> .....	27
Cuadro 4. DPPH, ABTS y FRAP en extractos de hoja de <i>P. dioica</i> .....	30
Cuadro 5. Actividad antimicrobiana de hoja de <i>P. dioica</i> .....	32
Cuadro 6. Efecto del nivel de extracto de hoja de <i>P. dioica</i> en las características sensoriales de hamburguesas de cordero .....	34
Cuadro 7. Evolución del pH en hamburguesas de cordero adicionadas con EHP y BHA durante el almacenamiento .....	35
Cuadro 8. Cambios microbiológicos en hamburguesas de cordero adicionadas con EHP y BHA durante el almacenamiento a 4 °C.....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Microplaca utilizada para la determinación de la CMI y CMB.....	21
Figura 2. Cambios en el parámetro a* (rojo) de hamburguesas de cordero adicionadas con EHP y BHA durante el almacenamiento.....	36
Figura 3. Valores de TBARS (mg MDA kg carne <sup>-1</sup> ) de hamburguesas de cordero adicionadas con EHP y BHA durante el almacenamiento....	38

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## RESUMEN

La oxidación de lípidos y la contaminación microbiana son las dos causas principales que causan deterioro en la carne. La industria cárnica tiene el reto actual de desarrollar productos cárnicos inocuos que sean conservados con aditivos naturales. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antioxidante y antimicrobiano del extracto crudo de hoja de *Pimenta dioica* L. (EHP) en hamburguesas de carne de cordero durante el almacenamiento. Una primera etapa se desarrolló con un diseño completamente al azar que consistió en determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana *in vitro* de tres extractos de hoja de *P. dioica* obtenidos con agua, etanol y acetona, respectivamente, analizados en relación a cuatro ensayos colorimétricos (Fenoles totales (FT), DPPH, ABTS y FRAP) y actividad antimicrobiana contra dos bacterias Gram-positivas y dos Gram-negativas. Posteriormente, por medio de un test de aceptación afectiva, se evaluaron tres concentraciones de EHP para garantizar que la adición a las hamburguesas no afectara las características sensoriales. En la segunda etapa se evaluó el efecto en las hamburguesas almacenadas durante 11 días a 4 °C, para lo cual se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x4 que consistió de tres tratamientos: T1= sin aditivo (control CO), T2=1000 ppm de extracto de hoja de pimienta (EHP) y T3=200 ppm aditivo sintético (BHA). El efecto antioxidante se evaluó a través de la medición del pH, color y oxidación lipídica (TBARS) y el efecto antimicrobiano por medio del conteo de la cuenta viable total (CVT), bacterias ácido lácticas (BAL) y hongos y levaduras (HyL). De los resultados de la primera etapa, se eligió el extracto acuoso ya que presentó actividad antioxidante y antimicrobiana similar ( $p>0.05$ ) a la de los extractos con solventes orgánicos. Respecto al test de aceptación afectiva, se eligió la concentración de 1000 ppm la cual obtuvo las

calificaciones más altas en la escala hedónica utilizada ( $p < 0.05$ ). Las hamburguesas control (T1) presentaron los valores más bajos para el color rojo ( $P < 0.05$ ). El EHP (T2) presentó una capacidad equivalente ( $P > 0.05$ ) para retardar la oxidación lipídica hasta los 11 días de almacenamiento, en comparación con el BHA (T3) ( $1.75 \text{ mg MDA kg carne}^{-1}$ ) y cuentas similares ( $P > 0.05$ ) de CVT ( $7.31 \text{ UFC g}^{-1}$ ) y LAB ( $7.49 \text{ UFC g}^{-1}$ ). La adición del extracto acuoso de hoja de *P. dioica* tiene potencial como antioxidante natural en productos cárnicos con la misma eficacia que el aditivo sintético BHA.

**Palabras clave:** Antioxidantes naturales; *Pimenta dioica*; cordero; vida de anaquel; conservador.

## ABSTRACT

Lipid oxidation and microbial contamination are the two main causes of deterioration in the meat. The meat industry has the challenge of developing safe meat products that are preserved with natural additives. The objective of this work was to evaluate the antioxidant and antimicrobial effect of crude leaf extract of *Pimenta dioica* L. (EHP) in lamb meat burgers during storage. A first stage will be rounded up with a completely randomized design that consisted of determining the antioxidant and antimicrobial activity *in vitro* of the extracts of the leaf of *P. dioica* with water, ethanol and acetone, respectively, analyzed in relation to four colorimetric tests (Total phenols (FT), DPPH, ABTS and FRAP) and antimicrobial activity against two Gram-positive and two Gram-negative bacteria. Subsequently, through an affective acceptance test, three concentrations of EHP were evaluated to ensure that the addition to the burgers did not affect the sensory characteristics. In the second stage the effect was evaluated in burgers stored for 11 days at 4 ° C, for which it refers to a completely randomized design with 3x4 factorial arrangement that consisted of three treatments: T1 = no additive (control CO), T2 = 1000 ppm *P. dioica* leaf extract (EHP) and T3 = 200 ppm synthetic additive (BHA). The antioxidant effect was evaluated through the measurement of pH, color and lipid oxidation (TBARS) and the antimicrobial effect in counting the total viable count (CVT), lactic acid bacteria (BAL) and fungi and yeasts (HyL). From the results of the first stage, the aqueous extract was chosen since it presented antioxidant and antimicrobial activity similar ( $p > 0.05$ ) to that of the extracts with organic solvents. Regarding the affective acceptance test, the concentration of 1000 ppm was chosen, which obtained the highest scores in the hedonic scale used (p

<0.05). The control burgers (T1) had the lowest values of color ( $P < 0.05$ ). The EHP (T2) presented an equivalent capacity ( $P > 0.05$ ) to delay lipid oxidation up to 11 days of storage, in comparison with the BHA (T3) (1.75 mg MDA kg meat<sup>-1</sup>) and similar counts ( $P > 0.05$ ). ) of CVT (7.31 CFU g<sup>-1</sup>) and LAB (7.49 CFU g<sup>-1</sup>). The addition of the aqueous leaf extract of *P. dioica* has potential as a natural antioxidant in meat products with the same efficacy as the synthetic BHA additive.

**Keywords:** Natural antioxidants; *Pimenta dioica*; lamb; shelf life; conservative.

## I. INTRODUCCIÓN

El consumo de carne ovina en México se ha ido incorporando a la dieta que se refleja en un crecimiento anual de 5.4% (FAOSTAT, 2016). Lo anterior ha permitido la diversificación de productos y subproductos ovinos; los cuales son una fuente de proteínas, aminoácidos, minerales y vitaminas de un valor biológico importante (Linares *et al.*, 2012). Por otro lado, esta riqueza nutricional provoca que la carne se deteriore principalmente por dos causas: la oxidación de lípidos y el crecimiento microbiano (Dave y Ghaly, 2011). Aunado a lo anterior, el procesamiento también influye en las causas del deterioro, de este modo, la manipulación y el deterioro se relacionan proporcionalmente, así entre más se manipule un producto, más se predispone al deterioro, la carne para hamburguesa pertenece al grupo de los alimentos que más rápido se deterioran, debido al rompimiento de membranas del músculo al momento de molerla y la manipulación durante su procesamiento (Kim *et al.*, 2013).

En este sentido, los productores y procesadores de carne se han enfrentado al reto de mantener y prolongar la vida de anaquel de toda la gama de productos cárnicos y una manera de contrarrestarlo ha sido con la adición de aditivos sintéticos (Carocho *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha demostrado que estos tienen efecto tóxico y cancerígeno (Anand y Sati, 2013) lo que ha llevado a evitarlos o sustituirlos en las formulaciones por productos de fuentes naturales (Shah *et al.*, 2014). En este aspecto, los extractos crudos obtenidos de fuentes vegetales han destacado por la versatilidad de sus fuentes de obtención, las cuales pueden ser desde especias (Fernandes *et al.*, 2016), frutas (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011) hasta subproductos agrícolas o agroindustriales (O'Keefe y Wang, 2006).

Las hojas de pimienta gorda (*Pimenta dioica* L.), también conocida como pimienta Tabasco, se consideran desechos agrícolas pues no son aprovechadas. Sin embargo, han sido reportadas como una fuente prometedora de compuestos fenólicos, los cuales han demostrado poseer efecto antioxidante y antimicrobiano *in-vitro* (Asha *et al.*, 2013). No obstante, el efecto antioxidante y antimicrobiano *in-vitro* de extractos crudos de hoja de *P. dioica* con solventes de diferente polaridad no se ha reportado. Lo que motiva a que se realicen investigaciones que demuestren la efectividad de sus fitoquímicos para



mantener la vida de anaquel de la carne, protegiéndola de la oxidación lipídica y el ataque microbiano, sin alterar sus características sensoriales.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## II. JUSTIFICACIÓN

La conservación de alimentos con la adición de extractos naturales ha llamado la atención de los investigadores en los últimos 30 años (Shahidi *et al.*, 1992; Moure *et al.*, 2001; Ayala-Zavala *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2014; Carocho *et al.*, 2018), principalmente por los efectos tóxicos y cancerígenos asociados a los aditivos sintéticos, debido a lo cual los consumidores se han sensibilizado y alertado (Del Nobile *et al.*, 2012; Sharma, 2015a; 2015b). Lo anterior, ha motivado que diversas investigaciones se enfoquen en demostrar la potencial aplicación de los extractos naturales en una gran variedad de alimentos, como frutas (Li Destri Nicosia *et al.*, 2016; Patrignani *et al.*, 2015), legumbres (Poimenidou *et al.*, 2016), derivados lácteos (Siwach *et al.*, 2016) y productos cárnicos (Nowak *et al.*, 2016).

La carne y los productos cárnicos, por su valor nutritivo, contenido de agua y pH neutro son susceptibles al deterioro microbiano, oxidativo y enzimático, lo que obliga a poner mayor atención en su manejo y elaboración (Dave y Ghaly, 2011). En este contexto, la hamburguesa es un producto cárnico que forma un medio idóneo para que la oxidación de lípidos y la contaminación microbiana se presenten, principalmente por la molienda de la carne, en la que hay manipulación y contacto con superficies, convirtiendo en prioridad la búsqueda de alternativas para extender la vida de anaquel del producto (Incoronato *et al.*, 2015). Respecto a lo anterior, varios estudios han demostrado que los extractos obtenidos de fuentes vegetales pueden ser una alternativa en la conservación de la carne para hamburguesa sin alterar sus propiedades sensoriales, como el extracto de orégano y toronjil en hamburguesas de cordero (Fernandes *et al.*, 2013), extracto de uva roja en hamburguesas de cerdo (Garrido *et al.*, 2011) y semilla de uva, orégano y romero en hamburguesas de res (Colindres y Brewer, 2011).

En general, la mayoría de los extractos y aceites esenciales utilizados como antioxidantes o antimicrobiano en productos cárnicos provienen de especias, sin embargo, también existen reportes del uso de extractos de residuos agroindustriales o residuos poscosecha que han demostrado su eficacia en la conservación de productos cárnicos, como la pulpa de tomate (Andres *et al.*, 2017), residuos del aceite de oliva

(Muñoño *et al.*, 2017), cáscaras de frutas (Hayrapetyan *et al.*, 2012) y los residuos del vino (Selani *et al.*, 2011).

Las hojas de pimienta gorda, las cuales durante la cosecha y beneficiamiento se descartan ya que son categorizadas como residuos al reportarse como materia extraña al momento de comercializar el fruto (NMX-FF-063-1987; De Oliveira *et al.*, 2009; Martínez-Pérez *et al.* 2013), pueden tener aplicación potencial en la conservación de la carne, principalmente por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas que han sido demostradas *in vitro* (Sahadeo y Vilas, 2011; Asha *et al.*, 2013; Vázquez-Cahuich *et al.*, 2013; Aumeeruddy-Elalfi *et al.*, 2015) lo cual se relaciona con sus componentes bioactivos principales, como el eugenol, metileugenol y beta-cariofileno (Jirovetz *et al.*, 2007, Dharmadasa *et al.*, 2015).

Sin embargo, hasta el momento no se tienen reportes que indiquen los efectos antimicrobianos y antioxidantes de extractos de hoja de pimienta en carne o productos cárnicos, por lo que este trabajo propuso utilizar el extracto de hoja de pimienta (EHP) como aditivo natural para conservar hamburguesas de carne de cordero, mediante la evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano para aumentar la vida de anaquel de un producto perecedero y aprovechar un residuo poscosecha.

### III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto antioxidante y antimicrobiano del extracto crudo de hoja de *P. dioica* (EHP) en hamburguesas de carne de cordero durante el almacenamiento.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto crudo de hoja de *P. dioica* *in vitro*.
- Establecer la dosis del extracto de hoja de *P. dioica* adicionado a las hamburguesas de carne de cordero por medio de la evaluación sensorial.
- Evaluar el efecto antioxidante del extracto de hoja de *P. dioica* sobre el deterioro químico en hamburguesas de carne de cordero.
- Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de hoja de *P. dioica* sobre el deterioro biológico en hamburguesas de carne cordero.

#### 3.3 Hipótesis

El extracto crudo de hoja de *P. dioica* muestra un efecto antioxidante y antimicrobiano en las hamburguesas de carne de cordero sin alterar su aceptación sensorial.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Concepto y composición nutricional de la carne

La carne es el producto pecuario de mayor valor, su importancia deriva de su riqueza nutricional, además de ser un complemento útil para la mayoría de las dietas, en especial las de países en desarrollo (FAO, 2016). De acuerdo con la NOM-009-Z00-1994, la carne es la estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conjuntivo elástico, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos, de las especies animales autorizadas para el consumo humano. El componente mayoritario de la carne es el agua y el resto comprende principalmente proteínas, lípidos, vitaminas y minerales de elevada biodisponibilidad, así como pequeñas cantidades de carbohidratos (Jiang y Xiong, 2016).

Las proteínas que la componen son de alta calidad, ya que contiene todos los aminoácidos esenciales en las cantidades adecuadas que nuestro organismo requiere para su funcionamiento y crecimiento (Pereira y Vicente, 2013). Las grasas resultan imprescindibles para la aceptabilidad de la carne porque influyen de manera importante en sus propiedades sensoriales (textura, jugosidad, sabor, aroma, color, entre otros, de los alimentos cocinados), estas propiedades dependen de la concentración y composición de cada una de las fracciones lipídicas (Andrés *et al.*, 2016). La grasa en la carne está compuesta por ácidos grasos y colesterol, en la grasa de cordero predomina el grupo de los ácidos grasos monoinsaturados, siendo el ácido oleico el principal componente (Karabagias *et al.*, 2011).

El porcentaje de nutrientes en los principales tipos de carne roja (res, cerdo, cordero), es muy similar en la composición total (Williams, 2007). En el Cuadro 1 se muestra que no hay diferencias entre el contenido de humedad y proteína, habiendo diferencias en el contenido de grasa. En lo referente a la composición específica de macronutrientes (aminoácidos esenciales y ácidos grasos) y micronutrientes (vitaminas y minerales), existen diferencias para los ácidos grasos y algunos minerales, como se indica en el Cuadro 2.

**Cuadro 1.** Composición nutricional promedio por cada 100 g para los principales tipos de carne

	<b>Res</b>	<b>Cerdo</b>	<b>Cordero</b>	<b>Referencia</b>
<b>Humedad (g)</b>	73.1	70.39	72.9	Williams, 2007;
<b>Proteína (g)</b>	23.2	21.9	21.9	Patterson <i>et al.</i> ,
<b>Grasa (g)</b>	2.8	6.9	4.7	2009

De acuerdo con los cuadros 1 y 2, la carne de cordero puede considerarse como una fuente rica de proteínas de alta calidad, vitaminas y minerales. Además, la carne de cordero tiene una proporción mayor de ácidos grasos poliinsaturados y saturados (50 mg 100 mg<sup>-1</sup>) comparado con la carne de res (38 mg 100 mg<sup>-1</sup>) y cerdo (22 mg 100 mg<sup>-1</sup>), lo cual es benéfico para la salud, ya que ayuda a controlar los niveles de colesterol en la sangre (Karabagias *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de los beneficios nutricionales que aportan sus componentes principales, esta composición biológica propicia el deterioro de su calidad y la reducción de la vida de anaquel (Jayasena y Jo, 2013).

**Cuadro 2.** Composición de aminoácidos, ácidos grasos, minerales y vitaminas para los principales tipos de carne

	<b>Res</b>	<b>Cerdo</b>	<b>Cordero</b>	<b>Referencia</b>
<b>Aminoácidos</b>				
Lisina (%)	8.4	7.8	7.6	Hamill y
Metionina (%)	2.3	2.5	2.3	Botineştean,
Triptofano (%)	1.1	1.4	1.3	2016
Valina (%)	5.7	5.0	5.0	
Histidina (%)	2.9	3.2	2.7	
Arginina (%)	6.6	6.4	6.9	
<b>Ácidos grasos</b>				
Ácido oleico (mg)	1395	759	1625	
Ácido linoleico (mg)	89	302	125	
Ácido docosahexaenoico (ω-3) (mg)	1.63	8.33	7.2	
<b>Minerales y vitaminas</b>				
Hierro(mg)	1.8	0.63	2.0	
Fósforo (mg)	215	209	194	
Vitamina B <sub>12</sub> (µg)	2.5	0.53	0.96	

#### **4.1.1 Carne para hamburguesa**

La carne ha formado parte de la alimentación del hombre desde el inicio de los tiempos y en la actualidad el consumidor dispone en el mercado de una gran variedad de productos para elegir (Decker y Park, 2010). Uno de ellos es la carne para hamburguesa, definido como la carne molida moldeada y envasada, producto obtenido de la carne fresca de animales de los géneros *Bos*, *Suis*, *Ovis*, *Gallus*, procedente de rastros que cumplan con lo establecido en las normas oficiales, que es cortada y pasada por un molino o picadora, adicionada de otros ingredientes, moldeada, envasada y conservada para su venta al público (NOM-034-SSA1-1993).

En Europa, la carne para hamburguesa y en específico la de carne de cordero está clasificada como un tipo de corte cárnico el cual se obtiene de recortes y de carne picada o molida de pierna, cuello y falda de corderos de no más de 12 meses de edad, y se define como porciones de carne picada con forma redonda y aplanada, a veces especiada y a veces sin mezclar con ningún ingrediente (INTEROVIC, 2014). Esto surgió como iniciativa del Parlamento Europeo, quien expresó la necesidad de productos innovadores en la industria de los pequeños rumiantes, especialmente en el caso de la carne de cordero (Aylward, 2008), para que no solo se modificarán los patrones de consumo al abrir el abanico de posibilidades de esta carne sino también sacar una mayor rentabilidad de la canal (INTEROVIC, 2014).

Sin embargo, mantener la vida de anaquel de la carne para hamburguesa representa un reto para los procesadores, debido a las características intrínsecas del producto, como el alto contenido de humedad y nutrientes, además del propio procesamiento ya que al momento de moler la carne, ésta se vuelve más susceptible al deterioro microbiano y oxidativo (Muthukumar *et al.*, 2014).

#### **4.2 Causas de deterioro de la carne**

La carne es un alimento altamente perecedero, sujeta a varios tipos de deterioro que dependen del manejo y condiciones de almacenamiento (Cervený *et al.*, 2009). Existen tres principales mecanismos para el deterioro de la carne y los productos cárnicos después del sacrificio y durante el procesamiento y almacenamiento: a) oxidación

lipídica, b) deterioro microbiano y c) deterioro enzimático autocatalítico (Dave y Ghaly, 2011).

#### **4.2.1 Oxidación lipídica**

Los efectos perjudiciales de la oxidación en la carne son numerosos. Las reacciones oxidativas son responsables de los cambios en el sabor, color, textura y valor nutricional, debido a la destrucción de vitaminas liposolubles y ácidos grasos esenciales como el ácido linoleico, tanto en carne fresca como en cocida (Baggio y Bragagnolo, 2006). Las reacciones de oxidación, generalmente, son catalizadas por diversos factores como la presencia de oxígeno, luz, calor, metales pesados, pigmentos, condiciones alcalinas así como el grado de insaturación de los ácidos grasos (Shahidi *et al.*, 1992).

La oxidación lipídica se define como el deterioro oxidativo de los ácidos grasos insaturados, es un fenómeno mediado por radicales libres envolviendo un mecanismo de reacción en cadena. Involucra tres etapas: iniciación, propagación y terminación. Esta degradación produce compuestos oxigenados, como aldehídos y cetonas (Addis, 2015) además de malonaldehído, los cuales provocan cambios en las características físicas y sensoriales de los productos cárnicos (Cunha *et al.*, 2018).

#### **4.2.2 Deterioro microbiano**

De acuerdo con Lambert *et al.*, (1991), el deterioro microbiano en la carne ha sido definido como cualquier síntoma o grupo de síntomas de actividad microbiana que se manifiesta por cambios en el olor, sabor o apariencia de la carne y los cuales están relacionados con la microflora de la carne. La composición de la microflora en la carne depende de factores como: a) prácticas de crianza previas al sacrificio, b) edad del animal al momento del sacrificio, c) manejo durante el sacrificio, evisceración y procesado, d) control de temperaturas durante el sacrificio, procesado y distribución, e) métodos de preservación, f) tipo de envasado y g) manejo y almacenamiento por el consumidor (Cervený *et al.*, 2009).

La composición de la carne influye en la población de microorganismos del deterioro y juega un rol importante en el patrón de deterioro, asimismo, constituye un excelente



sustrato para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos (Kadim y Mahgoub, 2007). Como las bacterias responsables del deterioro: *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus spp.*, *Enterobacter* (Jayasena y Jo, 2013), bacterias patógenas: *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp.*, y *Staphylococcus aureus* (Dave y Ghaly, 2011), hongos: *Rhizopus*, *Sporotrichum*, *Fusarium*, *Monilia*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Addis, 2015) y levaduras: *Candida*, *Torulopsis* (Karabagias *et al.* 2011).

#### **4.3 Conservación de la carne**

La conservación de la carne se ha vuelto imprescindible, por tres causas principales: 1) la incidencia de enfermedades transmitidas por carne y productos cárnicos contaminados, lo que conlleva a enormes gastos en el sector de salud pública; 2) pérdidas económicas para los procesadores y comercializadores como resultado del deterioro de la carne en algún punto de la cadena comercial y 3) el desperdicio de toneladas de carne que no llegan a consumirse por causa del deterioro afectando la seguridad alimentaria aunado al impacto ambiental generado por la crianza de animales que no alcanzan el propósito final que es el consumo de su carne (Saucier, 2016). Por lo anterior, a lo largo de la historia del consumo de carne se han ido desarrollando procesos para su conservación, principalmente aquellos que conciernen al deterioro microbiano, aunque se buscan otros métodos para minimizar el deterioro químico, como cambios en el color y oxidación (Zhou *et al.*, 2010).

Los métodos actuales de conservación están generalmente clasificados como: a) Control de la temperatura, b) Control de la actividad de agua y c) Uso de conservadores químicos o bioconservadores (Zhou *et al.*, 2010). Una combinación de estos métodos puede ser usado para disminuir el proceso de deterioro (Fernandes *et al.*, 2015).

#### **4.4 Uso de conservadores químicos: antioxidantes y antimicrobianos**

Una de las estrategias para evitar el deterioro de la carne es la aplicación de conservadores, los cuales pueden funcionar como antioxidantes o antimicrobianos (Dave y Ghaly, 2011). Los antioxidantes son esenciales para extender la vida útil de la

carne, previenen la oxidación de las moléculas mediante la donación de un átomo de hidrógeno o de un electrón, reduciéndose a sí mismos en forma de radical, sólo que en una forma más estable que no permite reacciones posteriores y por lo tanto, preservan la calidad de los productos (Carocho *et al.*, 2014). La peroxidación lipídica y la rancidez son los tipos más comunes de oxidación que ocurren en la carne y productos cárnicos durante el almacenamiento. La oxidación lipídica se determina a menudo mediante el índice de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Dave y Ghaly, 2011).

Los antioxidantes químicos más utilizados para evitar la peroxidación lipídica y la rancidez son los derivados de fenoles, como el hidroxianisolbutilado (BHA), el hidroxitoluenobutilado (BHT), la butilhidroquinona terciaria (TBHQ) y el propilgalato (PG), están clasificados como antioxidantes fenólicos sintéticos (Carocho *et al.*, 2014). Su uso es extenso con la intención de retardar o prevenir los efectos negativos de la peroxidación lipídica mediante la eliminación de los radicales peroxilo portadores de la cadena o la disminución de la formación de radicales primarios lipídicos iniciadores (desdoblamiento de la cadena) y radicales secundarios (antioxidantes preventivos) (Addis, 2015).

Por otro lado, los antimicrobianos se añaden a los alimentos con los propósitos de: (1) controlar el deterioro natural de los alimentos (control de los alimentos) y/o (2) evitar/controlar la contaminación por microorganismos, incluidos los patógenos (Carocho *et al.*, 2014). Con el objetivo de extender la vida útil de la carne, al reducir la proliferación bacteriana durante el sacrificio, transporte, procesamiento y almacenamiento (Dave y Ghaly, 2011). Por otro lado, el crecimiento de los microorganismos y el deterioro de la carne dependen de la especie de bacteria, la disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura, humedad y la atmósfera de envasado (Cervený, 2009). En general, la membrana celular y las enzimas se ven dañadas por la presencia de aditivos antimicrobianos (Dave y Ghaly, 2011).

Los antimicrobianos comunes en la industria alimentaria incluyen: cloruros, nitritos, sulfuros y ácidos orgánicos (Addis, 2015). Aunque también se ha reportado que el BHA, BHT y TBHQ los cuales tienen propiedades antimicrobianas contra bacterias (predominantemente Gram-negativas), hongos, virus y protozoos (Dave y Ghaly, 2011).

La eficacia de estos aditivos utilizados también como antioxidantes, puede deberse al número de grupos hidroxilo fenólicos disponibles para la eliminación de radicales libres (Dave y Ghaly, 2011). Aunque los antioxidantes y antimicrobianos han sido utilizados desde hace muchos años por la industria alimentaria, varios estudios han confirmado que el consumo excesivo de aditivos sintéticos se relaciona con enfermedades gastrointestinales, respiratorias, dermatológicas y reacciones neurológicas adversas (Carocho *et al.*, 2014).

El BHA y BHT están implicados en el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) en niños (Patel, 2015). Además, varios estudios demuestran su carcinogenicidad y efecto perjudicial sobre la salud humana y en cepas de ratones para análisis clínicos (Ramadan y Suzuki, 2012). Varios estudios han mostrado evidencia de que la eliminación de aditivos sintéticos puede mejorar el trastorno del comportamiento (Konikowska *et al.*, 2012). En este contexto, los reportes anteriores crean la necesidad de identificar alternativas naturales y probablemente de fuentes más seguras que replacen a los aditivos sintéticos, lo cual podría traer beneficios a la salud y funcionalidad en su aplicación (Vuong *et al.*, 2011).

#### **4.5 Obtención de extractos naturales para la conservación de la carne**

Los extractos de plantas como conservadores en la carne y los productos cárnicos se han ido incorporando de forma gradual como materia prima en la industria alimentaria, como consecuencia del incremento en el consumo de productos con etiqueta limpia (Cabarkapa *et al.*, 2016). Los extractos pueden obtenerse de diferentes partes de la planta como tallos, hojas, flores, raíces y semillas (Fernandes *et al.*, 2016), así como subproductos de la agroindustria (Andres *et al.*, 2017). También pueden extraerse con diferentes solventes (Moudache *et al.*, 2016), como el agua, el etanol y las mezclas etanol-agua por ser económicos, seguros y sustentables comparados con otros solventes orgánicos (Mustafa y Turner, 2011). Las mezclas etanol-agua funcionan para extraer los compuestos fenólicos de plantas, debido a su polaridad (Spigno *et al.*, 2007). Además al utilizar solo agua, se evitan las regulaciones para el uso de solventes orgánicos como medios de extracción y se realiza una extracción amigable con el medioambiente (Wijngaard *et al.*, 2012).

Obtenido el extracto, generalmente se determinan sus compuestos fenólicos, entre los que destacan los polifenoles, flavonoides, diterpenos y taninos, los cuales son responsables de su actividad antioxidante y antimicrobiana (Hygreeva *et al.*, 2014). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, se debe a que previenen la formación de radicales libres grasos que reaccionan o absorben oxígeno en el proceso de autoxidación, retrasando el inicio del proceso autoxidante en los lípidos (Akarpat *et al.*, 2008).

Por otro lado, los compuestos fenólicos poseen actividad antimicrobiana por la presencia de grupos hidroxilo y se reporta que entre mayor número de grupos hidroxilo tenga un compuesto fenólico mayor será su toxicidad contra los microorganismos (Cowan, 1999). Sin embargo, la actividad antimicrobiana no es atribuible a un mecanismo específico, ya que hay varios mecanismos en las células microbianas en los que supuestamente los compuestos fenólicos tienen sitio de acción (Burt, 2004). En general, los compuestos fenólicos pueden degradar la pared celular, alterar la bicapa fosfolipídica de la membrana citoplasmática y dañar las proteínas de la membrana, lo que conduce a una mayor permeabilidad de la membrana celular y pérdida de los constituyentes celulares (Burt, 2004).

#### **4.6 Efecto antioxidante y antimicrobiano de los extractos naturales en la carne**

Los extractos de plantas han demostrado su efecto antioxidante y/o antimicrobiano en varios productos cárnicos (Costa *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014). Uno de los productos cárnicos que ha sido usado frecuentemente como modelo de estudio es la carne para hamburguesas, producto cárnico propenso al deterioro oxidativo y microbiano (Schmidt *et al.*, 2016).

El deterioro oxidativo se debe a la ruptura de las membranas musculares al momento de moler la carne, lo cual conduce a la exposición de los lípidos de las membranas a iones metálicos que actúan como pro-oxidantes (Mariem *et al.*, 2014), también, durante el proceso de producción, la carne puede contaminarse con microorganismos que pueden causar su deterioro o transmitir enfermedades al momento del consumo (Hulankova *et al.*, 2013).

Los extractos naturales obtenidos de fuentes vegetales se han utilizado como antioxidantes naturales. Al respecto, Trindade *et al.* (2009) aplicaron extractos de romero y orégano en carne para hamburguesa de res irradiada, encontrando que el extracto de romero fue más efectivo que el de orégano en la aceptación sensorial. También, Garrido *et al.*, (2011) reportaron que la actividad antioxidante del extracto de la pulpa de uva roja disminuyó de manera significativa la oxidación de lípidos respecto a las muestras control en hamburguesas de cerdo. Mientras que Fernandes *et al.* (2014) evaluaron diferentes cantidades del extracto de orégano en hamburguesas de cordero, las cuales no comprometieron los parámetros fisicoquímicos evaluados y obtuvieron mayor aceptación que las hamburguesas control. La inflorescencia de banano, considerado un residuo del cultivo en combinación con eritorbato de sodio en hamburguesas de carne de cerdo, se encontró un efecto antioxidante al retrasar la oxidación de lípidos sin causar daño a las características fisicoquímicas y sensoriales (Schmidt *et al.*, 2016). Asimismo, Fernandes *et al.* (2016) evaluaron el extracto de orégano en hamburguesas de ovejas de desecho, los análisis demostraron que la adición del extracto a la carne le proporcionó estabilidad en el color y reducción en la oxidación de lípidos equivalentes al uso de BHT, lo cual proporcionó también una apariencia más saludable.

Por otro lado, referente al estudio de extractos naturales como agentes antimicrobianos en hamburguesas, Kim *et al.*, (2013) evaluaron dicho efecto de dos especies vegetales en hamburguesas de res. La adición de los extractos al 0.5% redujo la tasa de crecimiento de bacterias aerobias y la actividad antimicrobiana fue más efectiva en coliformes. Mientras que Baker *et al.*, (2015) reportan que la adición de 500 ppm del extracto de tomillo, en hamburguesas de cordero almacenadas a 4°C, redujo el conteo total en placa, las bacterias psicrófilas y coliformes. El efecto antimicrobiano del extracto de orégano fue evaluado en hamburguesas de borrego durante 20 días almacenadas a 2 °C, los resultados mostraron reducción en el conteo total en placa en las hamburguesas a las que se les adicionó el extracto comparadas con las que no se les adicionó (Fernandes *et al.*, 2016).

#### **4.6.1 Residuos agroindustriales como fuente de extractos naturales**

Las hojas de pimienta gorda (*P. dioica*) consideradas como un desecho durante la cosecha de los frutos de la pimienta (De Oliveira *et al.*, 2009) son una fuente de componentes fenólicos, de los cuales destacan el eugenol, metileugenol y beta-cariofileno (Vadlapudi y Kaladhar, 2012). Componentes que contienen un potencial antioxidante y antimicrobiano *in-vitro* (Oussalah *et al.*, 2006; Nayak *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2010). Sin embargo, hasta el momento no se tienen reportes sobre la evaluación de extractos de las hojas de pimienta en productos cárnicos (Gochev y Girova, 2009; Girova *et al.*, 2010).

A pesar de los beneficios demostrados que ofrecen los extractos obtenidos de plantas y de residuos agroindustriales en la conservación de la carne (Ahmad *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014), algunos de ellos como los de especias y hierbas (orégano, tomillo, romero, etc.) tienen aplicaciones limitadas a pesar de su alta actividad antioxidante, ya que imparten un sabor característico a hierba y apariencia verdosa (Fernandes *et al.*, 2016). Por lo anterior, los productos cárnicos a los que se adicionen necesitan ser aprobados por medio de una evaluación sensorial previa para elegir las dosis adecuadas (Villalobos-Delgado *et al.*, 2015; Bellés *et al.*, 2017).

#### **4.7 Evaluación sensorial de productos cárnicos con extractos naturales**

Al adicionar un extracto natural como conservador en un producto cárnico se asegura su inocuidad, sin embargo, esta adición puede afectar las cualidades sensoriales e influir en la aceptación y por lo tanto, impactar en su comercialización (Adeyinka y Richard, 2013). La evaluación sensorial es el método utilizado para evocar, medir, analizar e interpretar aquellas respuestas a los productos percibidas por los sentidos de la vista, el olfato, el tacto, el gusto y la audición (Lawless y Heymann, 2010). Se utiliza para analizar la aceptación de los consumidores y la calidad de los productos, actuando como una parte inherente al emplear nuevos aditivos en una formulación (Fernandes *et al.*, 2013).

Los tipos de evaluación sensorial pueden clasificarse como análisis descriptivo, análisis discriminativo y afectivo (Meilgaard *et al.*, 2016). La prueba de aceptación afectiva se utiliza para evaluar la respuesta de aceptación de panelistas no entrenados a un

producto, calificando su grado de afición usando una escala hedónica (Lawless y Heymann, 2010). La escala hedónica tradicional de nueve puntos desarrollada por Peryam y Pilgrim (1957) es la más utilizada para investigar el gusto de los consumidores por los productos a evaluar, este método proporciona una escala equilibrada con una categoría neutral centrada que trata de producir pasos psicológicamente iguales o cambios en el tono hedónico, en la cual 1 significa disgusta extremadamente y 9 gusta extremadamente (Lawless y Heymann, 2010). Típicamente, la prueba de aceptación involucra de 50 a 150 panelistas que declaren ser consumidores habituales o que les guste el producto (Meilgaard *et al.*, 2016).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Ubicación

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Bióticos de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, ubicado en la carretera Villahermosa-Teapa Km. 25. Ra. La Huasteca, 2ª sección, municipio de Centro, Tabasco, México y en el Laboratorio de Instrumentación Analítica del Instituto Tecnológico de Mérida ubicado en Avenida Tecnológico s/n en la ciudad de Mérida, Yucatán, México.

### 5.2 Recolección y acondicionamiento de las hojas

Las hojas de *P. dioica* se obtuvieron durante la cosecha de la pimienta gorda, en la Ranchería Mérida y Guarumo del municipio de Jalapa, Tabasco, en el mes de octubre de 2016. La comunidad se ubica en las coordenadas 17°49'18"LN y 92°47'38"LO. Las hojas se lavaron y posteriormente se secaron a temperatura ambiente y protegieron de la luz; para posteriormente molerlas en una licuadora industrial Hammer Mill® y tamizarlas en una malla no. 60. El material tamizado se depositó en frascos ámbar de boca ancha con capacidad de 1 kg, para después almacenar hasta su posterior extracción y análisis.

### 5.3 Obtención de los extractos crudos y contenido total de fenoles

#### 5.3.1 Obtención de extractos

Se eligieron como solventes de extracción, agua, etanol al 70% y acetona al 70%, con la finalidad de obtener diferentes compuestos fenólicos de acuerdo a la polaridad de los solventes, evaluar su efecto antioxidante y antimicrobiano; para elegir el más adecuado para aplicarlo en las hamburguesas de carne de cordero. Todos los extractos se realizaron al 5%.

Para el extracto acuoso, la mezcla homogénea se sometió a baño maría a 90 °C durante 10 min con agitación constante. Posteriormente, se enfrió en agua fría y se filtró con membrana Millipore de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0.45 µm. En el caso del extracto etanólico, la mezcla se maceró durante 48 h con agitación constante. Se



centrifugó durante 10 min a 3000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se filtró en un filtro Millipore de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0.45 µm. Para el extracto cetónico, la mezcla se maceró por 24 h con agitación constante. Posteriormente se centrifugó a 4 °C, durante 20 min a 6000 rpm y se recuperó el sobrenadante.

Para los análisis de actividad antioxidante *in-vitro* se utilizaron extractos frescos y para los demás análisis el extracto acuoso se liofilizó y los extractos con solventes orgánicos se concentraron en rotavapor con una bomba de vacío en un baño de agua a 45 °C, finalmente se secaron en estufa al vacío a 65 °C. Todos los extractos se conservaron en frascos ámbar a 4 °C y protegieron de la luz hasta su posterior uso.

### **5.3.2 Contenido total de fenoles (CTF)**

El CTF del extracto de las hojas de *P. dioica* se determinó con el método descrito por Kim *et al.*, (2013): para lo cual se utilizaron 0.125 mL del extracto previamente diluido que se mezcló con 0.625 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y 0.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7.5%. La absorbancia se midió a 760 nm con un espectrofotómetro Rayleigh<sup>®</sup> después de 45 min de incubación a temperatura ambiente y protegido de la luz. El contenido fenólico se calculó con una curva patrón usando ácido gálico como estándar. Los resultados se reportaron como equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG g extracto seco<sup>-1</sup>). Los análisis se realizaron por triplicado.

## **5.4 Actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos crudos de hoja de *P. dioica***

### **5.4.1 Actividad antioxidante**

#### **5.4.1.1 Captación de radicales por DPPH**

La capacidad de captación de radicales por DPPH, se determinó con el método propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995). Una alícuota previamente diluida de 200 µL de la muestra del extracto se mezcló con 2 mL de DPPH en metanol (concentración final de 125 µM), la mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 60 min protegidos de la luz. La absorbancia se midió a 515 nm. El porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(AB-AA)/AB] \times 100$$

Donde: AB es la absorbancia del blanco en el t=0 min y AA representa la absorbancia del extracto al t=60 min. A partir de los porcentajes de inhibición obtenidos de un gradiente de concentración del extracto, se determinó por regresión lineal el IC<sub>50</sub>, definido como la concentración del extracto necesaria (en µg mL<sup>-1</sup>) a la cual el 50% del radical DPPH se captó. Los análisis se realizaron por triplicado.

#### **5.4.1.2 Captación de radicales por ABTS**

El ensayo de captación de radicales ABTS se empleó para evaluar la capacidad de captación de los radicales libres, basado en la metodología utilizada por Re et al.(1999): se preparó una solución 7.0 mM de ABTS con 2.45 mM de persulfato de potasio (1:1, v/v), esta solución se dejó reposar de 12 a 16 h a temperatura ambiente protegida de la luz. Posteriormente, se mezclaron 20 mL del extracto previamente diluido con 80 mL de la solución ABTS, se agitaron vigorosamente y se dejó reposar protegida de la luz durante 6 min. Se leyó la absorbancia de la muestra a 734 nm. Los resultados se calcularon y reportaron de la misma forma que para el DPPH. Los análisis se realizaron por triplicado.

#### **5.4.1.3 Poder de reducción antioxidante del ion férrico**

El potencial antioxidante del extracto se determinó usando el ensayo de capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP) con el método propuesto por Fernandes *et al.*, (2016). El reactivo FRAP se preparó mezclando solución buffer de acetato (300 mM, pH 3.6), solución de 10 mM del reactivo TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) en 40 mM de HCl y 20 mM FeCl<sub>3</sub> a 10:1:1 (v/v/v). Una alícuota de 3,400 µL del reactivo se mezcló con 100 µL del extracto diluido. La absorbancia se midió a 595 nm después de 30 min. La curva patrón se preparó usando diferentes concentraciones de Trolox. Los resultados se expresaron como mmol equivalentes de Trolox por gramo de extracto seco (mmol ET g es<sup>-1</sup>). Los análisis se realizaron por triplicado.

## **5.4.2 Actividad antimicrobiana de los extractos crudos**

### **5.4.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo**

Para evaluar el efecto antimicrobiano del extracto crudo de hoja de pimienta, se utilizaron dos bacterias Gram-negativas y dos Gram-positivas. Las cepas de *Escherichia coli* (108412), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus cereus* (ATCC 11778) procedentes del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los medios utilizados para la actividad antimicrobiana fueron infusión cerebro corazón (BHI) para la difusión en agar y Mueller Hinton (MH) para la micro-dilución en placa con un tiempo de incubación de 24 h a 37° C. Las bacterias se inocularon en el medio correspondiente (infusión cerebro corazón (BHI) para difusión en agar y Mueller Hinton (MH) para micro-dilución en placa) con un tiempo de incubación de 24 h a 37° C.

### **5.4.2.2 Difusión en agar**

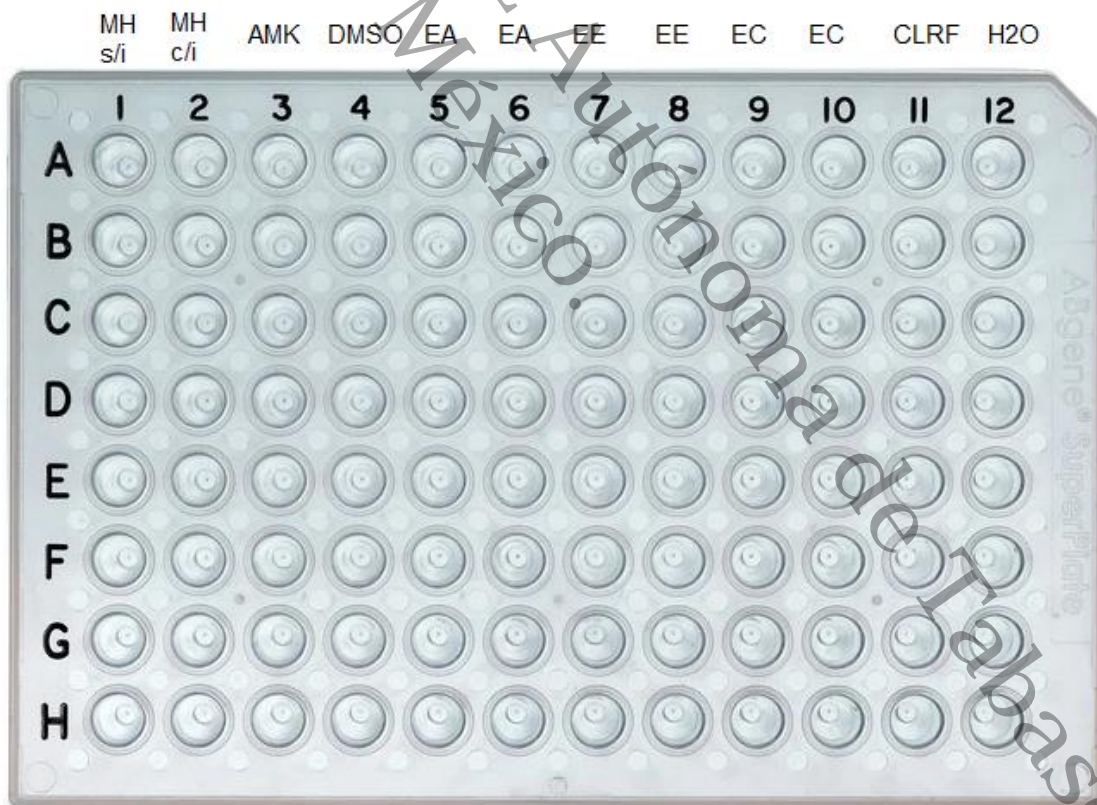
Los efectos inhibitorios del extracto de la planta se evaluaron por el método de difusión en agar. Las bacterias conservadas en congelación en medio BHI con glicerol al 50%, se activaron en caldo (BHI) durante 12 h a 36 °C en 10 mL de medio líquido, de este cultivo se tomó 1 mL para inocular 50 mL del mismo medio en las mismas condiciones de incubación, para obtener una concentración de  $10^8$  UFC/mL, a las 12 h se detuvo el crecimiento en refrigeración y posteriormente se tomaron 100  $\mu$ L que se inocularon en la superficie de cajas Petri con agar-BHI. Sobre las cajas inoculadas se colocaron discos de papel filtro Whatman No.1 (2 mm) impregnados con 10 mg de cada extracto, 60  $\mu$ g de amikacina como control positivo y 10  $\mu$ L del solvente de cada extracto como control negativo y se incubaron a 37 °C durante 24 h, registrándose al final de la incubación la medición de la zona de inhibición en milímetros (Abbes *et al.*, 2014).

### **5.4.2.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)**

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) por el método de microdilución en placa. Para lo cual, se incubó un

inóculo durante 8 h de *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli* y *B. cereus* en caldo Mueller Hinton (MH). El inóculo de cada bacteria tuvo una densidad de cultivo de  $10^8$ . Se utilizaron microplacas estériles con 96 pozos con capacidad de 400  $\mu\text{L}$  por pozo, cada placa se compuso de 12 columnas y 8 filas.

La placa se preparó de acuerdo a la Figura 1. El carril 1 y 2 tenían medio MH, el 1 sin inóculo (MH s/i) para control de esterilidad del medio y el 2 con inóculo (MH c/i) para verificación de crecimiento de bacterias. Del carril 3 al 11 se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del medio MH preparado con la mitad de agua indicada por el proveedor y con inóculo de cada bacteria para posteriormente completarlos con los controles positivos: amikacina (AMK) con un gradiente de concentración de 2 a 0.015  $\text{mg mL}^{-1}$  y cloranfenicol (CLRF) con un gradiente de 4 a 0.03  $\text{mg mL}^{-1}$ , control negativo: DMSO del 20 al 0.15% y el gradiente de extractos (EA, EE y EC) de 50 a 0.39  $\text{mg/mL}$ , respectivamente. El carril 12 contenía sólo agua destilada estéril para control de esterilidad ( $\text{H}_2\text{O}$ ).



**Figura 1.** Microplaca utilizada para la determinación de la CMI y CMB

Cada placa se agitó durante cinco minutos a 150 rpm en un agitador vórtex IKA® con un adaptador para placas. Posteriormente, se incubaron por 24 h a 37 °C, al final del tiempo de incubación se verificó el crecimiento de bacterias con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (MTT) al 1% como indicador de viabilidad ya que es un indicador de óxido-reducción que al ser reducido a formazano por las enzimas deshidrogenasas de células vivas cambia su tonalidad de amarillo a violeta. Se aplicaron 100 µL de solución de MTT al 1% a cada pozo y las placas se incubaron a 37 °C por una hora. El crecimiento bacteriano se identificó en los pozos que tuvieran coloración violeta. Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB), se tomaron 10 µL de cada tubo, se inocularon en una caja con agar MH, se incubaron a 37 °C por 24 h y se observó presencia de crecimiento microbiano. En caso de encontrar crecimiento, se reportó como actividad bacteriostática y en caso contrario se reportó como bactericida (Balouiri et al., 2016).

## **5.5 Determinación de la concentración del extracto**

Identificado el extracto para evaluar el efecto antioxidante y antimicrobiano de la hoja de *P. dioica* en la carne, se determinaron las concentraciones a evaluar con un test de aceptación afectiva. Para ello, se evaluaron tres concentraciones, las cuales se basaron en los IC<sub>50</sub> obtenidos en la captación del radical DPPH y ABTS y CMI. También se realizó una revisión de las concentraciones utilizadas de extractos de plantas, principalmente especias y subproductos agroindustriales, en productos cárnicos para comparar las concentraciones añadidas en otros estudios que tuvieron efecto antioxidante y/o antimicrobiano sin alterar las características sensoriales de los productos cárnicos evaluados (Cunha et al., 2018; García-Lomillo y González-SanJosé, 2017).

### **5.5.1 Preparación de las hamburguesas**

Las hamburguesas se elaboraron con carne de cordero Pelibuey de 15.0 ± 0.20 kg (alrededor de 70 días de edad). La carne deshuesada y sin tejido conectivo de las piernas y lomo de la canal se molió en un molino de carne marca Torrey® usando el cedazo de 3 mm. Se prepararon cuatro formulaciones, cada una con un 1.5% de sal.

Las hamburguesas control fueron las hamburguesas sin extracto y 3 tratamientos con tres diferentes concentraciones de EHP: 250, 500 y 1000 ppm, estimadas a partir del análisis *in vitro*. Para preparar las hamburguesas, la carne de cordero y los ingredientes se homogenizaron manualmente. Las hamburguesas se formaron usando una moldeadora manual (100 mm de diámetro x 2 cm de alto) con peso de 100 g.

### **5.5.2 Evaluación sensorial**

Los atributos elegidos para determinar la aceptación sensorial de las hamburguesas con el EHP fueron aroma, textura, succulencia, sabor y aceptación global con la finalidad de determinar la dosis de extracto mejor aceptada. Las hamburguesas se evaluaron con un test de aceptación afectiva usando una escala hedónica de 9 intervalos, en la cual 1 representaba “Me disgusta extremadamente” y 9 “Me gusta extremadamente”, como lo describe Meilgaard *et al.*, (2016). Las muestras se cocinaron en una parrilla eléctrica Black & Decker® a 180 °C hasta que la temperatura interna de la carne fuera de 72 °C, posteriormente, se almacenaron en un horno a temperatura máxima de 60 °C por no más de 30 min. Se cortaron en seis partes y se sirvieron en platos desechables de plástico, codificados con tres dígitos antes de servirlos individualmente a los participantes. Cada tratamiento se evaluó por 60 consumidores (Meilgaard *et al.*, 2016). El 53.44% de los participantes seleccionados fueron hombres y del total de participantes el 35% estaban en un rango de edad de entre 20 y 40 años.

De los resultados obtenidos, se seleccionó la concentración de 1000 ppm de extracto de hoja de pimienta que se añadiría a las hamburguesas de cordero para evaluar su efecto antioxidante y antimicrobiano.

### **5.6 Evaluación *in situ* del EHP adicionado a hamburguesas de carne de cordero**

Las hamburguesas se prepararon de acuerdo a la sección 5.5.1, con condiciones asépticas controladas para evitar una carga microbiana alta y que el experimento se llevara a buen término durante el almacenamiento.

La carne se asignó a uno de los siguientes tratamientos: T1: (C) control negativo, carne sin aditivos; T2: (EHP) carne con la dosis de extracto seleccionada en la evaluación sensorial (p/p) del EHP añadido a la carne para hamburguesas y T3: (BHA) control

positivo, carne con 0.02% de BHA. Todas las formulaciones se prepararon con un 1.5% de sal. Las hamburguesas se empacaron en bolsas de polietileno con cierre hermético y se mantuvieron en refrigeración a temperatura de 4 °C por 11 días. Los análisis se llevaron a cabo los días 0, 3, 7 y 11 del tiempo de almacenamiento. El pH, color, oxidación lipídica, el conteo de mesófilos aerobios, bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras se determinaron por duplicado para cada muestreo. El experimento se repitió por duplicado con muestras adquiridas en diferentes fechas.

### **5.6.1 Efecto antioxidante del EHP en las hamburguesas de carne de cordero**

#### **5.6.1.2 Medición del pH**

El pH de cada hamburguesa se midió en tres diferentes puntos con un potenciómetro para productos cárnicos (HI 99163, Hanna Instruments®, USA) equipado con un electrodo para penetración.

#### **5.6.1.2 Medición del color**

Los cambios en el color se monitorearon con un colorímetro (X-rite, SP60, USA) que se calibró con un estándar blanco y negro. El color se expresó en las coordenadas L\* (Luminosidad), a\* (Rojo-Verde) y b\* (Amarillo-Azul). Las lecturas del color se realizaron en la superficie de cada hamburguesa por triplicado en tres puntos elegidos al azar para estimar la decoloración de la carne.

#### **5.6.1.3 Análisis de la oxidación de lípidos**

Los productos de la oxidación secundaria de los lípidos en la carne se cuantificaron con el método de destilación TBARS de acuerdo al método descrito por Mohd-Esa *et al.*, (2010) en los días 0, 3, 7 y 11 del tiempo de almacenamiento. La carne de cordero (10 g) se cortó en trozos pequeños y se homogenizó con 100 mL de agua destilada durante 2 minutos. Se agregaron unas gotas de HCl 4 M para llevar la mezcla a un pH de 1.5. La mezcla se puso en calentamiento y se recogió el destilado (5 mL) en un matraz cónico. Se preparó un blanco de manera similar, utilizando 100 mL de agua destilada sin muestra añadida. Se transfirieron 5 mL de destilado a un tubo de vidrio con tapa y se agregaron 5 mL del reactivo TBA (0.02 M). La mezcla se incubó en agua en ebullición durante 35 min. Posteriormente, los tubos se enfriaron en agua durante 10 minutos y finalmente la absorbancia se midió contra el blanco a 538 nm utilizando un

espectrofotómetro UV visible (PerkinElmer Lambda 11). La oxidación de los lípidos se expresó como sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBAR) en mg de malonaldehído (MDA) kg de carne de res<sup>-1</sup>.

## **5.6.2 Efecto antimicrobiano del extracto en las hamburguesas de carne de cordero**

### **5.6.2.1 Análisis microbiológico**

Se homogenizaron 25 g de carne para hamburguesa con 225 mL de agua esterilizada peptonada (0.1% w/v) en bolsas estériles por 2 min a temperatura ambiente. Se prepararon diluciones decimales ( $10^{-1}$  –  $10^{-6}$ ) en agua peptonada (0.1%) y de éstas se realizó conteo en placa en superficie de acuerdo al tipo de medio de cultivo, el conteo se realizó por triplicado. Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: agar recuento total en placa (PCA) para el recuento viable total (CVT), agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) para el conteo de bacterias ácido lácticas (BAL), y agar papa dextrosa (PDA) para hongos y levaduras (HL). Todos los cultivos se incubaron a 37 °C por 24 h. Las cuentas microbiológicas se expresarán como el  $\log_{10}$  de las unidades formadores de colonias por gramo de hamburguesa ( $\log$  UFC g<sup>-1</sup>).

## **5.7 Diseño Experimental y Análisis Estadístico**

Para el análisis *in-vitro* de la hoja de *P. dioica*, se utilizó un diseño completamente al azar. Los niveles fueron los métodos de extracción: acuoso, etanólico y cetónico, con tres repeticiones cada uno, las variables respuesta fueron: el contenido total de fenoles, IC<sub>50</sub>, mmol ET, milímetros de la zona de inhibición y la CMI. Bajo el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu_i + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:  $\mu_i$  = Media global,  $\tau_i$  = métodos de extracción y  $\varepsilon_{ij}$  = Error aleatorio

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias con la prueba de Tukey a una probabilidad del 5%. Para correlacionar el contenido de FT con las actividades antioxidantes, los coeficientes de correlación lineal de Pearson (r) se calcularon para los tres métodos de actividad antioxidante

Para el análisis de los datos de la evaluación sensorial, los puntajes numéricos de cada intervalo de la escala hedónica, se tabularon y analizaron para cada tratamiento



utilizando un ANOVA para determinar diferencias significativas en el promedio de los puntajes asignados a las muestras y la comparación múltiple de medias se realizó con el método de Tukey a una probabilidad del 5%.

Para el análisis de los datos del efecto antioxidante y antimicrobiano del extracto en la carne para hamburguesa, se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 3 x 4. Los factores fueron las concentraciones de aditivos añadidos a las hamburguesas (control (sin aditivo), EHP (1000 ppm) y 0.02% de BHA) y los tiempos de almacenamiento (0, 3, 7 y 11 días). El número de tratamientos resultaron de la interacción de las concentraciones a añadir y el tiempo, es decir, A=3 x B=4 dando 12 tratamientos en estudio.

Bajo el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:  $\mu_i$  = Media global,  $A_i$  = Concentración de aditivos añadidos,  $B_j$  = Tiempos de almacenamiento,  $AB_{ij}$  = La interacción entre el efecto de las dosis y los tiempos de almacenamiento y  $\varepsilon_{ijk}$  = Error aleatorio

Se realizó el ANOVA y la comparación múltiple de medias se hizo con la prueba de Tukey a una probabilidad del 5%. Todos los análisis se realizaron por medio del uso del paquete estadístico SAS, versión 9.0, 2002.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Evaluación de los extractos crudos de hoja de *P. dioica* *in vitro*

#### 6.1.1 Rendimiento de extracción, contenido total de fenoles y actividad antioxidante de la hoja de *P. dioica*

En este trabajo, se obtuvieron tres diferentes extractos de la hoja de *P. dioica*, con agua y mezclas acuosas de etanol y acetona (70%). Los rendimientos de extracción (Cuadro 3) oscilaron entre 28.3 y 33.3%, siendo el extracto cetónico (EC) el de mayor rendimiento ( $P < 0.05$ ) comparado con el extracto acuoso (EA) y etanólico (EE). Esto muestra que el rendimiento de extracción aumentó al incrementar la polaridad del solvente utilizado en la extracción, lo que coincide con lo reportado en otras investigaciones realizadas en plantas de la familia *Myrtaceae*, como hojas de *Eucalyptus globulus* (Rodrigues *et al.*, 2018) y flores de *Eugenia caryophyllus* (Hemalatha *et al.*, 2016). Por otro lado, además de obtener el rendimiento más alto, el EC presentó el mayor contenido ( $P < 0.05$ ) de fenoles totales (FT) ( $626.29 \pm 28.11$  mg EAG g extracto seco<sup>-1</sup>) comparado con el EA y EE que no presentaron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre sí ( $488.29 \pm 15.56$  y  $516.35 \pm 4.96$ , respectivamente) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Fenoles totales y rendimiento en extractos de hoja de *P. dioica*

Extracto	Rendimiento (%)	Fenoles totales (mg EAG g extracto seco <sup>-1</sup> )	Fenoles totales (mg EAG g materia seca <sup>-1</sup> )
Acuoso	28.3 <sup>b</sup>	488.29 $\pm$ 15.56 <sup>b</sup>	136.733 $\pm$ 5.47 <sup>c</sup>
Etanólico	32.3 <sup>a</sup>	516.35 $\pm$ 4.96 <sup>b</sup>	168.193 $\pm$ 2.56 <sup>b</sup>
Cetónico	33.3 <sup>a</sup>	626.29 $\pm$ 28.11 <sup>a</sup>	207.87 $\pm$ 7.80 <sup>a</sup>

Cada valor representa la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ) Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (LSD) a un nivel de probabilidad  $P < 0.05$  en columna.

El objetivo del proceso de extracción es proporcionar el máximo rendimiento de sustancias con la más alta calidad en términos de concentración de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de los extractos (Shah *et al.*, 2014). Por lo que, el

rendimiento de la extracción depende de varios factores como la polaridad del solvente, pH, temperatura, tiempo de extracción y la composición de la muestra (Gullón *et al.*, 2017). El rendimiento de extracción influye en el contenido de compuestos fenólicos los cuales se relacionan con la actividad antioxidante del extracto, debido a que se derivan de los metabolitos secundarios de las plantas, protegiendo múltiples órganos de la oxidación, y por lo tanto, deben considerarse como antioxidantes naturales (Granato *et al.*, 2018).

Diversos estudios indican que los extractos obtenidos con acetona-agua incrementaron la solubilidad de los compuestos fenólicos y por ello se obtuvieron valores altos en el contenido de FT (Alothman *et al.*, 2009; Do *et al.*, 2014; Złotek *et al.*, 2016). También hay reportes en los que destaca al etanol como uno de los mejores solventes comparado con la acetona y el agua, principalmente por su efectividad y por ser reconocido como un solvente seguro (Hidalgo y Almajano, 2017). Sin embargo, la selección del solvente más adecuado para la extracción más eficiente de compuestos fenólicos, depende del material utilizado y de la posterior aplicación del extracto (Vuong *et al.*, 2011).

Referente a estudios en *P. dioica*, las investigaciones son escasas, principalmente porque están enfocadas en la obtención de aceites esenciales más que en extractos de diferente polaridad. En este sentido, el contenido de FT obtenido con los tres solventes fue mayor al extracto obtenido con etanol al 50%, reportado por Dearlove *et al.*, (2008) en pimienta en polvo ( $122.1 \pm 7.0$  mg EAG g extracto seco<sup>-1</sup>) y al extracto obtenido por Soxhlet ( $102.1 \pm 1.80$  mg EAG g extracto seco<sup>-1</sup>) reportado por Nayak *et al.*, (2008), que obtuvo un rendimiento del 20%. En otro estudio, realizado en un extracto metanólico de hojas maduras e inmaduras por Dharmadasa *et al.*, (2015), el contenido de FT reportado es menor ( $94.15 \pm 2.14$  y  $99.09 \pm 3.65$  mg EAG g extracto seco<sup>-1</sup>, respectivamente) comparado con los tres solventes. Las diferencias en el contenido de FT entre los extractos evaluados en este experimento y lo reportado por otros autores pueden deberse a diferencias genotípicas y ambientales

En este sentido, los resultados del extracto acuoso a pesar de haber obtenido el rendimiento y contenido de FT más bajos, presentó cantidades superiores de

compuestos fenólicos comparado con aquellos extractos obtenidos con solventes orgánicos en otras investigaciones, por lo que se considera el solvente universal más seguro y económico y efectivo para la extracción de compuestos bioactivos.

### **6.1.2 Actividad antioxidante**

Debido a las diferencias entre los métodos disponibles para determinar la actividad antioxidante, los resultados de un solo método se reducirían a un mecanismo de acción. Por lo que se utilizaron tres técnicas, basadas en la captación del radical DPPH·, la captación del catión radical ABTS y la habilidad para reducir el ion férrico por medio del ensayo FRAP.

#### **6.1.2.1 Captación de radicales por DPPH·**

El Cuadro 4, muestra la habilidad de los extractos para captar el radical DPPH·, expresada como IC<sub>50</sub>, que se define como la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial del radical a un 50%. El IC<sub>50</sub> de un compuesto se relaciona de forma inversa con su actividad antioxidante, entre más bajo es su valor más alta es la actividad antioxidante (Hidalgo y Almajano, 2017). Los resultados muestran que el tipo de solvente influyó (P<0.05) en la captación del radical de los extractos de hoja de *P. dioica* L, siendo la extracción con acetona la que mostró el menor IC<sub>50</sub> (52.26±11.74 µg mL<sup>-1</sup>) seguido por el etanol (71.31±9.24 µg mL<sup>-1</sup>) y el agua (74.51±5.45 µg mL<sup>-1</sup>). Sin embargo, estas dos últimas no presentaron diferencias entre ellas (P>0.05). No obstante, en otros estudios realizado por Dhanani *et al.*, (2017) y Do *et al.*, (2014) en plantas comunes del sur de Asia, los IC<sub>50</sub> más bajos se reportaron en el extracto etanólico. La diferencia en la eficacia para captar el radical DPPH entre los extractos puede ser explicada por la existencia de compuestos polifenólicos con diferentes características químicas y polaridades, las cuales pueden solubilizarse en solventes específicos (Yakoub *et al.*, 2018). Este método y el de Foulín-Ciocalteu, utilizado para determinar el contenido de FT, presentaron el mismo orden entre los solventes, en los cuales destaca el extracto obtenido con acetona, estas similitudes se deben a que ambos ensayos operan con el mismo mecanismo de transferencia de electrones (Tan y Lim, 2015).

**Cuadro 4.** DPPH, ABTS y FRAP en extractos de hoja de *P. dioica*

Extracto	DPPH·, IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	ABTS· <sup>+</sup> , IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	FRAP (mmol ET g extracto seco <sup>-1</sup> )
Acuoso	74.51±5.45 <sup>b</sup>	141.73±1.49 <sup>b</sup>	6.36±0.11 <sup>c</sup>
Etanólico	71.31±9.24 <sup>b</sup>	123.79±16.36 <sup>ab</sup>	6.76±0.18 <sup>b</sup>
Cetónico	52.26±11.74 <sup>a</sup>	116.90±10.82 <sup>a</sup>	7.52±0.16 <sup>a</sup>

Cada valor representa la media ± desviación estándar (n = 3) Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (LSD) a un nivel de probabilidad P <0.05 en columna.

#### 6.1.2.2 Captación del radical ABTS·<sup>+</sup>

En el segundo ensayo se cuantificó la captación del catión radical ABTS·<sup>+</sup> (Cuadro 4). Al igual que el ensayo DPPH· los resultados se expresaron como IC<sub>50</sub>. Los resultados muestran el mismo efecto del solvente de extracción, sin embargo, sólo se encontraron diferencias significativas (P<0.05) entre el extracto cetónico y acuoso. El extracto etanólico presentó un IC<sub>50</sub> similar (P>0.05) al extracto cetónico y acuoso. La actividad antioxidante de los extractos para captar el radical puede ordenarse como EC>EE>EA. Sin embargo, aunque el extracto acuoso de hoja de *P. dioica* obtuvo el IC<sub>50</sub> más bajo, este valor fue similar al reportado por Loizzo *et al.*, (2016) para un extracto etanólico obtenido de bayas (76.1±1.9). La obtención de extractos acuosos es un procedimiento simple, rápido, barato y no tóxico para extraer compuestos fenólicos de manera eficiente debido a la polaridad del agua (Takao *et al.*, 2015). Se puede inferir que los extractos preparados con diferentes solventes y técnicas exhiben valores variables de la actividad antioxidante influenciados por el cambio en la polaridad, la cual altera la habilidad para disolver los diferentes compuestos fenólicos (Hayouni *et al.*, 2007). Ningún estudio hasta el momento ha reportado la habilidad para captar el radical ABTS·<sup>+</sup> en hoja de *P. dioica* con los solventes utilizados en este estudio.

#### 6.1.2.3 Poder de reducción antioxidante del ión férrico (FRAP)

Los resultados del ensayo FRAP se muestran en el Cuadro 4. Todos los extractos mostraron un efectivo potencial reductor, incluso mejor que el Trolox, un análogo de la vitamina E, soluble en agua y que es usado como referencia para captar radicales libres

(Hidalgo y Almajano, 2017). Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tres extractos, siendo el valor más alto para el EC ( $7.52 \pm 0.16$ ), seguido del EE ( $6.76 \pm 0.18$ ) y el EA ( $6.36 \pm 0.11$ ). Los tres extractos mostraron la misma tendencia y orden que en la actividad antioxidante medida por la captación de radicales libres, cabe resaltar que los tres extractos mostraron potencial reductor mayor a  $6 \text{ mmol g extracto seco}^{-1}$ , los cuales si se comparan con los reportados por Dharmadasa *et al.*, (2015) para un extracto metanólico de hoja de *P. dioica* colectadas en Sri Lanka, los tres extractos duplican el equivalente de Trolox en miligramos. Este método demostró la habilidad de los extractos para reducir iones metálicos. Generalmente, las propiedades reductoras están asociadas con la presencia de compuestos, que ejercen su acción al romper la cadena de radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno (Loizzo *et al.*, 2016).

#### **6.1.2.4 Relación entre la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles**

Para correlacionar el contenido de FT con las actividades antioxidantes, los coeficientes de correlación lineal de Pearson ( $r$ ) se calcularon para los tres métodos de actividad antioxidante. Se observó una correlación moderada ( $r = -0.6949$ ) para el método ABTS y una correlación fuerte para los métodos DPPH y FRAP ( $r = -0.8288$  y  $r = 0.9127$ , respectivamente). Mientras más cercano a uno es el valor de  $|r|$  más fuerte es la correlación entre las variables, por lo que el método de FRAP presentó un grado de asociación más estrecho entre la actividad antioxidante y el contenido de FT. La correlación moderada entre la actividad antioxidante y los FT se puede atribuir a la presencia de compuestos fenólicos además de otros metabolitos secundarios como aceites volátiles, caretonoides y vitaminas (Wongsa *et al.* 2012). La correlación fuerte indica que la actividad antioxidante se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos (Fernandes *et al.* 2016). Estos resultados están en concordancia con los reportados por Carvalho *et al.* (2015), Nascimento *et al.* (2014) y Medina-Juárez *et al.* (2012). Para el caso de la *P. dioica*, Turgay y Esen, (2015) reportaron una correlación similar ( $r = 0.81$ ) entre el contenido de FT y el DPPH. Es importante considerar que la actividad antioxidante en extractos de plantas depende tanto del material utilizado como de las interacciones, efectos sinérgicos y antagónicos entre los

componentes fenólicos así como la estructura y concentración de los mismos (Hayouni et al. 2007; Craft et al. 2012)

### 6.1.3 Actividad antimicrobiana

Los resultados de los métodos de difusión en disco y micro-dilución para determinar la actividad antimicrobiana de los EA, EE y EC de las hojas de *P. dioica* se muestran en el Cuadro 5. Con el método de difusión en disco, se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) para la sensibilidad de las bacterias con los tres extractos evaluados (EA, EE y EC), pero la diferencia más importante radicó en que las bacterias Gram-positivas (*B. cereus* y *S. aureus*) presentaron mayor sensibilidad que las Gram-negativas (*S. Typhimurium* y *E. coli*), lo anterior en concordancia con otras investigaciones que evaluaron la actividad antimicrobiana de la *P. dioica* en polvo (Ceylan y Fung, 2004), aceite esencial de hojas (Vazquez et al., 2013) y aceite esencial de bayas (Dussault et al., 2014), cabe destacar que el extracto acuoso presentó una zona de inhibición similar a las encontradas con un extracto metanólico (14 y 15 mm) probado en cepas de *S. aureus* (Asha et al., 2013).

**Cuadro 5.** Actividad antimicrobiana de hoja de *P. dioica*

Extracto	<i>B. cereus</i> (ATCC 11778)		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>S. typhimurium</i> (ATCC 14028)		<i>E. coli</i> (ATCC 35150)	
	ZI <sup>1</sup> (mm)	CMI <sup>2</sup>	ZI* (mm)	CMI	ZI (mm)	CMI	ZI* (mm)	CMI
Acuoso	13.5±1.7 <sup>a</sup>	12.5	15.2±2.3 <sup>a</sup>	12.5	8.7±1.9 <sup>a</sup>	25	9.2±2.6 <sup>a</sup>	12.5 <sup>a</sup>
Etanólico	10.0±0.8 <sup>b</sup>	12.5	12.0±3.5 <sup>ab</sup>	12.5	8.0±0.8 <sup>a</sup>	25	7.5±0.5 <sup>a</sup>	25
Cetónico	12.0±2.3 <sup>a</sup>	12.5	8.2±0.5 <sup>b</sup>	12.5	7.7±1.2 <sup>a</sup>	25	9.0±1.1 <sup>a</sup>	25

<sup>1</sup>:Concentración del extracto 10 mg ml<sup>-1</sup>; <sup>2</sup>: MIC en mg mL<sup>-1</sup>; <sup>a,b,c</sup> Los valores de la media en la misma columna no seguidos por una letra común difieren significativamente ( $P < 0.05$ ); por sus siglas reconocidas en inglés ATCC= Colección Americana de Cultivos Tipo, ZI= zonas de inhibición, CMI= Concentración Mínima Inhibitoria

Por otro lado, el método de microdilución en placa ofrece una determinación más precisa de la actividad antimicrobiana, pero al igual que el ensayo de difusión en disco se observó que las bacterias Gram-positivas presentaron mayor sensibilidad a los tres extractos, con una MIC de 12.5 mg mL<sup>-1</sup> con actividad bactericida. En el caso de las

Gram-negativas la MIC fue de 25 mg mL<sup>-1</sup>, excepto para el extracto acuoso que inhibió el crecimiento de *E. coli* con una MIC de 12.5 mg mL<sup>-1</sup> en todos los casos la actividad fue bacteriostática. Esto sugiere que el extracto acuoso posee compuestos antimicrobianos no fenólicos responsables de inhibir el crecimiento de esta bacteria (Cowan, 1999).

Las diferencias en los efectos antimicrobianos entre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se deben principalmente a la diferencia en la estructura de sus paredes celulares (CITA). La pared celular de las bacterias Gram-negativas está constituida por una capa externa de lipopolisacáridos y una membrana adicional, las cuales le aportan más capacidad de amortiguación funcionando como una barrera preventiva contra compuestos hidrofóbicos y por lo tanto, a los compuestos fenólicos y no fenólicos (Negi, 2012).

## **6.2 Determinación de la dosis del extracto y evaluación sensorial**

De los resultados obtenidos de la actividad antioxidante y antimicrobiana de la hoja de *P. dioica* se eligió el extracto acuoso por presentar contenido total de fenoles, actividad antioxidante y antimicrobiana similares ( $P > 0.05$ , ver Cuadro 4 y 5) comparado con los extractos obtenidos con solventes orgánicos. Por otro lado, Shah *et al.*, (2014) mencionan que es importante garantizar la remoción de todas las trazas del solvente de extracción para que no afecte la salud humana y sea aceptable para los consumidores.

Todos los atributos sensoriales de las hamburguesas de carne de cordero elaboradas con tres diferentes concentraciones de extracto de hoja de *P. dioica* (EHP) mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las concentraciones y el control (Cuadro 6). La adición del EHP en las hamburguesas de cordero mejoró el aroma, el sabor y la aceptación global ( $P < 0.05$ ) comparadas con la hamburguesa control, siendo la concentración de 1000 ppm, la que obtuvo la mayor aceptación con calificaciones en todos los atributos mayores de 7 que corresponden a “Me gusta moderadamente” en la escala sensorial utilizada. Con respecto a la succulencia y textura, la concentración de 250 y 500 ppm mostraron aceptabilidad semejante a las hamburguesas control ( $P > 0.05$ ).



**Cuadro 6.** Efecto del nivel de extracto de hoja de *P. dioica* en las características sensoriales de hamburguesas de cordero (media  $\pm$  desviación estándar) (n=60)

Atributo	Control 0 ppm	C1 250 ppm	C2 500 ppm	C3 1000 ppm	S <sup>1</sup>
Aroma	5.82 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>	6.42 $\pm$ 1.68 <sup>b</sup>	6.48 $\pm$ 1.66 <sup>b</sup>	6.97 $\pm$ 1.55 <sup>b</sup>	**
Textura	6.65 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>	7.07 $\pm$ 1.51 <sup>ab</sup>	6.95 $\pm$ 1.48 <sup>ab</sup>	7.40 $\pm$ 1.45 <sup>b</sup>	*
Suculencia	6.58 $\pm$ 1.89 <sup>a</sup>	6.88 $\pm$ 1.75 <sup>a</sup>	6.90 $\pm$ 1.50 <sup>ab</sup>	7.48 $\pm$ 1.32 <sup>b</sup>	*
Sabor	6.47 $\pm$ 2.09 <sup>a</sup>	7.15 $\pm$ 1.66 <sup>b</sup>	7.38 $\pm$ 1.37 <sup>bc</sup>	7.77 $\pm$ 1.58 <sup>c</sup>	***
Aceptación global	6.72 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup>	7.32 $\pm$ 1.36 <sup>b</sup>	7.42 $\pm$ 1.27 <sup>b</sup>	7.73 $\pm$ 1.25 <sup>b</sup>	**

<sup>1</sup>: Significancia: \*\*\*( $P < 0.001$ ), \*\*( $P < 0.01$ ), \*( $P < 0.05$ ); a,b,c: Valores de la media en la misma fila no seguidos por una letra común difieren significativamente ( $P < 0.05$ )

Los resultados de la evaluación sensorial indicaron que el EHP puede ser utilizado como ingrediente para proteger del deterioro químico y biológico a las hamburguesas de carne de cordero sin comprometer las características sensoriales. Además, considerando que la aceptación de las hamburguesas de carne de cordero fue dependiente de la concentración, se eligió la concentración mayor para garantizar la aceptación sensorial y el posible efecto antioxidante y antimicrobiano. Otros estudios, también demostraron que la adición de extractos de plantas no afectó las propiedades sensoriales de los productos cárnicos (Lara *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2016).

## 6.3 Efecto antioxidante del EHP en las hamburguesas de carne de cordero

### 6.3.1 Medición del pH

Los cambios en el pH de las hamburguesas de carne de cordero evaluadas, se presentan en el Cuadro 7. Durante todo el almacenamiento hubo variación de pH entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ). Al tercer día de almacenamiento, los tres tratamientos tuvieron un aumento en el pH ( $P > 0.05$ ), las hamburguesas adicionadas con EHP y BHA presentaron los valores más altos (6.12 y 6.09, respectivamente) sin diferencias entre ellos ( $P > 0.05$ ). Para el final del almacenamiento, el pH de las hamburguesas control y las adicionadas con EHP disminuyó a 5.25 y 5.52 almacenamiento y el pH de las

hamburguesas tratadas con BHA (5.98) no presentó alteración respecto al tercer día ( $P>0.05$ ), siendo las más estables durante el almacenamiento. Los pH finales para todos los tratamientos estuvieron por debajo de 6.4, valor considerado como crítico para el consumo de acuerdo con Cózar *et al.*, (2013).

**Cuadro 7.** Evolución del pH en hamburguesas de cordero adicionadas con EHP y BHA durante el almacenamiento (media  $\pm$  desviación estándar) (n=4)

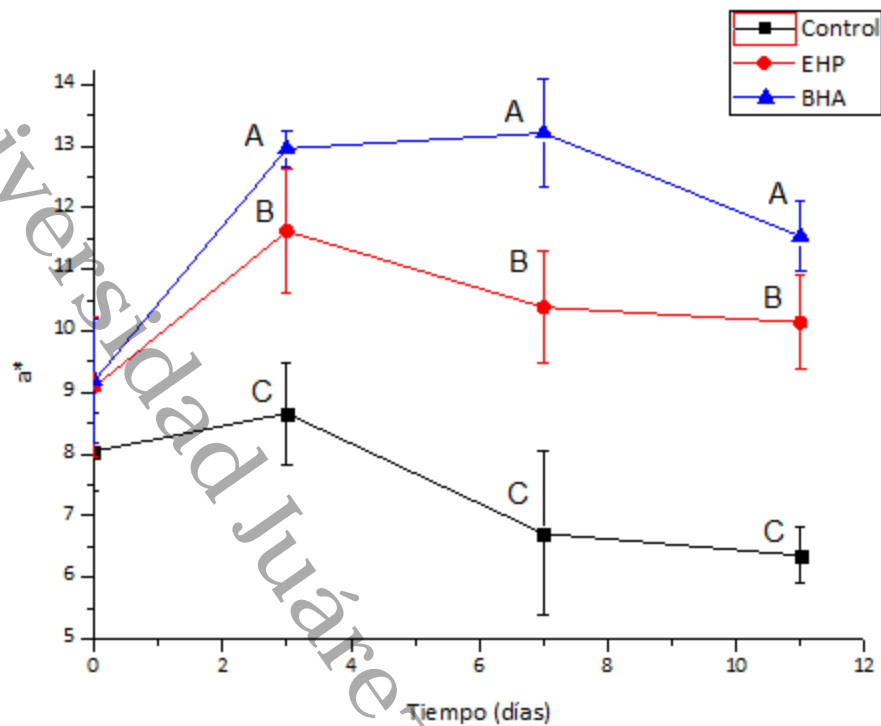
Variable	Tratamientos	Tiempo de almacenamiento (días)			
		0	3	7	11
pH	CO	5.74 $\pm$ 0.02 <sup>Bb</sup>	5.94 $\pm$ 0.05 <sup>Ba</sup>	5.82 $\pm$ 0.05 <sup>Ba</sup>	5.25 $\pm$ 0.21 <sup>Cc</sup>
	EHP	5.82 $\pm$ 0.06 <sup>ABb</sup>	6.12 $\pm$ 0.05 <sup>Aa</sup>	5.85 $\pm$ 0.04 <sup>ABb</sup>	5.53 $\pm$ 0.09 <sup>Bc</sup>
	BHA	5.89 $\pm$ 0.02 <sup>Ab</sup>	6.09 $\pm$ 0.10 <sup>Aa</sup>	5.96 $\pm$ 0.08 <sup>Ab</sup>	5.98 $\pm$ 0.11 <sup>Aa</sup>

<sup>A,B,C</sup>: Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ) para cada tratamiento; <sup>a,b,c</sup>: Diferentes letras en una fila indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ) por cada día de muestreo; Tratamientos: CO-control; EHP-extracto de hoja de *P. dioica* 1000 ppm; BHA 200 ppm; Significancia: n.s.: no significativa ( $P>0.05$ ); \* ( $P<0.05$ )

La disminución en el pH en productos cárnicos durante el almacenamiento, por lo general se le atribuye a la producción de ácidos orgánicos principalmente por el incremento de la población de bacterias ácido lácticas (Jones, 2004), fenómeno que se observa con las hamburguesas control y las hamburguesas adicionadas con EHP (Cuadro 8). La estabilidad del pH en las hamburguesas con BHA se puede explicar con el aumento de las poblaciones de bacterias que causan degradación de proteínas y aminoácidos y formación de amonía (Morsy *et al.* 2018).

### 6.3.2 Medición del color

Los cambios en luminosidad ( $L^*$ ), rojo ( $a^*$ ) y amarillo ( $b^*$ ) se analizaron durante el almacenamiento. Para la luminosidad y amarillo no se encontraron diferencias entre tratamientos ( $P>0.05$ ). Para la luminosidad todos los valores disminuyeron durante el almacenamiento, los cuales estuvieron entre 51.29 y 46.39. Los valores de  $b^*$  (amarillo) aumentaron lo que se relacionó con los resultados de TBARS, los valores encontrados estuvieron en el rango de 9.90 a 12.04, las muestras control obtuvieron los valores más altos coincidiendo con las muestras que obtuvieron una mayor oxidación de lípidos.



**Figura 2.** Cambios en el parámetro  $a^*$  (rojo) de hamburguesas de cordero adicionadas con EHP y BHA durante el almacenamiento.

<sup>A,B,C</sup> Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ )

El valor de  $a^*$  (rojo) se considera el parámetro de color más importante en la evaluación de la oxidación de la carne ya que una disminución en el color rojo hace a un producto cárnico inaceptable para los consumidores (Suman y Joseph, 2013). Todos los tratamientos presentaron variación ( $P < 0.05$ ) en este parámetro ( $a^*$ ) durante el periodo de almacenamiento (Figura 2). Durante los 11 días de almacenamiento, las muestras control obtuvieron los valores más bajos de rojo ( $P < 0.05$ ), en comparación con las hamburguesas con EHP y BHA. La decoloración de las hamburguesas control durante el almacenamiento se puede explicar debido a la oxidación lipídica, la cual potencia la oxidación de la mioglobina. Los productos de la oxidación lipídica, promueven la conversión de la oximioglobina roja en metamioglobina café, la cual se acumula en la superficie de la carne, permitiendo la decoloración de las hamburguesas (Faustman *et al.*, 2010). Por otro lado, el color rojo de las hamburguesas adicionadas con EHP no presentó diferencias ( $P < 0.05$ ) al inicio y final del almacenamiento, esto pudo deberse a

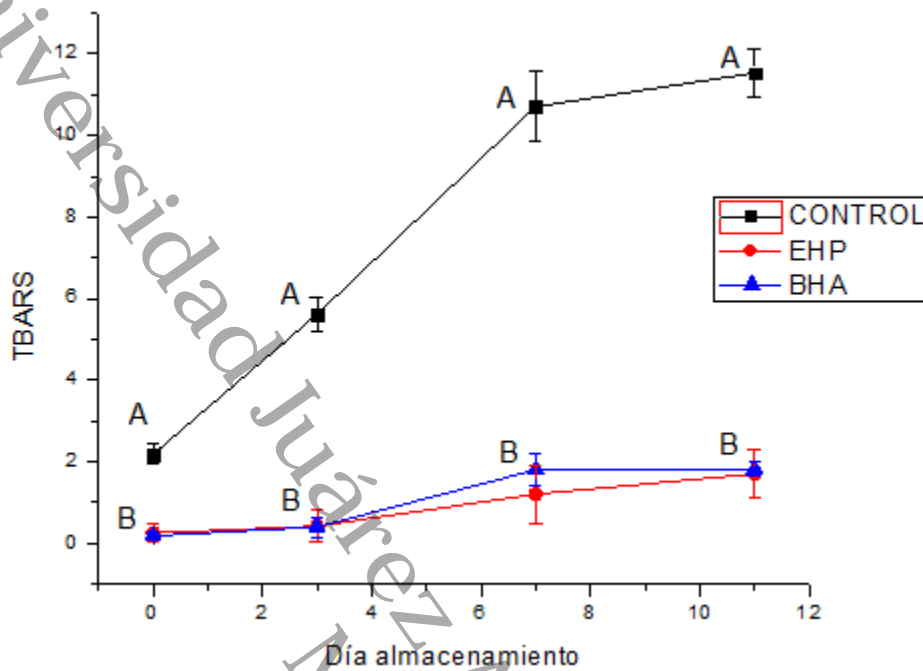
que la mayoría de los compuestos fenólicos son solubles en agua y esta característica permite la interacción directa con la mioglobina y las proteínas solubles, lo cual ejerció protección contra la decoloración, reduciendo así la oxidación de los lípidos (Kroll y Rawel, 2001). Esta tendencia coincide con otros estudios realizados en carne de cordero adicionada con extractos de plantas (Andres *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2016; Muíño *et al.*, 2017).

### 6.3.3 Oxidación de lípidos

La oxidación de lípidos se analizó en las hamburguesas de carne de cordero almacenadas a 4 °C usando el método de destilación de TBARS (Figura 3). En todos los tratamientos hubo incremento ( $P < 0.05$ ) en los valores de TBARS a través del tiempo, pero en las hamburguesas control, la oxidación fue mayor comparada con los otros dos tratamientos desde el inicio y hasta el final del periodo de almacenamiento ( $P < 0.05$ ), presentando un valor máximo de  $11.53 \pm 0.09$  mg MDA/kg a los 11 días. El EHP y el BHA presentaron la misma capacidad para reducir la oxidación lipídica en las hamburguesas de cordero, ya que no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos a los 11 días de almacenamiento, demostrando una inhibición mayor al 80% comparada con las hamburguesas control. Al respecto, Munekata *et al.*, (2016) y Fernandes *et al.*, (2017) también observaron un incremento en los valores de TBARS durante el almacenamiento en refrigeración de hamburguesas de cordero adicionadas con extractos de plantas.

De acuerdo con Soldatou *et al.*, (2009), la rancidez en carne de cordero solo puede detectarse cuando los valores de TBARS son mayores a 4.40 mg MDA/kg, y esto puede variar dependiendo de la sensibilidad individual. Basándose en este valor, se puede asumir que las hamburguesas control alcanzaron niveles detectables a partir del día 3 de almacenamiento, mientras que las hamburguesas con EHP y BHA no excedieron este límite durante todos los días del almacenamiento. Sin embargo, este valor es mayor que el límite de 1.59 mg MDA/kg indicado como el valor máximo que no afecta la salud de los consumidores (Ozer y Sariçoban, 2010). Debido a esto, el uso de antioxidantes naturales en la carne de cordero es extremadamente importante para

prevenir problemas de salud en los consumidores, quienes podrían consumir productos oxidados sin ser conscientes de los riesgos.



**Figura 3.** Valores de TBARS (mg MDA kg carne<sup>-1</sup>) de hamburguesas de cordero adicionadas con EHP y BHA durante el almacenamiento. A,B,C Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05)

#### 6.4 Efecto antimicrobiano del extracto en las hamburguesas de carne de cordero

La evolución de los conteos (log<sub>10</sub> UFC/g) de la cuenta viable total CVT (mesófilos aerobios), bacterias ácido lácticas BAL y hongos y levaduras HyL se muestran en el Cuadro 8. Estos microorganismos están presentes naturalmente en la carne ovina (Gutiérrez *et al.*, 2013; Andrés *et al.*, 2016).

Al inicio del tiempo de almacenamiento no se encontraron diferencias para la CVT (P>0.05). Las cuentas iniciales de mesófilos aerobios (CVT) alcanzaron un conteo de 5.81 log<sub>10</sub> UFC/g, el cual fue menor que el límite establecido por la NOM-034-SSA1-1993 en carne para hamburguesa y similares a los encontrados en otros estudios en carne de cordero (Fernandes *et al.*, 2016).

**Cuadro 8.** Cambios microbiológicos en hamburguesas de cordero adicionadas con EHP y BHA durante el almacenamiento a 4 °C. Unidad: log UFC g<sup>-1</sup>

Microorganismos	Tratamientos	Tiempo de almacenamiento (días)			
		0	3	7	11
<b>Cuenta viable total</b>	CO	5.81 ± 0.09 <sup>Aa</sup>	6.46 ± 0.09 <sup>Ab</sup>	7.24 ± 0.11 <sup>Ac</sup>	7.54 ± 0.12 <sup>Ad</sup>
	EHP	5.73 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	6.36 ± 0.16 <sup>Ab</sup>	7.12 ± 0.15 <sup>Ac</sup>	7.26 ± 0.15 <sup>Bd</sup>
	BHA	5.80 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	6.40 ± 0.17 <sup>Ab</sup>	7.10 ± 0.10 <sup>Bc</sup>	7.36 ± 0.11 <sup>Bd</sup>
<b>Bacterias ácido lácticas</b>	CO	6.13 ± 0.22 <sup>Aa</sup>	6.50 ± 0.13 <sup>Ab</sup>	7.33 ± 0.07 <sup>Ac</sup>	7.54 ± 0.13 <sup>Ad</sup>
	EHP	5.92 ± 0.06 <sup>Ba</sup>	6.35 ± 0.15 <sup>Ab</sup>	7.35 ± 0.10 <sup>ABc</sup>	7.50 ± 0.11 <sup>Ad</sup>
	BHA	5.82 ± 0.25 <sup>Ba</sup>	6.31 ± 0.17 <sup>Bb</sup>	7.20 ± 0.12 <sup>Bc</sup>	7.42 ± 0.09 <sup>Ad</sup>
<b>Hongos y levaduras</b>	CO	5.72 ± 0.24 <sup>Aa</sup>	6.18 ± 0.12 <sup>Ab</sup>	7.01 ± 0.20 <sup>Ac</sup>	7.38 ± 0.14 <sup>Ad</sup>
	EHP	5.65 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	6.01 ± 0.11 <sup>ABb</sup>	6.77 ± 0.19 <sup>Bc</sup>	7.10 ± 0.17 <sup>Bd</sup>
	BHA	5.63 ± 0.07 <sup>Aa</sup>	5.99 ± 0.19 <sup>Bb</sup>	6.79 ± 0.19 <sup>Bc</sup>	7.23 ± 0.10 <sup>Ad</sup>

<sup>A,B,C</sup>: En una columna, diferentes letras indican diferencias significativas (P<0.05) para cada tipo de microorganismo; <sup>a,b,c,d</sup>: En una fila, diferentes letras indican diferencias significativas (P<0.05) por cada día de muestreo

Durante el almacenamiento, la CVT incrementó significativamente (P<0.001) para todos los tratamientos y las hamburguesas con BHA (7.36 log<sub>10</sub> UFC/g) no difirieron (P>0.05) en relación con las hamburguesas que contenían el extracto de hoja de pimienta (7.26 log<sub>10</sub> UFC/g), pero difirieron en relación a las hamburguesas control (7.54 log<sub>10</sub> UFC/g) (P<0.05). Considerando el límite máximo de CVT de 7 log<sub>10</sub> UFC/g, establecido por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF, 2004), para el cual la carne es considerada inapropiada para el consumo, las hamburguesas almacenadas bajo las condiciones de este estudio podrían tener un máximo de vida de anaquel de 7 días, ya que después de este periodo todos los tratamientos se consideran inaceptables.

Al inicio del tiempo de almacenamiento, las hamburguesas control obtuvieron una población mayor de bacterias ácido lácticas (BAL) en relación con las adicionadas con EHP y BHA (P<0.05), pero al final del tiempo de almacenamiento los tres tratamientos obtuvieron poblaciones similares (P>0.05). Sin embargo, las hamburguesas control

presentaron las poblaciones más altas, seguidas por las adicionadas con EHP y BHA, lo cual tuvo relación directa con el pH. A partir del día 7, la concentración reportada para los tres tratamientos alcanzó los límites máximos considerados para las BAL (7 log<sub>10</sub> UFC/g) y en la cual inicia la alteración de la carne (Nortjé y Shaw, 1989). En contraste a los presentes resultados, Andrés *et al.*, (2016) observaron una concentración menor en hamburguesas de cordero adicionadas con extracto de orujo de tomate a los 7 días de almacenamiento

Los hongos y levaduras siguieron una tendencia creciente similar a los otros microorganismos, sin embargo, al final del tiempo de almacenamiento las hamburguesas adicionadas con EHP presentaron una concentración menor ( $P < 0.05$ ) comparadas con las hamburguesas control y las adicionadas con BHA. Esto en concordancia con las propiedades antifúngicas del EHP, como previamente se ha reportado en otros estudios, y principalmente a la presencia de sus compuestos fenólicos (Kamble, 2012; Rao *et al.*, 2012).

Algunos autores han sugerido que el uso de extractos de plantas ricos en compuestos fenólicos prolonga la vida de anaquel de la carne y productos cárnicos debido a su actividad antimicrobiana, incluida la *P. dioica* como una de las especias con uno de los mayores potenciales, sugiriendo actividad antimicrobiana compatible con antioxidantes sintéticos (Tajkarimi *et al.* 2010). Sin embargo, la vida de anaquel es frecuentemente limitada por el deterioro microbiano dependiendo de las condiciones de almacenamiento, como de la concentración inicial del material crudo (Bañón *et al.*, 2007), así como de la concentración del extracto y el empaque utilizado (Garrido *et al.*, 2011).

## VII. CONCLUSIONES

La hoja de *Pimenta dioica* es una fuente importante de compuestos fenólicos los cuales tienen una relación directa con la actividad antioxidante, por lo que los extractos pueden ser útiles como aditivos para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. La actividad antimicrobiana *in vitro* no fue efectiva para bacterias Gram-negativas.

La adición de extracto acuoso de hoja de *P. dioica* en una concentración de 1000 ppm mejora la aceptación de hamburguesas de carne de cordero. También, tiene efecto antioxidante al adicionarse en este producto cárnico, inhibiendo la oxidación lipídica al mismo nivel que el aditivo sintético BHA durante el almacenamiento (4°C), pero limita microbiológicamente la vida de anaquel de las hamburguesas a 7 días.

La hoja de *P. dioica* puede ser considerada como materia prima para la obtención de extractos que se utilicen como conservadores para mejorar la calidad, la estabilidad y la seguridad de productos cárnicos.



## VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda complementar el estudio de los extractos de hoja de *Pimenta dioica* con el análisis de otros compuestos fitoquímicos como flavonoides, taninos, saponinas, entre otros. De igual forma, obtener la composición química de los extractos permitiría identificar los compuestos específicos responsables del efecto antioxidante y antimicrobiano

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* con hongos y levaduras de interés comercial.

Se requieren más estudios que aborden una concentración máxima límite del extracto acuoso de hoja de *P. dioica* que no afecte los atributos sensoriales de la carne y con esto evaluar si mejora el efecto antimicrobiano durante el almacenamiento.

Probar otros sistemas de almacenamiento de las hamburguesas de carne de cordero (empaque al vacío, atmósferas modificadas, congelación).

## IX. LITERATURA CITADA

- Abbes, Z., El Abed, N., Amri, M., Kharrat, M., Ahmed, S. B. H. (2014) Antioxidant and antibacterial activities of the parasitic plants *Orobanche foetida* and *Orobanche crenata* collected on faba bean in Tunisia. *Journal of Animal and Plant Sciences* 24: 310-314.
- Addis, M. (2015) Major Causes of Meat Spoilage and Preservation Techniques: A Review. *Food Science and Quality Management* 41: 101-114.
- Adeyinka, A., y Richard, F. (2015) Application of phytochemical extracts and essential oils in food products: A review. *Internatinal Journal of Biotechnology and Food Science* 3(3): 31-35.
- Ahmad, S. R., Gokulakrishnan, P., Giriprasad, R., Yattoo, M. A. (2015) Fruit based natural antioxidants in meat and meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(11): 1503-1513.
- Akarpat, A., Turhan, S., Ustun, N. S. (2008) Effects of Hot-Water Extracts from Myrtle, Rosemary, Nettle and Lemon Balm Leaves on Lipid Oxidation and Color of Beef Patties during Frozen Storage. *Journal of Food Processing and Preservation* 32(1): 117-132.
- Alothman, M., Bhat, R., y Karim, A. A. (2009) Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry* 115(3): 785-788.
- Anand, S. y Sati, N. (2013) Artificial preservatives and their harmful effects: looking toward nature for safer alternatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 4(7): 2496.
- Andres, A. I., Petron, M. J., Delgado-Adamez, J., Lopez, M., Timon, M. (2017). Effect of Tomato Pomace Extracts on the Shelf-Life of Modified Atmosphere-Packaged Lamb Meat. *Journal of Food Processing and Preservation* 41(4): e13018.
- Asha, M., Chaithra, M., Kambar, Y., Vivek, M., Kekuda, P. (2013) Antibacterial activity of leaf and bark extracts of *Pimenta dioica* (Linn.) Merrill against clinical isolates of

*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2(5): 3207-3215.

Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., Mahomoodally, F. (2015) Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. Industrial Crops and Products 71: 197-204.

Ayala-Zavala, J. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., González-Aguilar, G. A. (2010) Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own byproducts: looking for integral exploitation. Journal of Food Science 75(8): R175-R181.

Aylward, L. (2008) Report on the future of the sheep/lamb and goat sector in Europe (2007/2192 (INI)). A6-0196/2008. Committee on Agriculture and Rural Development. Rapporteur: Liam Aylward: Report to the European Parliament (2008/196).

Baggio, S. R., Bragagnolo, N. (2006) Cholesterol oxide, cholesterol, total lipid and fatty acid contents in processed meat products during storage. LWT-Food Science and Technology 39(5): 513-520.

Baker, I. A., Oray, K. A., Hussein, K. N. (2015) Effect of Thyme Leaves Extract on Quality of Lamb and Chicken Meat during Storage. Journal University of Zakho 3(A) 2: 198-204.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S. K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis 6(2): 71-79.

Bañón, S., Díaz, P., Rodríguez, M., Garrido, M. D., Price, A. (2007) Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. Meat Science 77: 626-633.

Bellés, M., Alonso, V., Roncalés, P., Beltrán, J. A. (2017) Effect of borage and green tea aqueous extracts on the quality of lamb leg chops displayed under retail conditions. Meat Science 129: 153-160.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25-30.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94(3): 223-253.
- Cabarkapa, I. S., Duragic, O. M., Kostadinovic, L. M. (2016) Essential oils: Mode of antimicrobial activity and potential application in food systems. *Agro Food Industry Hi-Tech* 27(3): 61-64.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., Ferreira, I. (2014) Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(4): 377-399.
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I. C. (2018) Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology* 71: 107-120.
- Carvalho, A. V., de Andrade Mattietto, R., de Oliveira Rios, A., de Almeida Maciel, R., Moresco, K. S., de Souza Oliveira, T. C. (2015) Bioactive compounds and antioxidant activity of pepper (*Capsicum* sp.) genotypes. *Journal of Food Science and Technology* 52(11): 7457-7464.
- Cervený, J., Meyer, J. D., Hall, P. A. (2009) Microbiological spoilage of meat and poultry products. In: *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Springer New York. pp. 69-86.
- Colindres, P. y Brewer, M. S. (2011) Oxidative stability of cooked, frozen, reheated beef patties: effect of antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(5): 963-968.
- Costa, D. C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Ramos, F., Castilho, M. C., Sanches-Silva, A. (2015) Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science & Technology* 45(2): 336-354.
- Cowan, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 564-582.

- Cózar, A., Linares, B., Garrido, D., Vergara, H. (2013) Physicochemical, Microbiological Quality and Oxidative Stability in Spiced Lamb Meat Burgers. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 3(3): 217.
- Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., Pegg, R. B. (2012) Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11(2): 148-173.
- Cunha, L. C., Monteiro, M. L. G., Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Muchenje, V., de Carvalho, F. A. L., Conte-Junior, C. A. (2018) Natural antioxidants in processing and storage stability of sheep and goat meat products. *Food Research International* 111: 379-390.
- Das, A. K., Rajkumar, V., Nanda, P. K., Chauhan, P., Pradhan, S. R., Biswas, S. (2016) Antioxidant efficacy of litchi (*litchi chinensis* sonn.) pericarp extract in sheep meat nuggets. *Antioxidants* 5(2): 16.
- Dave, D. y Ghaly, A. E. (2011) Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: A critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Science* 6(4): 486-510.
- De Oliveira, R. A., Reis, T. V., do Sacramento, C. K., Duarte, L. P., de Oliveira, F. F. (2009) Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19(3): 771-775.
- Dearlove, R. P., Greenspan, P., Hartle, D. K., Swanson, R. B., Hargrove, J. L. (2008) Inhibition of protein glycation by extracts of culinary herbs and spices. *Journal of Medicinal Food* 11(2): 275-281.
- Decker, E. A., y Park, Y. (2010) Healthier meat products as functional foods. *Meat Science* 86(1): 49-55.
- Del Nobile, M. A., Lucera, A., Costa, C., Conte, A. (2012) Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology* 3(287): 103-115.
- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., Kumar, S. (2017) Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry* 10: S1193-S1199.

- Dharmadasa, R.M., Abeysinghe, D. C., Dissanayake, D.M.N., Abeywardhane, K.W., Fernando, N.S. (2015) Leaf essential oil composition, antioxidant activity, total phenolic content and total flavonoid content of *Pimenta dioica* (L.) Merr (Myrtaceae): A superior quality spice grown in Sri Lanka. *Universal Journal of Agricultural Research* 3(2): 49-52.
- Ding, Y., Wang, S. Y., Yang, D. J., Chang, M. H., Chen, Y. C. (2015) Alleviative effects of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) flower on lipid peroxidation and protein degradation in emulsified pork meatballs. *Journal of Food and Drug Analysis* 23(3): 501-508.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Phuong, L. T. N., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., Ju, Y. H. (2014) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22(3): 296-302.
- FAO, Food and Agricultural Organization (2016) Carne y productos cárnicos. <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/home.html>. Consultada el 25 de marzo de 2017
- FAOSTAT, Food and Agricultural Organization Statistics (2016) Ganadería primaria. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL>. Consultada el 14 de noviembre de 2016.
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., Suman, S. P. (2010) Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat science* 86(1): 86-94.
- Fernandes, R. P. P., Trindade, M. A., Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., de Melo, M. P. (2013) Sensory acceptance of lamb burger prepared with natural antioxidants. Conference paper en 59th International Congress of Meat Science and Technology. Realizado en Izmir, Turquía. Del 18 al 23 de agosto 2013. [https://www.researchgate.net/publication/293489156\\_SENSORY\\_ACCEPTANCE\\_OF\\_LAMB\\_BURGER\\_PREPARED\\_WITH\\_NATURAL\\_ANTIOXIDANTS](https://www.researchgate.net/publication/293489156_SENSORY_ACCEPTANCE_OF_LAMB_BURGER_PREPARED_WITH_NATURAL_ANTIOXIDANTS). Consultado el 25 de marzo de 2017
- Fernandes, R. P. P., Trindade, M. A., Tonin, F. G., Pugine S. M. P., Hirano, M. H., Lorenzo, J. M., de Melo, M. P. (2014) Physicochemical parameters and sensory

properties of lamb burger manufactured with different concentrations of oregano extract. Conference paper en 60th International Congress of Meat Science and Technology (60th ICOMST). Realizado en Punta Del Este, Uruguay. Del 17 al 22 de agosto de 2014.  
[https://www.researchgate.net/publication/281840893\\_PHYSICOCHEMICAL\\_PARAMETERS\\_AND\\_SENSORY\\_PROPERTIES\\_OF\\_LAMB\\_BURGER\\_MANUFACTURED\\_WITH\\_DIFFERENT\\_CONCENTRATIONS\\_OF\\_OREGANO\\_EXTRACT](https://www.researchgate.net/publication/281840893_PHYSICOCHEMICAL_PARAMETERS_AND_SENSORY_PROPERTIES_OF_LAMB_BURGER_MANUFACTURED_WITH_DIFFERENT_CONCENTRATIONS_OF_OREGANO_EXTRACT).  
Consultada el 25 de marzo de 2017

Fernandes, R. D. P. P., Trindade, M. A., Tonin, F. G., MP, S., Pugine, J. M., de Melo, M. P. (2015) Protein and myoglobin oxidative stability during 120 days of frozen storage of burgers added with oregano extract. Conference paper en 61st International Congress of Meat Science and Technology. Realizado en Clermont-Ferrand, Francia. Del 23 al 28 de agosto 2015. DOI: 10.13140/RG.2.1.3819.8800

Fernandes, R. P. P., Trindade, M. A., Tonin, F. G., Lima, C. G., Pugine S. M. P., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., de Melo M. P. (2016) Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* 53(1): 451-460.

Fernandes, R. P. P., Trindade, M. A., Tonin, F. G., Pugine, S. M. P., Lima, C. G., Lorenzo, J. M., De Melo, M. P. (2017) Evaluation of oxidative stability of lamb burger with *Origanum vulgare* extract. *Food Chemistry* 233: 101-109.

Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J. A. (1997) Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry* 59(3): 345-353.

García-Lomillo, J., y González-SanJosé, M. L. (2017) Applications of wine pomace in the food industry: approaches and functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16(1): 3-22.

- Garrido, M. D., Auqui, M., Martí, N., Linares, M. B. (2011) Effect of two different red grape pomace extracts obtained under different extraction systems on meat quality of pork burgers. *LWT - Food Science and Technology* 44(10): 2238-2243.
- Girova, T., Gochev, V., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Schmidt, E., Stoyanova, A. (2010) Antimicrobial activity of essential oils from spices against psychrotrophic food spoilage microorganisms. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 24(sup1): 547-552.
- Gochev, V. K., y Girova, T. D. (2009) Antimicrobial activity of various essential oils against spoilage and pathogenic microorganisms isolated from meat products. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 23(sup1): 900-904.
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., Miyashita, K., Camp, J., Alasalvar, C., Ismail, A. B., Elmore, S., Birch, G. G., Chalampopoulos, D., Astley, S. B., Pegg, R., Zhou, P., Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods?. *Food Chemistry* 264: 471-475.
- Gullón, B., Gullón, P., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., Eibes, G. (2017). Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties. *Industrial Crops and Products* 108, 649-659.
- Gutierrez, J. I., Tejada, J. F., Parra, V., Andrés, A. I. (2013) Evolution of the fatty acid composition and oxidative stability of Merino lamb meat stored under different modified atmospheres. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 52: 81–92.
- Hamill, R. y Botineştean, C. (2016) Meat: Estructure. In: Caballero B., Finglas P. M., Toldrá F. (eds.). *Encyclopedia of Food and Health*, Vol. 3, Foo-Min. Academic Press of Elsevier. Oxford. pp. 701-710.
- Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007) The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of *Tunisian Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry* 105(3): 1126-1134.



- Hayrapetyan, H., Hazeleger, W. C., Beumer, R. R. (2012) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat pate at different temperatures. *Food Control* 23(1): 66-72.
- Hemalatha, R., Nivetha, P., Mohanapriya, C., Sharmila, G., Muthukumaran, C., Gopinath, M. (2016) Phytochemical composition, GC-MS analysis, *in vitro* antioxidant and antibacterial potential of clove flower bud (*Eugenia caryophyllus*) methanolic extract. *Journal of Food Science and Technology* 53(2): 1189-1198.
- Hidalgo, G. I., y Almajano, M. (2017) Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: a review. *Antioxidants* 6(1): 7-34.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6): 1841-1856.
- Hulankova, R., Borilova, G., Steinhauserova, I. (2013) Combined antimicrobial effect of oregano essential oil and caprylic acid in minced beef. *Meat Science* 95(2): 190-194.
- Hygreeva, D., Pandey, M. C., Radhakrishna, K. (2014) Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. *Meat Science* 98(1): 47-57.
- ICMSF (2004) Microorganismos indicadores. En *Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico*. Acribia, Zaragoza, España. pp. 3–5.
- Incoronato, A. L., Gammariello, D., Conte, A., Del Nobile, M. A. (2015) Technological solutions to increase shelf life of fresh meat burger. *Journal of Food Processing and Preservation* 39(6): 1324-1333.
- INTEROVIC (2014) Guía de Cortes de la Carne de Cordero y Lechal. <http://www.interovic.es/materiales-promocionales-de-la-campana-carne-de-cordero-y-lechal-vuelva-disfrutar-de-la-carne>. Consultada el 25 de marzo de 2017.
- Jayasena, D. D., y Jo, C. (2013) Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology* 34(2): 96-108.

- Jiang, J., y Xiong, Y. L. L. (2016) Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Science* 120: 107-117.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Schmidt, E. (2007) Spice plants: chemical composition and antioxidant properties of *Pimenta* Lindl. essential oils, part 1: *Pimenta dioica* (L.) Merr. leaf oil from Jamaica. *Nutrition-Vienna* 31(2): 55.
- Jones, R. J. (2004) Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Microbiology* 90(3): 273-282.
- Kadim, I., T., y Mahgoub O. (2007) Postharvest Handling of Red Meat. In *Handbook of Food Preservation*. Taylor & Francis Group pp. 173-202.
- Kamble, V. A. (2012) *In vitro* anticandidal activity of *Pimenta dioica* (Allspice) essential oil against clinical isolates of *Candida albicans* and *non-albicans candida*. *International Journal of Life Science and Pharma Research* 2(3): 150-158.
- Karabagias, I., Badeka, A., Kontominas, M. G. (2011) Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Science* 88(1): 109-116.
- Kim, S. J., Cho, A. R., Han, J. (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control* 29(1): 112-120.
- Konikowska, K., Regulska-Ilow, B., Rozanska, D. (2012) The influence of components of diet on the symptoms of ADHD in children. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 63(2): 127-134.
- Kroll, J., y Rawel, H. M. (2001) Reactions of plant phenols with myoglobin: influence of chemical structure of the phenolic compounds. *Journal of Food Science* 66(1): 48-58.

- Kumar, B. H., Badarudin, A., y Jose, A. (2010) DPPH Radical scavenging activity and antibacterial activity of *Pimenta dioica* (L.) Merr. *Oriental Journal of Chemistry* 26(4): 1501-1505.
- Lambert, A. D., Smith, J. P., Dodds, K. L. (1991) Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat—a review. *Food Microbiology* 8(4): 267-297.
- Lara, M. S., Gutierrez, J. I., Timon, M., Andrés, A. I. (2011) Evaluation of two natural extracts (*Rosmarinus officinalis* L. and *Melissa officinalis* L.) as antioxidants in cooked pork patties packed in MAP. *Meat Science* 88(3): 481-488.
- Lawless, H. T., y Heymann, H. (2010) *Sensory evaluation of food: principles and practices*. 2nd ed. Springer Science y Business Media. New York. pp. 325-328.
- Li Destri Nicosia, M. G., Pangallo, S., Raphael, G., Romeo, F.V., Strano, M.C., Rapisarda, P., Droby, S., Schena, L. (2016) Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract. *Postharvest Biology and Technology* 114: 54-61.
- Linares, M. B., Berruga, M. I., Bórnez, R., Vergara, H. (2007) Lipid oxidation in lamb meat: Effect of the weight, handling previous slaughter and modified atmospheres. *Meat science* 76(4): 715-720.
- Linares, M. B., Cózar, A., Garrido, M. D., Vergara, H. (2012) Chemical and sensory quality of lamb meat burgers from Manchego Spanish breed. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 63(7): 843-852.
- Maqsood, S., Benjakul, S., Abushelaibi, A., Alam, A. (2014) Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: A detailed review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(6): 1125-1140.
- Mariem, C., Sameh, M., Nadhem, S., Soumaya, Z., Najiba, Z., Raoudha, E. G. (2014) Antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from *Nitraria retusa* fruits and their applications to meat product preservation. *Industrial Crops and Products* 55: 295-303.

- Martínez-Pérez, D., Hernández-García, M. y Martínez-González, E. (2013) La pimienta gorda en México (*Pimenta dioica* L. Merrill): avances y retos en la gestión de la innovación. 1st ed. Chapingo, Edo. de México: Universidad Autónoma Chapingo. pp. 30 y 42.
- Medina-Juárez, L. Á., Molina-Quijada, D., Del Toro Sánchez, C. L., González-Aguilar, G. A., Gámez-Meza, N. (2012) Antioxidant activity of peppers (*Capsicum annum* L.) extracts and characterization of their phenolic constituents. *Interciencia* 37(8): 588-593.
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T., Civille, G. V. (2016) *Sensory evaluation techniques*, 5<sup>th</sup> edn. Taylor & Francis Group. CRC press. Boca Raton, Florida, USA. pp. 307.
- Moharram, H. A., y Youssef, M. M. (2014) Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology* 11(1): 31-42.
- Mohd-Esa, N., Hern, F. S., Ismail, A., Yee, C. L. (2010) Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry* 122(4): 1055-1060.
- Morsy, M. K., Mekawi, E., Elsabagh, R. (2018) Impact of pomegranate peel nanoparticles on quality attributes of meatballs during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology* 89: 489-495.
- Moudache, M., Colon, M., Nerin, C., Zaidi, F. (2016) Phenolic content and antioxidant activity of olive by-products and antioxidant film containing olive leaf extract. *Food Chemistry* 212: 521-527.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., Parajó, J. C. (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72(2): 145-171.
- Muño, I., Díaz, M. T., Apeleo, E., Pérez-Santaescolástica, C., Rivas-Cañedo, A., Pérez, C., Cañeque, V., Lauzurica, S., de la Fuente, J. (2017) Valorisation of an extract from olive oil waste as a natural antioxidant for reducing meat waste resulting from oxidative processes. *Journal of Cleaner Production* 140 Part 2: 924-932.

- Munekata, P. E. S., Fernandes, R. D. P. P., de Melo, M. P., Trindade, M. A., Lorenzo, J. M. (2016) Influence of peanut skin extract on shelf-life of sheep patties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6(7), 586-596.
- Mustafa, A., y Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta* 703(1): 8-18.
- Muthukumar, M., Naveena, B. M., Vaithiyanathan, S., Sen, A. R., Sureshkumar, K. (2014) Effect of incorporation of *Moringa oleifera* leaves extract on quality of ground pork patties. *Journal of Food Science and Technology* 51(11): 3172-3180.
- Nascimento, P. L., Nascimento, T. C., Ramos, N. S., Silva, G. R., Gomes, J. E. G., Falcão, R. E., Moreira, K. A., Porto, A. L., Silva, T. (2014) Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of phenolics isolated from different extracts of *Capsicum frutescens* (*Pimenta Malagueta*). *Molecules* 19(4): 5434-5447.
- Nayak, Y., Abhilash, D., Vijaynarayana, K., Fernandes, J. (2008) Antioxidant and hepatoprotective activity of *Pimenta dioica* leaves extract. *Journal of Cell and Tissue Research* 8(3): 1571-1576
- 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.
- Norma Mexicana NMX-FF-063-1987. (1987) Especies y condimentos. Pimienta gorda o tipo jamaica. (*Pimenta officinalis* o *Pimenta dioica merrill*) entera en estado seco. Especificaciones. Spices and condiments-allspice or jamaica type. (*Pimenta officinalis* o *Pimenta dioica Merrill*) whole and dry especifications. Normas mexicanas. Dirección general de normas, 30 de julio de 1987.
- Norma Oficial Mexicana NOM-009-Z00-1994. (1994) Proceso sanitario de la carne. Diario Oficial de la Federación, 16 de noviembre de 1994.
- Norma Oficial Mexicana NOM-034-SSA1-1993. (1993) Bienes y Servicios. Productos de la carne. Carne molida y carne molida moldeada. Envasadas. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación, 23 de marzo de 1994.

- Nortjé, G.L. y Shaw, B.G. (1989) The effect of ageing treatment on the microbiology and storage characteristics of beef in modified atmosphere packs containing 25% CO<sub>2</sub> plus 75% O<sub>2</sub>. *Meat Science* 25: 43–58.
- Nowak, A., Czyzowska, A., Efenberger, M., Krala, L. (2016) Polyphenolic extracts of cherry (*Prunus cerasus* L.) and blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as natural preservatives in meat products. *Food Microbiology* 59: 142-149.
- O'Keefe, S. F. y Wang, H. (2006) Effects of peanut skin extract on quality and storage stability of beef products. *Meat Science* 73(2): 278-286.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2006) Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat science* 73(2): 236-244.
- Ozer, O. y Sariçoban, C. (2010) The effects of butylated hydroxyanisole, ascorbic acid, and a-tocopherol on some quality characteristics of mechanically deboned chicken patty during freezer storage. *Czech Journal of Food Sciences* 28: 150–160.
- Patel, S. (2015) Plant essential oils and allied volatile fractions as multifunctional additives in meat and fish-based food products: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* 32(7): 1049-1064.
- Patterson, K. Y., Trainer D., Holden, J. M., Howe, J. C. (2009) USDA Nutrient Data Set for Fresh Pork. Council Responsible for Nutrition. <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/80400525/Data/Pork/Pork09.pdf>. Consultada el 25 de marzo de 2017.
- Patrignani, F., Siroli, L., Serrazanetti, D. I., Gardini, F., Lanciotti, R. (2015) Innovative strategies based on the use of essential oils and their components to improve safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology* 46(2): 311-319.
- Pereira, P. M. D. C. C. y Vicente, A. F. D. R. B. (2013) Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science* 93(3): 586-592.

- Peryam, D. R., Pilgrim, F. J. (1957) Hedonic scale method of measuring food preferences. *Food Technology* 11: 9-14.
- Poimenidou, S. V., Bikouli, V. C., Gardeli, C., Mitsi, C., Tarantilis, P. A., Nychas, G.-J., Skandamis, P. N. (2016) Effect of single or combined chemical and natural antimicrobial interventions on *Escherichia coli* O157:H7, total microbiota and color of packaged spinach and lettuce. *International Journal of Food Microbiology* 220: 6-18.
- Ramadan, A. M., Suzuki, T. (2012) Detection of genotoxicity of phenolic antioxidants, butylated hydroxyanisole and tert-butylhydroquinone in multiple mouse organs by the alkaline comet assay. *Journal of American Science*: 8(1): 722-727.
- Rao, P. S., Navinchandra, S., Jayaveera, K. N. (2012) An important spice, *Pimenta dioica* (Linn.) Merrill: A review. *International Current Pharmaceutical Journal* 1(8): 221-225.
- 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.
- Rodrigues, V. H., de Melo, M. M., Portugal, I., Silva, C. M. (2018) Extraction of Eucalyptus leaves using solvents of distinct polarity. Cluster analysis and extracts characterization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 135: 263-274.
- Rodriguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Andrade, M. J., Kylli, P., Estevez, M. (2011) Avocado (*Persea americana* Mill.) Phenolics, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(10): 5625-5635.
- Sahadeo, P. y Vilas, K. (2011) Antibacterial activity of some essential oils against food borne pathogen and food spoilage bacteria. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2(3): B143- B150.
- Saucier, L. (2016) Microbial spoilage, quality and safety within the context of meat sustainability. *Meat Science* 120: 78-84.

- Schmidt, M. M., Kubota, E. H., Prestes, R. C., Mello, R. O., Rosa, C. S., Scapin, G., Ferreira, S. (2016) Development and evaluation of pork burger with added natural antioxidant based on extract of banana inflorescence (*Musa cavendishii*). *CyTA-Journal of Food* 14(2), 280-288.
- Selani, M. M., Contreras-Castillo, C. J., Shirahigue, L. D., Gallo, C. R., Plata-Oviedo, M., Montes-Villanueva, N. D. (2011) Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat Science* 88(3): 397-403.
- Shah, M. A., Bosco, S. J. D., Mir, S. A. (2014) Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science* 98(1): 21-33.
- Shahidi, F., Wanasundara, P. K. J. P. D., Hong, C. (1992) Antioxidant activity of phenolic-compounds in meat model systems. In Ho, C. T., Lee, C. Y., and Huang, M. T. (eds). *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health I, Analysis, Occurrence and Chemistry*. ACS Symposium Series 506. American Chemical Society. USA. pp. 214-222.
- Sharma, S. (2015a) Harmful Effect of Chemicals Present in Junk Food. *Global Journal For Research Analysis* 4(6): 11-12.
- Sharma, S. (2015b) Food Preservatives and their harmful effects. *International Journal of Scientific and Research Publications* 5 (4): 1-2.
- Siwach, R., Tokas, J., Seth, R. (2016) Use of lycopene as a natural antioxidant in extending the shelf-life of anhydrous cow milk fat. *Food Chemistry* 199: 541-546.
- Soldatou, N., Nerantzaki, A., Kontominas, M. G., Savvaidis, I. N. (2009) Physicochemical and microbiological changes of "Souvlaki"—A Greek delicacy lamb meat product: Evaluation of shelf-life using microbial, colour and lipid oxidation parameters. *Food Chemistry* 113(1): 36-42.
- Spigno, G., Trarnelli, L., De Faveri, D. M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81(1): 200-208.

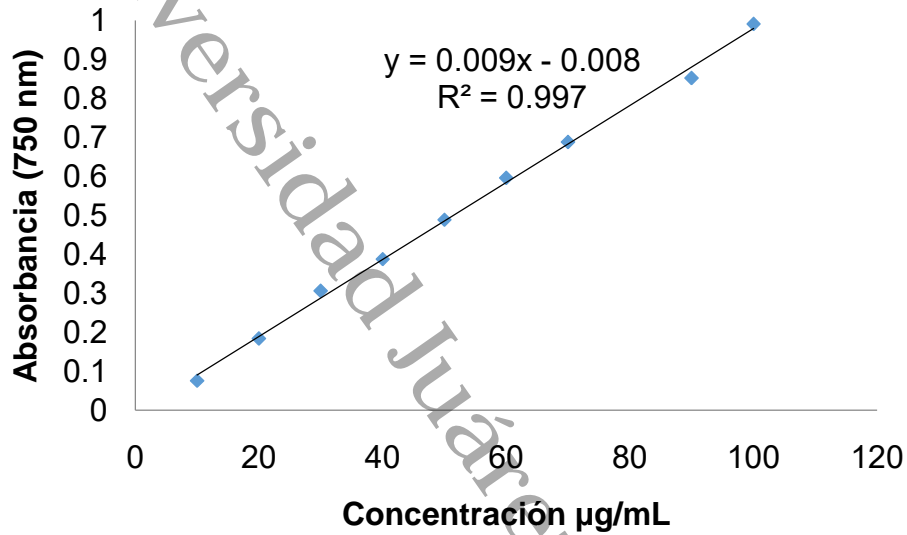


- Suman, S. P., Joseph, P. (2013) Myoglobin chemistry and meat color. Annual Review of Food Science and Technology 4, 79-99.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. O. (2010) Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21:1199-1218.
- Takao, L. K., Imatomi, M., Gualtieri, S. C. J. (2015) Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). Brazilian Journal of Biology 75(4): 948-952.
- Tan, J. B. L., y Lim, Y. Y. (2015) Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. Food Chemistry 172: 814-822.
- Trindade, R. A., Lima, A., Andrade-Wartha, E. R., Oliveira-Silva, A. M., Mancini-Filho, J., Villavicencio, A. L. C. H. (2009) Consumer's evaluation of the effects of gamma irradiation and natural antioxidants on general acceptance of frozen beef burger. Radiation Physics and Chemistry 78(4): 293-300.
- Turgay, O., y Esen, Y. (2015) Antioxidant, total phenolic and antimicrobial characteristics of some species. Bulgarian Journal of Agricultural Science 21(3): 498-503.
- Vadlapudi, V., y Kaladhar, D. S. V. G. K. (2012) Phytochemical evaluation and molecular characterization of some important medicinal plants. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2: S26-S32.
- Vázquez-Cahuich, D.A., Espinosa-Moreno, J., Centurion-Hidalgo, D., Velázquez-Martinez, J. R., Borges-Argaez, R., Farfan-Caceres, M. (2013) Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of *Malvaviscus arboreus* Cav, *Pimenta dioica* (L.) Merr., *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth and *Psidium guajava* L. Tropical and Subtropical Agroecosystems 16(3): 505-513.
- Villalobos-Delgado, L. H., Caro, I., Blanco, C., Bodas, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., Mateo, J. (2015) Effect of the addition of hop (infusion or powder) on the oxidative stability of lean lamb patties during storage. Small Ruminant Research 125: 73-80.

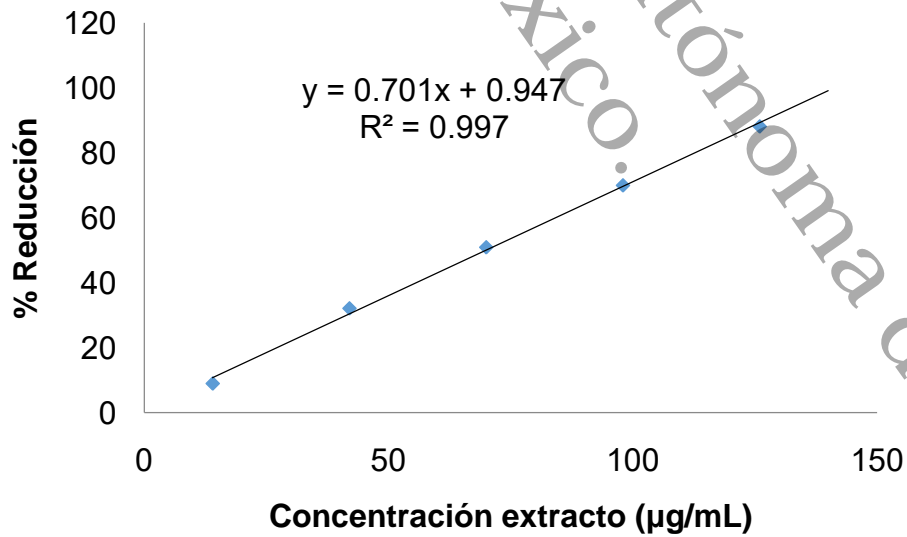
- Vuong, Q. V., Stathopoulos, C. E., Nguyen, M. H., Golding, J. B., Roach, P. D. (2011) Isolation of green tea catechins and their utilization in the food industry. *Food Reviews International* 27(3): 227-247.
- Williams, P. (2007) Nutritional composition of red meat. *Nutrition & Dietetics* 64(4): 113-119.
- Wijngaard, H., Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. (2012) Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International* 46(2): 505-513.
- Wongsa, P., Chaiwarit, J., Zamaludien, A. (2012) *In vitro* screening of phenolic compounds, potential inhibition against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry* 131(3): 964-971.
- Yakoub, A. R. B., Abdehedi, O., Jridi, M., Elfalleh, W., Nasri, M., Ferchichi, A. (2018) Flavonoids, phenols, antioxidant, and antimicrobial activities in various extracts from Tossa jute leave (*Corchorus olitorus* L.). *Industrial Crops and Products* 118: 206-213.
- Zhou, G. H., Xu, X. L., Liu, Y. (2010) Preservation technologies for fresh meat—A review. *Meat Science* 86(1): 119-128.
- Złotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M., Świeca, M. (2016). The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23(5): 628-633

## X. ANEXOS

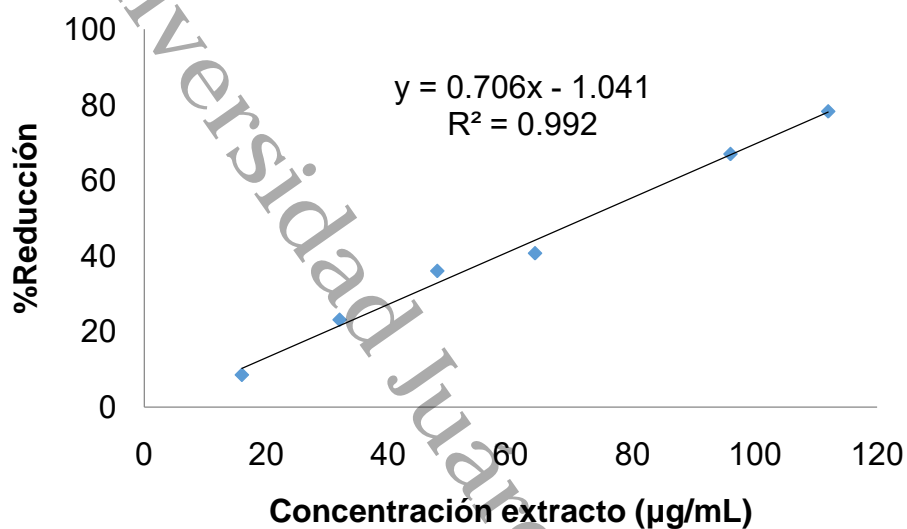
Anexo 1. Curva de calibración de fenoles totales con ácido gálico



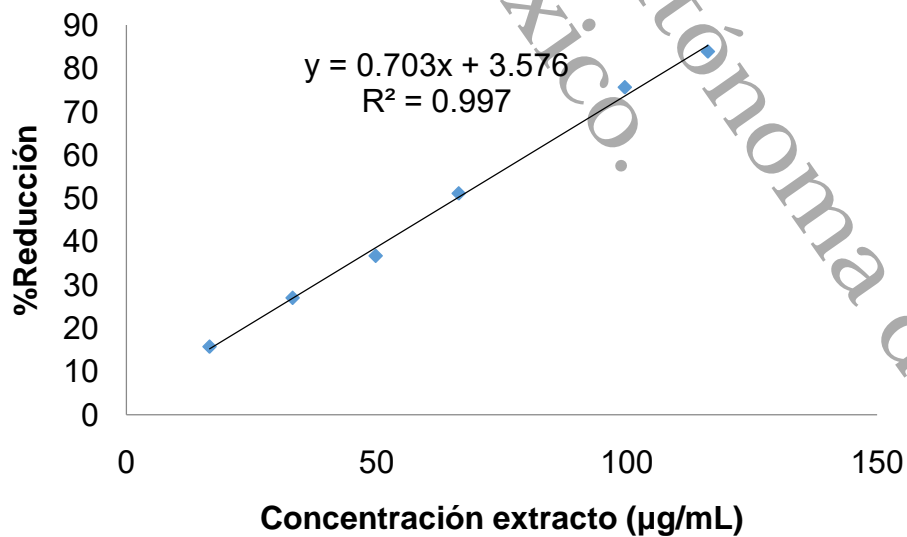
Anexo 2. Porcentaje de reducción del radical DPPH para el extracto acuoso



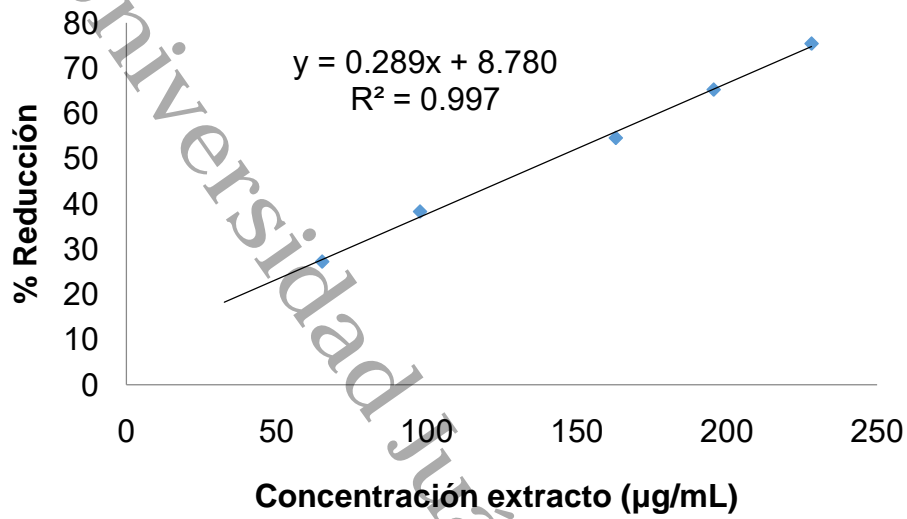
**Anexo 3.** Porcentaje de reducción del radical DPPH para el extracto etanólico



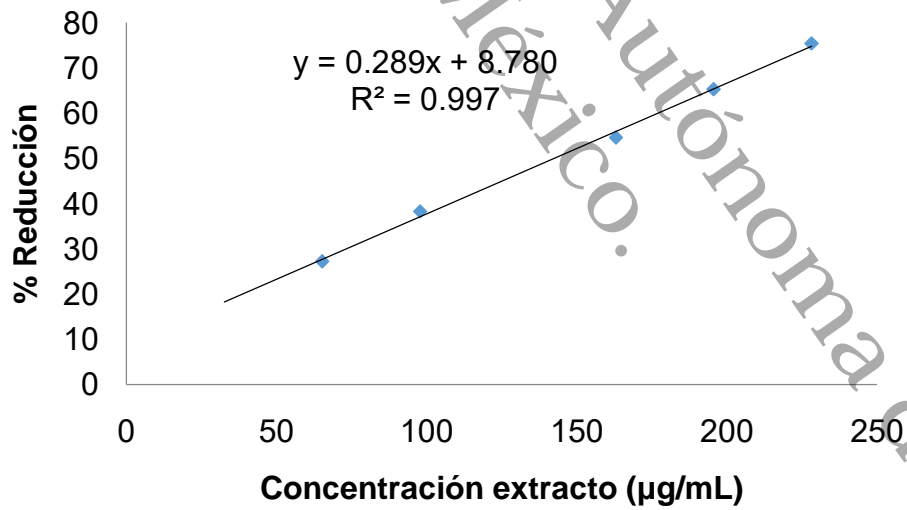
**Anexo 4.** Porcentaje de reducción del radical DPPH para el extracto cetónico



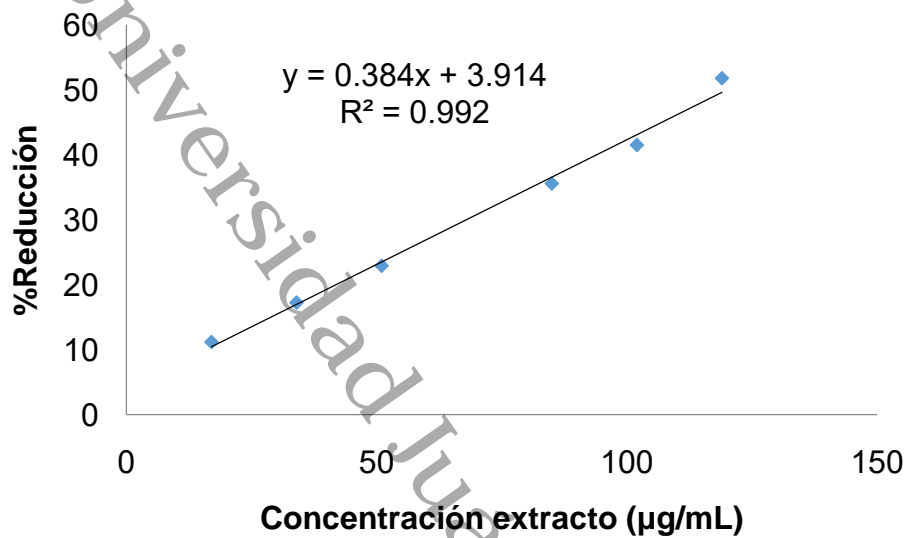
**Anexo 5.** Porcentaje de reducción del radical ABTS para el extracto acuoso



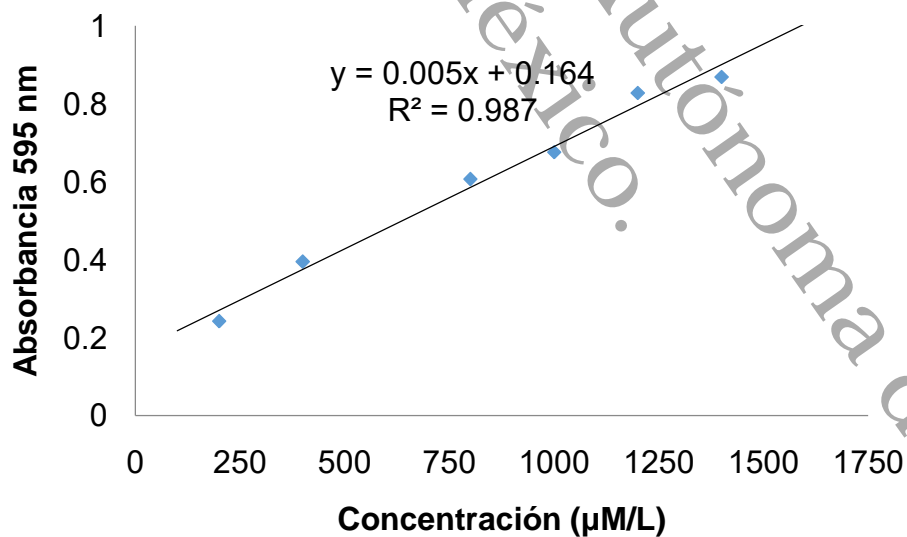
**Anexo 6.** Porcentaje de reducción del radical ABTS para el extracto etanólico



**Anexo 7.** Porcentaje de reducción del radical ABTS para el extracto cetónico



**Anexo 8.** Curva de calibración de Trolox para el método FRAP



**Anexo 9.** Ficha utilizada para la evaluación sensorial

Nombre: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: M o F

Usted está recibiendo cuatro muestras de **HAMBURGUESA DE CORDERO**. Por favor, evalúe cada producto y marque de acuerdo con la siguiente escala cuánto le gusta o disgusta cada una de las características que se le indican:

ESCALA	
Me disgusta extremadamente	1
Me disgusta mucho	2
Me disgusta moderadamente	3
Me disgusta ligeramente	4
Ni me gusta ni me disgusta	5
Me gusta ligeramente	6
Me gusta moderadamente	7
Me gusta mucho	8
Me gusta extremadamente	9

MUESTRA	132
AROMA	
TEXTURA	
SUCULENCIA	
SABOR	
CALIDAD GLOBAL	

MUESTRA	711
AROMA	
TEXTURA	
SUCULENCIA	
SABOR	
CALIDAD GLOBAL	

MUESTRA	164
AROMA	
TEXTURA	
SUCULENCIA	
SABOR	
CALIDAD GLOBAL	

MUESTRA	868
AROMA	
TEXTURA	
SUCULENCIA	
SABOR	
CALIDAD GLOBAL	

**COMENTARIOS:**

132: \_\_\_\_\_

711: \_\_\_\_\_

164: \_\_\_\_\_

868: \_\_\_\_\_

**¡GRACIAS POR SU PARTICIPACIÓN!**