

# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

## **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS NATURALES EN LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE DE POLLO**

**MONZERRAT ROSAS ESPEJEL**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

**2020**

La presente tesis titulada: **Actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos naturales en la conservación de la carne de pollo**, realizada por la alumna: **Monzerrat Rosas Espejel**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

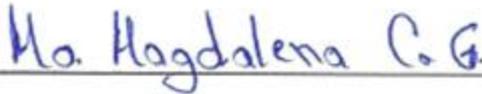
DOCTORA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

CONSEJERO



DR. DAVID HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

ASESORA



DRA. MARÍA MAGDALENA CROSBY GALVÁN

ASESOR



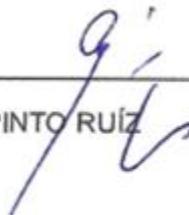
DR. JACINTO EFRÉN RAMÍREZ BRIBIESCA

ASESORA



DRA. MA. CARMEN YBARRA MONCADA

ASESOR



DR. RENÉ PINTO RUÍZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, agosto de 2020.

# ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS NATURALES EN LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE DE POLLO

Monzerrat Rosas Espejel, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2020

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivos: 1) Evaluar la actividad antioxidante (AA) y antimicrobiana (AM) de los extractos de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*), albahaca (*Ocimum basilicum* L.), cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, variedad valencia), cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), cáscara de mango (*Mangifera indica* cv. Ataulfo) y cáscara de guayaba (*Psidium guajava* L.), obtenidos por maceración (MC) o ultrasonido (US); 2) Seleccionar los tres extractos con mejor AA y AM y evaluarlos a diferentes concentraciones (50, 37.5, 25.5 y 12.5 mg mL<sup>-1</sup>) para elegir aquella más adecuada; 3) Analizar el efecto de los tres extractos en la oxidación de lípidos, conteo microbiológico, pH y color en la carne de pollo almacenada a 4 ± 1 °C por 15 días. El contenido de fenoles (FE) y flavonoides (FL) se determinó por el método de Folin-Ciocalteu y colorimétrico, respectivamente; la AA de los extractos por el método DPPH; y la AM se evaluó frente a *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens* por el método de difusión en agar. En las muestras de carne con extractos se midió la oxidación de lípidos por el contenido de TBARS, conteo microbiológico de cuenta total viable (CTV), *Enterobacteriaceae* (EN) y *Pseudomonas* spp (PS), pH y color (L\*, a\* y b\*). De los siete extractos obtenidos por US o MC, los extractos de tomillo (E-TO), cáscara de mango (E-MA) y cáscara de guayaba (E-GU) por US presentaron la mejor (p<0.05) AA y AM. De estos tres extractos, el mayor contenido de FE, FL, así como la más alta AA y AM se obtuvo con la concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup>. Los E-TO y E-MA, redujeron (p<0.05) la oxidación de lípidos y el crecimiento microbiano de CTV, EN y PS, en comparación con el conservador sintético (BHT), al finalizar el período de almacenamiento. Adicionalmente, se preservaron el pH y el color de la carne, contribuyendo a extender la vida útil de la carne de pollo. El E-GU no tuvo efecto favorable (p<0.05) en la conservación de la carne de pollo al compararse con el BHT. Los E-TO y E-MA obtenidos por US tienen efecto favorable en la conservación de la carne de pollo.

**Palabras clave:** alimentos, radicales libres, patógenos, microorganismos alterantes.

# ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NATURAL EXTRACTS IN THE CONSERVATION OF CHICKEN MEAT

Monzerrat Rosas Espejel, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2020

## ABSTRACT

The present study had as objectives: 1) To evaluate the antioxidant (AA) and antimicrobial (AM) activity of extracts of oregano (*Origanum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*), basil (*Ocimum basilicum* L.), orange peel (*Citrus sinensis*, variety Valencia), mandarin peel (*Citrus reticulata*), mango peel (*Mangifera indica* cv. Ataulfo) and guava peel (*Psidium guajava* L.), obtained by maceration (MC) or ultrasound (US); 2) Select the three extracts with the best AA and AM and evaluate them at different concentrations (50, 37.5, 25.5 and 12.5 mg mL<sup>-1</sup>) to choose the most appropriate; 3) Analyze the effect of the three extracts on lipid oxidation, microbiological count, pH and color in chicken meat stored at 4 ± 1 °C by 15 days. The content of phenols (FE) and flavonoids (FL) was determined by the Folin-Ciocalteu and colorimetric method, respectively; the AA of the extracts by the DPPH method; and AM was evaluated against *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* by the agar diffusion method. In the meat samples with extracts, the lipid oxidation was measured by the content of TBARS, microbiological count of total viable count (CTV), *Enterobacteriaceae* (EN) and *Pseudomonas* spp (PS), pH and color (L\*, a\* and b\*). Of the seven extracts obtained by US or MC, the extracts of thyme (E-TO), mango peel (E-MA) and guava peel (E-GU) by the US presented the best (p<0.05) AA and AM. Of these three extracts, the highest content of FE, FL, as well as the highest AA and AM was obtained with a concentration of 50 mg mL<sup>-1</sup>. The E-TO and E-MA, reduced (p<0.05) the lipid oxidation and the microbial growth of CTV, EN and PS, in comparison with the synthetic preservative (BHT), at the end of the storage period. Additionally, the pH and color of the meat were preserved, helping to extend the shelf life of the chicken meat. The E-GU did not have a favorable effect (p<0.05) on the conservation of chicken meat when compared to the BHT. The E-TO and E-MA obtained by the US have a favorable effect on the preservation of chicken meat.

**Keywords:** food, free radicals, pathogens, alteration microorganisms.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo brindado durante mis estudios de Posgrado.

Al Colegio de Postgraduados, especialmente al Programa de Ganadería por permitirme desarrollar profesional y académicamente, a través de mis estudios de Doctorado.

Al Dr. David Hernández Sánchez, por haber confiado en mí en el inicio de mi trayecto por esta institución, por su tiempo, consejos, orientación y conocimientos brindados, pero sobretodo por todo su apoyo.

A la Dra. María Magdalena Crosby Galván, por su apoyo incondicional en el laboratorio y sus acertados consejos.

A la Dra. Ma. Carmen Ybarra Moncada, por los conocimientos que me ha brindado, elementos esenciales para mi formación y por siempre otorgarme el tiempo necesario para resolver mis dudas.

Al Dr. Efrén Ramírez Bribiesca y al Dr. René Pinto Ruíz, por formar parte de mi consejo particular y por sus acertadas aportaciones.

Al Dr. Ricardo Bárcena Gama y al Dr. Gilberto Aranda Osorio por las correcciones realizadas a los escritos.

A la Ing. Margarita Crosby Galván, por todo su apoyo y recomendaciones para la elaboración de este trabajo.

## DEDICATORIAS

A Dios, tu que en silencio me has acompañado a lo largo de mi vida y sin pedir nada a cambio, hoy me regalas la alegría de ver realizado uno más de mis sueños.

A mis papas, Martha Espejel Morales y Antonino Rosas Gonzáles, por todo el amor que a lo largo de mi existencia he recibido de su parte y haberme apoyado en los momentos más difíciles, ya que sin su amor y comprensión no hubiera podido salir adelante y lograr lo que en estos momentos soy. Por todo lo que significan en mi vida y por todo lo que me han dado solo les puedo decir...Gracias.

A mis hermanos, Diana y Sergio con mucho cariño para ustedes por estar conmigo en todo momento compartiendo cada uno de mis logros.

A Jorge, por los momentos que durante este tiempo hemos compartido, por siempre alentarme a seguir adelante y por el apoyo brindado para culminar una más de mis metas.

A mis abuelitos Consuelo<sup>†</sup>, Julia<sup>†</sup>, Moisés y Lázaro<sup>†</sup>, por todos los sabios consejos que me han brindado para ser una mejor persona, y todos los cuidados que han tenido hacia mí.

A la familia Aguilar García por los buenos deseos y todo el apoyo brindado.

A todos los profesores del Colegio de Postgraduados y en especial a los del Programa de Ganadería, por compartir sus conocimientos y contribuir en mi formación profesional.

Monzerrat

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE CUADROS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
Objetivos .....	2
Literatura citada .....	3
CAPÍTULO I. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS NATURALES DE PLANTAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS .....	4
1.1. RESUMEN .....	4
1.2. ABSTRACT .....	6
1.3. INTRODUCCIÓN .....	7
1.4. ALTERACIONES EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS DURANTE SU ALMACENAMIENTO .....	8
1.5. CONSERVADORES SINTÉTICOS .....	9
1.6. EXTRACTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE .....	10
1.7. EXTRACTOS NATURALES COMO CONSERVADORES EN LA CALIDAD DE LA CARNE .....	14
1.8. LITERATURA CITADA .....	19
CAPÍTULO II. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA EN EXTRACTOS DE ESPECIAS Y CÁSCARA DE FRUTOS OBTENIDOS POR MACERACIÓN O ULTRASONIDO .....	25
2.1. RESUMEN .....	25
2.2. ABSTRACT .....	26
2.3. INTRODUCCIÓN .....	27

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.4.1. Ubicación .....	27
2.4.2. Materiales .....	28
2.4.3. Obtención de extractos de especias y cáscara de frutos.....	28
2.4.3.1. Extractos obtenidos por maceración.....	28
2.4.3.2. Extractos obtenidos por ultrasonido.....	28
2.4.4. Contenido total fenólico .....	29
2.4.5. Contenido total de flavonoides.....	29
2.4.6. Actividad antioxidante (AA) de los extractos.....	30
2.4.7. Actividad antimicrobiana (AM) .....	30
2.4.7.1. Cepas microbianas.....	30
2.4.7.2. Actividad antimicrobiana por difusión en agar .....	31
2.4.8. Análisis y modelo estadístico.....	31
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
2.5.1. Contenido total fenólico .....	32
2.5.2. Contenido total de flavonoides.....	34
2.5.3. Actividad antioxidante (AA) de los extractos.....	36
2.5.4. Actividad antimicrobiana (AM) de los extractos .....	37
2.6. CONCLUSIONES .....	40
2.7. LITERATURA CITADA.....	40
CAPÍTULO III. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE TRES EXTRACTOS NATURALES EN LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE DE POLLO.....	44
3.1. RESUMEN .....	44
3.2. ABSTRACT .....	45
3.3. INTRODUCCIÓN .....	46

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.4.1. Ubicación .....	47
3.4.2. Materiales .....	47
3.4.3. Obtención de extractos naturales .....	48
3.4.4. Análisis de los extractos naturales.....	48
3.4.4.1. Contenido total fenólico .....	48
3.4.4.2. Contenido total de flavonoides .....	49
3.4.4.3. Actividad antioxidante (AA).....	49
3.4.4.4. Actividad antimicrobiana (AM) .....	49
3.4.4.4.1. Cepas microbianas.....	49
3.4.4.4.2. Actividad antimicrobiana por difusión en agar .....	50
3.4.5. Distribución de tratamientos en las muestras de carne .....	50
3.4.6. Análisis de las muestras de carne de pollo.....	51
3.4.6.1. Determinación de la oxidación de lípidos .....	51
3.4.6.2. Recuento microbiológico .....	51
3.4.6.3. Determinación de pH .....	52
3.4.6.4. Determinación de color.....	52
3.4.7. Análisis estadístico .....	53
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	53
3.5.1. Análisis de los extractos naturales.....	53
3.5.1.1. Contenido total fenólico y flavonoides .....	53
3.5.1.2. Actividad antioxidante (AA).....	55
3.5.1.3. Actividad antimicrobiana (AM) .....	56
3.5.2. Análisis de las muestras de carne de pollo.....	57
3.5.2.1. Oxidación de lípidos .....	58
3.5.2.2. Recuento microbiológico .....	59

3.5.2.3. pH.....	63
3.5.2.4. Color.....	64
3.6. CONCLUSIONES .....	67
3.7. LITERATURA CITADA.....	68
CONCLUSIONES GENERALES.....	75

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante de siete extractos naturales obtenidos por maceración y ultrasonido (Media $\pm$ DE) .....	33
<b>Cuadro 2.</b> Inhibición bacteriana de siete extractos naturales obtenidos por maceración o ultrasonido (Media $\pm$ DE) .....	38
<b>Cuadro 3.</b> Contenido de fenoles y flavonoides, y actividad antioxidante de tres extractos naturales obtenidos por ultrasonido y evaluados a cuatro concentraciones (Media $\pm$ DE) .....	54
<b>Cuadro 4.</b> Inhibición bacteriana de tres extractos naturales obtenidos por ultrasonido, evaluados a cuatro concentraciones (Media $\pm$ DE) .....	56

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efecto de tres extractos naturales sobre los valores TBARS en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días..... 58
- Figura 2.** Efecto de tres extractos naturales sobre la cuenta total viable en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días..... 60
- Figura 3.** Efecto de tres extractos naturales sobre el conteo de *Enterobacteriaceae* en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días..... 61
- Figura 4.** Efecto de tres extractos naturales sobre el conteo de *Pseudomonas* spp en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días..... 62
- Figura 5.** Efecto de tres extractos naturales sobre el pH en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días. .... 63
- Figura 6.** Efecto de tres extractos naturales sobre el parámetro de color L\* en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días..... 65
- Figura 7.** Efecto de tres extractos naturales sobre el parámetro de color a\* en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días..... 66
- Figura 8.** Efecto de tres extractos naturales sobre el parámetro de color b\* en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días..... 67

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La carne de pollo es de las carnes de mayor consumo debido a su alto valor nutricional, bajo contenido de grasa y precio (Mexis *et al.*, 2012; Skunca *et al.*, 2018). Sin embargo, es muy susceptible a procesos de degradación que pueden ocurrir debido al desarrollo microbiano y oxidación lipídica ocasionando decoloración, acumulación de sabores y olores desagradables que la hacen inadecuada para el consumidor (Sivarajan *et al.*, 2017; Piñon *et al.*, 2018).

Actualmente en la industria cárnica se utilizan conservadores sintéticos como el Terbutil Hidroquinona (TBHQ), Butilhidroxianisol (BHA) y Butilhidroxitolueno (BHT), los cuales prolongan la vida de anaquel de la carne (Carocho *et al.*, 2018); no obstante, en diversos países se ha prohibido su empleo por relacionarse con problemas de salud como alergias, trastornos digestivos, insomnio, e incluso algunos tipos de cáncer (Carocho *et al.*, 2014).

Por lo que ha surgido la necesidad de buscar nuevas alternativas como es el uso de conservadores naturales (Chibane *et al.*, 2018). Entre éstos se encuentran los extractos naturales provenientes de pulpa, cáscara o semillas de frutas o de diferentes especias que contienen compuestos fenólicos, quinonas, flavonoides, carotenoides y terpenos con actividad antioxidante y antimicrobiana (Contreras-Calderon *et al.*, 2011; Yashin *et al.*, 2017).

En la literatura, existen múltiples investigaciones en donde se ha estudiado el efecto antioxidante y antimicrobiano de diferentes extractos naturales de aceites esenciales, vegetales, semillas, frutas y especias. Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se realizan en modelos *in vitro* y en raras ocasiones se extrapolan a modelos alimenticios (Fisher y Phillips, 2006). En este sentido, el uso de extractos naturales de especias y cáscara de frutos, con actividad antioxidante y antimicrobiana puede servir como una alternativa a la utilización de conservadores químicos, permitiendo prolongar la vida útil de la carne cruda de pollo almacenada en condiciones de refrigeración a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## Objetivos

### General

Evaluar el efecto de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos naturales en la conservación de la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días.

### Específicos

1. Determinar la capacidad antioxidante de los extractos de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*), albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, variedad valencia), cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), cáscara de mango (*Mangifera indica* cv. Ataulfo) y cáscara de guayaba (*Psidium guajava* L.) obtenidos por maceración o ultrasonido.
2. Evaluar la inhibición de *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens* causada por los extractos de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*), albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, variedad valencia), cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), cáscara de mango (*Mangifera indica* cv. Ataulfo) y cáscara de guayaba (*Psidium guajava* L.), obtenidos por maceración o ultrasonido.
3. Seleccionar los tres extractos naturales con la mejor actividad antioxidante y antimicrobiana, y cuantificar su contenido de fenoles, flavonoides, capacidad antioxidante y antimicrobiana a diferentes concentraciones (50, 37.5, 25.5 y 12.5 mg mL<sup>-1</sup>), para evaluar la concentración más efectiva en la carne de pollo.
4. Analizar el efecto de los tres extractos naturales en la oxidación de lípidos, recuento microbiológico (cuenta total viable, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* spp), pH y color (L\*, a\*, b\*) en carne de pollo almacenada  $4 \pm 1$  °C durante 15 días.

## Literatura citada

- Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Food Science and Food Safety*, 13(4): 377-399.
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2018). Antioxidants: reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Food Science and Technology*, 71: 107-120.
- Chibane, L.B., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., Oulahal, N. (2018). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 1457-1474.
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7): 2047-2053.
- Fisher, K., Phillips, C. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1232-1240.
- Mexis, S.F., Chouliara, E., Kontominas, M.G. (2012). Shelf life extension of ground chicken meat using an oxygen absorber and a citrus extract. *LWT Food Science and Technology*, 49: 21-27.
- Piñon, M., Alarcon-Rojo, A., Paniwnyk, I., Mason, T., Luna, I., Renteria, A. (2018). Ultrasound for improving the preservation of chicken meat. *Food Science and Technology*, 39: 1-7.
- Sivarajan, M., Lalithapriya, U., Mariajenita, P., Vajiha, B.A., Harini, K., Madhushalini, D., Sukumar, M. (2017). Synergistic effect of spice extracts and modified atmospheric packaging towards non-thermal preservation of chicken meat under refrigerated storage. *Poultry Science*, 96(8): 2839-2844.
- Skunca, D., Tomasevic, I., Nastasijevic, I., Tomovic, V., Djekic, I. (2018). Life cycle assessment of the chicken meat chain. *Journal of Cleaner Production*, 184: 440-450.
- Yashin, A., Yashin, Y., Xia, X., Nemzer, B. (2017). Antioxidant activity of spices and their impact on human health: a review. *Antioxidants*, 6: 1-18.

## **CAPÍTULO I. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS NATURALES DE PLANTAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS**

M. Rosas Espejel, \* D. Hernández Sánchez, \*\* R. G. Cruz Monterrosa, \*\*\* R. Pinto Ruiz, \*\*\*\* M. M. Crosby Galván, \* M. C. Ybarra Moncada, \*\*\*\*\* A. Ley de Coss\*\*\*\*

\* Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Estado de México.

\*\* Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Estado de México.

Correo electrónico: sanchezd@colpos.mx.

\*\*\* Departamento de Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Lerma, Estado de México.

\*\*\*\* Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad Autónoma de Chiapas, México.

\*\*\*\*\* Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología Agroalimentaria, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México.

### **1.1. RESUMEN**

La demanda de productos cárnicos de calidad, saludables y seguros está en constante aumento, por ello se busca reemplazar el uso de conservadores sintéticos por compuestos naturales de plantas que sean saludables y permitan prolongar la vida de anaquel de los productos cárnicos. La carne y los productos cárnicos son ricos en proteínas y dependiendo del tipo de músculo, contienen cantidades y proporciones variables de triglicéridos y fosfolípidos. La principal causa de deterioro de la carne es el ataque por diferentes tipos de microorganismos o la oxidación de los lípidos, lo cual puede ocurrir durante el almacenamiento. Algunos conservadores sintéticos como el 2,6-di-terbutil-4-metilfenol (BHT), ter-butil-4- hidroxianisoles (BHA) y ter-butilhidroquinona (TBHQ) se están restringiendo ya que se ha comprobado por medio de estudios toxicológicos que en animales experimentales causan lesiones estomacales, hemorragias y desarrollo de tumores carcinogénicos. Numerosos extractos de plantas han sido investigados por su actividad antioxidante y antimicrobiana, como extractos de aceites esenciales (EO), frutas, vegetales y especias. Los EO y otros extractos de las plantas son los principales responsables de las actividades antimicrobianas en plantas, hierbas y especias, se ha documentado que son antimicrobianos efectivos contra varios patógenos transmitidos por los alimentos. Las frutas y verduras son una de las fuentes más ricas de polifenoles

naturales. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios capaces de inhibir o retrasar los procesos de oxidación. Otro grupo de compuestos fenólicos, los flavonoides, son conocidos por su actividad antimicrobiana, sintetizados por las plantas como respuesta a infecciones microbianas. Algunas investigaciones, han demostrado el uso efectivo de extractos naturales con actividad antimicrobiana y antioxidante en la preservación de la calidad de la carne de pollo, cerdo y res, debido a su capacidad de inhibir el crecimiento microbiano y retrasar los procesos de oxidación de lípidos.

**Palabras clave:** carne, conservación, vida útil, gram-positivas, gram-negativas

# CHAPTER I. ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NATURAL EXTRACTS OF PLANTS IN MEAT PRODUCTS

## 1.2. ABSTRACT

The demand for quality, healthy and safe meat products is constantly increasing, therefore, the use of synthetic preservatives is being replaced for natural plant compounds that are healthy and allow to prolong the shelf life of meat products. Meat and meat products are rich in protein and depending on the type of muscle, contain varying amounts and proportions of triglycerides and phospholipids. The main cause of deterioration of the meat is the attack by different types of microorganisms or the oxidation of lipids, which can occur during storage. Some synthetic preservatives such as 2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and tert-butylhydroxyquinone (TBHQ) are being restricted since it has been proven through toxicological studies that in experimental animals cause stomach lesions, hemorrhages and development of carcinogenic tumors. Numerous plant extracts have been investigated for their antimicrobial and antioxidant activity, such as extracts from essential oils (EO), fruits, vegetables and spices. The EO and other plant extracts are principally responsible for antimicrobial activities in plants, herbs and spices, have been documented to be effective antimicrobials against several foodborne pathogens. The fruits and vegetables are one of the richest sources of natural polyphenols. Phenolic compounds are secondary metabolites capable of inhibiting or delaying oxidation processes. Another group of phenolic compounds, the flavonoids, are known for their antimicrobial activity, synthesized by plants in response to microbial infection. Some researches have demonstrated the effective use of natural extracts with antimicrobial and antioxidant activity in the preservation of the quality of chicken, pork and beef meat, due to its ability to inhibit microbial growth and delaying lipid oxidation processes.

**Key words:** meat, conservation, shelf-life, gram-positive, negative-gram

### 1.3. INTRODUCCIÓN

La oxidación de lípidos y el crecimiento microbiano propician la degradación de la carne y disminuyen su vida de anaquel (Zhang *et al.*, 2016). Conservadores sintéticos como el Butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT), Terbutil Hidroxiquinona (TBHQ) y galato de propilo sirven para reducir el crecimiento microbiano y prolongar la vida de anaquel de la carne, pero se ha demostrado que exhiben efectos negativos contra la salud como alergias, intoxicaciones, problemas digestivos, insomnio e incluso cáncer (Sharma *et al.*, 2017).

La demanda de productos cárnicos de calidad, saludables y seguros está en constante aumento, por ello diversas investigaciones en alimentos analizan sustancias de origen natural capaces de sustituir a los productos sintéticos utilizados para extender la vida útil de los alimentos (Gravador *et al.*, 2014). Las hierbas y especias, las cuales son una parte importante en la dieta del humano, han sido utilizadas por años en la medicina tradicional y para mejorar el sabor, color y aroma de los alimentos.

Algunos extractos de plantas con propiedades antioxidantes y antimicrobianas se han utilizado para reducir la oxidación de lípidos y la contaminación en los productos cárnicos prolongando su vida de anaquel (Luciano *et al.*, 2017), estas propiedades son atribuidas a los compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, lecitinas, entre otros, presentes en los extractos o aceites esenciales de las plantas.

Varios estudios han publicado la capacidad antioxidante y el contenido fenólico de algunas especias, entre ellas, el clavo, canela y orégano son las especias y hierbas con mayor actividad antimicrobiana, sus aceites esenciales contienen compuestos químicos como carvacrol, cinamaldehído y eugenol (Radha *et al.*, 2014). En este sentido, el uso de extractos naturales de plantas con actividad antioxidante y antimicrobiana es una alternativa al uso de conservadores químicos, permitiendo prolongar la vida de anaquel de los productos cárnicos.

#### 1.4. ALTERACIONES EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS DURANTE SU ALMACENAMIENTO

La preservación de productos cárnicos involucra un conjunto de tratamientos que buscan prolongar la vida útil de éstos, manteniendo, en el mayor grado posible, sus atributos de calidad, incluyendo color, textura, sabor y valor nutritivo. Este proceso implica diferentes escalas de conservación, desde períodos cortos, dados por métodos domésticos de cocción y almacenamiento en frío, hasta períodos muy prolongados, dados por procesos industriales estrictamente controlados como es el caso de la congelación y la deshidratación (Rodríguez, 2011).

La carne y los productos cárnicos son ricos en proteínas y dependiendo del tipo de músculo, contienen cantidades y proporciones variables de triglicéridos y fosfolípidos (Ponnampalam *et al.*, 2017). La estabilidad de almacenamiento de la carne se puede ampliar con sistemas de envasado oportuno o por la adición exógena de antioxidantes (Siripatrawan y Harte, 2010).

La principal causa de deterioro de la carne es el ataque por diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos) o la oxidación de los lípidos, lo cual puede ocurrir durante el almacenamiento en refrigeración de estos productos (Zhang *et al.*, 2016). La oxidación de los lípidos inicia en los ácidos grasos insaturados de los tejidos y es una de las mayores causas de la pérdida de vida de anaquel de la carne, lo cual se relaciona con pérdidas en la calidad de producto tales como sabor, color, textura y valor nutricional (Devalkal *et al.*, 2014). Además, la carne y los productos cárnicos frecuentemente se contaminan con microorganismos durante el proceso de sacrificio y procesamiento del producto, provocando cambios indeseables en las características de calidad de la carne, relacionadas con bacterias ácido lácticas, principales organismos relacionados con la descomposición de los productos cárnicos (Doulgeraky *et al.*, 2012).

Los factores que afectan la sobrevivencia y el crecimiento microbiano se clasifican en: 1) Factores implícitos y microbianos (microorganismos presentes, velocidad de crecimiento, efectos sinérgicos, etc.), 2) Factores intrínsecos, aquellos factores químicos y físicos que actúan dentro del alimento (nutrientes, pH, actividad de agua, presencia de conservadores y otras sustancias antimicrobianas, microestructura, etc.)

y 3) Factores extrínsecos (temperatura, humedad relativa, presión parcial de oxígeno, etc.) (Rodríguez, 2011).

### **1.5. CONSERVADORES SINTÉTICOS**

Dentro de los contaminantes no intencionales se pueden encontrar componentes naturales del propio alimento, toxinas producidas por alguna bacteria, productos derivados del procesamiento del alimento y de la contaminación ambiental, contaminantes que resultan del manejo del alimento como pesticidas y fertilizantes entre otros. Por otro lado, los aditivos se añaden de manera intencional para preservar o mejorar las características del alimento. Los conservadores se adicionan con el propósito de evitar la oxidación de grasas y controlar el crecimiento de microorganismos, y pueden ser químicos o naturales.

Con la evolución de la ciencia de alimentos han surgido muchos compuestos químicos con actividad antimicrobiana. El agente antimicrobiano más antiguo es la sal de mesa, la cual se sigue utilizando en la actualidad para conservar productos cárnicos. En el siglo XX se dieron grandes avances en la conservación de alimentos por medio de agentes químicos. Fue entonces cuando empezaron las revisiones de daños a la salud que cada agente podría causar (Rodríguez, 2011).

Los conservadores sintéticos más populares son derivados de las estructuras fenólicas o los que tengan un grupo fenólico dentro de la configuración de su estructura molecular. Entre los fenólicos más frecuentemente usados como antioxidantes son los derivados de las estructuras, 2,6-di-terbutil-4-metilfenol (BHT), el terbutil-4-hidroxianisól (BHA), ter-butilhidroxiquinona (TBHQ). La estabilidad térmica de los antioxidantes sintéticos es baja, sobre todo porque estos productos fueron diseñados para proteger a las grasas y aceites en el ambiente o temperaturas relativamente bajas. Sin embargo, el calentamiento que se aplica a los productos representa un estrés térmico que puede afectar seriamente la eficacia de los antioxidantes sintéticos tales como BHA, BHT, BHQ, EQ; cuando se añaden antes y / o durante la cocción o procesamiento (Méndez *et al.*, 2006).

Los antioxidantes tienen que poseer las siguientes propiedades: a) ser efectivos a bajas concentraciones (0.001-0.02 %); b) no mostrar desarrollo de sabor, olor y color cuando son adicionados; c) ser compatibles con el alimento; d) ser de fácil aplicación;

e) tener estabilidad bajo las condiciones del proceso y/o el almacenamiento del alimento; f) no tener efectos toxicológicos (Hui, 2010).

En los Estados Unidos de Norteamérica el uso de los conservadores está sujeto a regulación por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, siglas en inglés), al igual que en México por la Norma Oficial NMX-F-252 SCFI-2005. Sin embargo, a la fecha los conservadores sintéticos se están restringiendo ya que se ha comprobado por medio de estudios toxicológicos que en animales experimentales causan lesiones estomacales, hemorragias y desarrollo de tumores carcinogénicos (Sharma *et al.*, 2017).

## **1.6. EXTRACTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE**

Las plantas han sido utilizadas desde tiempos muy antiguos para aromatizar alimentos y bebidas, y con propósitos medicinales en la cura y prevención de enfermedades. Se estima que en el planeta existen entre 250,000 a 500,000 especies de plantas y solo una décima parte de estas ha sido explorada. Hay más de 1,340 plantas con compuestos antimicrobianos definidos. En los últimos años varios estudios se han conducido a evaluar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de extractos naturales de aceites esenciales (EO), frutas y vegetales. Los EO son un grupo de terpenoides, sesquiterpenos y posiblemente diterpenos con diferentes grupos de hidrocarburos alifáticos, ácidos, alcoholes, aldehídos y ésteres acíclicos (Fisher y Phillips, 2006). Junto con otras sustancias son los principales responsables de las actividades antimicrobianas en plantas, hierbas y especias.

Varios investigadores han propuesto que la acción antimicrobiana de los EO puede atribuirse a su habilidad de penetrar a través de la membrana bacteriana al interior de la célula y mostrar una actividad inhibitoria en las propiedades funcionales y lipofílicas de la célula (Guinoiseau *et al.*, 2010).

Sin embargo, la actividad antimicrobiana de los OE ha sido consistentemente ligado a compuestos fenólicos tales como carvacrol, eugenol y timol (Barbosa *et al.*, 2009). Los compuestos fenólicos pueden alterar la membrana celular que da lugar a la inhibición de propiedades funcionales de la célula, y eventualmente causa la fuga del contenido interno de esta. Los mecanismos de acción pueden relacionarse con la

capacidad de los compuestos fenólicos para alterar la permeabilidad celular microbiana, daño de las membranas citoplasmática, interferir con el sistema de generación de energía celular (ATP) e interrumpir la fuerza motriz del protón (Burt, 2004).

Se ha documentado que los aceites esenciales son antimicrobianos efectivos contra varios patógenos transmitidos por los alimentos, incluyendo *E. coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* y otros (Callaway *et al.*, 2011).

Friedman *et al.* (2002) probaron 96 EO y 23 compuestos del aceite, contra *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella enterica* y encontraron que 27 EO presentaban alguna actividad inhibitoria contra los cuatro géneros bacterianos. Los aceites de raíz de jengibre (*Zingiber officinale*), jazmín (*Jasminum*), semilla de zanahoria (*Daucus carota*), semilla de apio (*Apium graveolens*) y naranja amarga (*Citrus aurantium*) presentaron efecto inhibitorio en *C. jejuni*; los aceites de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum verum*), laurel (*Laurus nobilis*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), toronjil (*Melissa officinalis*) y pimienta de jamaica (*Pimenta dioica*) tuvieron efecto inhibitorio sobre *E. coli* O157: H7; los aceites de laurel, clavo de olor, orégano, canela, pimienta de jamaica y tomillo inhibieron a *L. monocytogenes*; finalmente, los aceites de orégano, canela, clavo de olor, pimienta de Jamaica, laurel y mejorana (*Origanum majorana*), fueron efectivos contra *S. enterica*. Los compuestos de cinamaldehído, carvacrol, benzaldehído, citral, timol y eugenol tuvieron actividad contra los 4 microorganismos.

Cherrat *et al.* (2014) evaluaron la actividad antimicrobiana de EO de laurel y mirto (*Myrtus communis*) contra varios patógenos transmitidos por alimentos. Los OE inhibieron el crecimiento de todas las bacterias, sin embargo, el EO de laurel mostró una actividad mayor en comparación con el de mirto. En general ambos EO fueron más activos contra gram-positivas que contra gram-negativas. La bacteria menos resistente a ambos EO fue *S. aureus*, y las cepas más resistentes fueron *L. monocytogenes* entre las gram-positivas y *E. coli* O157: H7 entre las cepas gram-negativas. De igual manera, Skandamis *et al.* (2002) reportan que los EO de clavo de

olor, orégano, romero y tomillo tienen alta actividad inhibitoria, particularmente contra las bacterias gram-positivas en comparación con gram-negativas.

En un estudio realizado por Flávia *et al.* (2008) se probó el efecto antimicrobiano del OE obtenido de la hoja de guayaba (*Psidium guajava*), contra microorganismos como *Salmonella* spp y *S. aureus* los cuales fueron inhibidos por dicho aceite.

Los EO de albahaca (*Ocimum basilicum*), apio, clavo de olor, cilantro (*Coriandrum sativum*), ajo (*Allium sativum*), tomillo blanco (*Thymus mastichina*), cebolla (*Allium cepa*), orégano, perejil (*Petroselinum sativum*), romero, salvia (*Salvia officinalis*) y tomillo son efectivos para inhibir el crecimiento de *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhimurium* y *Shewanella putrefaciens*, además presentan actividad antioxidante, reduciendo en algunos casos hasta el 50 % de los radicales libre. Esta actividad antimicrobiana y antioxidante puede deberse a la presencia de compuestos como carvacrol, timol y eugenol (Teixeira *et al.*, 2013).

El EO de eucalipto (*Eucalyptus*) es efectivo en la disminución del crecimiento de *S. aureus*, *H. influenzae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* (Elaissi *et al.*, 2012). El EO del limón (*Citrus aurantifolia*) inhibe el crecimiento de bacterias gram-positivas como *S. aureus*, *B. subtilis* y *S. epidermidis*, debido a la presencia de  $\beta$ -pineno (12.6 %), limoneno (53.8 %),  $\gamma$ -terpineno (16.5 %), terpinoleno (0.6 %),  $\alpha$ -terpineol (0.4 %) y citral (2.5 %) (Costa *et al.*, 2014). El EO de comino (*Cuminum cyminum*) presenta una buena actividad antioxidante en comparación con otros antioxidantes sintéticos (BTH y BHA), además tiene un amplio espectro sobre bacterias como *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, gracias a la presencia de compuestos como Timoquinona y P-cimeno (monoterpeno) (Singh *et al.*, 2014). El OE del jugo de zanahoria tiene actividad antimicrobiana en bacterias como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *Salmonella typhi*, *E. coli*, *Shigella dysenteriae* y *Aspergillus niger*.

Las frutas en general son una buena fuente de antioxidantes, debido a que son ricas en polifenoles. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios capaces de inhibir o retrasar los procesos de oxidación. Estos compuestos consisten de un grupo hidroxil (-OH) unido directamente a un grupo de hidrocarburos aromáticos. Los

números y las posiciones del -OH (que están vinculados al anillo aromático) en relación con el grupo funcional carboxilo determinan la capacidad de las actividades antioxidantes de cada material vegetal. Basados en la estructura de los anillos aromáticos, los compuestos fenólicos se clasifican en ácido fenólico (ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico), flavonoides (antocianinas, flavonoles, flavonas, isoflavonas), taninos diterpernos (hidrolizables y taninos condensados), estilbenos, curcuminoides, cumarinas, lignanos, quinonas, y otros (alcaloides fenólicos, terpenoides fenólicos, aceite volátil (Quiñones *et al.*, 2012).

La actividad antimicrobiana que presentan los extractos naturales de frutas, también está relacionada con la presencia de compuestos fenólicos. Debido a la adsorción de estos en la membrana celular provocando su ruptura y la salida del contenido celular, además de la generación de hidroperóxidos a partir de polifenoles (Negi, 2012).

Se ha reportado que el concentrado de jugo de limón (*Citrus limon*), lima ácida (*Citrus aurantiifolia*) y de arándano (*Vaccinium myrtillus*) inactivan a *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, y *Salmonella* spp (Nogueira *et al.*, 2003; Enache y Chen, 2007). También se ha probado la actividad antibacteriana del extracto de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) contra microorganismos como *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* siendo *Salmonella* y *Listeria* las más susceptibles a éste (Du *et al.*, 2009).

El extracto de cáscara de granada (*Punica granatum*) mostró una excelente actividad antioxidante al obtener valores de los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) de  $4.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que el Butilhidroxitolueno (BHT) tuvo un valor  $21.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , lo que indica que este antioxidante natural es más fuerte. Adicionalmente, presentó actividad inhibitoria contra *S. aureus* y *B. cereus* con una concentración inhibitoria mínima de 0.01 % (Kanatt *et al.*, 2010).

Benitez *et al.* (2011) evaluaron la actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos de seis cáscaras de frutos: mandarina (*Citrus reticulata*), naranja (*Citrus sinensis*), limón (*Citrus aurantifolia*), pomelo (*Citrus grandis*), mango (*Mangifera indica*) y guayaba. Los extractos acuosos de las cáscaras presentaron una actividad antioxidante mayor a la del té verde (*Camellia sinensis*) (control), excepto la cáscara de guayaba que presentó una actividad similar a la del control. Para determinar la

actividad antibacteriana los extractos se evaluaron frente a dos cepas gram-negativas y dos cepas gram-positivas. Los extractos de mango y guayaba presentaron actividad a una concentración de 35 mg de extracto puro frente a *E. coli*. Frente a *Enterococcus faecalis* tanto el extracto de cáscara de mango y guayaba presentaron actividad a una concentración de 35 mg. Frente a *S. aureus* solo el extracto de mango presentó actividad antibacteriana a una concentración de 700 mg.

Moo-Huchin *et al.* (2015) estudiaron los componentes antioxidantes y la actividad antioxidante de tres frutos tropicales de Yucatán, México, la manzana estrella morada (*Chrysophyllum cainito* L.), anacardo amarillo y anacardo rojo (*Anacardium occidentale*). Los tres frutos presentaron un buen contenido de fenoles ( $695.1 \pm 47.3$ ,  $633.2 \pm 22.2$ ,  $13,16.8 \pm 45.7$  mg de GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  en PS, respectivamente), sin embargo, la cáscara de anacardo rojo mostró un mayor contenido en comparación con las otras cáscaras de frutas analizadas. Se identificaron seis componentes fenólicos: ácido ferúlico, ácido caféico, ácido sinápico, ácido gálico, ácido elágico y miricetina.

Es importante mencionar que un factor crítico en el manejo de extractos naturales es su proceso de extracción, ya que de esto depende su calidad en términos de concentración de compuestos y su poder antioxidante. Existen varias técnicas para recuperar los extractos de las plantas, como la extracción de Soxhlet, maceración, extracción con fluidos supercríticos, extracción con agua subcrítica y extracción asistida por ultrasonido. En general, el material vegetal es limpiado, secado y molido en polvo fino seguido de extracción con solvente. Se han usado diferentes solventes, ya sea por separado o en combinación, como etanol absoluto, etanol al 90 %, etanol al 70 %, acetona, metanol, hexano y agua (Biswas *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2014).

## **1.7. EXTRACTOS NATURALES COMO CONSERVADORES EN LA CALIDAD DE LA CARNE**

La industria cárnica, utiliza diferentes conservadores sintéticos, con el fin de reducir la oxidación de lípidos y el crecimiento microbiano durante el almacenamiento de la carne, llevando a un retraso de deterioro que permita aumentar su vida de anaquel (Devatkal y Naveena, 2010). Sin embargo, estos aditivos químicos, han sido relacionados con propiedades tóxicas y cancerígenas (Sharma *et al.*, 2017).

Debido a la preocupación que esto ha generado, los consumidores exigen cada vez más el uso de productos naturales como conservadores alternativos en los alimentos (Biswas *et al.*, 2012). Algunas investigaciones, han demostrado el uso efectivo de extractos naturales con actividad antimicrobiana y antioxidante en la preservación de la calidad de la carne de pollo, cerdo y res.

Radha *et al.* (2014) y Zhang *et al.* (2016) evaluaron el efecto antimicrobiano y antioxidante de diferentes extractos de especias como: clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinamomum cassia*) orégano (*Origanum vulgare*), mostaza negra (*Brassica nigra*), clavo (*Eugenia caryophyllata*) y romero (*Rosemarinus officinalis*) en la vida de anaquel de la carne de pollo cruda almacenada durante 15 días a 4 °C, encontrando que la adición de los extractos de estas especias en 1 % p/v, retrasó eficazmente el crecimiento microbiano de *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, bacterias ácido-lácticas y cuenta total viable (CTV), así mismo, se redujo la oxidación de lípidos y se mantuvieron y/o mejoraron los atributos sensoriales. Sin embargo, el efecto de conservación más fuerte en ambos estudios se logró al combinar los extractos de clavo de olor, canela y orégano (0.33 %-0.33 %-0.33 % p/v) y los extractos de clavo y romero (0.5 %-0.5 % p/v), extendiendo la vida de anaquel aproximadamente 6 días en comparación con la vida útil de las muestras control.

El uso de aceites esenciales como agentes antimicrobianos en la carne de pollo ha sido evaluado en diferentes investigaciones. El aceite de tomillo en una concentración del 5 % p/v, limitó significativamente el crecimiento de *E. coli* y bacterias ácido lácticas (BAL), disminuyendo el contenido microbiano total hasta en un 50 % en comparación con las muestras de control en la carne de pollo cruda almacenada durante tres semanas a 4°C (Fратиanni *et al.*, 2010).

Los aceites esenciales también han sido evaluados en combinación con otros métodos de conservación, como el uso películas biodegradables, atmósferas modificadas (MAP) y diferentes condiciones de refrigeración y congelación.

Pavelková *et al.* (2014) compararon el efecto del ácido Etilendiaminotetracético (EDTA), el aceite de romero y el aceite de tomillo sobre la calidad microbiológica de la pechuga de pollo empacada al vacío a 4 °C por un periodo de 18 días. Los aceites

de orégano (2.0 % p/v) y tomillo (2.0 % p/v) presentaron mayor eficacia en comparación con las muestras control y las muestras adicionadas con EDTA al 1.50 % p/p, al disminuir la CTV de 4.72 log UFC g<sup>-1</sup> en el día cero a 3.68 y 4.05 log UFC g<sup>-1</sup> en el día 18, no encontrando diferencia significativa entre estos dos tratamientos (p<0.05). En el caso de las *Enterobacteriaceae* el rango fue de 0 log UFC g<sup>-1</sup> en el primer día a 5.66 y 5.60 log UFC g<sup>-1</sup> al día 18, para las muestras control y las muestras empacadas al vacío; el tratamiento con EDTA en el día tres presentó un conteo de 3.09 log UFC g<sup>-1</sup>, las muestras adicionadas con los aceites mantuvieron el rango de 0 log UFC g<sup>-1</sup> durante todo el periodo de almacenamiento. De acuerdo con los resultados obtenidos, los tratamientos con aceite de orégano y tomillo empacados al vacío extienden la vida de anaquel del producto de 8 a 9 días en comparación con las muestras control.

Ravishankar *et al.* (2009) publicaron un estudio en donde utilizaban películas de manzana que contenían diferentes concentraciones de carvacrol y cinamaldehído (ingredientes activos del aceite de orégano y el aceite de canela, respectivamente) para envolver pechugas de pollo y evaluar su efecto en la disminución de microorganismos patógenos asociados a las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS). En comparación con las películas control, las que contenían carvacrol y cinamaldehído mostraron una fuerte inhibición de *E. coli* O157:H7, *S. enterica* y *L. monocytogenes* después de 72 horas de almacenamiento a 4 °C. Se utilizaron tres concentraciones de carvacrol y cinamaldehído (3, 1.5 y 0.5 %), obteniendo mejores resultados en las películas con mayor concentración (3 %), ya que el carvacrol indujo la reducción en aproximadamente 3 log UFC g<sup>-1</sup> de *S. enterica* y *E. coli* O157:H7, y el cinamaldehído en 2.8 y 1.2 respectivamente, para ambas bacterias. En el caso de *L. monocytogenes*, el carvacrol indujo la reducción en 2.2 log UFC g<sup>-1</sup> de *S. enterica* y 0.2 log UFC g<sup>-1</sup> de *E. coli* O157:H7. A pesar, de que los resultados son satisfactorios y que en general el carvacrol exhibió una actividad más fuerte contra los microorganismos estudiados, los autores recomiendan un mayor estudio de las propiedades sensoriales de los productos tratados con estos ingredientes.

En una investigación similar, se evaluaron biopelículas de manzana y tomate que contenían 0.5 y 0.75 % de carvacrol o cinamaldehído, demostrado que la adición de

0.5 % de estos aceites esenciales vegetales en las películas protegieron de manera eficaz a la carne de pollo contra los patógenos bacterianos y el deterioro, a la vez mejoraron las propiedades sensoriales de los alimentos. Sin embargo, el panel de degustación indicó una mayor preferencia por el pollo recubierto con la película de tomate que contenía carvacrol sobre el recubrimiento de manzana correspondiente. También hubo una mayor preferencia por las películas de manzana que contenían cinamaldehído sobre la correspondiente envoltura que contenía carvacrol (Du *et al.*, 2012).

El uso de MAP en combinación con el aceite de orégano ha demostrado tener buenos efectos en la preservación de la calidad de la carne de pollo a 4 °C durante 25 días. La combinación de aceite de orégano al 0.1 % p/p y una MAP de 30 % de CO<sub>2</sub> / 70 % de N<sub>2</sub> y 70 % de CO<sub>2</sub> / 30 % de N<sub>2</sub>, permitió extender la vida de anaquel del producto de 5 a 6 días (sin afectar sus características sensoriales) ya que la población microbiana se redujo de 1 a 5 log UFC g<sup>-1</sup> (Chouliara *et al.*, 2007).

Otros extractos evaluados debido a su actividad antimicrobiana y antioxidante en la calidad de la carne de pollo y sus derivados son el extracto de cacao (*Theobroma cacao*), el aceite de naranja (*Citrus sinensis*), residuos de la industria vinícola, semillas de naranja (*Citrus sinensis*), limón (*Citrus limon*) y toronja (*Citrus paradisi*), extractos de cáscara de plátano (*Musa paradisiaca*) y cáscara de zapote (*Manilkara zapota*) en carne cruda (Hassan y Fan, 2005; Nannapaneni *et al.*, 2009; Selani *et al.*, 2011; Adeyemi *et al.*, 2013; Devatkal *et al.*, 2014), así como, jugo de granada (*Punica granatum*) en empanadas, semillas de durazno (*Prunus persia*) en carne molida y extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) en nuggets (Naveena *et al.*, 2008; Yogesh y Ali, 2014; Teruel *et al.*, 2015).

En la carne de cerdo también se han evaluado diferentes extractos naturales. Shan *et al.* (2009) reportan los efectos antioxidantes y antimicrobianos de la canela (*Cinnamomum verum*), el orégano (*Origanum vulgare*), el clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), la cáscara de granada (*Punica granatum*) y los extractos de semilla de uva (*Vitis vinifera*) en carne cruda de cerdo a temperatura ambiente (~20 °C). Los resultados mostraron que los cinco extractos son efectivos contra *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella enterica*, así mismo, aumentaron la estabilidad del cerdo crudo

frente a la oxidación de lípidos. El clavo de olor fue el más eficaz para retardar la oxidación de los lípidos e inhibir a los microorganismos.

Aunado a lo anterior, otras investigaciones han utilizado de manera efectiva en la carne de cerdo cruda extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), hoja de mostaza (*Brassica juncea*), té verde (*Camellia sinensis*) y menta (*Mentha spicata*) (Hernández- Hernández *et al.*, 2009; Mi-Ai *et al.*, 2010; Biswas *et al.*, 2012).

Algunos extractos utilizados en subproductos de esta carne son por ejemplo: extracto de olivo (*Olea europaea* L.) en carne cocida (DeJong y Lanari, 2009); aceite de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y tomillo (*Thymus*) en mortadela (Viuda-Martos *et al.*, 2010); extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y toronjil (*Melissa officinalis* L.) en empanadas cocinadas empacadas en MAP (Lara *et al.*, 2011); extracto de té verde (*Camellia sinensis*) y romero (*Rosmarinus officinalis* L.) en salchichas (Jongberg *et al.*, 2013); extractos de té verde (*Camellia sinensis*), algas marinas (*Ulva lactuca* y *Ulva rigida*), semillas de uva (*Vitis vinifera*) y castaño (*Castanea sativa*) en empanadas de cerdo (Lorenzo *et al.*, 2014); extractos de cereza (*Prunus cerasus* L.) y grosella negra (*Ribes nigrum* L.) en salchichas (Nowak *et al.*, 2016).

La carne de res, también ha sido expuesta al tratamiento de extractos naturales con el fin retrasar su proceso de degradación. Rojas y Brewer (2008) evaluaron el efecto del extracto de romero (0.02 %), orégano (0.02 %) y semilla de uva (0.02 %) en carne cruda de res envasada al vacío y almacenada durante 4 meses a -18 °C. Concluyendo que la adición de estos extractos redujo significativamente el proceso de oxidación lipídica sin alterar las características sensoriales del producto, los valores de TBARS de las muestras con semilla de uva y orégano disminuyeron hasta en un 12 % en comparación con las muestras control.

Los aceites esenciales (EO) extraídos de la naranja (*Citrus sinensis*) han demostrado ser eficaces en la inhibición de bacterias como *E. coli* O157: H7 y *Salmonella* spp presentes en la carne de res cruda. Pittman *et al.* (2011) aplicaron mediante pulverización (a una tasa de 3.79 L min<sup>-1</sup>) los CEO a concentraciones de 3 y 6 % en la superficie de diferentes trozos de carne. Estos redujeron significativamente (p<0.05) la concentración de ambos microorganismos durante un período de 90 días,

con una reducción inicial de aproximadamente 1.4 unidades logarítmicas. Kim *et al.* (2013) evaluaron diez extractos de vegetales de hoja verde en una concentración del 0.1 y 0.5 % p/p en carne de res molida almacenada durante 12 días a 4 °C, así mismo, compararon la actividad antioxidante de los extractos vegetales con BHT (0.1 y 0.5 %), utilizando el método de TBARS. Concluyendo que la adición de estos extractos redujo significativamente ( $p < 0.05$ ) el proceso de oxidación lipídica. La carga microbiana de CTV, Coliformes y BAL disminuyó significativamente en las muestras tratadas con los extractos, obteniendo una reducción mayor en el tratamiento al 0.1 %.

Otros extractos evaluados en la carne de res cruda y sus subproductos son: extracto de oliva (*Olea europaea* L.) en carne cocida, extracto de hoja de loto (*Nelumbo nucifera*) en carne fresca y extracto de cáscara de granada (*Punica granatum*) en albóndigas (DeJong y Lanari, 2009; Turgut *et al.*, 2017).

## 1.8. LITERATURA CITADA

- Adeyemi, K.D., Olorunsanya, O.A., Abe, O.T. (2014). Effect of citrus seed extracts on oxidative stability of raw and cooked chicken meat. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 3(1): 195-199.
- Barbosa, L.N., Rall, V.L.M., Fernandes, A.A.H., Ushimaru, P.I., Probst, I.S., Fernandes, A. (2009). Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens Disease*, 6(6): 725-728.
- Benites, J.V., Díaz, R.G., López, J.V., Gajardo, S.S., Kusch, F.F, Rojas, M.A. (2011). Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica. *BIOFARBO*, 19(1): 1-7.
- Biswas, A.K., Chatli, M.K., Sahoo, J. (2012). Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. *Food Chemistry*, 133: 467-472.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foodsea review. *International Journal Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Callaway, T.R., Carroll, J.A., Arthington, J.D., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Ricke, S.C. (2011). Citrus products and their use against bacteria: potential health and cost benefits. Preedy (Eds.). New York, N.Y.
- Costa, R., Bisignano, C., Filocamo, A., Grasso, E., Occhiuto, F., Spadaro, F. (2014). Antimicrobial activity and chemical composition of Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle essential oil from Italian organic crops. *Journal of Essential Oil Research*, 26: 400-408.

- Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Garcia-Gonzalo, D., Pagan, R., Laglaoui, A. (2014). Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94: 1197-1204.
- Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. (2007). Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat stored at 4°C. *Food Microbiology*, 24: 607-617.
- DeJong, S., Lanari, M.C. (2009). Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract. *Food Chemistry*, 116: 892-897.
- Devatkal, S.K., Naveena, B.M. (2010). Effect of salt, kinnow and pomegranate fruit by product powders on color and oxidative stability of raw ground goatmeat during refrigerated storage. *Meat Science*, 85(2): 306-311.
- Devatkal, S.K., Kumboj, R., Paul, D. (2014). Comparative antioxidant effect of BHT and water extracts of banana and sapodilla peels in raw poultry meat. *Journal of Food Science Technology*, 51(2): 387-391.
- Doulgeraky, A., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal Food Microbiology*, 157: 130-141.
- Du, W.X., Olsen, C.W., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Levin, C.E., Friedman, M. (2009). Effects of allspice, cinnamon, and clove bud essential oils in edible apple films on physical properties and antimicrobial activities. *Journal of Food Science*, 74(7): 372-378.
- Du, W.X., Avena-Bustillos, R.J., Woods, R., Breksa, A.P., McHugh, T.H., Friedman, M., Levin, C.E., Mandrell, R. (2012). Sensory evaluation of baked chicken wrapped with antimicrobial apple and tomato edible films formulated with cinnamaldehyde and carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 7799-7804.
- Elaissi, A., Rouis, Z., Ben Salem, N.A., Mabrouk, S., ben Salem, Y., Salah, K.B.H., Aouni, M., Farhat, F., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F., Khouja, M.L. (2012). Chemical composition of eight eucalyptus species essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12: 81-96
- Enache, E., Chen, Y. (2007). Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in cranberry juice concentrates at different °Brix Levels. *Journal Food Protection*, 70: 2072-2077.
- Fisher, K., Phillips, C. (2006). The effect of lemon, orange, bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1232-1240.
- Flávia, A.G., Neto, M.A., Bezerra, J.N.S., Macrae, A., Viana de Sousa, O., Fonteles-Filho, A.A., Vieira, H.S.F. (2008). Antibacterial activity of guava, (*Psidium*

- guajava) Linnaeus, Leaf extracts on diarrhea causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50(1): 11-15.
- Fratianni, F., Martino, L.D., Melone, A., Feo, V.D., Coppola, R., Nazzaro, F. (2010). Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of Food Science*, 75(8): 528-535.
- Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65: 1545-1560.
- Guinoiseau, E., Luciani, A., Rossi, P.G., Quilichini, Y., Ternengo, S., Bradesi, P., Berti, L. (2010). Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina Corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *European Journal Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29: 873-879.
- Hassan, O., Fan, L.S. (2005). The antioxidation potential of polyphenol extract from cocoa leaves on mechanically deboned chicken meat (MDCM). *LWT-Food Science Technology*, 38: 315-321.
- Hernández-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M.E., Guerrero-Legarreta, I. (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, 81: 410-417.
- Hui, Y.H. (2010). *Meat Science and Applications*. Cap.20 en: *Meat Curing Technology*. Edit. Marcel Research in Meat Color, 71: 100-121.
- Jongberg, S., Tørngren, M.A., Gunvig, A., Skibsted, L.H., Lund, M.N. (2013). Effect of green tea or rosemary extract on protein oxidation in Bologna type sausages prepared from oxidatively stressed pork. *Meat Science*, 93: 538-546.
- Kanatt, S.R., Chander, R., Sharma, A. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *International Journal of Food Science*, 45: 216-222.
- 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: 112-120.
- Lara, M.S., Gutiérrez, J.I., Timón, 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: 481-488.
- Lorenzo, J.M., Batlle, R., Gómez, M. (2014). Extension of the shelf life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. *LWT-Food Science Technology*, 59: 181-188.
- Luciano, G., Roscini, V., Mattioli, S., Ruggeri, S., Gravador, R. S., Natalello, A., Lanza, M., de Angelis A., Priolo, A. (2017). Vitamin E is the major contributor to the antioxidant capacity in lambs fed whole dried citrus pulp. *Animal*, 11: 411-417.

- Méndez, W.D. (2006). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana Salud Publica*, 33(1): 1-7.
- Mi-Ai, L., Ji-Hun, C., Yun-Sang, C., Doo-Jeong, H., Hack-Youn, K., So-Yeon, S., Hae-Kyung, C., Cheon-Jei, K. (2010). The antioxidative properties of mustard leaf (*Brassica juncea*) kimchi extracts on refrigerated raw ground pork meat against lipid oxidation. *Meat Science*, 84: 498-504.
- Moo-Huchin, V.M, Moo-Huchin, M.I., Estrada-León, R.J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I.A., Ortiz-Vázquez, E., Betancur-Ancona, D., Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 166: 17-22.
- Nannapaneni, R., Chalova, V.I., Crandall, P.G., Ricke, S.C., Johnson, M.G., O'Bryan, C.A. (2009). *Campylobacter* and *Arcobacter* species sensitivity to commercial orange oil fractions. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 43-49.
- Naveena, B.M., Sen, A.R., Vaithyanathan, S., Babji, Y., Kondaiyah, N. (2008). Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science*, 80: 1304-1308.
- 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: 7-17.
- Nogueira, M.C., Oyarzabal, O.A., Gombas, D.E. (2003). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in cranberry, lemon and lime juice concentrates. *Journal of Food Protection*, 66(9): 1637-1641.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 142-149.
- Pavelková, A., Kacániová, M., Horská, E., Rovná, K., Hleba, H., Petrová, J. (2014). The effect of vacuum packaging, EDTA, oregano and thyme oils on the microbiological quality of chicken's breast. *Anaerobe*, 29: 128-133.
- Pittman, C.I., Pendleton, S., Bisha, B., O'Bryan, C.A, Goodridge, L., Crandall, P.G., Ricke, S.C. (2011). Validation of the use of citrus essential oils as a post-harvest intervention against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on beef primal cuts. *Journal of Food Science*, 76: 433-438.
- Ponnampalam, E.N., Plozza, T., Kerr, M.G., Lindena, N., Mitchell, M., Bekhit, A.E.D., Jacobs, J.L., Hopkins, D.L. (2017). Interaction of diet and long ageing period on lipid oxidation and colour stability of lamb meat. *Meat Science*, 129: 43-49.
- Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, M. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1): 76-89.
- Radha, K.K., Babuskin, S., Saravana Babu, P.A., Sasikala, M., Sabina, K., Archana, G., Sivarajan, M., Sukumar, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant effects of

- spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 171: 32-40.
- Ravishankar, S., Zhu, L., Olsen, C.W., Mchugh, T.H., Friedman, M. (2009). Edible apple film wraps containing plant antimicrobials inactivate foodborne pathogens on meat and poultry products. *Journal of Food Science*, 74(8): 440-445.
- Rodríguez, S.E.N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1): 153-170.
- Rojas, M.C., Brewer, M.S. (2008). Effect of natural antioxidants on oxidative stability of frozen, vacuum-packaged beef and pork. *Journal of Food Quality*, 31: 173-188.
- 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: 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: 21-33.
- Shan, B., Cai, Y., Brooks, J. D., Corke, H. (2009). Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(11): 1879-1885.
- Sharma, H., Mendiratta, S.K., Agarwal, R.K., Kumar, S., Soni, A. (2017). Evaluation of anti-oxidant and anti-microbial activity of various essential oils in fresh chicken sausages. *International Journal of Food Science Technology*, 54(2): 279-292.
- Singh, S., Das, S.S., Singh, G., Schuff, C., de Lampasona, M.P., Catalán, C.A.N. (2014). Composition, in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *BioMed Research International*, 1: 1-10.
- Siripatrawan, U., Harte, B.R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24: 770-775.
- Skandamis, P., Tsigarida, E., Nychas, G.-J.E. (2002). The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*, 19:97-103.
- Teixeira, B., Marques, A., Nunos, Ramos, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43: 587-595.
- Teruel, M.R., Garrido, M.D., Espinosa, M.C., Linares, M.B. (2015). Effect of different format-solvent rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) on frozen chicken nuggets quality. *Food Chemistry*, 172: 40-46.
- Turgut, S.S., Işıkçı, F., Soyer, A. (2017). Antioxidant activity of pomegranate peel extract on lipid and protein oxidation in beef meatballs during frozen storage. *Meat Science*, 129: 111-119.

- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A. (2010). Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf life of mortadela. *Meat Science*, 85: 568-576.
- Yogesh, K., Ali, J. (2014). Antioxidant potential of thuja (*Thuja occidentalis*) cones and peach (*Prunus persia*) seeds in raw chicken ground meat during refrigerated ( $4 \pm 1$  °C) storage. *Journal of Food Science and Technology*, 51: 1547-1553.
- Zhang, H., Wu, J., Guo, X. (2016). Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality. *Food Science and Human Wellness*, 5: 39-48.

## CAPÍTULO II. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA EN EXTRACTOS DE ESPECIAS Y CÁSCARA DE FRUTOS OBTENIDOS POR MACERACIÓN O ULTRASONIDO

### 2.1. RESUMEN

Los extractos de frutas y especias son conservadores naturales debido a su actividad antioxidante (AA) y antimicrobiana (AM). El estudio tuvo como objetivo evaluar la AA y AM de extractos de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*), albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, variedad valencia), mandarina (*Citrus reticulata*), mango (*Mangifera indica* cv. Ataulfo) y guayaba (*Psidium guajava* L.), obtenidos por maceración (MC) o ultrasonido (US). Los fenoles (FE) y flavonoides (FL) se cuantificaron con el método de Folin-Ciocalteu y colorimétrico, respectivamente. La AA se determinó con el método DPPH. La AM de los extractos se evaluó frente a *Salmonella Typhimurium* (ST), *Escherichia coli* (EC) y *Pseudomonas fluorescens* (PF) con el método de difusión en agar. Se implementó un diseño factorial con asignación completamente al azar. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Tukey. Los extractos de tomillo obtenidos por US o MC tuvieron la mayor cantidad de FE ( $p < 0.05$ ) (71.46 y 64.87 mg de ácido gálico  $g^{-1}$  PS, respectivamente). El mayor ( $p < 0.05$ ) contenido de FL se registró en los extractos de mango y tomillo procesados por US con 39.12 y 38.90 mg de quercetina  $g^{-1}$  PS, respectivamente. El extracto de guayaba obtenido por US tuvo mayor ( $p < 0.05$ ) AA. La mejor ( $p < 0.05$ ) inhibición de ST se presentó con los extractos de mango y tomillo obtenidos por US, y EC fue inhibida ( $p < 0.05$ ) con los extractos de tomillo, mango y guayaba obtenidos por ambos métodos; adicionalmente, PF fue inhibida ( $p < 0.05$ ) por los extractos de albahaca (MC y US) y tomillo por US. En general, el mayor contenido de FE, FL y AA, e inhibición bacteriana se obtuvo con los extractos obtenidos por US. De los siete extractos naturales obtenidos por MC o US, los extractos de tomillo, cáscara de mango y cáscara de guayaba por US, tuvieron la mejor ( $p < 0.05$ ) AA y AM. Estos resultados muestran ser efectivos contra la oxidación y el crecimiento microbiano, lo cual permite abrir diversas líneas de investigación para utilizarse en la conservación de alimentos.

**Palabras clave:** patógenos, alimentos, radicales libres, inhibición bacteriana.

## CHAPTER II. ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN EXTRACTS OF SPICES AND PEELS OF FRUITS OBTAINED BY MACERATION OR ULTRASOUND

### 2.2. ABSTRACT

Fruit and spice extracts are natural preservatives due to their antioxidant (AA) and antimicrobial (AM) activity. The objective of the study was to evaluate the AA and AM of extracts of oregano (*Origanum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*), basil (*Ocimum basilicum* L.) and orange peel (*Citrus sinensis*, valencia variety), mandarin (*Citrus reticulata*), mango (*Mangifera indica* cv. Ataulfo) and guava (*Psidium guajava* L.), obtained by maceration (MC) or ultrasound (US). Phenols (FE) and flavonoids (FL) were quantified with the Folin-Ciocalteu and colorimetric method, respectively. AA was determined with the DPPH method. The AM of the extracts was evaluated against *Salmonella* Typhimurium (ST), *Escherichia coli* (EC) and *Pseudomonas fluorescens* (PF) with the agar diffusion method. A factorial design with completely randomisation was implemented. The data were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's tests. The thyme extracts obtained by US or MC had the highest amount of FE ( $p < 0.05$ ) (71.46 and 64.87 mg of gallic acid  $g^{-1}$  PS, respectively). The highest ( $p < 0.05$ ) content of FL was recorded in the mango and thyme extracts processed by the US with 39.12 and 38.90 mg of quercetin  $g^{-1}$  PS, respectively. The guava extract obtained by US had higher ( $p < 0.05$ ) AA. The best ( $p < 0.05$ ) inhibition of ST was presented with the extracts of mango and thyme obtained by US, and EC was inhibited ( $p < 0.05$ ) with the extracts of thyme, mango and guava obtained by both methods; additionally, PF was inhibited ( $p < 0.05$ ) by basil extracts (MC and US) and thyme by US. In general, the highest content of FE, FL and AA, and bacterial inhibition was obtained with the extracts obtained by US. Of the seven natural extracts obtained by MC or US, the extracts of thyme, mango peel and guava peel by US, had the best ( $p < 0.05$ ) AA and AM. These results show to be effective against oxidation and microbial growth, which allows opening various lines of research to be used in food preservation.

**Keywords:** pathogens, food, free radicals, bacterial inhibition.

## 2.3. INTRODUCCIÓN

Numerosos extractos de plantas son investigados por su actividad antioxidante (AA) y antimicrobiana (AM), como es el caso de los extractos de aceites esenciales, vegetales, frutas y especias (Lara *et al.*, 2011). Los aceites esenciales y otros extractos de las plantas son responsables de la AM en plantas, hierbas y especias; además, está documentado su efecto antimicrobiano contra patógenos transmitidos por alimentos, incluyendo *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Callaway *et al.*, 2011).

Las frutas y especias son fuentes ricas en polifenoles. Estos compuestos son metabolitos secundarios capaces de inhibir o retrasar los procesos de oxidación (Zuo *et al.*, 2002). Los flavonoides son compuestos fenólicos conocidos por su AM, sintetizados por las plantas en respuesta a infecciones microbianas (Górniak *et al.*, 2019). Diversas investigaciones demuestran el uso efectivo de extractos naturales con AA y AM en la preservación de la calidad de alimentos, debido a su capacidad de inhibir el crecimiento microbiano y retrasar los procesos de oxidación de lípidos y proteínas. Algunos extractos naturales se han estudiado en la conservación de carne, leche, queso, pescado y vegetales, entre otros (Chibane *et al.*, 2018).

Existen diversas técnicas para obtener extractos naturales; sin embargo, la elección del método de extracción más adecuado permite optimizar el rendimiento, la calidad y la concentración de los compuestos extraídos, maximizando su capacidad antioxidante y antimicrobiana (Shah *et al.*, 2014). El objetivo de este estudio fue evaluar la AA y AM de siete extractos naturales de especias y cáscara de frutos obtenidos por maceración (MC) o ultrasonido (US).

## 2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1. Ubicación

La investigación se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal del Posgrado en Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

## **2.4.2. Materiales**

Las especias de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*), albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y los frutos de naranja (*Citrus sinensis*, variedad valencia), mandarina (*Citrus reticulata*), mango (*Mangifera indica* cv. Ataulfo) y guayaba (*Psidium guajava* L.) fueron adquiridos en un supermercado local de la ciudad de Texcoco, Estado de México. Las muestras se seleccionaron de manera visual con color y tamaño homogéneo. Se trasladaron al laboratorio bajo condiciones asépticas a una temperatura de 8 °C. Se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. Las especias y cáscara de los frutos se liofilizaron a -50 °C y 0.035 mBar (Labconco, FreeZone, USA). Posteriormente se molieron en un mortero.

## **2.4.3. Obtención de extractos de especias y cáscara de frutos**

### **2.4.3.1. Extractos obtenidos por maceración**

La extracción por maceración (MC) se realizó con lo descrito por Ramful *et al.* (2011), con modificaciones. Se pesaron 0.5 g de muestras secas y pulverizadas se colocaron en un tubo de plástico de 50 mL con tapón de rosca y se agregó 5.0 mL de etanol al 95 % (J.T. Baker, México). Luego se agitó el tubo durante 1 min en vórtex y se dejó reposar por 12 h a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 2,265 g por 15 min, el sobrenadante se recuperó en un tubo de 50 mL y se almacenó a -20 °C. Se añadieron 5 mL de etanol al 95 % a la fase sólida obtenida en la centrifugación y se repitió el mismo procedimiento para la segunda extracción. Los sobrenadantes de las dos extracciones se recolectaron y almacenaron a -20 °C, protegidos de la luz, hasta su uso para la determinación de la actividad antioxidante (AA) y antimicrobiana (AM).

### **2.4.3.2. Extractos obtenidos por ultrasonido**

La extracción por ultrasonido (US) se realizó con el método descrito por Marghitas *et al.* (2007), con modificaciones. Se pesaron 0.5 g de muestras secas y pulverizadas en tubos de plástico de 50 mL con tapón de rosca y se agregó 5.0 mL de etanol al 95 %. Luego se agitaron durante 1 min en vórtex y se sometieron a sonicación en un baño de US (Autoscience, As 2060B, USA) con hielo por 15 min. Posteriormente, se hizo la centrifugación a 2,265 g por 15 min, el sobrenadante se decantó en un tubo de plástico de 50 mL y se almacenó a -20 °C. Se añadieron 5 mL de etanol al 95 % a

la fase sólida obtenida en la centrifugación y se repitió el procedimiento para realizar una segunda extracción. Los sobrenadantes de las dos extracciones se colectaron en un tubo de plástico de 50 mL y se almacenaron a -20 °C, protegido de la luz, hasta la determinación de la AA y AM.

#### **2.4.4. Contenido total fenólico**

El contenido total de fenoles en los extractos se determinó con el reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, México), con base en la metodología descrita por Ramful *et al.* (2011), con modificaciones. Se tomó una alícuota de 250 µL del extracto en un tubo de vidrio de 10 mL y se añadieron 3.5 mL de agua destilada, luego se agregaron 250 µL de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, México). La mezcla se agitó en un vórtex durante 1 min, y se dejó reposar durante 3 min en oscuridad a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente se agregó 1 mL de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; Merck, México) al 20 %. La mezcla se incubó en baño maría a 40 °C por 40 min en oscuridad, y se midió la absorbancia a 685 nm en un espectrofotómetro (Cary E, Varian, USA). Se utilizó ácido gálico (Merck, México) como estándar para elaborar la curva de calibración. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico por gramo de muestra en peso seco (mg GAE g<sup>-1</sup> PS).

#### **2.4.5. Contenido total de flavonoides**

El contenido total de flavonoides de los extractos se determinó con el método colorimétrico descrito por Ramful *et al.* (2011), con modificaciones, usando quercetina (Sigma Aldrich, México) como estándar. Se colocaron 2.5 mL de extracto en un tubo de vidrio de 10 mL y se añadieron 150 µL de nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>; J.T. Baker, México) al 5 %. La solución se mezcló y se dejó reposar en oscuridad a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 150 µL de cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>; Merck, México) al 10 %, después de 1 min se añadió 1 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH; J.T. Baker, México) 1 M. La solución se mezcló y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Cary E, Varian, USA) a 510 nm. Los resultados se reportaron como mg de quercetina por gramo de muestra en peso seco (mg QE g<sup>-1</sup> PS).

#### 2.4.6. Actividad antioxidante (AA) de los extractos

La actividad antioxidante (AA) se determinó con el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) descrito por Zhang *et al.* (2014), con modificaciones. Se mezcló 0.5 mL del extracto de especias o cáscara de frutos con 0.5 mL de metanol (J.T. Baker, México), y se agregaron 3.0 mL de solución de DPPH (Sigma Aldrich, México). La mezcla se agitó en vórtex durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente (25 °C) por 30 min la oscuridad. Luego se midió la absorbancia a 517 nm con un espectrofotómetro (Cary E, Varian, USA). Se utilizó Trolox (Sigma Aldrich, México) como estándar para la curva de calibración.

El porcentaje de inhibición de DPPH se calculó con la siguiente fórmula (Mariem *et al.*, 2014):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \times 100$$

dónde:  $Abs_{control}$  es la absorbancia del testigo y  $Abs_{muestra}$  es la absorbancia de la muestra.

#### 2.4.7. Actividad antimicrobiana (AM)

##### 2.4.7.1. Cepas microbianas

Las cepas de *Salmonella* Typhimurium (ST; ATCC 14028) y *Escherichia coli* (EC; ATCC 25922) se obtuvieron del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. La cepa de *Pseudomonas fluorescens* (PF; CDBB-B1243) se obtuvo de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares, ubicados en la Ciudad de México.

Las cepas de EC y PF se replicaron en frascos de vidrio de 150 mL con caldo soya tripticaseína (CST; BD Bioxon, México) adicionando 15 % de glicerol (Sigma, México) y se incubaron a 37 y 28 °C, respectivamente, por 24 h. La cepa de ST se sembró en caldo nutritivo (CN; BD Bioxon, México) con 15 % de glicerol y se incubó a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se tomó 1 mL de cultivo de los frascos que presentaron crecimiento y se colocó en viales Eppendorf de 2 mL, previamente esterilizados, elaborando 10 viales de cada cepa como stock. Cada vial se identificó con el nombre

de la cepa, clave y fecha de elaboración, y se almacenaron a -20 °C en un ultracongelador (Thermo Scientific®, modelo 88500A61, USA).

Las cepas de trabajo o control de calidad se obtuvieron de uno de los viales preservados a -20 °C y bajo condiciones asépticas. El contenido de los viales con EC y PF, se depositó en frascos de vidrio de 100 mL que contenían 50 mL de medio CST, fueron incubados por 24 h a 37 y 28 °C, respectivamente; posteriormente se sembraron por estría en placa con agar soya tripticaseína (AST; Bioxon, México). En ST se realizó el mismo procedimiento utilizando CN e incubando a 37 °C por 24 h, sembrándose por estría en placa con agar nutritivo (AN; Bioxon, México). Las cajas de Petri se identificaron con el nombre del microorganismo inoculado, la fecha de siembra y se colocaron en refrigeración a 4 °C.

#### **2.4.7.2. Actividad antimicrobiana por difusión en agar**

La AM de los extractos se determinó por triplicado usando el método de difusión en agar para detectar la inhibición del crecimiento de ST, EC y PF, de acuerdo con lo descrito por Radha *et al.* (2014), con modificaciones. Los cultivos de EC y PF, se inocularon en AST (BD Bioxon, México) y ST en AN (BD Bioxon, México), posteriormente se colocó un disco de 6 mm de diámetro de papel Whatman® 541 impregnado con 0.1 mL de cada extracto de especias o cáscara de frutos. Las placas se incubaron a 37 °C para ST y EC, y a 28 °C para PF, durante 24 h. La AM se evaluó midiendo con un Vernier (Scala, México) la zona de inhibición, correspondiente al diámetro de la zona que mostró visiblemente la ausencia de crecimiento microbiano y que incluye el disco de 6 mm. Como control se utilizaron discos similares de papel Whatman impregnados con 0.1 mL de agua destilada. La población bacteriana en todos los medios utilizados como inóculo fue mayor a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

#### **2.4.8. Análisis y modelo estadístico**

Se implementó un diseño factorial 2x7 con asignación completamente al azar, los factores corresponden a método de extracción y extracto natural, con 2 y 7 niveles, respectivamente. Se ensayaron 14 tratamientos con tres repeticiones y la unidad experimental consistió del extracto natural a una concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup>.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia de los efectos factoriales. Se aplicó prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para comparar el efecto de los tratamientos sobre las variables respuesta. Se utilizó el programa estadístico SAS® Versión 9.1 (SAS, 2003). Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) usando el software Minitab versión 19, para evaluar conjuntamente todas las variables medidas en cada extracto y determinar los tres extractos naturales con mejor AA y AM.

## 2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.5.1. Contenido total fenólico

El Cuadro 1 presenta las concentraciones de fenoles (FE) en los extractos de especias y frutos evaluados en este estudio. Se observó efecto de interacción ( $p < 0.05$ ) entre el extracto (E) y el método de extracción (ME), implicando que el contenido de FE en los E depende del ME. Los FE retrasan o inhiben los procesos de oxidación y poseen propiedades antimicrobianas, están presentes en cereales, frutos secos, especias, verduras y frutas (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2016), de ahí el interés de los tratamientos evaluados en el presente estudio. La AA de estos fitoquímicos se debe a su capacidad redox, al actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, inhibidores de oxígeno (Mariem *et al.*, 2014).

El efecto de los extractos de tomillo obtenidos por ultrasonido (US) o maceración (MC) y el extracto de mango obtenido por US resultó significativamente superior ( $p < 0.05$ ) a los demás tratamientos sobre el contenido de FE, con los niveles más altos. Estos tratamientos superaron al extracto de guayaba procesado por US, el cual tuvo el segundo nivel más alto de estos metabolitos secundarios. En un estudio realizado por Köksal *et al.* (2017) reportan que el contenido de FE en el extracto de tomillo cambió de 256.0 a 158 mg GAE g<sup>-1</sup> PS, cuando este se obtiene con agua o etanol, respectivamente. Estos valores resultan altos comparados con la cantidad de FE cuantificados en este estudio. En contraste, Roby *et al.* (2013) reportan valores inferiores a los obtenidos en este estudio (8.10, 7.30, 6.15 4.75 mg GAE g<sup>-1</sup> PS) usando extractos con metanol, etanol, éter etílico y hexano, respectivamente. En el tomillo se identifican compuestos fenólicos como los ácidos 3,4-dihidroxibenzoico, protocatéquico, 5-O-cafeoylquinic, cafeico y rosmarínico (Martins *et al.*, 2015).

**Cuadro 1.** Contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante de siete extractos naturales obtenidos por maceración y ultrasonido (Media  $\pm$  DE).

Método de extracción (ME) / Extracto (E)	Contenido de fenoles, mg de ácido gálico g <sup>-1</sup> *	Contenido de flavonoides, mg de quercetina g <sup>-1</sup> *	Actividad antioxidante, % de inhibición
<b>Maceración</b>			
Oregano <sup>¥</sup>	23.17 $\pm$ 0.12 <sup>d,e, f, g</sup>	13.75 $\pm$ 0.02 <sup>h</sup>	37.61 $\pm$ 0.15 <sup>f</sup>
Tomillo <sup>£</sup>	64.87 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	36.37 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	49.50 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
Albahaca <sup>Ω</sup>	26.86 $\pm$ 0.13 <sup>d,e</sup>	16.95 $\pm$ 0.07 <sup>f</sup>	3.82 $\pm$ 0.10 <sup>j</sup>
Cáscara de naranja <sup>✱</sup>	17.71 $\pm$ 0.12 <sup>f, g</sup>	9.06 $\pm$ 0.03 <sup>j</sup>	5.65 $\pm$ 0.10 <sup>i</sup>
Cáscara de mandarina <sup>ᵇ</sup>	16.53 $\pm$ 0.13 <sup>g</sup>	8.76 $\pm$ 0.04 <sup>j</sup>	10.62 $\pm$ 0.12 <sup>h</sup>
Cáscara de mango <sup>ᶜ</sup>	50.89 $\pm$ 0.14 <sup>b,c</sup>	31.13 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	39.86 $\pm$ 0.13 <sup>e</sup>
Cáscara de guayaba <sup>ⓧ</sup>	43.89 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>	19.56 $\pm$ 0.07 <sup>e</sup>	39.11 $\pm$ 0.15 <sup>e,f</sup>
<b>Ultrasonido</b>			
Oregano	26.11 $\pm$ 0.03 <sup>d, e, f</sup>	14.92 $\pm$ 0.04 <sup>g</sup>	43.27 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>
Tomillo	71.46 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	38.90 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	50.21 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
Albahaca	29.21 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	20.86 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	7.49 $\pm$ 0.12 <sup>i</sup>
Cáscara de naranja	20.69 $\pm$ 0.03 <sup>d, e, f, g</sup>	13.18 $\pm$ 0.04 <sup>h</sup>	6.84 $\pm$ 0.14 <sup>i</sup>
Cáscara de mandarina	19.39 $\pm$ 0.09 <sup>e,f, g</sup>	11.90 $\pm$ 0.03 <sup>i</sup>	19.89 $\pm$ 0.13 <sup>g</sup>
Cáscara de mango	66.47 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	39.12 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	47.11 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>
Cáscara de guayaba	55.05 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	21.91 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>	70.41 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
<b>Efecto factorial</b>	<b>Nivel de significancia observado (P)</b>		
ME	<0.0001	<0.0001	<0.0001
E	<0.0001	<0.0001	<0.0001
MExE	0.0021	<0.0001	<0.0001

\* En peso seco. <sup>¥</sup>Oregano (*Origanum vulgare*), <sup>£</sup>Tomillo (*Thymus vulgaris*), <sup>Ω</sup>Albahaca (*Ocimum basilicum* L.), <sup>✱</sup>Cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, variedad valencia), <sup>ᵇ</sup>Cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), <sup>ᶜ</sup>Cáscara de mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo), <sup>ⓧ</sup>Cáscara de guayaba (*Psidium guajava* L).

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j: Literales distintas en la misma columna indican diferencias (p<0.05).

El contenido de FE en semilla y cáscara de mango oscila de 54.67 a 117 mg GAE g<sup>-1</sup> (Soong y Barlow, 2004; Ajila *et al.*, 2007) y el contenido de estos metabolitos cuantificados en la cáscara de mango (66.47 mg GAE g<sup>-1</sup> PS) en este estudio están dentro de estos valores. La presencia de estos compuestos bioactivos en la cáscara y semilla del mango le confieren alta AA y en especial por ser altos en FE, como la quercetina, mangiferina, ácido 3,4-dihidroxibenzoico y xantonas (Dorta *et al.*, 2012).

Las variaciones en el perfil fenólico de los extractos evaluados con los reportados en la literatura se pueden relacionar con cambios en las condiciones de crecimiento de las especies vegetales (suelo, clima, precipitación, altitud), variación genética, métodos de cosecha y métodos de extracción, entre otros; los cuales modulan el contenido y calidad de estos fitoquímicos (Naghdi Badi *et al.*, 2004; Biswas *et al.*, 2014).

Se observó una tendencia relacionada con la cantidad de FE. La cantidad de FE en el mismo extracto fue mayor cuando se utilizó US en lugar de MC (Cuadro 1); esto sucedió en todos los materiales analizados (cáscara de frutos y especias), en donde la cantidad de estos metabolitos aumentó desde 8 hasta 30 %. Al respecto, en el extracto de tomillo obtenido por US la cantidad de FE fue mayor a la obtenida con MC en un 10 %.

Lo anterior, podría deberse a la ruptura de las paredes celulares producida por la cavitación acústica con la técnica de US, intensificando la transferencia de masa y mejorando el efecto de penetración del disolvente en el tejido vegetal (Ammer *et al.*, 2017). Caso contrario ocurre en la técnica por MC, donde se presenta una resistencia a la transferencia de masa, por lo que hay menor eficiencia y bajo rendimiento de extracción (Jadhav *et al.*, 2009). En general, la duración del proceso de US es inferior a 1 h, pero el rendimiento de extracción es de 6 % a 35 % mayor al obtenido mediante técnicas tradicionales como MC, en donde el tiempo de extracción es de 12 horas o más (Vilkhu *et al.*, 2008; Jabbar *et al.*, 2014).

### **2.5.2. Contenido total de flavonoides**

El Cuadro 1 presenta la cantidad de flavonoides (FL) determinada en los extractos de especias y frutos evaluados en este estudio. Se observó efecto de interacción

( $p < 0.05$ ) entre el extracto (E) y el método de extracción (ME), implicando que el contenido de FL depende del efecto simultáneo E y ME.

Los extractos de mango y de tomillo obtenidos por US presentaron mejor ( $p < 0.05$ ) nivel de FL y no presentaron diferencia entre sí ( $p > 0.05$ ), pero difirieron ( $p < 0.05$ ) de los extractos de tomillo y mango obtenidos por MC. El menor ( $p < 0.05$ ) contenido de estos metabolitos se observó en los extractos de naranja y mandarina obtenidos por MC, los cuales resultaron similares entre ellos ( $p > 0.05$ ).

El contenido de FL determinados en mango en este estudio fue superior al observado por Robles-Sánchez *et al.* (2011), quienes reportan valores de  $16.9 \pm 0.9$  y  $11.2 \pm 0.2$  mg QE  $100 \text{ g}^{-1}$  en fruto completo y en fruto cortado del mango variedad Ataulfo, respectivamente. De manera similar, Ajila *et al.* (2010) reportan 0.101 a 0.392 mg de FL  $\text{g}^{-1}$  de cáscara de mango, donde quercetina y kaempferol son los FL más importantes en la cáscara de este fruto.

En el tomillo se reportan valores de FL entre 44.2 y 36.6 mg de quercetina por gramo de muestra en peso seco (mg QE  $\text{g}^{-1}$  PS) cuando el extracto se obtiene con agua y etanol, respectivamente (Köksal *et al.*, 2017), valores similares a los observados en este estudio cuando se extraen por MC o US. Los FL identificados en esta especie pertenecen a las flavonas, flavonoles y flavanonas, como quercetin 3-O-rutinoside, quercetin 3-O-glucoside, luteolin 7-O-glucoside y eridictyol (Martins *et al.*, 2015).

Los FL son uno de los compuestos fenólicos más importantes y se identifican más de 6,000 compuestos de este grupo (Mariem *et al.*, 2014; Radha *et al.*, 2014). Son de importancia por poseer amplio espectro de actividad biológica, donde se incluye potente AA y AM.

Estos metabolitos secundarios tienen la capacidad de eliminar los radicales libres, incluidos los radicales hidroxilo, peróxido y superóxido, y pueden formar complejos con iones metálicos catalíticos que los hacen inactivos (Embuscado, 2015). También pueden inhibir las enzimas lipoxigenasa y ciclooxigenasa, las responsables del desarrollo de la rancidez oxidativa en los alimentos (Chen *et al.*, 2017), lo cual ofrece otras líneas de investigación para estos compuestos, como su uso en alimentos funcionales.

El método de extracción empleado influyó en la cantidad de FL, la técnica de US tuvo mejor eficiencia que MC, en los siete extractos analizados. En el tomillo por US la cantidad de FL fue mayor a la obtenida con MC en un 6 %. En los materiales vegetales analizados la cantidad de FL aumentó entre 5 y 45 % cuando se obtuvieron por US. Las diferencias pueden deberse a los mecanismos de acción y características de ambos métodos, las cuales fueron descritas anteriormente.

### **2.5.3. Actividad antioxidante (AA) de los extractos**

La actividad antioxidante (AA) de los extractos evaluados se muestra en el Cuadro 1. Se detectó efecto ( $p < 0.05$ ) de interacción para la AA causada por la fuente de extracto (E) y el método de extracción (ME). La AA de un extracto natural puede estar influenciada por el ME utilizado, ya que el procedimiento de extracción influye en la composición del extracto (Shah *et al.*, 2014).

El extracto de guayaba obtenido por US presentó 70 % de inhibición, con la mayor AA ( $p < 0.05$ ). Los extractos de tomillo obtenidos por US y MC mostraron niveles de inhibición cercanos al 50 %, sin diferencia ( $p > 0.05$ ) entre estos. En contraste, los extractos de albahaca y de cáscara de naranja registraron la menor ( $p < 0.05$ ) AA.

El método de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) permite determinar la captación de radicales libres por un antioxidante y funciona como radical libre orgánico estable; cuando es captado y transformado a DPPH-H, la solución cambia de color púrpura a amarillo y este viraje se relaciona con la disminución de la absorbancia a 517 nm (Abozed *et al.*, 2014; Radha *et al.*, 2014).

Congruente con los resultados obtenidos en este estudio, la literatura reporta valores de inhibición del 70 y 78 % en pulpa de guayaba procesada en extracto etanólico (Wolf y Sylo, 2018) o en acetona (Melo *et al.*, 2008), respectivamente. La capacidad antioxidante de la guayaba se relaciona con el alto contenido de antioxidantes naturales, dentro de los cuales se describen las antocianinas (delphinidin-3-O-glucoside y cyanidin-3-O-glucoside), flavonoides (myricetin-3-O-arabinoside, myricetin-3-O-xyloside y isorhamnetin-3-O-galactopyranoside), proantocianinas, sesquiterpenos y triterpenos (Flores *et al.*, 2015).

En el tomillo se reporta una AA con 52 % de inhibición evaluada mediante DPPH (Embuscado, 2015), resultado similar al observado en este estudio cuando el extracto de la especia se obtuvo por US (50 %) o MC (49 %). La AA de esta especia se atribuye al contenido de ácidos fenólicos (ácido gálico, cafeico, y rosmarínico), timol, carvacrol diterpenos fenólicos y flavonoides (luteolina y apigenina) (Leal *et al.*, 2017).

La AA en extractos naturales se relaciona con la presencia de diferentes metabolitos secundarios que pueden incluir FE, quinonas, FL, carotenoides y terpenos (Yashin *et al.*, 2017). Generalmente contienen un grupo hidroxilo (-OH) unido a un grupo hidrocarburo aromático. Los números y las posiciones del -OH vinculados al anillo aromático, en relación con el grupo funcional carboxilo, determinan la capacidad antioxidante (Falowo *et al.*, 2014). Nayak *et al.* (2015) atribuyen el nivel de AA de los fitoquímicos a la genética, el medio ambiente (ubicación) y las condiciones de crecimiento (humedad, fertilización, plagas y enfermedades, etc.), así como a los métodos de procesamiento y almacenamiento de frutas, verduras y especias.

En este estudio, se observó una tendencia en relación a la AA. La AA en el mismo extracto fue mayor cuando se obtuvo por US en comparación con MC (Cuadro 1). La causa probablemente está en la extracción por US, la cavitación acústica rompe las paredes celulares y agiliza la transferencia de masa del analito desde la fase sólida a la fase líquida (solvente) (García-Salas *et al.*, 2010), en consecuencia, se logran tiempos de extracción más cortos, contribuyendo a evitar la degradación de los metabolitos y preservar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Chemat *et al.*, 2017). Caso contrario ocurre con métodos tradicionales como el MC, donde la temperatura ambiente y el tiempo prolongado requerido para la extracción propician extractos con AA baja (Ngamwonglumlert *et al.*, 2015).

#### **2.5.4. Actividad antimicrobiana (AM) de los extractos**

Los extractos (E) evaluados presentaron diferencia ( $p < 0.05$ ) en la inhibición de *Salmonella Typhimurium* (ST), *Escherichia coli* (EC) y *Pseudomonas fluorescens* (PF; Cuadro 2). Se observó efecto de interacción entre extracto (E) y método de extracción (ME) para la inhibición de *Salmonella*, esta interacción puede deberse a que el ME influye en la cantidad y calidad de metabolitos obtenidos en el extracto, factores relacionados con su actividad biológica, como la AM.

**Cuadro 2.** Inhibición bacteriana de siete extractos naturales obtenidos por maceración o ultrasonido (Media  $\pm$  DE).

Método de extracción (ME)/Extracto (E)	Diámetro de inhibición, mm		
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<b>Maceración</b>			
Oregano <sup>¥</sup>	10.33 $\pm$ 0.06 <sup>d,e</sup>	12.67 $\pm$ 0.06 <sup>b,c</sup>	9.00 $\pm$ 0.00 <sup>b,c,d</sup>
Tomillo <sup>£</sup>	15.33 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	18.89 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	9.67 $\pm$ 0.07 <sup>b,c</sup>
Albahaca <sup>Ω</sup>	10.67 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>	13.67 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	10.33 $\pm$ 0.03 <sup>a,b</sup>
Cáscara de naranja <sup>*K</sup>	8.00 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	11.33 $\pm$ 0.06 <sup>b,c,d</sup>	8.00 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
Cáscara de mandarina <sup>°</sup>	8.00 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	8.89 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	8.00 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
Cáscara de mango <sup>°E</sup>	16.78 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	17.89 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	8.33 $\pm$ 0.07 <sup>b,c,d</sup>
Cáscara de guayaba <sup>°X</sup>	14.67 $\pm$ 0.06 <sup>b,c</sup>	18.22 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	8.00 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
<b>Ultrasonido</b>			
Oregano	11.00 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	13.00 $\pm$ 0.06 <sup>b,c</sup>	10.00 $\pm$ 0.03 <sup>b,c,d</sup>
Tomillo	19.22 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	20.00 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	10.33 $\pm$ 0.06 <sup>a,b</sup>
Albahaca	12.33 $\pm$ 0.06 <sup>c,d</sup>	14.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	11.33 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
Cáscara de naranja	8.20 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	12.00 $\pm$ 0.00 <sup>b,c,d</sup>	8.20 $\pm$ 0.03 <sup>c,d</sup>
Cáscara de mandarina	8.20 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	9.67 $\pm$ 0.06 <sup>c,d</sup>	8.20 $\pm$ 0.09 <sup>c,d</sup>
Cáscara de mango	19.89 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	18.33 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	9.00 $\pm$ 0.03 <sup>c,d</sup>
Cáscara de guayaba	15.89 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	18.22 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	8.30 $\pm$ 0.06 <sup>c,d</sup>
<b>Efecto factorial</b>	<b>Nivel de significancia observado (P)</b>		
ME	<0.0001	0.1441	0.0013
E	<0.0001	<0.0001	<0.0001
MExE	0.0008	0.9980	0.6740

<sup>¥</sup>Oregano (*Origanum vulgare*), <sup>£</sup>Tomillo (*Thymus vulgaris*), <sup>Ω</sup>Albahaca (*Ocimum basilicum* L.),

<sup>\*K</sup>Cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, variedad valencia), <sup>°</sup>Cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*),

<sup>°E</sup>Cáscara de mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo), <sup>°X</sup>Cáscara de guayaba (*Psidium guajava* L.).

a,b,c,d,e: Literales distintas en la misma columna indican diferencias (p<0.05).

El extracto de mango y el extracto de tomillo obtenidos por US, tuvieron el mejor ( $p < 0.05$ ) efecto en la inhibición de ST y no presentaron diferencia entre ellos ( $p > 0.05$ ). EC tuvo la mayor ( $p < 0.05$ ) inhibición con los extractos de tomillo, mango y guayaba obtenidos por US o MC. Los extractos de tomillo obtenido por US y albahaca procesado por US o MC redujeron en mayor grado ( $p < 0.05$ ) el crecimiento de PF, sin diferencia entre estos.

Akthar *et al.* (2014) reportan al tomillo como un inhibidor de *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. Typhimurium*, debido a su contenido de timol, linalol y carvacrol. En albahaca, se reporta la inhibición de *Brochothrix thermosphacta*, *E. coli*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas putida*, *S. Typhimurium* y *Shewanella putrefaciens*, por la presencia de metabolitos como terpineno y estragol (Kumara *et al.*, 2016).

La guayaba también inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* y *E. coli*, por la presencia de aceites esenciales, FL, saponinas, nerolidol,  $\beta$ -sitosterol y ácido ursólico (Biswas *et al.*, 2014).

La presencia y el nivel de concentración de diferentes compuestos fitoquímicos como FE, FL, alcaloides, saponinas, taninos, terpenos, carvacrol y timol, entre otros, han sido reconocidos como la fuente potencial de actividades antimicrobianas en materiales vegetales (Sharma *et al.*, 2012).

En este trabajo, el rango de inhibición para ST aumentó desde 2 hasta 25 %, para EC desde 2 hasta 9 % y para PF desde 2 hasta 11 %, en los extractos obtenidos por US vs MC. Lo cual puede estar asociado a los mecanismos de acción, rendimientos de FE y FL, la temperatura y tiempos cortos de extracción con la técnica de US (Chemat *et al.*, 2017). Muchos compuestos naturales son sensibles a luz y temperatura, y en la técnica de MC, los fitoquímicos pueden degradarse por los tiempos de extracción prolongados (Thongson *et al.*, 2004).

La AM de los compuestos fenólicos involucra diferentes modos de acción, pueden alterar la permeabilidad de las células, dañar las membranas citoplasmáticas, interferir con el sistema de generación de energía (ATP) y alterar la fuerza motriz del protón (Calo *et al.*, 2015).

Finalmente, de los siete extractos naturales obtenidos por MC o US, los extractos de tomillo, cáscara de mango y cáscara de guayaba por US, presentaron la mejor AA y AM.

## 2.6. CONCLUSIONES

En general, los extractos de especias y cáscara de frutos evaluados tuvieron un mayor contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante, así como, una mejor inhibición del crecimiento de *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*, cuando fueron obtenidos por el método de ultrasonido en comparación con el de maceración. De los siete extractos naturales analizados, los extractos de tomillo, cáscara de mango y cáscara de guayaba por ultrasonido, presentaron la mejor actividad antioxidante y antimicrobiana. Estos resultados demuestran su efectividad contra la oxidación y el crecimiento microbiano, lo cual ofrece diversas líneas de investigación, en la industria alimentaria como alternativa al uso de antioxidantes sintéticos.

## 2.7. LITERATURA CITADA

- Ajila, C.M., Aalami, M., Leelavathi, K., Rao, P. (2010). Mango peel powder: a potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11: 219-224.
- Ajila, C.M., Naidu, K.A., Bhat, S.G., Prasada Rao, U.J.S. (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105: 982-988.
- Akthar, M.S., Degaga, B., Azam, T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(1): 1-7.
- Ameer, K., Shahbaz, H.M., Kwon, J.-H. (2017). Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: a review. *Food Science and Food Safety*, 16(2): 295-315.
- Abozed, S.S., El-kalyoubi, M., Abdelrashid, A., Salama, M.F. (2014). Total phenolic contents and antioxidant activities of various solvent extracts from whole wheat and bran. *Annals of Agricultural Science*, 59(1): 63-67.
- Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D., Yadav, A. (2014). Antimicrobial activities of leaf extracts of guava (*Psidium guajava* L.) on two gram-negative and gram-positive bacteria. *International Journal of Microbiology*, 1: 1-7.
- Callaway, T.R., Carroll, J.A., Arthington, J.D., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Ricke, S.C. (2011). Citrus products and their use against bacteria: potential health and cost benefits. Preedy (Eds.). New York, N.Y.

- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems- A review. *Food Control*, 54: 111-119.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34: 540-560.
- Chen, L., Teng, H., Jia, Z., Battino, M., Miron, A., Yu, Z., Cao, H., Xiao, J. (2017). Intracellular signaling pathways of inflammation modulated by dietary flavonoids: the most recent evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17.
- Chibane, L.B., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., Oulahal, N. (2018). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4): 1457-1474.
- Dorta, E., Lobo, M.G., González, M. (2012). Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: effect on antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 45: 261-268.
- Embuscado, M.E. (2015). Spices and herbs: natural sources of antioxidants-a mini review. *Journal of Functional Foods*, 18: 811-819.
- Falowo, A.B., Fayemi, P.O., Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: a review. *Food Research International*, 64: 171-181.
- Flores, G., Wu, S., Negrina, A., Kennelly, J. E. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. *Food Chemistry*, 170: 327-335.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic compound extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15: 8813-8826.
- Górniak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18: 241-272.
- Gutiérrez-Grijalva, E.P., Ambriz-Pérez, D.L., Leyva-López, N., Castillo-López, R.I., Heredia, J.B. (2016). Review: Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66: 87-100.
- Jabbar, S., Abid, M., Wu, T., Hashim, M.M., Saeeduddin, M., Hu, B., Lei, S., Zeng, X. (2014). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds and antioxidants from carrot pomace: a response surface approach. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6): 1878-1888.
- Jadhav, D., Rekha, B.N., Gogate, P.R., Rathod, V.K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: a comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*, 93(4): 421-426.
- Köksal, E., Bursal, E., Gülçin, I., Korkmaz, M., Çağlayan, C., Gören, A.C., Alwasel, S.H. (2017). Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme

- (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *International Journal of Food Properties*, 20: 514-525.
- Kumara, M.S., Sayeed, M.A., Rani, U.S. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Hindawi Publishing Corporation*, 1: 1-21.
- 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: 481-488.
- Leal, F., Taghouti, M., Nunes, F., Silva, A., Coelho, A.C., Matos, M. (2017). *Thymus* plants: a review-micropropagation, molecular and antifungal activity. *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*.
- Marguitas, L.A., Dezmirean, D., Laslo, L., Moise, A., Popescu, O., Maghear, O. (2007). Validated method for estimation of total flavonoids in romanian propolis. *Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Cluj-Napoca*, 63: 1-6.
- Mariem, C., Sahema, M., Nadhema, S., Soumayaa, Z., Najibab, 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.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Silva, S., Henriques, M., Ferreira, I.C.F.R. (2015). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterization. *Food Chemistry*, 167: 131-137.
- Melo, E.A., Maciel, M.I.S., Lima, V.L.A.G, Nascimento, R.J. (2008). Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas*, 44: 93-201.
- Naghdi Badi, H., Yazdani, D., Ali, S.M., Nazari, F. (2004). Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 19: 231-236.
- Nayak, B., Liu, R.H., Tang, J. (2015). Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables, and grains- a review. *Critical Food Science and Nutrition*, 55: 887-918.
- Ngamwonglumlert, L., Devahastin, S., Chiewchan, N. (2015). Natural colorants: pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods. *Food Science and Nutrition*, 57: 3243-3259.
- Radha, K.K., Babuskina, S., Azhagu Saravana Babu, P., Sasikala, M., Sabina, K., Archana, G. (2014). Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 171: 32-40.
- Ramful, D., Tarmus, E., Aruoma, O.I., Bourdon, E., Theeshan, B. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International*, 44: 2088-2099.

- Robles-Sánchez, M., Astiazarán-García, H., Martín-Belloso, O., Gorinstein, S., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L.A., Yepiz-Plascencia, G., González-Aguila. (2011). Influence of whole and fresh-cut mango intake on plasma lipids and antioxidant capacity of healthy adults. *Food Research International*, 44: 1386-1391.
- Roby, M.H.H., Sarhana, M.A., Selima, K.A.H., Khalela, K.I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43: 827-831.
- Shah, M.A., Bosco, S.J.D., Mir, S.A. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, 98: 21-33.
- Sharma, A.K., Gangwar, M., Tilak, R., Nath, G., Sinha, A.S.K., Tripathi, Y.B., Kumar, D. (2012). Comparative in vitro antimicrobial and phytochemical evaluation of methanolic extract of root, stem and leaf of *Jatropha curcas* Linn. *Pharmacognosy Journal*, 4: 34-40.
- Soong, Y.Y., Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit sedes. *Food Chemistry*, 88: 411-417.
- Thongson, C., Davidson, P.M., Mahakarnchanakul, W., Weiss, J. (2004). Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent-extracted spices. *Letters in Applied Microbiology*, 39(5): 401-406.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry -a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2): 161-169.
- Wolf, T.A. Sylo, C.M. (2018). Efeito do processamento industrial para obtenção de goiabada sobre os compostos antioxidantes da goiaba (*Psidium guajava* L.) da cv. 'Paluma'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40: 1-10.
- Yashin, A., Yashin, Y., Xia, X., Nemzer, B. (2017). Antioxidant activity of spices and their impact on human health: a review. *Antioxidants*, 6: 1-18.
- Zhang, Y., Sun, Y., Xi, W., Shen, Y., Qiao, L., Zhong, L., Ye, X., Zhou, Z. (2014). Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chemistry*, 145: 674-680.
- Zuo, Y., Wang, C., Zhan, J. (2002). Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3789-3794.

## CAPÍTULO III. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE TRES EXTRACTOS NATURALES EN LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE DE POLLO

### 3.1. RESUMEN

Los extractos de frutas y especias son conocidas como conservadores naturales debido a su actividad antioxidante (AA) y antimicrobiana (AM). El estudio tuvo como objetivos: 1) Evaluar la AA y AM de los extractos de tomillo (E-TO), cáscara de mango (E-MA) y cáscara de guayaba (E-GU) a diferentes concentraciones para seleccionar la mejor; 2) Analizar el efecto de la mejor concentración de cada extracto en la oxidación de lípidos, recuento microbiológico, pH y color en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C por 15 días; además de incluir un control positivo (BHT) y un control sin ningún aditivo (C). Se cuantificó el contenido de fenoles (FE), flavonoides (FL), AA y AM frente a *Salmonella Typhimurium* (ST), *Escherichia coli* (EC) y *Pseudomonas fluorescens* (PF) de los tres extractos a las concentraciones de 50, 37.5, 25.5 y 12.5 mg mL<sup>-1</sup>. En las muestras de carne adicionadas con la mejor concentración de extractos se midió la oxidación de lípidos por el contenido de TBARS, conteo microbiológico de cuenta total viable (CTV), *Enterobacteriaceae* (EN), *Pseudomonas spp* (PS), pH y color (L\*, a\* y b\*). Se utilizó un modelo mixto con asignación completamente al azar y medidas repetidas en el tiempo. El mejor ( $p < 0.05$ ) efecto AA y AM de los extractos evaluados se observó con la concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup>. Los valores de TBARS en la carne almacenada por 15 días aumentaron ( $p < 0.05$ ) quedando en el siguiente orden C>E-GU>BHT>E-MA>E-TO. Los recuentos bacterianos de CTV, EN y PS en los tratamientos con E-TO y E-MA fueron inferiores ( $p < 0.05$ ) a los observados en el C y BHT. Además, la adición de E-TO y E-MA en la carne de pollo se relacionó con valores de pH más bajos ( $p < 0.05$ ) en comparación con el C y BHT. Las muestras de carne tratadas con E-TO y E-MA mantuvieron valores más altos ( $p < 0.05$ ) de L\*, a\* y b\* durante el almacenamiento. El E-GU a una concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup> tuvo menor ( $p < 0.05$ ) efecto en la conservación de la carne de pollo en comparación con el antioxidante sintético. Los E-TO y E-MA, aplicados a una concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup>, tienen efecto favorable en la conservación de la carne de pollo.

**Palabras clave:** alimentos, calidad, radicales libres, patógenos, microorganismos alterantes.

## CHAPTER III. ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THREE NATURAL EXTRACTS IN THE QUALITY OF CHICKEN MEAT

### 3.2. ABSTRACT

Fruit and spice extracts are known as natural preservatives due to their antioxidant (AA) and antimicrobial (AM) activity. The study had as objectives: 1) To evaluate the AA and AM of the extracts of thyme (E-TO), mango peel (E-MA) and guava peel (E-GU) at different concentrations to select the best; 2) Analyze the effect of the best concentration of each extract on lipid oxidation, microbiological count, pH and color in chicken meat stored at  $4 \pm 1$  °C by 15 days; in addition to including a positive control (BHT) and a control without any additive (C). The content of phenols (FE), flavonoids (FL), AA and AM was quantified against *Salmonella* Typhimurium (ST), *Escherichia coli* (EC) and *Pseudomonas fluorescens* (PF) of the three extracts at concentrations of 50, 37.5, 25.5 and 12.5 mg mL<sup>-1</sup>. In the meat samples added with the best concentration of extracts, the oxidation of lipids was measured by the content of TBARS, microbiological count of total viable count (CTV), *Enterobacteriaceae* (EN), *Pseudomonas* spp (PS), pH and color (L\*, a\* and b\*). A mixed model with completely randomized allocation and repeated measures over time was used. The best ( $p < 0.05$ ) AA and AM effect of the evaluated extracts was observed with the concentration of 50 mg mL<sup>-1</sup>. The TBARS values in meat stored by 15 days increased ( $p < 0.05$ ), remaining in the following order C>E-GU>BHT>E-MA>E-TO. The bacterial counts of CTV, EN and PS in the treatments with E-TO and E-MA were lower ( $p < 0.05$ ) than those observed in C and BHT. Furthermore, the addition of E-TO and E-MA in chicken meat was associated with lower pH values ( $p < 0.05$ ) compared to C and BHT. The meat samples treated with E-TO and E-MA maintained higher values ( $p < 0.05$ ) of L\*, a\* and b\* during storage. E-GU at a concentration of 50 mg mL<sup>-1</sup> had a lower ( $p < 0.05$ ) effect on the conservation of chicken meat compared to the synthetic antioxidant. The E-TO and E-MA, applied at a concentration of 50 mg mL<sup>-1</sup>, have a favorable effect on the conservation of chicken meat.

**Keywords:** food, quality, free radicals, pathogens, alteration microorganisms.

### 3.3. INTRODUCCIÓN

La carne de pollo es de las carnes de mayor consumo, debido a su alto valor nutricional, bajo contenido de grasa y precio (Mexis *et al.*, 2012; Skunca *et al.*, 2018). Sin embargo, su composición favorece la oxidación lipídica y el desarrollo microbiano durante el almacenamiento afectando su calidad (Selani *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2012).

Los lípidos se distribuyen en el espacio intracelular y extracelular de la carne, pero estos son químicamente inestables y fácilmente oxidables, especialmente en el almacenamiento de la carne (Falowo *et al.*, 2014). La oxidación de los lípidos provoca rancidez, formación de olores y sabores indeseables, decoloración, pérdida de valor nutritivo y sensorial (Chaijan, 2008; Amaral *et al.*, 2018), disminución de la vida útil y la acumulación de compuestos tóxicos que perjudican la salud del consumidor (Sampaio *et al.*, 2012). Adicionalmente, las características intrínsecas (nutrientes, disponibilidad de agua y pH) y extrínsecas (sacrificio, procesamiento y almacenamiento) de la carne, la hacen susceptible al desarrollo microorganismos alterantes y patógenos (Alonso *et al.*, 2014). Los microorganismos relacionados con la descomposición de la carne de aves de corral incluyen bacterias como *Pseudomonas* spp, *Enterobacteriaceae* y *Lactobacillus* spp (Ioannis y Stratakos, 2012).

Para retardar los procesos de degradación y prolongar la vida de anaquel, la industria cárnica ha utilizado durante años conservadores sintéticos (Lorenzo *et al.*, 2014) como el Terbutil Hidroquinona (TBHQ), Butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT) (Naveena *et al.*, 2008). Sin embargo, estos compuestos se catalogan por sus efectos negativos a la salud como alergias, intoxicaciones, problemas digestivos, insomnio e incluso cáncer (Maqsood *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017).

En los últimos años, la demanda de productos cárnicos de calidad, saludables y seguros ha aumentado (Vargas-Sánchez *et al.*, 2014). Así, surge la necesidad de desarrollar nuevos métodos de conservación. Los extractos naturales de plantas, verduras, granos, especias y frutas con actividad antioxidante (AA) y antimicrobiana (AM) son la alternativa para usarse como conservadores químicos que permiten

prolongar la vida de anaquel de los alimentos (Govaris *et al.*, 2010; Shahidi y Zhong, 2010).

Los extractos de tomillo, cáscara de mango y cáscara de guayaba poseen alta AA y AM, inhiben bacterias gram positivas y negativas (Vega-Vega *et al.*, 2013; El-Hawary y Rabeh, 2014; Fernandes *et al.*, 2014; Sakkas y Papadopoulou, 2017). Los objetivos de este estudio fueron: 1) Evaluar la AA y AM de los extractos de tomillo, cáscara de mango y cáscara de guayaba a diferentes concentraciones para seleccionar la mejor; 2) Analizar el efecto de la mejor concentración de cada extracto en la oxidación lipídica, recuento microbiológico, pH y color en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días.

### **3.4. MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se desarrolló en dos etapas. La primer etapa consistió en la evaluación de la actividad antioxidante (AA) y antimicrobiana (AM) en los extractos de tomillo (E-TO), cáscara de mango (E-MA) y cáscara de guayaba (E-GU) a concentraciones de 50, 37.5, 25.5 y 12.5 mg mL<sup>-1</sup> para seleccionar la mejor. En la segunda etapa se aplicó la mejor concentración de E-TO, E-GU y E-MA en carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días, incluyendo dos tratamientos control, para evaluar el impacto de los cinco tratamientos sobre la oxidación de lípidos, recuento microbiológico, pH y color.

#### **3.4.1. Ubicación**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal, perteneciente al Posgrado de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

#### **3.4.2. Materiales**

El tomillo (*Thymus vulgaris*), mango (*Mangifera indica* cv. Ataulfo) y guayaba (*Psidium guajava* L.) se adquirieron en un supermercado local de la ciudad de Texcoco, Estado de México. Se seleccionaron de manera visual con color y tamaño homogéneo; y trasladaron al laboratorio bajo condiciones asépticas a una temperatura de  $8 \pm 1$  °C.

Se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. Se liofilizaron a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $0.035\text{ mBar}$  (Labconco, FreeZone, USA) y posteriormente se molieron en un mortero.

Los filetes de pechuga de pollo fueron adquiridos en un expendio local de venta de carne en la ciudad de Texcoco, Estado de México. Se llevaron al laboratorio para su análisis bajo condiciones asépticas a temperatura de  $4 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4.3. Obtención de extractos naturales**

Los tres extractos se obtuvieron por el método de extracción por ultrasonido de acuerdo con lo descrito por Marghitas *et al.* (2007) con modificaciones. Se pesó  $0.5\text{ g}$  de muestra seca y pulverizada en un tubo de plástico de  $50\text{ mL}$  con tapón de rosca y se agregó  $5.0\text{ mL}$  de etanol al  $95\%$ . El tubo se agitó durante  $1\text{ min}$  en vórtex y se sometió a sonicación en un baño de ultrasonido (US) (Autoscience, As 2060B, USA) por  $15\text{ min}$  en baño con hielo. Posteriormente, se centrifugó a  $2,265\text{ g}$  durante  $15\text{ min}$ . El sobrenadante se decantó en un tubo de plástico de  $50\text{ mL}$  y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La fase sólida obtenida en la centrifugación se le adicionó  $5\text{ mL}$  de etanol al  $95\%$  y se repitió el procedimiento en la segunda extracción. Los sobrenadantes de las dos extracciones se colectaron en un tubo de plástico de  $50\text{ mL}$ , posteriormente se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , protegido de la luz. De cada extracto se prepararon cuatro concentraciones ( $50, 37.5, 25.5$  y  $12.5\text{ mg mL}^{-1}$ ) para la medir la AA y AM.

### **3.4.4. Análisis de los extractos naturales**

#### **3.4.4.1. Contenido total fenólico**

El contenido total de fenoles en los extractos se analizó con el reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, México), de acuerdo a lo descrito por Ramful *et al.* (2011), con modificaciones. Se tomó una alícuota de  $250\text{ }\mu\text{L}$  de extracto en un tubo de vidrio de  $10\text{ mL}$  y se añadieron  $3.5\text{ mL}$  de agua destilada, posteriormente se agregaron  $250\text{ }\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, México). La mezcla se agitó en un vórtex durante  $1\text{ min}$  y se dejó reposar durante  $3\text{ min}$  en oscuridad a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente se agregó  $1\text{ mL}$  de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; Merck, México) al  $20\%$ . La mezcla se incubó en baño maría a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $40\text{ min}$  en oscuridad, posteriormente se midió la absorbancia a  $685\text{ nm}$  en un espectrofotómetro (Cary E, Varian, USA). Se utilizó ácido gálico (Merck, México) como estándar para elaborar la

curva de calibración. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico por gramo de muestra en peso seco (mg GAE g<sup>-1</sup> PS).

#### **3.4.4.2. Contenido total de flavonoides**

El contenido total de flavonoides de los extractos evaluados se determinó con el método colorimétrico descrito por Ramful *et al.* (2011), con modificaciones, usando quercetina (Sigma Aldrich, México) como estándar. Se colocaron 2.5 mL de extracto en un tubo de vidrio de 10 mL y se añadieron 150 µL de nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>; J.T. Baker, México) al 5 %. Se mezcló la solución y se dejó reposar en oscuridad a 25 °C por 5 min. Posteriormente se agregaron 150 µL de cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>; Merck, México) al 10 %, después de 1 min se añadió 1 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH; J.T. Baker, México) 1 M. La solución se mezcló y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Cary E, Varian, USA) a 510 nm. Los resultados se reportaron como mg de quercetina por gramo de muestra en peso seco (mg QE g<sup>-1</sup> PS).

#### **3.4.4.3. Actividad antioxidante (AA)**

La AA se determinó por el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) descrito por Zhang *et al.* (2014) con modificaciones. Se mezcló 0.5 mL de extracto con 0.5 mL de metanol (J.T. Baker, México) y se agregaron 3.0 mL de solución de DPPH (Sigma Aldrich, México). La mezcla se agitó en vórtex durante 1 min y se reposó a 25 °C por 30 min en oscuridad, posteriormente se leyó la absorbancia a 517 nm usando un espectrofotómetro (Cary E, Varian, USA). Se utilizó Trolox (Sigma Aldrich, México) como estándar para la curva de calibración. El porcentaje de inhibición de DPPH se calculó de la siguiente manera (Mariem *et al.*, 2014):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \times 100$$

dónde: Abs<sub>control</sub> es la absorbancia del testigo y Abs<sub>muestra</sub> es la absorbancia de la muestra.

#### **3.4.4.4. Actividad antimicrobiana (AM)**

##### **3.4.4.4.1. Cepas microbianas**

Las cepas utilizadas fueron *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028; ST) y *Escherichia coli* (ATCC 2592; EC) adquiridas en el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, así como *Pseudomonas fluorescens* (CDBB-B-1243; PF) adquirida en la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares, ubicados en la Ciudad de México. Los cultivos de EC y PF se transfirieron en frascos de vidrio de 100 mL que contenían 50 mL de medio caldo soya tripticaseina (CST; BD Bioxon, México) y se incubaron durante 24 h a  $37 \pm 1$  °C y  $28 \pm 1$  °C, respectivamente. Para ST se realizó el mismo procedimiento utilizando caldo nutritivo (CN; BD Bioxon, México) e incubando a  $37 \pm 1$  °C por 24 h. La población bacteriana en todos los medios utilizados como inóculo fue mayor a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

#### **3.4.4.4.2. Actividad antimicrobiana por difusión en agar**

La AM de los extractos se midió por el método de difusión en agar para detectar la inhibición del crecimiento de ST, EC y PF de acuerdo con lo descrito por Radha *et al.* (2014), con modificaciones. Se tomó 1 mL de inóculo de cada microorganismo y se adicionó a 10 mL de agar a una temperatura de  $45 \pm 1$  °C, la mezcla se homogeneizó y se vertió en placa dejando solidificar. Los cultivos de EC y PF se inocularon en AST (BD Bioxon, México) y ST en AN (BD Bioxon, México). Posteriormente, en las placas se colocaron tres discos (6 mm de diámetro de papel Whatman® 541) distribuidos de forma homogénea y previamente impregnados con 0.1 mL de cada uno de los extractos evaluados. Las placas se incubaron a  $37 \pm 1$  °C para ST y EC, y a 28 °C para PF, por 24 h. La AM se evaluó midiendo con un vernier (Scala, México) el halo de inhibición, correspondiente al diámetro de la zona que mostró visiblemente la ausencia de crecimiento microbiano (incluye el disco de 6 mm). Se utilizaron discos similares de papel Whatman impregnados con agua destilada estéril como control.

#### **3.4.5. Distribución de tratamientos en las muestras de carne**

Los filetes se cortaron asépticamente y fueron asignados a uno de los cinco tratamientos: C: muestras control; BHT: control positivo con 0.02 % de Butilhidroxitolueno; E-TO: tratamiento con extracto de tomillo; E-MA: tratamiento con extracto de cáscara de mango y E-GU: tratamiento con extracto de cáscara de

guayaba. Los tres extractos naturales se adicionaron a una concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup>, debido a que fue la concentración con mejor AA y AM.

Las muestras se sumergieron durante un minuto en las diferentes soluciones preparadas y se escurrieron por un minuto, después de la inmersión. Se empacaron en charolas de poliestireno (con almohadillas absorbentes) y se cubrieron con película plástica adherible. Finalmente, se almacenaron a 4 ± 1 °C durante 15 días. En el día 0, 3, 6, 9, 12 y 15 del almacenamiento de las muestras se midió la oxidación de lípidos por el contenido sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteo microbiológico de cuenta total viable (CTV), *Enterobacteriaceae* (EN) y *Pseudomonas* spp (PS), pH y color (L\*, a\* y b\*).

### **3.4.6. Análisis de las muestras de carne de pollo**

#### **3.4.6.1. Determinación de la oxidación de lípidos**

La oxidación de lípidos se determinó mediante el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acuerdo con lo descrito por Radha *et al.* (2014) con modificaciones. Se pesó 5 g de muestra de carne y se homogeneizó en 5 mL de agua destilada. Posteriormente, se transfirió 1 mL del homogeneizado de carne a un tubo de vidrio de 5 mL y se agregaron 50 µL de Butil Hidroxitolueno (Merck, México) al 7.2 % y 2 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA)- ácido tricloroacético (TCA) (Merck, México) (15 mM TBA- 15% TCA). La mezcla se agitó en un vórtex por 1 min y se incubó en un baño de agua en ebullición. Se enfrió la muestra a temperatura ambiente por 10 min y se agitó en un vórtex por 1 min; se centrifugó a 2,265 g por 15 min. Finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 531 nm en un espectrofotómetro (STP, México). Se utilizó malondialdehído (MDA) como estándar para la elaboración de la curva de calibración. Los resultados se expresaron en miligramos de malondialdehído por kilogramo de carne de pollo (mg MDA kg<sup>-1</sup>).

#### **3.4.6.2. Recuento microbiológico**

Se realizó el recuento microbiológico de cuenta total viable (CTV), *Pseudomonas* spp (PS) y *Enterobacteriaceae* (EN), de acuerdo con lo descrito por Latou *et al.* (2014) con modificaciones. Se pesó asépticamente 25 g de cada muestra de carne de pollo y se homogeneizó en 225 mL de agua peptonada estéril, posteriormente, se

prepararon diluciones decimales seriadas. Se tomó 0.1 mL de cada dilución y se extendió uniformemente sobre la superficie del agar sólido con una varilla de vidrio previamente esterilizada. En la determinación de CTV, se utilizó agar para métodos estándar (BD Bioxon, México). Las placas se incubaron en forma invertida a  $37 \pm 1$  °C por 48 h. El conteo de PS se realizó en medio Pseudomonas agar base (Pronadisa, México) adicionado con suplemento de ceftridina, fucidina y cefalotina a una concentración de 5, 5 y 25 mg, respectivamente (Pronadisa, México), las placas se incubaron a  $28 \pm 1$  °C por 48 h. Para el caso de EN, la siembra se realizó por vaciado en placa; inoculándose 1 mL de cada dilución en cajas Petri, posteriormente, se adicionó 15 mL de agar bilis y rojo violeta con glucosa (ABRVG; BD Bioxon, México) fundido a  $45 \pm 1$  °C, mezclándose hasta lograr una completa incorporación del inóculo con el medio. Una vez que el medio solidificó, se vertieron 7 mL de ABRVG ( $45 \pm 1$  °C) sobre la superficie del medio inoculado, finalmente, las placas se incubaron a  $37 \pm 1$  °C por 24 h.

Después del periodo de incubación se examinaron visualmente las placas y se contaron las colonias típicas de cada medio de cultivo. El número de colonias se multiplicó por el inverso de la dilución correspondiente y se expresó como log UFC (unidades formadoras de colonias)  $g^{-1}$  de carne.

#### **3.4.6.3. Determinación de pH**

El pH se midió con lo descrito por Ibrahim *et al.* (2011), con modificaciones. Se pesaron 10 g de muestra y se homogeneizaron en 100 mL de agua destilada, posteriormente, la mezcla fue filtrada. El pH del filtrado se midió utilizando un potenciómetro Orion Star A121 (Thermo Scientific, México). El potenciómetro se calibró a temperatura ambiente con buffer 4.0 y 7.0 (Thermo Scientific, México).

#### **3.4.6.4. Determinación de color**

El color de las muestras se evaluó utilizando un colorímetro de sensor óptico Chroma Meter CR-410 (Konica Minolta, México) con un área de medición e iluminación de 11 y 53 mm de diámetro, respectivamente. Los valores se expresaron en parámetros de  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (+ rojo/- verde) y  $b^*$  (+ amarillo/- azul) en el espacio de color (Ahn *et al.*, 2004). Se realizaron tres mediciones en diferentes puntos sobre la superficie en cada muestra de carne.

### **3.4.7. Análisis estadístico**

En la primera etapa se implementó un diseño completamente al azar para cada extracto. Cada diseño unifactorial ensayó cuatro tratamientos correspondientes a las concentraciones de 50, 37.5, 25.5 y 12.5 mg mL<sup>-1</sup> y cuatro repeticiones por tratamiento. Los datos obtenidos del contenido de FE, FL, AA y AM de los tres extractos naturales a diferentes concentraciones, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). Asimismo, se aplicó la prueba de Tukey para comparar las medias de tratamientos utilizando el programa estadístico SAS<sup>®</sup> versión 9.1 (SAS, 2003). Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) usando el software Minitab versión 19, para evaluar conjuntamente todas las variables medidas en cada extracto y determinar la concentración más adecuada para adicionarla a la carne de pollo.

En la segunda etapa de esta investigación se implementó un modelo mixto con asignación completamente al azar y medidas repetidas en el tiempo (Stroup *et al.*, 2018). Se ensayaron cinco tratamientos con tres repeticiones y seis mediciones en el tiempo. Los datos obtenidos de las variables medidas en la carne se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar los efectos de tratamientos y tiempos. Cuando se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) se realizó la prueba de Tukey-Kramer para comparar las medias, utilizando el programa estadístico SAS<sup>®</sup> versión 9.1 (SAS, 2003).

## **3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.5.1. Análisis de los extractos naturales**

#### **3.5.1.1. Contenido total fenólico y flavonoides**

El contenido de fenoles (FE) y flavonoides (FL) cuantificados en los extractos de especias y cáscara de frutos de esta investigación se muestran en el Cuadro 3. Los extractos de tomillo (E-TO), cáscara de mango (E-MA) y cáscara de guayaba (E-GU) evaluados a su concentración más alta tuvieron una variación en su contenido FE de  $73.20 \pm 0.24$  a  $58.12 \pm 0.16$  mg GAE g<sup>-1</sup> PS. En cada extracto se presentó diferencia ( $p < 0.05$ ) en el contenido de FE entre las concentraciones analizadas; la cantidad más alta se relacionó con la mayor concentración del extracto (50 mg mL<sup>-1</sup>). Los FE son

metabolitos secundarios producidos por las plantas, generalmente responsables de la actividad antioxidante (AA) y antimicrobiana (AM) de verduras, frutas y especias (Mahmoudi *et al.*, 2016).

**Cuadro 3.** Contenido de fenoles y flavonoides, y actividad antioxidante de tres extractos naturales obtenidos por ultrasonido y evaluados a cuatro concentraciones (Media  $\pm$  DE).

Extracto	Concentración del extracto, mg mL <sup>-1</sup>	Contenido de fenoles, mg de ácido gálico g <sup>-1</sup> *	Contenido de flavonoides, mg de quercetina g <sup>-1</sup> *	Actividad antioxidante, % de inhibición
Tomillo	50.0	73.20 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	40.83 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	51.65 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
	37.5	69.30 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	36.40 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	48.73 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
	25.5	63.14 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>	29.77 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	43.16 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>
	12.5	54.71 $\pm$ 0.14 <sup>d</sup>	21.65 $\pm$ 0.15 <sup>d</sup>	35.97 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>
Cáscara de mango	50.0	68.70 $\pm$ 0.10 <sup>e</sup>	40.13 $\pm$ 0.13 <sup>e</sup>	48.60 $\pm$ 0.14 <sup>e</sup>
	37.5	64.42 $\pm$ 0.14 <sup>f</sup>	35.99 $\pm$ 0.10 <sup>f</sup>	43.26 $\pm$ 0.14 <sup>f</sup>
	25.5	54.27 $\pm$ 0.21 <sup>g</sup>	26.07 $\pm$ 0.09 <sup>g</sup>	34.07 $\pm$ 0.10 <sup>g</sup>
	12.5	44.86 $\pm$ 0.19 <sup>h</sup>	16.39 $\pm$ 0.15 <sup>h</sup>	26.41 $\pm$ 0.12 <sup>h</sup>
Cáscara de guayaba	50.0	58.12 $\pm$ 0.16 <sup>i</sup>	23.98 $\pm$ 0.13 <sup>i</sup>	72.03 $\pm$ 0.11 <sup>i</sup>
	37.5	53.04 $\pm$ 0.24 <sup>j</sup>	19.75 $\pm$ 0.16 <sup>j</sup>	65.74 $\pm$ 0.17 <sup>j</sup>
	25.5	43.80 $\pm$ 0.21 <sup>k</sup>	10.40 $\pm$ 0.15 <sup>k</sup>	56.41 $\pm$ 0.15 <sup>k</sup>
	12.5	34.47 $\pm$ 0.15 <sup>l</sup>	5.17 $\pm$ 0.10 <sup>l</sup>	45.19 $\pm$ 0.10 <sup>l</sup>

\* en peso seco. Literales a-d en una misma columna son para el extracto de tomillo, e-h para el extracto de cáscara de mango e i-l para el extracto de cáscara de guayaba. Literales distintas para cada extracto en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

El contenido de flavonoides (FL) en los extractos evaluados a cuatro concentraciones observó un comportamiento similar al de FE (Cuadro 3); cuando se evaluó la concentración más alta de los extractos, los valores oscilaron entre 40.83  $\pm$  0.13 a 23.98  $\pm$  0.13 mg QE g<sup>-1</sup> PS. El contenido más alto ( $p < 0.05$ ) de FL en los tres extractos analizados se encontró en la concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup>. Los flavonoides (FL) son de gran importancia entre los compuestos FE (Seleem *et al.*, 2017), exhiben amplia

gama de propiedades como antiinflamatorias, antimutagénicas, antivirales, antitrombóticas, antioxidantes y antimicrobianas (Li *et al.*, 2015).

Köksal *et al.* (2017) reportan en E-TO valores de 158 mg GAE g<sup>-1</sup> PS y 36.6 mg QE g<sup>-1</sup> PS de FE y FL, respectivamente. En un estudio realizado por Umamaheshen *et al.* (2016) en E-MA de cinco variedades, los valores de FE y FL variaron de 48.9 ± 0.35 a 87.38 ± 0.43 mg GAE g<sup>-1</sup> PS y de 8.7 ± 0.32 a 15.6 ± 0.23 mg QE g<sup>-1</sup> PS, respectivamente. Para el E-GU en la literatura se informan cantidades de FE de 381.32 ± 10.61 mg GAE g<sup>-1</sup> PS y cantidades de FL de 39.36 ± 3.56 mg QE g<sup>-1</sup> PS (Zulkifli *et al.*, 2012). Las diferencias en el perfil de FE y FL de los extractos evaluados en este estudio con los descritos en la literatura pueden estar influenciada por diferencias en la variedad, madurez, tipo de suelo, clima, factores genéticos, métodos de procesamiento y extracción (Rahimmalek *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2012). No obstante, lo importante es lograr obtener extractos con una concentración de FE y FL capaz de reducir la actividad antioxidante (AA) y antimicrobiana en productos cárnicos.

#### **3.5.1.2. Actividad antioxidante (AA)**

La AA de los extractos naturales se evaluó por el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). El método se basa en utilizar el radical libre DPPH, el cual interactúa con compuestos antioxidantes, aceptando un átomo de hidrógeno para pasar a su forma reducida (Fitriana *et al.*, 2016). El Cuadro 3 muestra los resultados de la AA del E-TO, E-MA y E-GU obtenidos por extracción asistida por ultrasonido. Las cuatro concentraciones analizadas en cada uno de los extractos presentaron diferencia ( $p < 0.05$ ) entre éstas, la mayor AA se obtuvo con la concentración más alta (50 mg mL<sup>-1</sup>). La AA de la guayaba, tomillo y mango se ha documentado, incluso con niveles de actividad más altos que los antioxidantes sintéticos como el Butilhidroxianisol (BHA) y el Butilhidroxitolueno (BHT) (Roby *et al.*, 2013; Marina y Noriham, 2014). La capacidad antioxidante de los extractos naturales se relaciona con la presencia de metabolitos secundarios que incluyen fenoles, taninos, cumarinas, lignanos, quinonas, flavonoides, carotenoides y terpenos (Jeong, *et al.*, 2004; Yashin *et al.*, 2017).

La AA de la cáscara de guayaba se atribuye a la presencia de compuestos como catequina, galangina, ácido gálico, kaempferol y cyanidin 3-glucoside (Chen *et al.*, 2015); en tomillo al contenido de ácidos fenólicos (ácido gálico, cafeico, y rosmarínico), timol, carvacrol, diterpenos fenólicos y flavonoides (luteolina y apigenina) (Pavelková *et al.*, 2014; Leal *et al.*, 2017; Yashin *et al.*, 2017); y en cáscara de mango a los polifenoles, carotenoides, vitamina E y vitamina C (Ajila *et al.*, 2007). Los niveles de estos compuestos y su interacción en los extractos evaluados pueden relacionarse con una AA más elevada a la observada en compuestos sintéticos.

### 3.5.1.3. Actividad antimicrobiana (AM)

Los extractos de E-TO, E-GU y E-MA evaluados a diferentes concentraciones presentaron diversos grados de inhibición ( $p < 0.05$ ) contra *Salmonella* Typhimurium (ST), *Escherichia coli* (EC) y *Pseudomonas fluorescens* (PF) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Inhibición bacteriana de tres extractos naturales obtenidos por ultrasonido, evaluados a cuatro concentraciones (Media  $\pm$  DE)

Extracto	Concentración del extracto, mg mL <sup>-1</sup>	Diámetro de inhibición, mm		
		<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Tomillo	50.0	24.30 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	26.83 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	18.81 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>
	37.5	22.20 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	21.18 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	17.16 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>
	25.5	17.77 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>	18.25 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	13.41 $\pm$ 0.49 <sup>c</sup>
	12.5	13.53 $\pm$ 0.25 <sup>d</sup>	14.20 $\pm$ 0.41 <sup>d</sup>	10.90 $\pm$ 0.39 <sup>d</sup>
Cáscara de mango	50.0	22.36 $\pm$ 0.33 <sup>e</sup>	22.15 $\pm$ 0.33 <sup>e</sup>	17.01 $\pm$ 0.30 <sup>e</sup>
	37.5	19.92 $\pm$ 0.19 <sup>f</sup>	20.42 $\pm$ 0.22 <sup>f</sup>	13.57 $\pm$ 0.27 <sup>f</sup>
	25.5	17.27 $\pm$ 0.54 <sup>g</sup>	17.22 $\pm$ 0.36 <sup>g</sup>	11.59 $\pm$ 0.32 <sup>g</sup>
	12.5	13.54 $\pm$ 0.15 <sup>h</sup>	13.48 $\pm$ 0.15 <sup>h</sup>	9.45 $\pm$ 0.34 <sup>h</sup>
Cáscara de guayaba	50.0	16.10 $\pm$ 0.26 <sup>i</sup>	17.82 $\pm$ 0.56 <sup>i</sup>	13.04 $\pm$ 0.42 <sup>i</sup>
	37.5	13.13 $\pm$ 0.33 <sup>j</sup>	15.43 $\pm$ 0.30 <sup>j</sup>	11.33 $\pm$ 0.25 <sup>j</sup>
	25.5	10.60 $\pm$ 0.40 <sup>k</sup>	11.12 $\pm$ 0.37 <sup>k</sup>	8.55 $\pm$ 0.17 <sup>k</sup>
	12.5	9.79 $\pm$ 0.33 <sup>l</sup>	11.10 $\pm$ 0.44 <sup>k</sup>	6.97 $\pm$ 0.35 <sup>l</sup>

Literales a-d en una misma columna son para el extracto de tomillo, e-h para el extracto de cáscara de mango e i-l para el extracto de cáscara de guayaba. Literales distintas para cada extracto en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Al aumentar la concentración del extracto, el halo de inhibición de ST, EC y PF fue mayor, este comportamiento se observó en los tres extractos analizados. La mayor sensibilidad a los extractos experimentales de las bacterias evaluadas se logró en la concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup>. Entre más grande es el diámetro del halo formado alrededor del sensidisco, el grado de inhibición en el crecimiento bacteriano es mayor. El tamaño del halo de inhibición esta influenciado por varios factores como el medio de cultivo utilizado, el periodo de incubación y la cantidad de inóculo utilizado (Balouiri *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos son similares a los informados en otros estudios donde compuestos naturales de especias y cáscara de frutos inhibieron el crecimiento de microorganismos patógenos y de aquellos que alteran los alimentos (Akthar *et al.*, 2014; Rosas-Burgos *et al.*, 2016; Ali *et al.*, 2017).

*Salmonella* y *E. coli* son los principales agentes bacterianos de las enfermedades transmitidas por carne y productos cárnicos (Niyonzima *et al.*, 2015). Estas bacterias pertenecen a la familia de las *Enterobacteriaceae* y son de importancia sanitaria en los alimentos a nivel mundial (Gut *et al.*, 2018; Heredia y Garcia, 2018). Además, el género *Pseudomonas* es de interés por los cambios indeseables que provoca en la calidad de diferentes alimentos, generando pérdidas económicas importantes (Sterniša *et al.*, 2019).

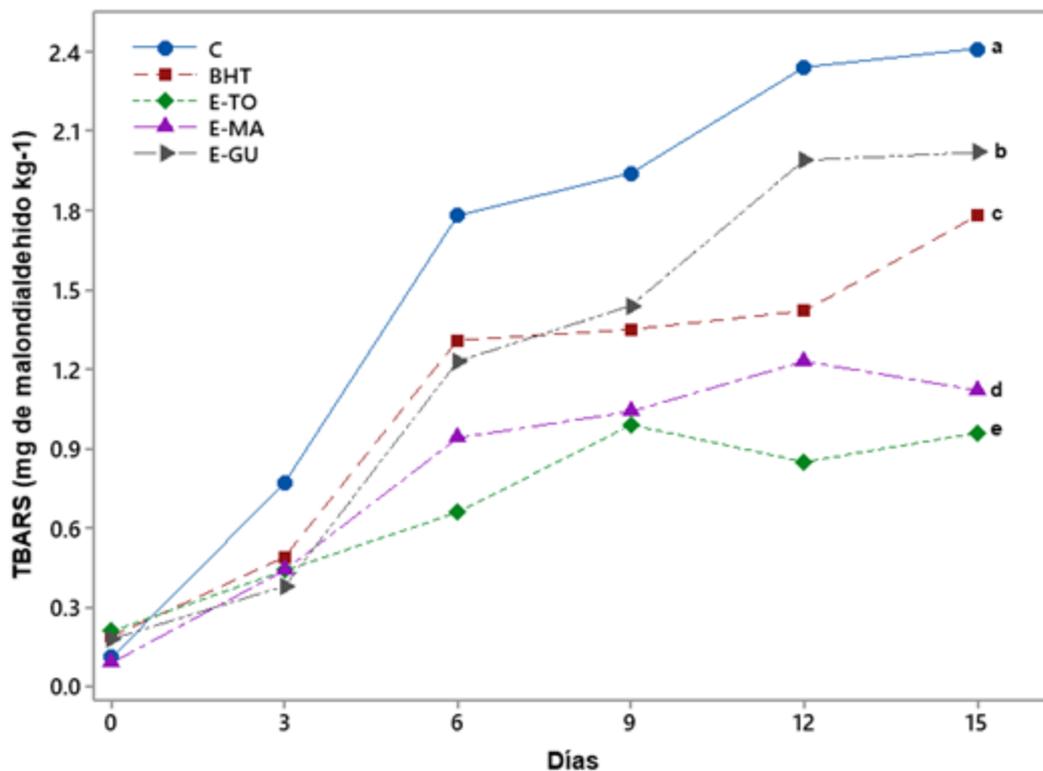
Los extractos evaluados en este estudio, mostraron buena capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano y es debido a la presencia y el nivel de concentración de diferentes compuestos fitoquímicos como FE, FL, alcaloides, saponinas, taninos, terpenos, carvacrol y timol, entre otros, reconocidos por su actividad antimicrobiana (Sharma *et al.*, 2012).

### **3.5.2. Análisis de las muestras de carne de pollo**

Los tres extractos naturales se aplicaron de manera independiente en la carne de pollo a una concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup>, debido a que fue la que presentó la mejor ( $p < 0.05$ ; Cuadro 3 y 4) AA y AM de las cuatro concentraciones evaluadas.

### 3.5.2.1. Oxidación de lípidos

La oxidación de lípidos en la carne de pollo sometida a almacenamiento en refrigeración se analizó midiendo el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS; Figura 1). Los resultados indican que el E-TO y E-MA son más ( $p < 0.05$ ) efectivos contra la formación de TBARS, incluso mejor ( $p < 0.05$ ) que el antioxidante comercial al finalizar el periodo de almacenamiento. Los resultados concuerdan con lo expuesto por otros autores, en donde extractos de tomillo y mango lograron retardar la oxidación de lípidos durante el almacenamiento de productos cárnicos (Fратиanni *et al.*, 2010; Kannat y Chawla, 2017). Por el contrario, el E-GU tuvo valores más altos ( $p < 0.05$ ) de TBARS en relación al BHT en el día 15 de almacenamiento.



**Figura 1.** Efecto de tres extractos naturales sobre los valores TBARS en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días. Tratamientos: C: control, BHT: control positivo, E-TO: extracto de tomillo, E-MA: extracto de cáscara de mango, E-GU: extracto de cáscara de guayaba. Literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el día 15 de almacenamiento.

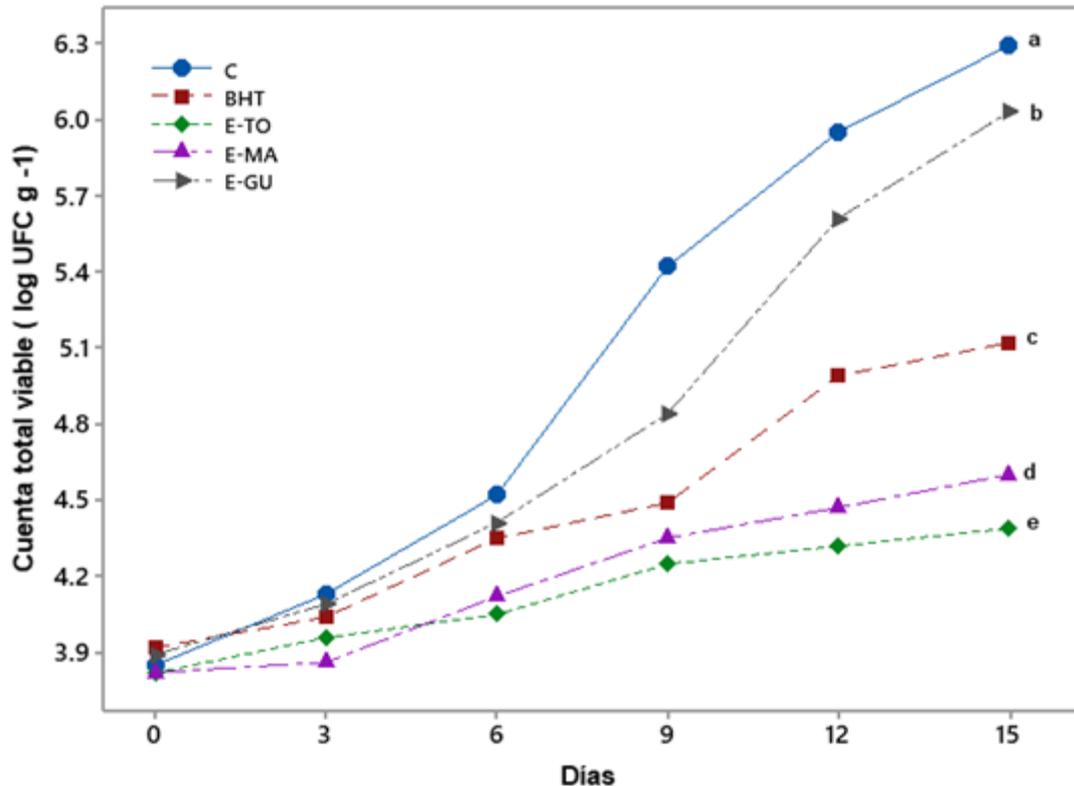
La AA de algunos extractos naturales se relaciona con la presencia y concentración de diferentes metabolitos, entre los que se encuentran los fenoles y flavonoides. Su acción se debe a su sistema donante de hidrógeno, que interfiere con el proceso de propagación de radicales libres (Maheswarappa *et al.*, 2013). Los números y las posiciones del grupo hidroxilo (-OH) vinculados al anillo aromático, en relación con el grupo funcional carboxilo, determinan su capacidad antioxidante (Di Bernardini *et al.*, 2011).

Por lo tanto, la calidad de la carne de pollo podría mejorarse mediante la adición de los extractos de tomillo y cáscara de mango evaluados en este estudio, dado que la oxidación de lípidos conduce a una pérdida de propiedades sensoriales y nutricionales. La menor AA del E-GU en la carne de pollo puede deberse a que algunos metabolitos involucrados en esta actividad se degradan fácilmente bajo diferentes condiciones de luz y temperatura, lo cual afecta sus propiedades, incluyendo la antioxidante y antimicrobiana (M'hiri *et al.*, 2015).

### **3.5.2.2. Recuento microbiológico**

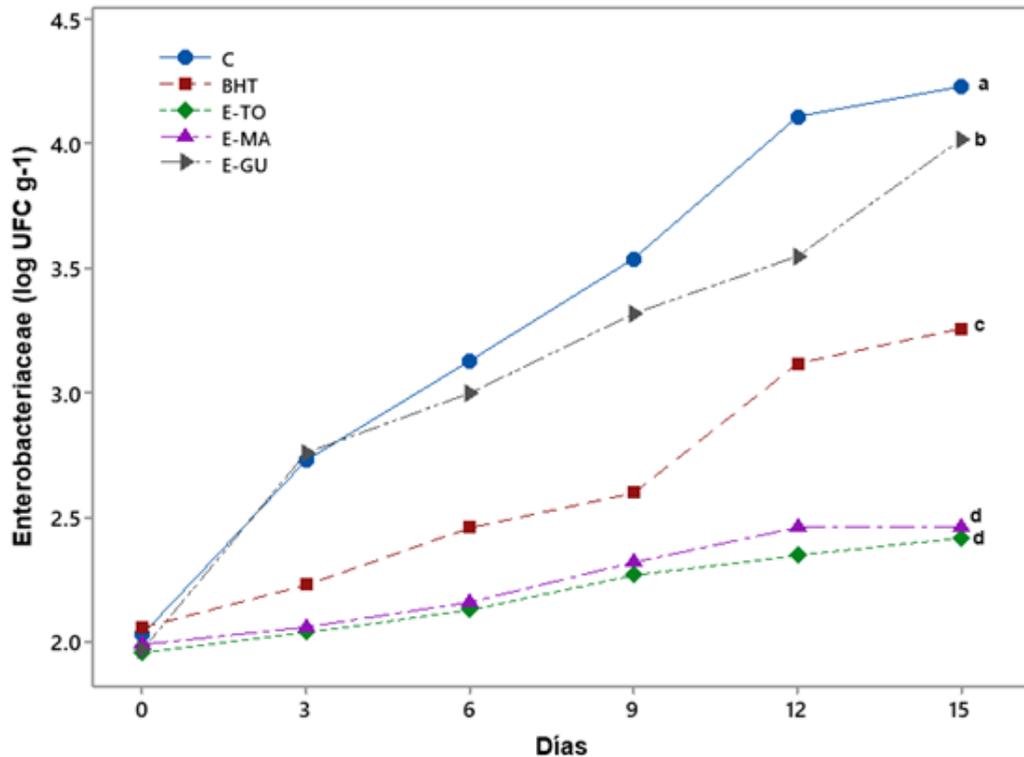
El recuento microbiológico de cuenta total viable (CTV), *Enterobacteriaceae* (EN) y *Pseudomonas* spp (PS) de las muestras de pollo en los tratamientos evaluados se muestran en las Figuras 2, 3 y 4, respectivamente.

La cuenta total viable (CTV) aumentó ( $p < 0.05$ ) en todos los tratamientos a medida que avanzó el tiempo de almacenamiento (Figura 2). En el día 15 las muestras C y E-GU excedieron el límite máximo permisible (LMP) de CTV propuesto para la carne fresca ( $6.0 \log \text{UFC g}^{-1}$ ; Jeon *et al.*, 2004). Al finalizar el almacenamiento, los valores de CTV para los tratamientos con extractos fueron de 4.39, 4.60 y  $6.03 \log \text{UFC g}^{-1}$  para el E-TO, E-MA y E-GU, respectivamente. Los E-TO y E-MA no rebasaron el LMP de CTV al término de los 15 días. Estos resultados muestran el potencial del E-TO y E-MA evaluados en este estudio al inhibir ( $p < 0.05$ ) la CTV, incluso mejor que el BHT, al finalizar el almacenamiento. La CTV de bacterias es un indicador microbiológico importante para evaluar la calidad y seguridad sanitaria de la carne (Huang *et al.*, 2013). Adicionalmente, es utilizado para predecir la vida útil de la carne cruda y su deterioro durante el almacenamiento (Tao y Peng, 2015).



**Figura 2.** Efecto de tres extractos naturales sobre la cuenta total viable en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días. Tratamientos: C: control, BHT: control positivo, E-TO: extracto de tomillo, E-MA: extracto de cáscara de mango, E-GU: extracto de cáscara de guayaba. Literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el día 15 de almacenamiento.

El recuento de EN, durante el almacenamiento de la carne de pollo se ilustra en la Figura 3. La población inicial de EN fue de 1.96 a 2.06 log UFC g<sup>-1</sup>. Los E-TO y E-MA fueron más efectivos ( $p > 0.05$ ) en la inhibición de estos microorganismos, con 2.42 y 2.46 log UFC g<sup>-1</sup>, respectivamente, al concluir el periodo del almacenamiento. El E-GU mostró valores de crecimiento más altos ( $p < 0.05$ ) que el antioxidante sintético en el día 15 de almacenamiento. La presencia de EN en los alimentos se relaciona con malas prácticas de manipulación y procesamiento de la carne de pollo (Whyte *et al.*, 2003).

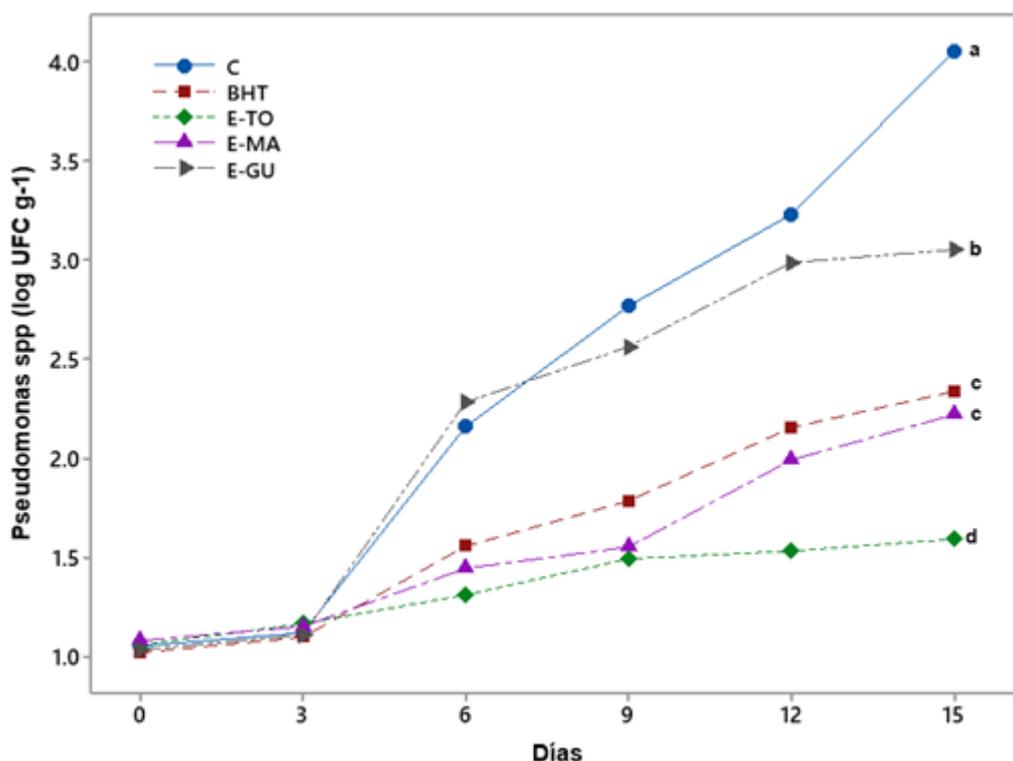


**Figura 3.** Efecto de tres extractos naturales sobre el conteo de *Enterobacteriaceae* en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días. Tratamientos: C: control, BHT: control positivo, E-TO: extracto de tomillo, E-MA: extracto de cáscara de mango, E-GU: extracto de cáscara de guayaba. Literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el día 15 de almacenamiento.

El conteo de PS se muestra en la Figura 4. Los valores iniciales se encontraron entre 1.02 y 1.08 log UFC g<sup>-1</sup>. Las muestras del C y E-GU mostraron valores más altos ( $p < 0.05$ ) que los tratamientos de BHT, E-MA y E-TO al término del almacenamiento. El comportamiento de inhibición fue similar al observado en CTV y EN. De los tres extractos analizados el E-TO fue el tratamiento más efectivo ( $p < 0.05$ ) en la inhibición de este género de bacterias gram negativas, con un conteo final de 1.59 log UFC g<sup>-1</sup>, en comparación con el E-MA y E-GU (2.22 y 3.05 log UFC g<sup>-1</sup>, respectivamente).

El E-TO evaluado en este estudio tuvo mejor efecto ( $p < 0.05$ ) en la disminución del crecimiento de PS que el conservador sintético al finalizar el almacenamiento, con una reducción del 66 %. Extractos naturales como el aceite de eucalipto, orégano, tomillo y romero reducen los recuentos microbianos de PS en alimentos en

comparación con el control (Soulto *et al.*, 2009; Ntzimani *et al.* 2010; Karabagias *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2016).



**Figura 4.** Efecto de tres extractos naturales sobre el conteo de *Pseudomonas* spp en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días. Tratamientos: C: control, BHT: control positivo, E-TO: extracto de tomillo, E-MA: extracto de cáscara de mango, E-GU: extracto de cáscara de guayaba. Literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el día 15 de almacenamiento.

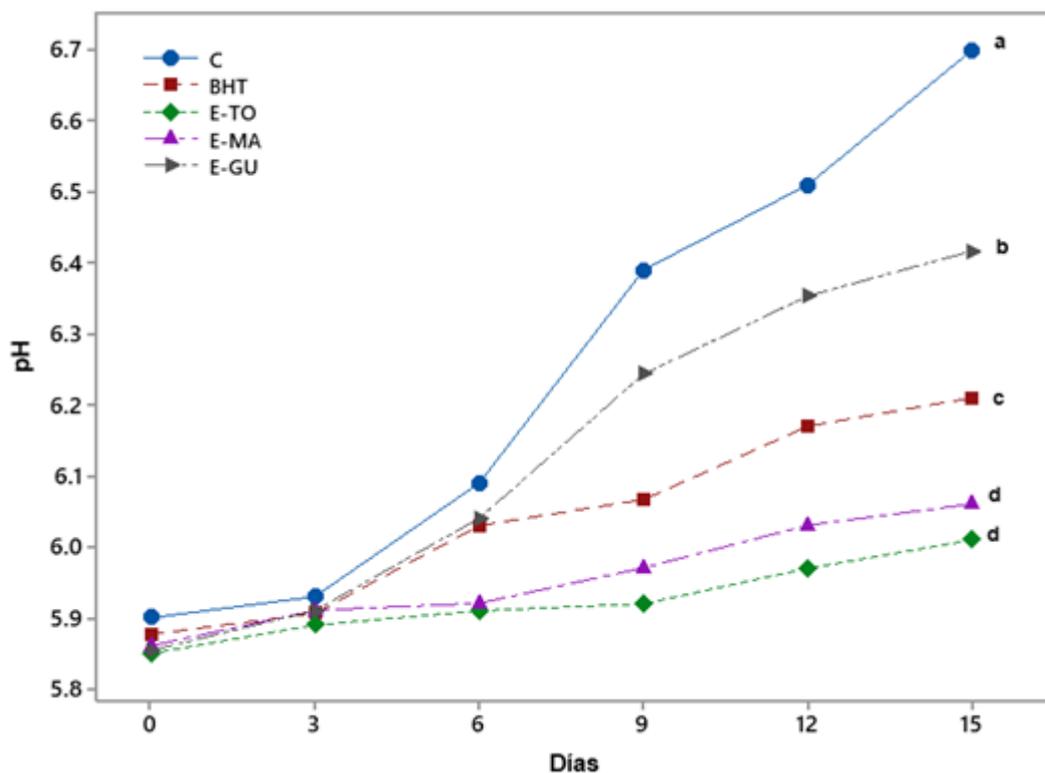
El género PS son microorganismos psicrotróficos de importancia por ser indicadores del deterioro de alimentos almacenados a bajas temperaturas en las cuales causa alteraciones superficiales (Gonzales-Miret *et al.*, 2006), comprometiendo la calidad de los alimentos y la aceptación del producto por el consumidor (Stellato *et al.*, 2017). De ahí la necesidad de buscar alternativas para mitigar el efecto de estas bacterias.

E-TO propició la mayor ( $p < 0.05$ ) inhibición de CTV, EN y PS, y se relacionó con la mayor cantidad de FE y FL en el extracto (Cuadro 3). La presencia y concentración de compuestos fitoquímicos como FE, FL, alcaloides, saponinas, taninos, terpenos, carvacrol y timol, es reconocida como la fuente potencial de actividad antimicrobiana

en materiales vegetales (Sharma *et al.*, 2017). El mecanismo de acción para la AM de los metabolitos presentes en los extractos naturales se puede explicar por el daño a la membrana citoplasmática, alterar la permeabilidad de las células e interferir en el sistema de generación de energía (ATP) (Calo *et al.*, 2015). Contribuyendo de esta manera a una reducción en las poblaciones microbianas, como se observó en este estudio en el E-TO y E-MA. La menor ( $p < 0.05$ ) AM del E-GU en la carne de pollo en comparación con el E-TO y E-MA puede deberse a una menor cantidad de FE y FL (Cuadro 3), adicionalmente, algunos metabolitos son más susceptibles a degradarse bajo diferentes condiciones ambientales, disminuyendo su AM (M'hiri *et al.*, 2015).

### 3.5.2.3. pH

La Figura 5 muestra el efecto de los tres extractos naturales sobre el pH de la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días.



**Figura 5.** Efecto de tres extractos naturales sobre el pH en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días. Tratamientos: C: control, BHT: control positivo, E-TO: extracto de tomillo, E-MA: extracto de cáscara de mango, E-GU: extracto de cáscara de guayaba. Literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el día 15 de almacenamiento.

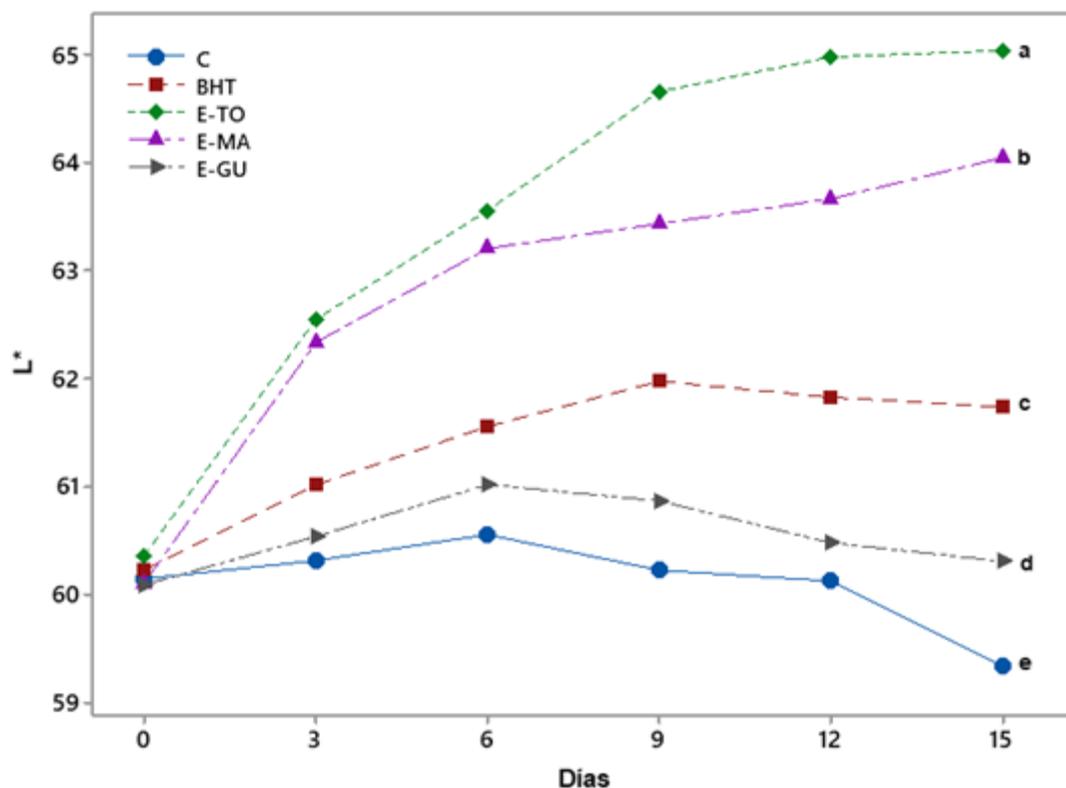
Los valores iniciales de pH en la carne incrementaron en todos los tratamientos a medida que avanzó el tiempo de almacenamiento. En los tratamientos adicionados con E-TO y E-MA el pH fue menor ( $p < 0.05$ ) en comparación con el C y BHT al finalizar el periodo de almacenamiento. El E-GU presentó valores más altos ( $p < 0.05$ ) de pH en relación al E-TO y E-MA, lo cual puede deberse a su menor actividad antimicrobiana (Cuadro 4). Sivarajan *et al.*, (2017) reportan un comportamiento similar de los valores de pH en carne de pollo adicionada con extractos de clavo y canela aplicados individualmente y en combinación con atmósfera modificada.

Durante el almacenamiento de la carne, el pH tiende a aumentar debido a la presencia de bacterias degradadoras de proteínas y aminoácidos, lo que resulta en la formación de amoníaco (Georgantelis *et al.*, 2007). El menor incremento del pH en la carne con E-TO y E-MA se debe a la presencia y cantidad de sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento y reproducción de bacterias que metabolizan compuestos nitrogenados (Cao *et al.*, 2013), de esta manera la carne se puede preservar por mayor tiempo.

#### **3.5.2.4. Color**

El color de la carne tiene un papel importante tanto en la calidad, como en la aceptación del producto por parte del consumidor. Esta variable se expresó en parámetros de  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (+ rojo/- verde) y  $b^*$  (+ amarillo/- azul), los cuales se indican en las Figuras 6, 7 y 8, respectivamente.

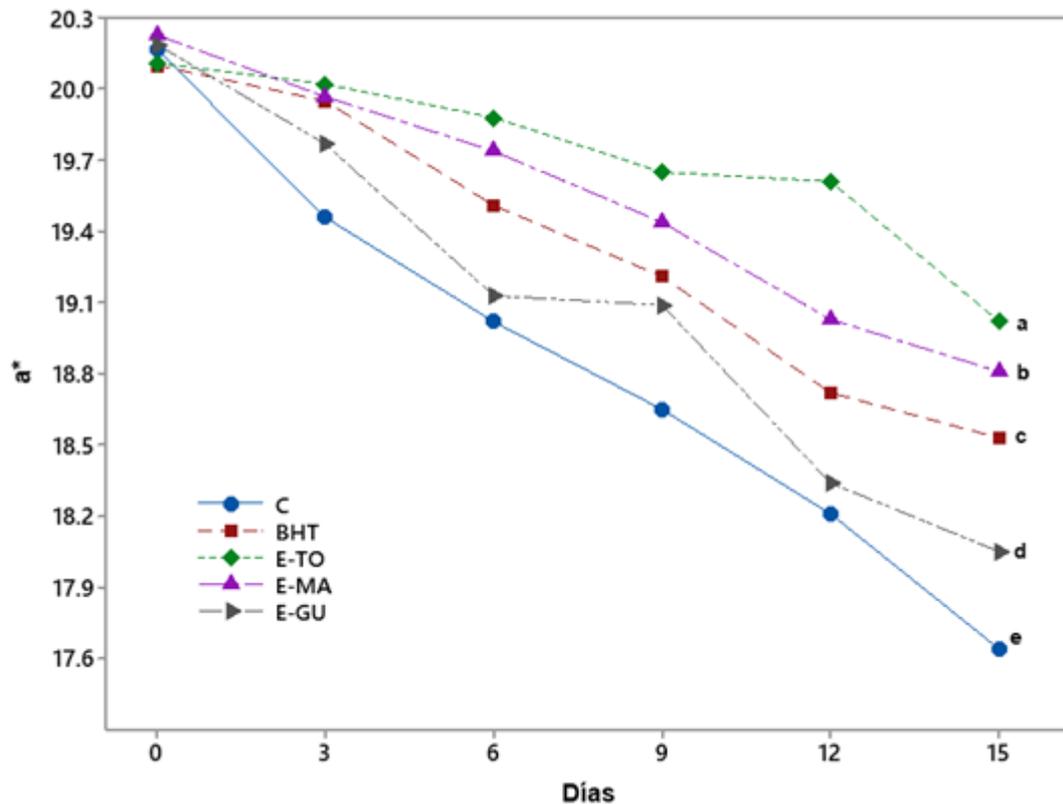
Los valores de  $L^*$  incrementaron durante el almacenamiento en los tratamientos evaluados (Figura 6). En la carne de pollo con E-TO y E-MA los valores fueron más altos ( $p < 0.05$ ) en comparación con las muestras C y BHT al concluir el tiempo de almacenamiento. El E-GU tuvo valores más bajos ( $p < 0.05$ ) de  $L^*$  que el tratamiento adicionado con el antioxidante sintético en el día 15 de almacenamiento. Petrou *et al.* (2012) informan datos semejantes en pechuga de pollo adicionada con quitosano y aceite de oregano durante los 21 días de almacenamiento de la carne. La luminosidad en el espacio de color  $L^*a^*b^*$  toma valores de 0 (oscuro) a 100 (claro), por lo tanto valores más bajos de  $L^*$  implican la presencia de tonalidades oscuras (Khan *et al.*, 2009).



**Figura 6.** Efecto de tres extractos naturales sobre el parámetro de color  $L^*$  en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días. Tratamientos: C: control; BHT: control positivo, E-TO: extracto de tomillo, E-MA: extracto de cáscara de mango, E-GU: extracto de cáscara de guayaba. Literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el día 15 de almacenamiento.

Todos los tratamientos presentaron disminución en los valores de  $a^*$  ( $p < 0.05$ ) en la carne de pollo durante su almacenamiento a  $4 \pm 1$  °C (Figura 7). Las muestras con E-TO y E-MA lograron mantener ( $p < 0.05$ ) las tonalidades rojas ( $a^*$ ) de la carne por más días durante el periodo de almacenamiento. Sin embargo, las muestras con E-GU presentaron valores de  $a^*$  más bajos ( $p < 0.05$ ), inclusive menores que el BHT. En algunos estudios en donde se evaluaron diferentes antioxidantes naturales se observó un comportamiento similar a lo reportado en este estudio para los valores de  $a^*$  en la carne adicionada con E-TO y E-MA (Mitsumoto *et al.*, 2005; Banerjee *et al.*, 2012). La tonalidad roja de la carne fresca es causada por la presencia y contenido de oximioglobina, una mioglobina oxigenada (Neethling *et al.*, 2017). Durante el almacenamiento la oximioglobina de la carne se transforma a metamioglobina generando un color marrón-oscuro, indeseable para el consumidor (Kim *et al.*, 2013). Se ha demostrado que algunos metabolitos secundarios como los fenoles tienen la

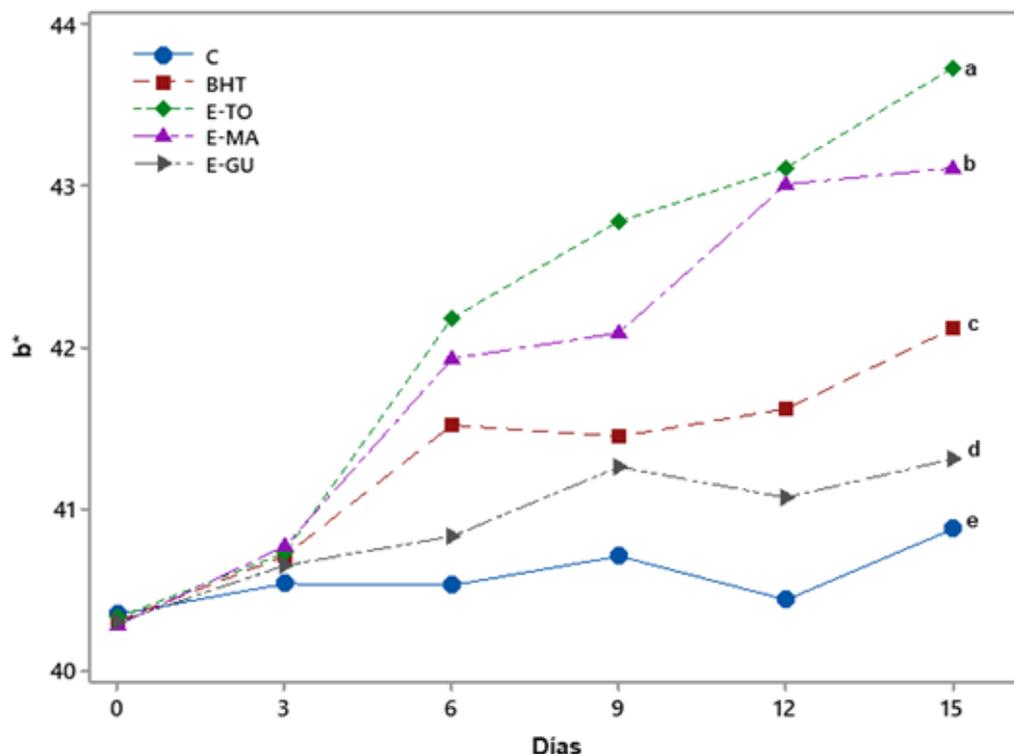
capacidad de interactuar con la mioglobina, retardando su proceso de oxidación, lo que disminuye la decoloración de la carne (Kroll y Rawel, 2001).



**Figura 7.** Efecto de tres extractos naturales sobre el parámetro de color  $a^*$  en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días. Tratamientos: C: control, BHT: control positivo, E-TO: extracto de tomillo, E-MA: extracto de cáscara de mango, E-GU: extracto de cáscara de guayaba. Literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el día 15 de almacenamiento.

Los tratamientos presentaron aumento en los valores de  $b^*$  ( $p < 0.05$ ) en la carne de pollo durante el almacenamiento (Figura 8). Las muestras con E-TO y E-MA tuvieron valores de  $b^*$  más altos ( $p < 0.05$ ) en comparación con las muestras control en el día 15 de almacenamiento. En contraste, el E-GU tuvo valores más bajos ( $p < 0.05$ ) de  $b^*$  que el tratamiento adicionado con el antioxidante sintético al finalizar el almacenamiento. Ruiz-Cruz *et al.* (2019) reportan un aumento de los valores de  $b^*$  en filetes de pollo con recubrimientos comestibles de extracto de tomate y quitosano. Los E-TO y E-MA adicionados en la carne de pollo en este estudio, lograron mejorar ( $p < 0.05$ ) la estabilidad del color durante el periodo de almacenamiento, en comparación con el antioxidante sintético (BHT), lo cual puede relacionarse con el

color que aportaron los extractos. El E-TO presentó una tonalidad verde-oscuro y el E-MA un color amarillo intenso; por el contrario el E-GU tuvo una coloración amarilla clara.



**Figura 8.** Efecto de tres extractos naturales sobre el parámetro de color  $b^*$  en la carne de pollo almacenada a  $4 \pm 1$  °C durante 15 días. Tratamientos: C: control, BHT: control positivo, E-TO: extracto de tomillo, E-MA: extracto de cáscara de mango, E-GU: extracto de cáscara de guayaba. Literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el día 15 de almacenamiento.

Algunos autores sugieren que el deterioro del color durante el almacenamiento podría explicarse por la degradación oxidativa de ciertos nitrosopigmentos de carnes crudas (Bekhit *et al.*, 2003; Haak *et al.*, 2009).

### 3.6. CONCLUSIONES

Los extractos de tomillo y cáscara de mango a una concentración de  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ , retrasaron la oxidación de lípidos y el crecimiento bacteriano de cuenta total viable, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* spp; además contribuyen a preservar características fisicoquímicas de la carne como el pH y el color, y permiten extender la vida útil de la carne cruda de pollo durante su almacenamiento. Estos dos extractos

naturales adicionados a la carne fresca de pollo muestran potencial para reemplazar al antioxidante sintético (BHT). El extracto de tomillo fue el más eficaz para preservar la carne de pollo y su resultado se atribuye a su cantidad de fenoles y flavonoides. El extracto de cáscara de guayaba a una concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup> no tuvo un efecto favorable en la conservación de la carne de pollo al compararse con el antioxidante sintético.

### 3.7. LITERATURA CITADA

- Ahn, J., Grün, I.U., Mustapha, A. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts *in vitro* and in ground beef. *Journal of Food Protection*, 67(1): 148-155.
- Ajila, C.M., Bhat, S.G., Prasada Rao, U.J.S. (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102(4): 1006-1011.
- Akthar, M.S., Degaga, B., Azam, T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(1): 1-7.
- Ali, J., Das, B., Saikia, T. (2017). Antimicrobial activity of lemon peel (*Citrus limon*) extract. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 9(4): 79-82.
- Alonso, M.Z., Sanz, M.E., Padola, N.L., Lucchesi, P.M.A. (2014). Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) aisladas durante el proceso de faena de pollos. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2): 122-125.
- Amaral, A.B., Silva, M.V., Lannes, S.C. (2018). Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors a review. *Food Science and Technology*, 3(1): 1-15.
- 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.
- Banerjee, R., Verma, A.K., Das, A.K., Rajkumar, V., Shewalkar, A.A., Narkhede, H.P. (2012). Antioxidant effects of broccoli powder extract in goat meat nuggets. *Meat Science*, 91(2): 179-184.
- Bekhit, A.E.D, Geesink, G.H., Ilian, M.A., Morton, J.D., Bickerstaffe, R. (2003). The effects of natural antioxidants on oxidative processes and metmyoglobin reducing activity in beef patties. *Food Chemistry*, 81(2): 175-187.
- Bou, R., Guardiola, F., Tres, A., Barroeta, A.C., Codony, R. (2004). Effect of dietary fish oil,  $\alpha$ -tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poultry Science*, 83(2): 282-292.
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems- A review. *Food Control*, 54: 111-119.
- Cao, Y., Gu, W., Zhang, J., Chu, Y., Ye, X., Hu, Y., Chen, J. (2013). Effects of chitosan, aqueous extract of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 141(3): 1655-1660.

- Chaijan, M. (2008). Review: Lipid and myoglobin oxidations in muscle foods. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(1): 47-53.
- Chen, Y.H., Zhou, T., Zhang, Y.J., Zou, Z.F., Wnag, F., Xu, D.P. (2015). Evaluation of antioxidant and anticancer activities of guava. *International Journal of Food Nutrition and Safety*, 6(1): 1-9.
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A.M., Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4): 1296-1307.
- El-Hawary, S.S., Rabeh M.A. (2014). *Mangifera indica* peels a common waste product with impressive immunostimulant, anticancer and antimicrobial potency. *Journal of Natural Sciences Research*, 4(3): 102-115.
- Falowo, A.B., Fayemi, P.O., Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: a review. *Food Research International*, 64: 171-181.
- Fernandes, M.R.V., Dias, A.L.T., Carvalho, R.R., Souza, C.R.F., Oliveira, W.P. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. *Industrial Crops and Products*, 60: 39-44.
- Fitriana, D.W., Ersam, T., Shimizy, K., Fatmawati, S. (2016). *Indonesian Journal of Chemistry*, 16(3): 297-301.
- Fратиanni, F., De Martino, L., Melone, A., De Feo, V., Coppola, R., Nazzaro, F. (2010). Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of Food Science*, 75(8), M528–M535. doi:10.1111/j.1750
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S.A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, 76(1): 172-181.
- Ghani, M.A., Barril, C., Bedgood, D.R., Prenzler, P. D. (2017). Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry*, 230: 195-207.
- González-Miret, M.L., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J. (2006). The establishment of critical control points at the washing and air chilling stages in poultry meat production using multivariate statistics. *Food Control*, 17(12): 935-941.
- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P.S. (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 137: 175-180.
- Gut, M.A., Vasiljevic, T., Yeager, T., Donkor O.N. (2018). Salmonella infection-prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. *Microbiology*, 164: 1327-1344.
- Haak, L., Raes, K., De Smet, S. (2009). Effect of plant phenolics, tocopherol and ascorbic acid on oxidative stability of pork patties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(8): 1360-1365.

- Heredia, N., García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition*, 4(3): 250-255.
- Huang, L., Zhao, J., Chen, Q., Zhang, Y. (2013). Rapid detection of total viable count (TVC) in pork meat by hyperspectral imaging. *Food Research International*, 54(1): 821-828.
- Ibrahim, H.M., Abou-Arab, A.A., Abu Salem, F.M. (2011). Antioxidant and antimicrobial effect of some natural plant extracts added to lamb patties during storage. *Grasas y Aceites*, 62(2): 139-148.
- Ioannis, S.A., and Stratakos, A.C. (2012). Application of modified atmosphere packaging and active/smart technologies to red meat and poultry: a review. *Food Bioprocess Technology*, 5: 1423-1446.
- Jeon, Y.-J., Kamil, J.Y.V.A., Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18): 5167-5178.
- Jeong, S.Y., Kim, D.R., Kim, K.C., Nam, D.U., Ahn Lee, S.C. (2004). Effect of seed roasting conditions on the antioxidant activity of defatted sesame meal extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 69(5): 377-381.
- Kanatt, S.R., Chawla, S.P. (2017). Shelf life extension of chicken packed in active film developed with mango peel extract. *Journal of Food Safety*, 38(1): 1-12.
- 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.
- Khan, M.A.I., Ueno, K., Horimoto, S., Komai, F., Someya, T., Inoue, K., Tanaka, K., Ono, Y. (2009). CIELAB color variables as indicators of compost stability. *Waste Management*, 29(12): 2969-2975.
- 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.
- Köksal, E., Bursal, E., Gülçin, I., Korkmaz, M., Çağlayan, C., Gören, A., Alwasel, S. H. (2017). Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *International Journal of Food Properties*, 20(3): 514-525.
- Kroll, J., 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.
- Latou, E., Mexis, S.F., Badeka, A.V., Kontakos, S., Kontominas, M.G. (2014). Combined effect of chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken breast fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1): 263-268.
- Leal, F., Taghouti, M., Nunes, F., Silva, A., Coelho, A.C., Matos, M. (2017). Thymus plants: a review-micropropagation, molecular and antifungal activity. *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*.

- Li, J.E., Fan, S.T., Qiu, Z.H., Li, C., Nie, S.P. (2015). Total flavonoids content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Mosla chinensis* Maxim. cv. Jiangxiangru. *Food Science and Technology*, 64: 1022-1027.
- Lorenzo, J.M., Batlle, R., Gómez, M. (2014). Extension of the shelf life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. *Food Science and Technology*, 59(1): 181-188.
- Lu, H., Shao, X., Cao, J., Ou, C., Pan, D. (2016). Antimicrobial activity of eucalyptus essential oil against *Pseudomonas in vitro* and potential application in refrigerated storage of pork meat. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(4): 994-1001.
- Maheswarappa, N.B, Subbaiah, V., Muthupalani, M., Yamagani, P.K., Mohan, K., Keshapaga, U.R., Asokan, S.V., Kalappurakkal, R.C. (2013). Antioxidant activity of carnosic acid and rosmarinic acid in raw and cooked ground chicken patties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2): 273-279.
- Mahmoudi, S., Khali, M., Benkhaled, A., Benamirouche, K., Baiti, I. (2016). Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian *Ficus carica* L. varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(3): 239-245.
- Marguitas, L.A., Dezmirean, D., Laslo, L., Moise, A., Popescu, O., Maghear, O. (2007). Validated method for estimation of total flavonoids in romanian propolis. *Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Cluj-Napoca*, 63:1-6.
- Mariem, C., Sahema, M., Nadhema, S., Soumayaa, Z., Najjibab, 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.
- Marina, Z., Noriham, A. (2014). Quantification of total phenolic compound and *in vitro* antioxidant potential of fruit peel extracts. *International Food Research Journal*, 21(5): 1925-1929.
- Martinez, R., Torres, P., Meneses, M.A., Figueroa, J.G., Pérez-Álvarez, Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*, 135: 1520-1526.
- Maqsood, S., Abushelaibi, A., Manheem, K., Kadim, I.T. (2015). Characterisation of the lipid and protein fraction of fresh camel meat and the associated changes during refrigerated storage. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41: 212-220.
- Mexis, S.F., Chouliara, E., Kontominas, M.G. (2012). Shelf life extension of ground chicken meat using an oxygen absorber and a citrus extract. *LWT-Food Science and Technology*, 49(1): 21-27.
- M'hiri, N., Ioannou, I., Mihoubi Boudhrioua, N., Ghoul, M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 161-170.

- Mitsumoto, M., O'Grady, M.N., Kerry, J.P., Joe Buckley, D. (2005). Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. *Meat Science*, 69(4): 773-779.
- Naveena, B.M., Sen, A.R., Vaithiyathan, S., Babji, Y., Kondaiah, N. (2008). Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science*, 80(4): 1304-1308.
- Neethling, N.E., Suman, S.P., Sigge, G.O., Hoffman, L.C., Hunt, M.C. (2017). Exogenous and endogenous factors influencing color of fresh meat from ungulates meat and muscle biology, 1(1): 253-275.
- Niyonzima, E., Ongol, M.P., Kimonyo, A., Sindic, M. (2015). Risk factors and control measures for bacterial contamination in the bovine meat chain: a review on *Salmonella* and pathogenic *E. coli*. *Journal of Food Research*, 4(5): 98-121.
- Ntzimani, A.G., Giatrakou, V.I., Savvaidis, I.N. (2010). Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4°C: microbiological and sensory evaluation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1): 187-196.
- Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H., De Meulenaer, B. (2012). Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(38): 9589-9594.
- Pavelková, A., Kacániová, M., Horská, E., Rovna, K., Hleba, L., Petrová, J. (2014). The effect of vacuum packaging, EDTA, oregano and thyme oils on the microbiological quality of chicken's breast. *Anaerobe*, 29: 128-133.
- Petrou, S., Tsiraki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I. N. (2012). Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3): 264-271.
- Radha, K.K., Babuskina, S., Azhagu Saravana Babu, P., Sasikala, M., Sabina, K., Archana, G. (2014). Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 171: 32-40.
- Rahimmalek, M., Bahreininejad, B., Khorrami, M., Tabatabaei, B.E.S. (2009). Genetic variability and geographic differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*, an endangered medicinal plant, as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Biochemical Genetics*, 47: 831-842.
- Ramful, D., Tarmus, E., Aruoma, O.I., Bourdon, E., Theeshan, B. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International*, 44(7): 2088-2099.
- Reddy, G.V.B., Sen, A.R., Nair, P.N., Reddy, K.S., Reddy, K.K., Kondaiah, N. (2013). Effects of grape seed extract on the oxidative and microbial stability of restructured mutton slices. *Meat Science*, 95(2): 288-294.

- Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.-H., Khalel, K.I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43: 827-831.
- Rosas-Burgos, E.C., Burgos-Hernández, A., Noguera-Artiaga, L., Kačániová, M., Hernández-García, F., Cárdenas-López, J.L., Carbonell-Barrachina, Á.A. (2016). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3): 802-810.
- Ruíz-Cruz, S., Valenzuela-López, C.C., Chaparro-Hernández, S., Ornelas-Paz, J.D., Toro-Sánchez, C.L., Márquez-Ríos, E., López-Mata, M.A., Ocaño-Higuera, V.M., Valdez-Hurtado, S. (2019). Effects of chitosan-tomato plant extract edible coatings on the quality and shelf life of chicken fillets during refrigerated storage. *Food Science and Technology*, 39(1): 103-111.
- Sakkas, H., Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3): 429-438.
- Sampaio, G.R., Saldanha, T., Soares, R.A.M., Torres, E.A.F.S. (2012). Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 135(3): 1383-1390.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9): 930-940.
- Sharma, A.K., Gangwar, M., Tilak, R., Nath, G., Sinha, A.S.K., Tripathi, Y.B., Kumar, D. (2012). Comparative *in vitro* antimicrobial and phytochemical evaluation of methanolic extract of root, stem and leaf of *Jatropha curcas* Linn. *Pharmacognosy Journal*, 4: 34-40.
- Sharma, H., Mendiratta, S.K., Agarwal, R.K., Kumar, S., Soni, A. (2017): Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of various essential oils in fresh chicken sausages. *Journal of Food Science and Technology*, 54(2): 279-292.
- Skunca, D., Tomasevic, I., Nastasijevic, I., Tomovic, V., Djekic, I. (2018). Life cycle assessment of the chicken meat chain. *Journal of Cleaner Production*, 184: 440-450.
- Seleem, D., Pardi, V., Murata, R.M. (2017). Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. *Archives of Oral Biology*, 76: 76-83.
- 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.
- Sivarajan, M., Lalithapriya, U., Mariajenita, P., Vajiha, B.A., Harini, K., Madhushalini, D., Sukumar, M. (2017). Synergistic effect of spice extracts and modified atmospheric packaging towards non-thermal preservation of chicken meat under refrigerated storage. *Poultry Science*, 96(8): 2839-2844.

- Soultos, N., Tzikas, Z., Christaki, E., Papageorgiou, K., Steris, V. (2009). The effect of dietary oregano essential oil on microbial growth of rabbit carcasses during refrigerated storage. *Meat Science*, 81(3): 474-478.
- Stellato, G., Utter, D.R., Voorhis, A., De Angelis, M., Eren, A.M., Ercolini, D. (2017). A few *Pseudomonas* oligotypes dominate in the meat and dairy processing environment. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1-9.
- Sterniša, M., Klančnik, A., Možina, S.S. (2019). Spoilage *Pseudomonas* biofilm with *Escherichia coli* protection in fish meat at 5 °C. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 99: 4635-4641.
- Stroup W.W., Milliken G.A., Claassen E.A., Wolfinger, R.D. (2018). SAS for mixed models: Introduction and basic applications. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. ISBN-978-1-63526 -135-6
- Tao, F., Peng, Y. (2015). A nondestructive method for prediction of total viable count in pork meat by hyperspectral scattering imaging. *Food and Bioprocess Technology*, 8: 17-30.
- Umamaheshen, K., Sivudu, S.N., Reddy, O.V.S. (2016). Evaluation of antioxidant activity, total phenolics and total flavonoids in peels of five cultivars of mango (*Mangifera indica*) fruit. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(2): 200-203.
- Vargas-Sánchez, R.D., Torrescano-Urrutia, G.R., Acedo-Félix, E., Carvajal-Millán, E., González-Córdova, A.F., Vallejo-Galland, B., Torres-Llanez, Sánchez-Escalante, A. (2014). Antioxidant and antimicrobial activity of commercial propolis extract in beef patties. *Journal of Food Science*, 79(8): 1499-1504.
- Vega-Vega, V., Silva-Espinoza, B.A., Cruz-Valenzuela, M.R., Bernal-Mercado, A.T., González-Aguilar, G.A., Ruiz-Cruz, S., Moctezuma, E., Siddiqui, W., Ayala-Zavala, J.F. (2013). Antimicrobial and antioxidant properties of byproduct extracts of mango fruit. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 1: 205-211.
- Whyte, P., McGill, K., Collins, J.D. (2003). An assessment of steam pasteurization and hot water immersion treatments for the microbiological decontamination of broiler carcasses. *Food Microbiology*, 20(1): 111-117.
- Yashin, A., Yashin, Y., Xia, X., Nemzer, B. (2017). Antioxidant activity of spices and their impact on human health: a review. *Antioxidants*, 6: 1-18.
- Zhang, Y., Sun, Y., Xi, W., Shen, Y., Qiao, L., Zhong, L., Ye, X., Zhou, Z. (2014). Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chemistry*, 145: 674-680.
- Zulkifli, K.S., Abdullah, N., Abdullah, A., Kamarudin, W.S.S.W., Aziman, N. (2012). Effect of heat drying on antioxidant activity of selected fruit peels. *IEEE Colloquium on Humanities, Science and Engineering (CHUSER)*. Pp. 129-134.

## CONCLUSIONES GENERALES

- Los resultados obtenidos demostraron que los extractos de oregano, tomillo, albahaca, cáscara de naranja, cáscara de mandarina y cáscara de mango, son efectivos contra los procesos de oxidación y crecimiento microbiano de bacterias como *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*.
- El mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, así como la mejor actividad antioxidante y antimicrobiana de los seis extractos evaluados *in vitro* se consiguió cuando fueron obtenidos por el método de extracción por ultrasonido, en comparación con los obtenidos por maceración.
- De los siete extractos naturales evaluados en la primera fase, el de tomillo, cáscara de mango y cáscara de guayaba obtenidos por ultrasonido presentaron la mejor actividad antioxidante y antimicrobiana.
- Los extractos de tomillo y cáscara de mango adicionados de manera individual a la carne cruda de pollo a una concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup>, retrasaron efectivamente la oxidación de lípidos y el crecimiento bacteriano de cuenta total viable, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* spp. Adicionalmente, preservaron características fisicoquímicas de la carne de pollo como el pH y el color, contribuyendo a extender la vida útil de la carne.
- Los extractos de tomillo y cáscara de mango evaluados en la carne fresca de pollo, obtuvieron mejores resultados en comparación con el antioxidante sintético (BHT) en todas las variables medidas, al finalizar el periodo de almacenamiento.
- El extracto de cáscara de guayaba a una concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup> no tuvo un efecto favorable en la conservación de la carne de pollo al compararse con el antioxidante sintético.

- El extracto de tomillo resultó ser el más prometedor para la preservación de la carne de pollo.