



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

**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE  
EXTRACTOS DE HOJAS DE *Agave angustifolia* Haw Y  
SU EFECTO SOBRE LA CALIDAD DE HAMBURGUESAS  
DE RES**

POR

**Gregorio Pollorena López**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

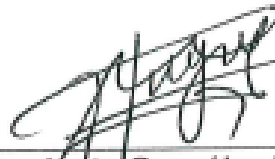
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Hermosillo, Sonora

Año de 2012

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Gregorio Pollorena López, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias, dentro del programa de Maestría en Ciencias del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.



---

Dr. Humberto González Ríos  
Director de tesis



M.C. Libertad Zamorano García  
Asesor



M.C. Martín Valenzuela Meléndres  
Asesor



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala  
Asesor



Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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



Dr. Ramón Pacheco Aguilar  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) por brindarme la oportunidad de realizar la Maestría en Ciencias y así cumplir un objetivo más como parte de mi formación profesional, así como permitirme el uso de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme los recursos económicos indispensables para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

Gracias a mi Dios porque sin su voluntad no hubiera podido llevar a cabo este trabajo, muchas gracias también por las fuerzas que me prestó para terminarlo.

Mejor es adquirir sabiduría que oro preciado; Y adquirir inteligencia vale más que la plata. (Proverbios, 16:16).

A mis asesores de tesis por su amable aceptación, por el tiempo y las recomendaciones vertidas en esta investigación: Dr. Humberto González Rios, M.C. Libertad Zamorano García, M.C. Martín Valenzuela Meléndres, Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala y Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo.

Una vez más al Dr. Humberto González Rios, por dirigir esta tesis, por confiar en mí desde el inicio. Agradezco su alto empeño, dedicación profesional, aportaciones teóricas, experiencias, consejos y llamadas de atención enmarcadas en torno a la investigación. Su exigencia y rigurosidad han sido claves en este trabajo, sin su dedicación y disponibilidad, sin duda no hubiera podido lograr esta meta.

A la Ing. Elizabeth Cohen Reyes por su gran apoyo y colaboración en la realización de esta investigación. Muchas gracias por el tiempo dedicado.

A mis compañeros de maestría: Q.B. Cynthia Guadalupe Barrón Ayala, Ing. Pedro Abraham Serna Guerrero, Ing. Marco Antonio Santis Gómez, Biol. María Dolores Figueroa Pizano, Ing. Vida Mariel López Peñuelas y Q.B. Aristeo Villalobos Rodríguez, por todo su apoyo y comprensión, por los momentos que convivimos y por las experiencias compartidas muchas gracias por todo.

Al T.I.C. German Cumplido por sus grandes aportaciones, experiencias compartidas y por facilitar la planta piloto de carnes para la elaboración de las hamburguesas.

A la M.C. Nidia Vanessa Valenzuela Grijalva por sus grandes y muy valiosas ideas y recomendaciones para hacer un buen trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Química y Bioquímica de Carne y Productos cárnicos: Thalia, Rigo, Ely, Lilly, Erika Javier, Carlos, muchas gracias por toda su colaboración.

A la M.C. Brenda Adriana Silva Espinoza por su gran apoyo y colaboración durante la realización del proyecto.

A los compañeros del Laboratorio de Tecnologías Emergentes del área de Vegetales: Miriam, Javier, América, Cristian, Isela, Luis, Juan, por sus consejos prácticos y enseñanzas, muchas gracias.

Al M.C. Luis Enrique González Siqueiros del área de Nutrición por su disposición para facilitar las instalaciones y realizar las determinaciones proximales.

## DEDICATORIA

A mis padres: Moisés Polloreña Serrano y Calixta López Alvarado. He llegado a esta etapa gracias a ustedes; gracias por su paciencia y comprensión, porque a pesar de las dificultades y carencias han realizado el máximo esfuerzo para darme lo mejor; reconozco su infinito esfuerzo por educarme y formarme, por los valores que siempre me han inculcado. Esta tesis se las dedico con mucho cariño a ustedes, como un símbolo de gratitud por el amor incondicional que siempre me han manifestado. Los quiero mucho.

A mis papas de Hermosillo: Alma Edith Polloreña López y Melquisedec Ramírez Ramírez porque también me han apoyado mucho durante mi estancia en esta ciudad. Muchas gracias también por apoyarme y aguantarme, muchas gracias por todo.

A mi prometida: Raquel León Flores, quien desde el inicio del posgrado ha sido una fuente de motivación, gracias por tu amor, paciencia, comprensión y por apoyarme en los momentos más difíciles. TE AMO que no se tío.

A mi familia hermanos y sobrinos: Juana Yaniva, Abigail, Moisés, Samuel, Solangel, Andrea, Ariday, Sofía y Moisés Roberto, por acompañarme en mis tristezas y alegrías, por todas las experiencias que vivimos juntos. Deseo que la mano de Dios siempre este presente en sus vidas y hogares, que sean tantas las bendiciones que no las puedan enumerar.

Al profe Humberto y la maestra Libertad, agradezco infinitamente todo su apoyo, por compartir desinteresadamente sus conocimientos, experiencia, consejos y por su amistad, más que unos directores, unos buenos amigos. Gracias por su ejemplo y por haberme enseñado tanto.

A todos mis amigos y conocidos.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Composición y Valor Nutricional de la Carne.....	4
Factores de Calidad de la Carne de Res.....	6
Características Fisicoquímicas.....	6
Color de la carne.....	7
Oxidación lipídica de la carne.....	7
Características Microbiológicas.....	8
Fuentes de contaminación microbiana.....	9
Alteración microbiana de las carnes frescas.....	9
Características Sensoriales.....	10
Olor y sabor.....	10
La Refrigeración en la Conservación de Carnes Frescas.....	11
Compuestos Antioxidantes y Antimicrobianos Utilizados en la Industria Cárnica.....	12
Antioxidantes Sintéticos.....	13
Antioxidantes Naturales.....	13
Compuestos fenólicos.....	13
Ácidos fenólicos.....	14
Flavonoides.....	15
Saponinas.....	16
Lignina.....	16

Mecanismo Antioxidante.....	17
Antimicrobianos Sintéticos.....	17
Descontaminación con cloro y ácidos orgánicos.....	18
Uso de nitratos y nitritos.....	18
Antimicrobianos Naturales.....	19
Mecanismo Antimicrobiano.....	19
Alternativas Naturales para la Conservación de Productos Cárnicos.....	20
Extractos de Fuentes Naturales.....	21
Cáscara de mango.....	21
Residuos de la industria del vino.....	22
Subproductos del procesado de aguacate.....	22
Subproductos del procesado de plantas del género Agave.....	23
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
Objetivos Específicos.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Experimento I: Capacidad Antioxidante y Antimicrobiana <i>in vitro</i> de los extractos.....	26
Materia Prima y Reactivos.....	26
Caracterización de las Hojas de Agave.....	26
Preparación de las Muestras y Condiciones de Extracción.....	27
Contenido de Fenoles y Flavonoides Totales.....	28
Inhibición del Radical DPPH•.....	29
Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC).....	29
Capacidad Antifúngica.....	30
Capacidad Antibacteriana y Concentración Mínima Inhibitoria.....	30
Análisis Estadístico.....	31
Experimento II: Aplicación del Extracto en un Producto Cárnico.....	32
Materiales y Reactivos.....	32
Preparación de Hamburguesas y Tratamientos.....	32
Determinaciones Fisicoquímicas.....	33



Medición de pH.....	33
Medición de color.....	33
Determinación de la oxidación de lípidos (TBARS).....	34
Porcentaje de metamioglobina (MetMb).....	34
Determinaciones Microbiológicas.....	35
Cuenta total de mesófilos y psicrófilos aerobios.....	35
Determinaciones Sensoriales.....	35
Análisis Estadístico.....	36
RESULTADOS Y DISCUSION.....	37
Resultados: Experimento I.....	37
Caracterización de las Hojas de Agave.....	37
Contenido de Compuestos Fenólicos.....	38
Capacidad Antioxidante.....	43
Capacidad Antifúngica y Antibacteriana.....	44
Resultados: Experimento II.....	49
Evaluaciones Físicoquímicas.....	49
Medición de pH.....	49
Color de las hamburguesas.....	49
Oxidación de lípidos y porcentaje de MetMb.....	53
Determinaciones Microbiológicas.....	56
Cuenta total de mesófilos y psicrófilos aerobios.....	56
Determinaciones Sensoriales.....	58
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Contenido de compuestos fenólicos de extractos de hojas de <i>A. angustifolia</i> Haw obtenidos mediante diferentes tipos de solventes y condición de la hoja.....	39
Cuadro 2. Contenido de flavonoides y capacidad antioxidante de extractos sin hidrolizar de hojas de <i>A. angustifolia</i> Haw obtenidos mediante diferentes tipos de solventes y condición de la hoja.....	42
Cuadro 3. Actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de hojas de <i>A. angustifolia</i> Haw obtenidos mediante diferentes tipos de solvente y condición de la hoja.....	45
Cuadro 4. Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) de extractos de hojas frescas y secas de <i>A. angustifolia</i> Haw obtenidos con diferentes solventes sobre bacterias patógenas alimentarias...	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de los tratamientos (C=Control; EA=Extracto de Agave; BHT y AG=Ácido gálico) sobre L* (A), a* (B) y ángulo Hue° (C) de hamburguesas de res almacenadas en refrigeración.....	50
Figura 2. Efecto de los tratamientos (C=Control; EA=Extracto de Agave; BHT y AG=Ácido gálico) sobre TBARS (A) y % de Metamioglobina (B) de hamburguesas de res almacenadas en refrigeración.....	54
Figura 3. Efecto de los tratamientos (C=Control; EA=Extracto de Agave; BHT y AG=Ácido gálico) sobre el crecimiento de microorganismos mesófilos (A) y psicrófilos (B) en hamburguesas de res almacenadas en refrigeración.....	57
Figura 4. Efecto de los tratamientos (C=Control; EA=Extracto de Agave; BHT y AG=Ácido gálico) sobre las características sensoriales olor (A), sabor (B) y decoloración (C) de hamburguesas de res almacenadas en refrigeración.....	59
Figura 5. Comportamiento del color de hamburguesas de res durante su almacenamiento en refrigeración obtenido mediante evaluación sensorial .....	61

## ANEXOS

Anexo 1. Formato de evaluación para el análisis sensorial.....	76
--	----

## RESUMEN

Actualmente, existe un gran interés en sustituir los antioxidantes sintéticos por naturales por ser más seguros y saludables. Dentro de las fuentes naturales de compuestos bioactivos están los subproductos agroindustriales generados durante el procesado de Agaves, que se usan en la elaboración de bebidas alcohólicas destiladas. Para la elaboración de Bacanora (una bebida con denominación de origen) se usa el *Agave angustifolia* Haw, generándose subproductos (hojas), que pueden ser utilizados para la extracción de compuestos bioactivos que potencialmente podrían ser aplicados en sistemas alimenticios. En base a lo anterior, se llevaron a cabo dos experimentos. En el primero se evaluó el contenido de fenoles y flavonoides totales, la capacidad antioxidante (DPPH y TEAC), y las propiedades antimicrobianas contra *A. alternata*, *E coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *S. Choleraesuis* de extractos obtenidos con diferentes solventes (metanol, etanol y agua) desde hojas frescas (HF) y secas (HS) de *A. angustifolia* Haw. En el segundo estudio se evaluó la estabilidad oxidativa, microbiológica y sensorial de hamburguesas de res adicionadas con el mejor extracto de Agave (EA) y comparado con BHT y ácido gálico (AG). El contenido de fenoles totales (FT) se determinó en la materia prima, extracto sin hidrolizar y extracto hidrolizado; siendo mayor en el extracto sin hidrolizar, por lo que las demás determinaciones se realizaron en este mismo. Los resultados del primer estudio indicaron que, el extracto acuoso sin hidrolizar de HS presentó el mayor ( $P<0.05$ ) contenido tanto de FT (42.84 mg EAG/g PS), flavonoides (6.46 mg EC/g PS) y capacidad antioxidante (DPPH=281.82  $\mu\text{mol ET/g PS}$  y TEAC=213.3  $\mu\text{mol ET/g PS}$ ). Los extractos de HS presentaron mayor ( $P<0.05$ ) porcentaje de inhibición contra *A. alternata* que los de HF. Todos los extractos presentaron diámetros de inhibición similares (7.8-8.8 mm) contra los patógenos probados. Con respecto al segundo estudio

los principales cambios en la calidad de las hamburguesas se observaron al día 5, siendo el AG más efectivo ( $P < 0.05$ ) para mantener la calidad de estas, mientras que EA y BHT mostraron propiedades similares, retardando la pérdida de calidad hasta por dos días con respecto al Control. Ninguno de los tratamientos probados fue efectivo para retardar el crecimiento de microorganismos mesófilos y psicrófilos en las hamburguesas. En base a las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y al efecto en la calidad de la carne, las hojas de *A. angustifolia* Haw pueden ser utilizadas como fuente alternativa natural y económica de agentes conservadores en la industria alimentaria.

**Palabras clave:** Antioxidantes, Antimicrobianos, *A. angustifolia* Haw, Hamburguesas de res.

## ABSTRACT

Currently, there is great interest for replacing synthetic antioxidants by natural being safer and healthier. Among the natural sources of bioactive compounds are agro-industrial byproducts produced during processing of Agaves, which are used in the production of distilled alcoholic beverages. For the preparation of Bacanora (a beverage with designation of origin) is used *Agave angustifolia* Haw, generating byproducts (leaves), which can be used for the extraction of bioactive compounds that could potentially be applied in food systems. Based on the above, were conducted two experiments. In the first experiment evaluated the total phenols and flavonoids content, antioxidant capacity (DPPH and TEAC) and antimicrobial properties against *A. alternata*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *S. Choleraesuis* of extracts obtained with different solvents (methanol, ethanol and water) from fresh leaves (HF) and dry (HS) of *A. angustifolia* Haw. In the second study was assessed the oxidative, microbiological and sensory stability of beef burgers added with the best Agave extract (EA) in comparison with BHT and gallic acid (AG). Total phenolic content (FT) was measured in the raw material, unhydrolyzed and hydrolyzed extract; being higher in the unhydrolyzed extract, so that the other determinations were performed in the same. The results of the first study indicated that the unhydrolyzed aqueous extract of HS had the highest ( $P < 0.05$ ) contents of FT (42.84 mg EAG/g PS), flavonoids (6.46 mg CE/g PS) and antioxidant capacity (DPPH ET = 281.82  $\mu\text{mol ET/g PS}$  and TEAC = 213.3  $\mu\text{mol ET/g PS}$ ). HS extracts had higher ( $P < 0.05$ ) percentage of inhibition against *A. alternata* than HF. All extracts showed similar inhibition diameters (7.8-8.8 mm) against the pathogens tested. On the second study, the main changes in the quality of the hamburgers were observed at day 5, the AG being more effective ( $P < 0.05$ ) to maintain the quality of these, while EA and BHT showed similar properties, slowing the loss of quality up to two days compared with the control. Neither treatment tested was effective in retarding the growth of mesophilic and psychrophilic microorganisms on hamburgers. Based on the antioxidant and

antimicrobial properties and in the effect on beef quality, the leaves of *A. angustifolia* Haw can be used as an economic alternative source of natural preservatives in food industry.

**Keywords:** Antioxidant, Antimicrobial, *A. angustifolia* Haw, beef burgers.



## INTRODUCCIÓN

En México, tanto el consumo como la producción de carne han incrementado con el paso de los años. Las especies que representan un mayor aporte de carne al mercado nacional son bovino, porcino y aves con una producción de 1.6, 2.5 y 1.2 millones de toneladas respectivamente. Específicamente para carne de bovino, el consumo per cápita anual es aproximadamente 20 kg (SAGARPA, 2007). En este contexto, las demandas y exigencias de calidad de los consumidores también se han incrementado, por ello la industria de la carne debe proveer productos que cumplan con dichas necesidades.

El primer encuentro del consumidor con la calidad de los productos cárnicos, especialmente con las carnes frescas se da a través de los anaqueles en los supermercados. Una de las principales causas de deterioro de la calidad es la oxidación lipídica, porque esta conduce a la decoloración, formación de malos olores, pérdida de la textura y de nutrientes, todos ellos son factores que afectan la aceptación de los consumidores de carne (Faustman *et al.*, 2010). La industria cárnica ha desarrollado diferentes métodos de conservación como la refrigeración y congelación que aumentan la vida de anaquel (Hui *et al.*, 2006). Sin embargo, estos métodos no han sido suficientes para cubrir la creciente demanda, por lo tanto se ha recurrido al empleo de antioxidantes que en combinación con los métodos antes mencionados han presentado resultados eficientes.

Dentro de los antioxidantes utilizados como conservadores en la industria cárnica se encuentran los sintéticos y los naturales. Los antioxidantes sintéticos fueron los primeros en utilizarse, sin embargo, han disminuido su uso debido a que se les ha relacionado con el padecimiento de enfermedades cancerígenas (McCarthy *et al.*, 2001). Por su parte, los antioxidantes naturales han despertado mayor interés debido a su seguridad y características de salud. Extractos de algunos materiales vegetales como frutas, hierbas, especias y sus constituyentes son buenas fuentes naturales de antioxidantes (Duan *et al.*, 2007). Estos antioxidantes, mediante diferentes mecanismos, permiten conservar las características sensoriales y de calidad, retardando la oxidación lipídica, evitando la formación de aromas y colores desagradables, así como el crecimiento de microorganismos deteriorativos (Kong *et al.*, 2010).

Se ha reportado que muchos extractos de plantas ricos en compuestos fenólicos han demostrado tener efectos positivos en la inhibición de la oxidación lipídica y deterioro de diversos sistemas cárnicos, por ejemplo, extractos de romero (Lund *et al.*, 2007), hojas de olivo (Hayes *et al.*, 2009), y recientemente extractos de frutas como jugos de granada (Vaithyanathan *et al.*, 2011), extractos de uva blanca (Jongberg *et al.*, 2011), etc. Sin embargo, debido a su alto costo de extracción, se buscan nuevas fuentes más económicas como los subproductos agroindustriales con el fin de tener un completo aprovechamiento de la materia prima. Con respecto a esto, recientemente se han explotado diversos subproductos con este fin, como por ejemplo la cáscara de mango (Ajila *et al.*, 2007), semilla de uva (Selani *et al.*, 2011), cáscara y semilla de aguacate (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011), entre otros, y dentro de esta familia de subproductos se encuentran también aquellos generados durante el procesado de plantas del género Agave.

Las plantas de Agave tienen hojas largas y fibrosas, de forma lanceolada y por lo general crecen en zonas áridas. El género comprende más de 200 especies, de las cuales, el 75% se encuentra en México el cual es considerado como el centro de origen (García-Mendoza, 2002). Se han realizado escasas

investigaciones sobre la extracción de compuestos fenólicos en subproductos provenientes de estas plantas; dentro de ellas se encuentran la realizada en hojas de maguey morado (Reyes-Munguía *et al.*, 2009) y en hojas de *Agave americana* (Ben Hamissa *et al.*, 2012). Por lo tanto, con el fin de proveer diferentes alternativas para el aprovechamiento de sus subproductos, es necesario realizar investigaciones que incluyan aspectos relacionados con los métodos de extracción más convenientes para las diferentes especies de agave conocidas y su aplicación en la industria alimentaria.

Los Agaves se han utilizado desde hace mucho tiempo como plantas medicinales y en la elaboración de artesanías. Actualmente, su principal uso es en la producción de bebidas alcohólicas destiladas como el tequila, sotol, mezcal y bacanora. El bacanora, es un destilado hecho 100% de Agave silvestre, fermentado y destilado. Esta bebida se elabora a partir de la cabeza (también llamada piña) del *A. angustifolia* Haw y el resto de la planta (hojas) se consideran subproductos (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 2007), los cuales representan una fuente potencial para la obtención de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante y antimicrobiana para ser aplicados en la industria alimentaria. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de compuestos fenólicos de hojas frescas y secas de *A. angustifolia* Haw, extraídos a través de diferentes solventes, así como también evaluar su eficacia para retardar la pérdida de calidad de hamburguesas de res durante su almacenamiento en refrigeración.

## ANTECEDENTES

### Composición y Valor Nutricional de la Carne

Existen diversos compuestos que constituyen el músculo, dentro de los que se incluyen: ácidos grasos libres, glicerol, triglicéridos, fosfolípidos, compuestos nitrogenados no proteicos, grupos amino y vitaminas. También existen otros componentes como glucógeno, ATP, mioglobina y algunos minerales presentes en pequeñas cantidades. Sin embargo, el componente más importante desde el punto de vista cuantitativo son las proteínas que constituyen cada fibra. Éstas, se encuentran clasificadas en cuatro diferentes grupos. Las proteínas miofibrilares representan el 60% del contenido proteico total, las proteínas sarcoplásmicas representan el 29%, las proteínas estromales el 6% y las proteínas granulares el 5% (Hui *et al.*, 2006).

Ahora, en un enfoque más sencillo, la composición proximal de la carne consta aproximadamente de 1% de cenizas (compuesta principalmente por elementos como potasio, fósforo, sodio, cloro, magnesio, calcio y hierro), 1% de carbohidratos (principalmente glucógeno ante-mortem y ácido láctico post-mortem), 5% de lípidos, 21% compuestos nitrogenados (en su mayoría proteínas), y el resto (72%) es agua (Hui *et al.*, 2001).

De los componentes químicos antes mencionados, el contenido de grasa es el que presenta mayor variación en cuanto a composición, dicha variación se debe principalmente a factores como: edad, sexo, raza, dieta y el tipo de corte (Warriss, 2010). De la composición lipídica de la carne, menos del 50% corresponde a ácidos grasos saturados y hasta un 70% de ácidos grasos

insaturados en algunas especies. En carne de res, el contenido de ácidos grasos insaturados varía entre 50-52% (Jiménez-Colmenero *et al.*, 2001).

Los ácidos grasos saturados predominantes en carne de res son: ácido mirístico (14:0), palmítico (16:0) y esteárico (18:0); mientras que dentro de los principales ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se encuentran el linoleico y  $\alpha$ -linoleico y el ácido graso monoinsaturado (MUFA) más predominante es el ácido oleico (18:1n-9) (Scollan *et al.*, 2006). La presencia de PUFAs y MUFAs en la dieta es considerada benéfica para la salud. Por ejemplo, los isómeros *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12 del ácido linoleico conjugado han sido los más estudiados debido a sus efectos biológicos. Dentro de estos efectos se incluyen como antioxidante, anti-obesidad, anticancerígeno, anti-arteriosclerótico, anti-diabetógeno, protector del sistema inmune y contribuye con la formación de hueso (Smedman y Vessby, 2001).

Aunque la composición lipídica ha sido la más estudiada, la carne presenta otros componentes que tienen también impacto en la nutrición. Por ejemplo, contiene proteínas de alto valor biológico, debido a que presentan los aminoácidos esenciales para la salud. La carne también es una fuente importante de vitaminas del complejo B, particularmente B1 (tiamina), niacina (ácido nicotínico), B2 (riboflavina), B6 y B12 (cianocobalamina), y vitamina A (retinol). Además, es la mayor fuente de hierro, cobre, zinc y selenio (Warriss, 2010).

Como la mayoría de los alimentos, la carne y sus componentes, tienden a perder el equilibrio y descomponerse durante el almacenamiento, perdiendo así sus características de calidad. La pérdida de color, oxidación de lípidos, formación de aromas desagradables, etc., son las principales evidencias de que la carne ha perdido su calidad, por lo tanto es rechazada por el consumidor (Hui *et al.*, 2006).

## Factores de Calidad de la Carne Fresca

La industria cárnica se ha encargado de satisfacer las demandas de calidad que el cliente desea encontrar en la carne y sus productos. Esto lo ha hecho desarrollando métodos y técnicas que permiten un mejor manejo y conservación de la misma. Estos métodos incluyen la refrigeración y congelación, los cuales se han implementado desde tiempo atrás, así se ha dado valor agregado a la carne y ha permitido conservar en mejores condiciones las características de calidad como el color, sabor, textura, etc. Mantener estos atributos de calidad en las mejores condiciones no sólo asegura la satisfacción del consumidor, sino que además permite que la carne no sea afectada para su uso tecnológico, pues estos parámetros de calidad influyen sobre la microestructura del músculo afectando también la integridad de la carne (Banović *et al.*, 2009).

### **Características Fisicoquímicas**

Dentro de las características de calidad más importantes en carne fresca se encuentran, la oxidación lipídica y cambios en el color (Faustman *et al.*, 2010). En las primeras etapas de conversión del músculo en carne el pH es muy importante, pues este puede afectar el color. Además el color también es importante pues es la primera impresión que el consumidor obtiene del alimento. Tanto el color como los lípidos de la carne pueden verse afectados por reacciones de oxidación que llevan al desarrollo de colores y olores desagradables, así como la formación de compuestos tóxicos que afectan la calidad de la carne y sus productos (Warriss, 2010).

Color de la carne. El color de la carne depende de la cantidad y estado químico de los pigmentos hemoglobina y mioglobina; en bovinos, el color normal de la carne es rojo cereza brillante, que adquiere tonalidades claras como en las carnes de animales jóvenes (Villena, 2005).

La mioglobina es una proteína con un grupo hemo, que puede verse afectada por los procesos de oxidación, afectando finalmente el color de la carne. La oxidación del átomo central de hierro ( $Fe^{2+}$  -  $Fe^{3+}$ ) en el grupo hemo de la mioglobina es la responsable de los cambios en la coloración de la carne. Cuando el animal se encuentra vivo la carne presenta color púrpura, el cual se debe principalmente al pigmento llamado mioglobina. Ésta, a través de un proceso de oxigenación pasa al estado oximioglobina, impartiendo el color rojo cereza característico en carnes frescas. La oximioglobina ( $Fe^{2+}$ ) mediante un proceso de oxidación cambia a metamioglobina ( $Fe^{3+}$ ), produciéndose un color marrón el cual es rechazado por parte de los consumidores (Faustman *et al.*, 2010).

Existen otros factores que también afectan el color de la carne, entre los que se encuentra la estructura de la superficie y la propagación de grasa intramuscular. Tanto la grasa intra como extra-muscular, son susceptibles a las reacciones de oxidación y deterioro produciendo compuestos que afectan la calidad de la carne (Judge *et al.*, 1989).

Oxidación lipídica de la carne. Los lípidos son constituyentes de muchos alimentos, entre ellos la carne. Estos, son un grupo de biomoléculas orgánicas formadas básicamente por carbono, hidrógeno y oxígeno, además pueden contener fósforo, nitrógeno y azufre. Todos los lípidos están formados por ácidos grasos saturados e insaturados y la composición de los mismos determina sus propiedades físicas, estabilidad y valor nutricional. Los ácidos grasos son susceptibles a degradarse por medio de un proceso de oxidación

autocatalítico, y esta susceptibilidad está en función del grado de insaturación (Xiong y Decker, 1995).

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas de pérdida de calidad de la carne durante su almacenamiento y procesado. La oxidación se asocia también a cambios en el color, pérdida de la calidad nutricional (vitaminas liposolubles como A y E, ácidos grasos esenciales linoleico y linolénico); pérdida de la calidad comercial, cambios organolépticos (olores y sabores a rancio, colores anormales) y pérdida de la seguridad alimentaria debido a la formación de compuestos tóxicos (Vivas, 2000).

El mecanismo de oxidación de los lípidos, se divide en tres etapas (iniciación, propagación y terminación). La fase de iniciación involucra la abstracción de una molécula de hidrógeno del ácido graso (LH) en presencia de ciertos catalizadores, con la consecuente formación de radicales libres (L•). En la etapa de propagación, los radicales libres formados reaccionan con el oxígeno para formar un radical peróxido de lípido (LOO•), el cual también puede reaccionar después con otra molécula lipídica para formar hidroperóxidos (LOOH). La terminación ocurre cuando los radicales hidroperóxidos que son compuestos altamente reactivos comienzan a reaccionar entre sí. Los productos finales de la oxidación lipídica son compuestos de cadena corta como aldehídos o ésteres (Nawar, 1996).

## **Características Microbiológicas**

La carne debido a su elevada actividad de agua (aw) y valor nutricional se clasifica dentro de los alimentos altamente susceptibles al ataque de microorganismos y de igual forma la mayoría de los productos elaborados con ella (Frazier y Westhoff, 2003). Aunque el músculo como tal, es prácticamente estéril (sólo antes del sacrificio), los diversos alimentos preparados a base de



carne ofrecen las condiciones que los microorganismos necesitan para su desarrollo incluyendo, aquellos involucrados en daños y enfermedades alimentarias. La invasión de los microorganismos a los alimentos se lleva a cabo por diferentes medios, dentro de los cuales se encuentra la manipulación humana principalmente (Arango y Restrepo, 2002).

Fuentes de contaminación microbiana. La contaminación de la carne se debe a causas externas durante las operaciones de desangrado, desuello y durante la obtención de la canal, en estas operaciones, los microorganismos proceden principalmente del exterior del animal (piel, pezuñas y pelo) y del túbulo intestinal de éste (Hui *et al.*, 2006). Los cuchillos, los paños, el aire, así como las manos y la ropa de los operarios pueden actuar como fuentes intermedias de contaminación. Durante las operaciones posteriores de manipulación de la carne, la contaminación puede tener su origen en las carretillas, en las cajas y en otros recipientes que se utilizan para el transporte de la carne. El equipo especializado, como son las picadoras, las embutidoras, empaquetadoras y los ingredientes que se emplean para elaborar determinados productos cárnicos (por ejemplo las tripas y las especias), es posible que aporten importantes cantidades de microorganismos perjudiciales (Frazier y Westhoff, 2003).

Alteración microbiana de las carnes frescas. La mayoría de las bacterias deteriorativas encontradas en carne fresca son aerobias y gram-positivas. Dentro de esta flora bacteriana se encuentran alrededor de 30 géneros diferentes y los más comunes son: *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Listeria spp.*, *Enterococcus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, las cuales son Gram-positivas y *Aeromonas spp.*, *Escherichia spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Pseudomonas spp.*, y *Campylobacter spp.*, que son Gram-negativas (Douglas *et al.*, 2001). Sin embargo, debido a que la carne se refrigera (0-4 °C), sólo permite el crecimiento de ciertas bacterias

tolerantes al frío como; *Pseudomonas spp.*, *Yersinia spp.*, *Listeria spp.*, y *Aeromonas spp.* El crecimiento excesivo de estas bacterias causa superficies babosas en la carne, sabores indeseables y cambios en el color (Frazier y Westhoff, 2003).

La carne molida es la que se encuentra más susceptible a la contaminación microbiana ya que sufre una mayor manipulación durante el proceso, aunado a que una vez realizada la molienda, esa representa una mayor superficie de contacto para la contaminación microbiana (Hui *et al.*, 2006). Las especificaciones sanitarias para este tipo de carne se encuentran en la NOM-034-SSA1-1993. Estas especificaciones indican que el límite máximo para mesófilos aerobios es de 5 000 000 UFC/g, *Salmonella spp* ausente en 30 g de muestra y para *Staphylococcus aureus* es de 1 000 UFC/g.

### **Características Sensoriales**

La calidad sensorial de la carne está definida por las características que el consumidor percibe como deseables, estas incluyen tanto las características visuales y sensoriales como las de seguridad alimentaria. Importantes características sensoriales incluyen, el color externo, la cantidad, color y distribución de la grasa, así como la ausencia de exceso de agua en la bandeja donde se presentan estos productos (Glitsch, 2000).

Olor y sabor. La apreciación del olor está dada por la mayor o menor existencia de productos o componentes químicos hidrosolubles o liposolubles, presentes en el tejido adiposo y el tejido muscular, estos se presentan con mayor evidencia al cocinar las carnes, en cuyo caso además de la solubilidad en medio salino y calor, se observará la volatilización de ciertas sustancias como carbonilos, algunos nucleótidos y ciertos ácidos grasos (Villena, 2005).

El sabor es solamente perceptible en carnes cocinadas, manifestándose en este estado olores y sabores con mayor facilidad para su detección. Muchas veces se utiliza la expresión flavour, para referirse a la conjunción sensorial del olor y del sabor de un alimento (Glitsch, 2000). Tanto el olor como el sabor de la carne de bovino, son más pronunciados cuando proviene de animales machos viejos, de alimentación variada, así como también en carnes maduradas (Villena, 2005). El olor y el sabor son las sensaciones más difíciles de definir objetivamente y la determinación de estas características depende principalmente de los paneles de catadores (Williams y Atkins, 1983).

### La Refrigeración en la Conservación de Carnes Frescas

El almacenamiento en refrigeración se lleva a cabo a temperaturas no muy superiores a las de congelación. Se puede emplear como principal medio de conservación de alimentos o como procedimiento para su conservación temporal hasta tanto no se aplique otro tratamiento para conseguir conservarlos. La mayoría de los alimentos más perecederos, entre los que se incluye la carne, se pueden mantener almacenados bajo refrigeración durante un tiempo limitado sin que su naturaleza original experimente modificaciones importantes. Con ello, no se evitan las modificaciones de la carne debidas a enzimas y a microorganismos, pero si se retardan considerablemente (Frazier y Westhoff, 2003).

Los parámetros a tener en cuenta en relación con el almacenamiento bajo refrigeración son: temperatura, humedad relativa, tamaño del corte, velocidad de aire, etc. La temperatura empleada para refrigeración de la carne debe ser entre 0–4 °C, la humedad relativa recomendada dentro de la cámara de refrigeración debe ser de 80-85 % para evitar tanto una mayor pérdida de humedad, así como el crecimiento microbiano (Judge *et al.*, 1989). El tamaño del corte influye también en el proceso de refrigeración, ya que un tamaño de

corte mayor tarda más en alcanzar en su centro geométrico la temperatura de refrigeración. En cuanto a la velocidad del aire, esta se recomienda que sea de 2-3 m/s (Hui *et al.*, 2006).

Los métodos empleados tradicionalmente para conservar las carnes frescas como refrigeración, congelación, etc., parece ser que no satisfacen la demanda de carne por parte de los consumidores (Warriss, 2010). Por lo tanto se han empleado métodos que combinados con estos prolongan la vida de anaquel de este tipo de productos (McCarthy *et al.*, 2001). Dentro de los métodos que han surgido se encuentra la aplicación de antioxidantes, los cuales han demostrado aumentar la vida de anaquel de las carnes frescas (Kong *et al.*, 2010).

### Compuestos Antioxidantes y Antimicrobianos Utilizados en la Industria Cárnica

Los antioxidantes tanto sintéticos como naturales han sido empleados como conservadores de los alimentos desde hace tiempo. Sin embargo, recientemente se ha buscado incrementar el uso de antioxidantes de origen natural debido a que son más seguros y saludables que los sintéticos (Hui *et al.*, 2006). Los antioxidantes son sustancias que en pequeñas cantidades son capaces de prevenir o retardar la oxidación de materiales oxidables como las grasas, aceites, alimentos crudos o procesados (Vivas, 2000). Éstos, son considerados como aditivos alimentarios, por ser añadidos intencionalmente a los alimentos sin el propósito de cambiar su valor nutritivo ni modificar sus características para la elaboración de productos. Los antioxidantes no pueden añadirse a los alimentos a menos que se haya demostrado que no produzcan manifestaciones agudas o crónicas de efectos tóxicos (Climent, 2000).

## Antioxidantes Sintéticos

Algunos de los antioxidantes sintéticos empleados en carne y sus productos son los compuestos fenólicos como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutil hidroxiquinona (TBHQ) y ésteres de ácido gálico, como propil galato (PG). Estos antioxidantes han sido utilizados ampliamente en la industria alimentaria. Los límites de aplicación permitidos son del 0.02% con respecto al contenido de grasa en el alimento (Pokorny *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha restringido el empleo de ciertos antioxidantes sintéticos debido a que existen estudios que relacionan estos compuestos con posibles riesgos en la salud, principalmente efectos cancerígenos (McCarthy *et al.*, 2001).

## Antioxidantes Naturales

Los antioxidantes naturales son obtenidos a partir de varias fuentes vegetales. La mayoría de los compuestos activos presentes en estas fuentes son compuestos fenólicos. Dentro de este grupo se encuentran el tocoferol, flavonoides y diversos ácidos fenólicos (Pokorny *et al.*, 2001).

Compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos o polifenoles son especies orgánicas que poseen en su estructura al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos unidos a él. Sin embargo, esos grupos funcionales pueden estar sustituidos por ésteres, glucósidos, etc., (Escarpa y González, 2001). Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más grandes de los metabolitos de las plantas. Miles de moléculas que presentan estructura polifenólica han sido identificadas en plantas superiores y cientos de ellas se encuentran en plantas comestibles (Manach *et al.*, 2004). Los polifenoles son constituyentes regulares de la alimentación humana. Las fuentes más ricas son

las frutas, bebidas como el té (negro y verde), café, vino y los jugos de frutas, y en menor grado hortalizas, cereales y leguminosas (Scalbert *et al.*, 2002).

Estas moléculas son metabolitos secundarios de las plantas y se biosintetizan a través de la ruta del ácido shiquímico (Vermerris y Nicholson, 2006). Hay una gran variabilidad en su estructura y presencia en las plantas. Los polifenoles son muy diferentes en tamaño y este grupo incluye tanto a los polifenoles simples como los ácidos hidroxibenzoicos, así como a los polímeros más complejos como lo son los taninos de alto peso molecular (Tomás-Barberán y Espín, 2001).

Ácidos fenólicos. El nombre de ácidos fenólicos, en general describe a los fenoles que poseen un ácido carboxílico funcional. Los ácidos fenólicos contienen dos esqueletos de carbono que los distinguen en: ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos. Aunque el esqueleto básico es el mismo, el número y posiciones de los grupos hidroxilos en el anillo aromático hacen la diferencia (Robbins, 2003).

Los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos son abundantes en los alimentos y pueden representar cerca de la tercera parte de los compuestos fenólicos en nuestra dieta (Tomás-Barberán y Gil., 2008). Estos compuestos pueden encontrarse como ésteres o en forma libre, los cuales, pueden estar solubles y acumulados en las vacuolas o bien insolubles como componentes de la pared celular (Yang *et al.*, 2001). Los ácidos hidroxicinámicos constituyen el grupo más ampliamente distribuido de compuestos fenólicos. Dentro de ellos hay cuatro estructuras básicas que existen en su forma natural las cuales corresponden a los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico (Escarpa y González, 2001). Dentro de los ácidos hidroxibenzoicos se encuentran el ácido gálico, protocatéquico, siríngico y varílico. La distribución de estos ácidos en las plantas comestibles es generalmente muy bajo, con la excepción de algunas

frutas rojas como rábano y cebolla, que pueden tener concentraciones de varias decenas de miligramos por kilogramo de peso fresco (Manach *et al.*, 2004).

Flavonoides. Los flavonoides son polifenoles que tienen el esqueleto del difenilpropano (C6-C3-C6). Las diferencias individuales dentro de cada grupo resultan desde la variación en número y arreglo de los grupos hidroxilos, así como de la naturaleza y extensión de alquilación y/o glicosilación. Dentro de los flavonoides se encuentran, las antocianinas, flavonoles, etc., (Karakaya, 2004).

Las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, están constituidos por una molécula de antocianidina que es la aglicona a la que se une un azúcar por medio de un enlace glucosídico (Vermerris y Nicholson, 2006). Estos compuestos están disueltos en las vacuolas de los tejidos epidérmicos de flores y frutos, los cuales imparten los colores rosa, rojo, azul o púrpura. En la dieta humana, las antocianinas se encuentran en el vino tinto, algunos cereales y en algunas hortalizas de hoja y raíces, pero son más abundantes en las frutas (Tomás-Barberán y Gil., 2008). Las antocianinas se encuentran principalmente en la cáscara, excepto en algunos frutos como la cereza y la fresa localizadas principalmente en la pulpa (Manach *et al.*, 2004).

Los flavonoles son una clase de flavonoides que presentan la estructura 3-hidroxiflavona. Su diversidad radica en las diferentes posiciones que acomodan los grupos -OH fenólicos. Los principales flavonoles son las catequinas, las cuales son abundantes en el té y el chocolate. En la uva y el chocolate, las catequinas son mayoritariamente catequina y epicatequina. Las proantocianidinas son flavonoles poliméricos (de 4 a 11 unidades), que están presentes en materiales vegetales tales como las semillas de la uva (Yang *et al.*, 2001). La quercetina es el principal flavonol en la dieta humana, se encuentra presente en muchas frutas, hortalizas y bebidas (Tomás-Barberán y Gil., 2008). Es particularmente abundante en cebolla (0.3 mg/g peso fresco) y en el té (10-25 mg/L). La quercetina usualmente se encuentra como 0-

glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente en su estructura. Más de 170 diferentes glicósidos de quercetina han sido identificados (Yang *et al.*, 2001).

Saponinas. Las saponinas son glucósidos, compuestos químicos cuyas estructuras están constituidas por un núcleo soluble en grasa (aglicona), que puede ser ya sea un esteroide triterpenoide (C-30), neutral o alcanolide (C-27) unida a una o más cadenas laterales de azúcares solubles en agua (glicona) a través de enlaces éster al núcleo aglicona en diferentes sitios de carbono. Las saponinas triterpenoides predominan en la soya, alfalfa y quillaja, mientras que las saponinas esteroides predominan en la yucca, tomate y avena (Kaneda *et al.*, 1987). Entre los diversos efectos biológicos que presentan las saponinas se encuentran la actividad hemolítica y la actividad antibacteriana. Algunas saponinas son benéficas, mientras que otras son consideradas peligrosas para los animales. Los efectos biológicos de las saponinas se ven afectados por factores como el tipo de núcleo de la saponina, el número de cadenas laterales del azúcar y el tipo de grupos funcionales (Hassan *et al.*, 2010).

Lignina. La lignocelulosa es el material más abundante en nuestro planeta, se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina, cuyas proporciones en las plantas pueden ser muy variables: 20-55% celulosa, 16-85% de hemicelulosa y 15-40% de lignina (Bayer *et al.*, 1998). La lignina es un polímero generado por la condensación al azar de los radicales libres de alcoholes aromáticos. En general, su estructura es difícil de definir, sin embargo, se sabe que contiene fundamentalmente tres alcoholes; coniferílico, sinapílico y p-cumarílico. También puede contener ácidos fenólicos tales como cumárico y ferúlico, que están esterificados con los grupos alcohol. Su degradación es difícil y protege a la celulosa y hemicelulosa de la hidrólisis enzimática por lo que se considera un compuesto recalcitrante (Howard *et al.*, 2003).



## **Mecanismo Antioxidante**

La mayoría de los antioxidantes, ya sean sintéticos o de origen natural, que actualmente se emplean en alimentos, tienen en su estructura grupos fenólicos o hidroxilo. Estos grupos son los responsables de la capacidad antioxidante, atrapando metales o mediante la donación de electrones para la estabilización de radicales libres (Decker *et al.*, 2000). Los antioxidantes pueden intervenir en diferentes etapas del proceso de oxidación, dependiendo de su modo de acción. Son considerados antioxidantes primarios aquellos capaces de donar un átomo de hidrógeno a un radical libre, convirtiéndolo en un producto estable. Además, este tipo de antioxidantes pueden reaccionar con radicales peróxidos o alcoxi para detener la reacción en cadena y la descomposición de hidroperóxidos (Yanishlieva, 2001). Los radicales formados por el antioxidante durante las etapas anteriores pueden reaccionar con otros radicales, para formar compuestos no radicales. Alternativamente, radicales provenientes del antioxidante se pueden estabilizar mediante resonancia (Yanishlieva, 2001).

## **Antimicrobianos Sintéticos**

En la industria cárnica se han desarrollado una gran variedad de estrategias para reducir el deterioro bacteriano dentro de ellas se encuentran: manejo adecuado de la canal; lavado con agua a diferentes temperaturas y presiones; remoción de los microorganismos recortando la superficie contaminada; etc., sin embargo también existen algunos métodos químicos, como la descontaminación con cloro, ácidos orgánicos y también los nitritos aplicados a diferentes productos ha demostrado reducir el crecimiento microbiano (Hui *et al.*, 2001).

Descontaminación con cloro y ácidos orgánicos. La incorporación de cloro en el agua de lavado de la canal ha demostrado reducir el crecimiento microbiano. Los niveles de cloro utilizados se encuentran en el rango de 20-400 ppm y su efectividad también depende de la temperatura y pH del agua. Se ha reportado que la adición de cloro a 100 ppm presenta reducción significativa de 2 log UFC/cm<sup>2</sup> (Warriss, 2010). Algunos ácidos orgánicos como el ácido acético han sido utilizados a diferentes concentraciones (1%, 2%, 4% y 5%) para evitar el crecimiento bacteriano. En un estudio donde se aplicó 1% de este ácido en la superficie de canales de res, se observó una reducción de *E. coli* desde 5 a 2.2 log UFC/cm<sup>2</sup> y *Salmonella wentworth* hasta 1.5 log UFC/cm<sup>2</sup> (Hui *et al.*, 2001). También se ha reportado la combinación de ácido acético con ácido láctico e incluso con ácido propiónico. En general, los lavados con ácidos pueden reducir la población bacteriana hasta 2 log UFC/cm<sup>2</sup> utilizándolos en apropiadas combinaciones (Fung *et al.*, 2001).

Uso de nitratos y nitritos. La adición de nitritos en la carne es la responsable del desarrollo del tradicional color y sabor curado. Sin embargo estos, presentan otro beneficio mayor, como retardar el crecimiento de *Clostridium botulinum* y de la producción de su toxina. Se han propuesto diferentes mecanismos por medio de los cuales los nitritos inhiben el crecimiento de *C. botulinum* dentro de ellos se encuentran, a) Formación de sustancias inhibitorias entre los nitritos y componentes de la carne, b) Los nitritos o sus compuestos intermediarios pueden actuar como oxidantes o reductores de enzimas intracelulares o ácidos nucleicos, c) Reacción de los nitritos con la membrana celular limitando el intercambio metabólico o transporte de sustancias (Sofos *et al.*, 1979).

## Antimicrobianos Naturales

Debido a la preocupación de los consumidores acerca del uso de antibióticos, pesticidas, hormonas y aditivos químicos que están asociados con el procesado convencional de los alimentos, los alimentos orgánicos y naturales han tenido un crecimiento explosivo (Devcich *et al.*, 2007). Un gran número de estudios han demostrado que los extractos naturales de plantas y frutas como romero, té, clavo, albahaca, orégano, extracto de semilla de uva, corteza de pino, arándano, entre muchos otros, tienen efecto antimicrobiano sobre patógenos alimentarios (Xi *et al.*, 2011). Por ejemplo Shan *et al.* (2009) reportaron que los extractos de semillas de uva disminuyeron la carga microbiana final e inhibieron la oxidación lipídica de carne de puerco durante su almacenamiento por más de 9 días.

En otro estudio realizado por Over *et al.* (2009) se reportó que el té verde aplicado a 3000, 6000 y 9000 ppm y combinado con ácidos orgánicos presenta un efecto significativo *in vitro* sobre el crecimiento de patógenos alimentarios. También se ha reportado que la aplicación de concentrado de arándano (10% peso/peso) en carne de res molida reduce el crecimiento de *L. monocytogenes* de 8.0-5.5 log UFC/g a 21 °C después de 7 días (Qiu y Wu., 2007). La mezcla de varios ingredientes disponibles comercialmente, incluida la mezcla de limón/cereza/vinagre aplicada al 1.5% en jamón y carne de pavo, inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes* (Glass y Sindelar., 2010).

## Mecanismo Antimicrobiano

Plantas, hierbas y especias, así como sus aceites esenciales, contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, mohos y levaduras (Cowan, 1999). Los compuestos

antimicrobianos de las plantas se encuentran generalmente en el aceite esencial obtenido a partir de sus hojas, flores, bulbos, rizomas y frutos. Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos (Doores, 1993).

Los posibles mecanismos de acción de los ácidos orgánicos sobre los microorganismos incluyen: reducción directa del pH del sustrato o medio de crecimiento debido a un aumento en la concentración de protones, el descenso en el pH interno de la célula por ionización de la molécula de ácido no disociada o por la interrupción de transporte de sustrato, debido a una alteración en la permeabilidad de la membrana celular (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009). Además de inhibir el transporte de sustratos, los ácidos orgánicos también pueden inhibir la oxidación de NADH, eliminando así el suministro de agentes reductores de los sistemas de transporte de electrones (Davidson, 2001). Dado que la parte no disociada de la molécula del ácido es la responsable de la actividad antimicrobiana, la eficacia a un pH dado depende en gran parte de la constante de disociación (pKa) del ácido (Beuchat, 2000).

### Alternativas Naturales para la Conservación de Productos Cárnicos

En años recientes se han descubierto diversas fuentes naturales que representan alternativas para evitar el deterioro oxidativo y microbiano de diversos productos cárnicos, dentro de dichas alternativas se encuentran los antioxidantes y antimicrobianos provenientes de numerosas fuentes como los extractos de especias, hierbas, frutas y verduras, etc. (Kong *et al.*, 2010).

## Extractos de Fuentes Naturales

Se ha reportado que muchos extractos de plantas ricos en compuestos fenólicos han demostrado tener efectos positivos en la inhibición de la oxidación lipídica y deterioro microbiano de diversos sistemas cárnicos, por ejemplo, extractos de romero (Lund *et al.*, 2007), hojas de olivo (Hayes *et al.*, 2009), y recientemente extractos de frutas como jugos de granada (Vaithiyanathan *et al.*, 2011), extractos de uva blanca (Jongberg *et al.*, 2011), etc. Sin embargo, se buscan nuevas fuentes más económicas como los subproductos agroindustriales con el fin de tener un completo aprovechamiento de la materia prima.

Cáscara de mango. La cáscara de mango es un subproducto importante obtenido durante la transformación de los productos de mango tales como pulpa y polvo de mango. En un estudio realizado por Ajila *et al.* (2007), se determinó el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de cáscara de mango, utilizando acetona como solvente. Para esto, se determinó el contenido de fenoles totales, antocianinas y carotenoides. Los resultados mostraron que las cáscaras provenientes de mangos más maduros tenían mayor contenido de antocianinas y carotenoides, mientras que en las provenientes de mangos menos maduros, presentaron un alto contenido de fenoles. Por otro lado, la capacidad antioxidante evaluada mediante el establecimiento de  $IC_{50}$  varió entre 1.39-5.24  $\mu\text{g}$  EAG.

En otro estudio realizado por Vega-Vega (2011), se evaluó la capacidad antioxidante de cáscara, semilla y pulpa de mangos de diferentes variedades el procesado del mango. En la cáscara se encontraron valores de fenoles totales que variaron desde 29.4-424.5 mg EAG/g PS y para flavonoides desde 21.93-235.63 mg EQ/g PS en los diferentes extractos y variedades analizadas.

Concluyendo que los subproductos de mango son fuentes importantes de compuestos funcionales.

Residuos de la industria del vino. Los residuos de la industria del vino representan aproximadamente el 30% del volumen de uva total utilizado en la producción. Estos subproductos como las semillas y las cáscaras son ricos en compuestos fenólicos los cuales son responsables de su alta capacidad antioxidante. Los flavonoles son los compuestos fenólicos más abundantes en la cáscara, mientras que los flavan-3-ol en la semilla (Cheynier *et al.* 2000).

Se probó el efecto de extractos de semilla y cáscara de uva sobre la oxidación lipídica, color, pH y características sensoriales de carne de pollo cruda y cocinada, almacenada a -18 °C. Los resultados de esta investigación mostraron que estos extractos son efectivos para inhibir la oxidación lipídica de la carne siendo estos comparables con antioxidantes sintéticos como el BHT. A su vez, los extractos causaron alteraciones en el color de la misma, reflejadas en el análisis instrumental y sensorial de las muestras cocinadas. Por último, en las evaluaciones sensoriales de olor y sabor, se obtuvieron buenos resultados comparables también con los antioxidantes sintéticos. Se concluyó que los subproductos del procesado de uvas son efectivos para retardar la oxidación lipídica de carne de pollo (Selani *et al.*, 2011).

Subproductos del procesado de aguacate. El procesado de aguacates, genera una importante cantidad de subproductos tales como las cáscaras y las semillas. Estos, son ricos en compuestos bioactivos con capacidad antioxidante y antimicrobiana. Rodríguez-Carpena *et al.* (2011) realizaron un estudio donde aplicaron extractos de subproductos de dos variedades de aguacate (“Hass” y “Fuerte”) para inhibir la oxidación de lípidos, proteínas y estabilización del color de hamburguesas de puerco almacenadas en refrigeración. Los resultados encontrados mostraron que los extractos de subproductos de aguacate

redujeron la pérdida del color rojo y aumentaron la luminosidad de las hamburguesas, siendo más efectivos los obtenidos de la variedad “Fuerte”. Por otro lado, las hamburguesas tratadas con los extractos, presentaron menor formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y los extractos de la variedad “Hass” inhibieron la formación de carbonilos proteicos al día 15.

Subproductos del procesado de plantas del género Agave. Las plantas de Agave tienen hojas largas y fibrosas, de forma lanceolada y por lo general crecen en zonas áridas. El género comprende más de 200 especies, de las cuales, el 75% se encuentra en México, considerado como el centro de origen (García-Mendoza, 2002). Se han realizado pocas investigaciones sobre la extracción de compuestos fenólicos en subproductos provenientes de estas plantas; dentro de ellas se encuentran la realizada en hojas de maguey morado (Reyes-Munguía *et al.*, 2009) y en hojas de *Agave americana* (Ben-Hamissa *et al.*, 2012). Por lo tanto, con el fin de proveer diferentes alternativas para el aprovechamiento de sus subproductos, es necesario realizar investigaciones que incluyan aspectos relacionados con los métodos de extracción más convenientes para las diferentes especies de Agave conocidas y su aplicación en la industria alimentaria.

Los Agaves se han utilizado desde hace mucho tiempo como plantas medicinales y en la elaboración de artesanías. Actualmente, su principal uso es en la producción de bebidas alcohólicas destiladas como el tequila, sotol, mezcal y bacanora. El bacanora, es un destilado hecho 100% de Agave silvestre, fermentado y destilado (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 2007). Según Salazar y Mungaray (2009), se estima una producción anual de 240 mil litros de esta bebida, así como también reportan que este Agave se recolecta en 34 municipios del estado de Sonora. Esta bebida se elabora a partir de la cabeza (también llamada piña) del *A. angustifolia* Haw y el resto de la planta (hojas) se consideran subproductos.

Debido a que los subproductos agroindustriales representan una fuente potencial y económica para la obtención de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante y antimicrobiana, es necesario aprovecharlos con este fin, a través de la obtención de extractos que pueden ser aplicados en la industria alimentaria para mantener la calidad de diversos alimentos y aumentar la vida de anaquel de los mismos. Como se ha demostrado, los subproductos obtenidos a partir de Agave también pueden ser una fuente rica de estos compuestos y tener una aplicación en la industria.



## HIPÓTESIS

Los extractos obtenidos de hojas de *Agave angustifolia* Haw, son ricos en compuestos bioactivos con capacidad antioxidante y antimicrobiana, los cuales prolongan la vida de anaquel de hamburguesas de res.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos ricos en compuestos bioactivos obtenidos de hojas de *Agave angustifolia* Haw, y su efecto sobre la calidad de hamburguesas de res.

### Objetivos Específicos

1. Evaluar el contenido de fenoles y flavonoides de extractos de hojas frescas y secas obtenidos mediante diferentes solventes.
2. Medir la capacidad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de hojas frescas y secas obtenidos mediante diferentes solventes.
3. Evaluar el efecto del mejor extracto antioxidante y antimicrobiano sobre la vida de anaquel de hamburguesas de res, a través de parámetros de calidad fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales, comparándolo con BHT y ácido gálico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Experimento I: Capacidad Antioxidante y Antimicrobiana de los Extractos

#### **Materia Prima y Reactivos**

Las hojas de *A. angustifolia* Haw fueron obtenidas de un productor local de Bacanora, ubicado en el municipio de Ures, Sonora, México (29° 42' latitud norte y 110° 38' longitud oeste). Las hojas fueron recolectadas de plantas adultas (8-9 años) utilizadas en la producción de Bacanora. Reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS<sup>+</sup>), persulfato de potasio, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>\*</sup>) y ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo., U.S.A.). Agar papa dextrosa (PDA), Caldo soya tripticasa (ST) y Agar Mueller Hinton (MH) fueron obtenidos de Difco BD. Todos los demás estándares y solventes fueron grado analítico y disponibles comercialmente de J. T. Baker. Se utilizó agua deionizada y destilada.

#### **Caracterización de las Hojas de Agave**

La caracterización se realizó evaluando propiedades físicas y fisicoquímicas como: largo y ancho (cm), peso (g), contenido de humedad (%) y pH.

## Preparación de las Muestras y Condiciones de Extracción

Las hojas fueron lavadas con agua clorada (250 ppm) durante 3 min, y posteriormente cortadas en trozos de 0.5 x 0.5 cm. Una mitad del material se utilizó en estado fresco (HF) para la extracción y la otra mitad se secó (HS) en un secador de flujo de aire (Blue M C-4850-Q, USA) a 50 °C durante 24 h, después fueron molidas (Krupps GX4100) y tamizadas a través de una malla número 50 (0.425 mm de apertura), y posteriormente utilizadas en la extracción.

Se prepararon tres tipos de extractos para cada tipo de hoja: 1) extractos obtenidos de la sonicación de la materia prima (SMP), 2) extractos macerados sin hidrolizar (MSH) y 3) extractos macerados hidrolizados (MH). Además, para los tres tipos de extractos se utilizaron tres solventes: metanol 80% (EM), etanol 80% (EE) y agua pura (A).

Para la obtención del extracto 1, se utilizó la metodología descrita por Ciriano *et al.* (2009) con algunas modificaciones. Primero, se mezclaron 20 mL de cada solvente con 10 g de materia prima y se homogenizaron durante 30 s a 11,000 rpm (Ultra Turrax T25, IKA-Werke, USA). Posteriormente, la mezcla fue sonicada (Branson, 2510R-DTH) durante 30 min y centrifugada a 14,000 rpm. El sobrenadante fue filtrado y el proceso fue repetido dos veces más, adicionando 10 mL de cada solvente.

Para obtener el extracto 2, en el caso de la extracción metanólica y etanólica se realizó de la siguiente manera: Se pesaron 10 g de materia prima y se mezclaron con 100 mL de cada solvente al 80%. Posteriormente se maceraron en condiciones de oscuridad durante un periodo de 10 d a 25 °C. Después, los extractos fueron filtrados y el solvente fue removido usando un evaporador rotatorio (Büchi 011, Switzerland) a presión reducida. La fracción acuosa resultante de la remoción del solvente, fue liofilizada formando el extracto seco. Para la extracción acuosa, se mezclaron 10 g de la materia prima con 100 mL de agua destilada a 100 °C, durante un periodo de 30 min.

Posteriormente, la mezcla se filtró y liofilizó obteniéndose el extracto seco. Las fracciones liofilizadas fueron resuspendidas en agua deionizada y congeladas a  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (Muthuswamy *et al.*, 2008).

El extracto 3 se obtuvo a partir del extracto 2. La hidrólisis se realizó como lo reportan Oboh y Rocha (2007). Primero se realizó una hidrólisis alcalina con 10 mL de NaOH 4M durante 4 h en ausencia de luz, seguido de una hidrólisis ácida con HCl 4M hasta que cada muestra tuviera un pH=2. La determinación de FT se realizó en los tres tipos de extractos (SMP, MSH, MH) y debido a que el mayor contenido se presentó en los extractos MSH, las demás determinaciones (flavonoides totales, capacidad antioxidante y antimicrobiana) fueron evaluadas en estos.

### **Contenido de Fenoles y Flavonoides Totales**

El contenido de FT fue medido según el método descrito por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se mezclaron 15  $\mu\text{L}$  del extracto con 75  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido [1:10] con agua destilada. Posteriormente, se adicionaron 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7.5%) y se incubó en oscuridad durante 30 min. Finalmente, se leyó la absorbancia a 765 nm (Fluorstar Omega BMG LABTECH). La concentración de FT fue calculada usando una curva estándar de ácido gálico (EAG) y los resultados fueron expresados como mg EAG/g peso seco (PS).

El contenido de flavonoides fue determinado basado en el método descrito por Zhishen *et al.* (1999) con ligeras modificaciones. Primero se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  del extracto con 400  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  (5%). Después de 5 min, se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  (10%), y un minuto más tarde, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de NaOH (1M) y 240  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Por último, se tomaron 150  $\mu\text{L}$  de la mezcla y se vertieron en la microplaca para leer

la absorbancia a 496 nm (Fluorstar Omega BMG LABTECH). El contenido de flavonoides fue calculado usando una curva estándar de catequina. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de catequina (EC)/g PS.

### **Inhibición del Radical DPPH<sup>•</sup>**

Esta prueba se basa en la medición de la habilidad de los antioxidantes para inhibir el radical estable DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidracil) (González-Aguilar *et al.*, 2007). Se preparó una solución 0.0634 mM de DPPH<sup>•</sup> en metanol y se mezclaron 140  $\mu$ L de la misma con 10  $\mu$ L de cada extracto. La mezcla fue agitada e incubada durante 30 min en la oscuridad. Después, se registró la absorbancia a 515 nm (Fluorstar Omega BMG LABTECH). Los resultados se calcularon utilizando una curva estándar de Trolox y fueron expresados como  $\mu$ mol equivalentes de Trolox (ET)/g PS.

### **Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC)**

Este análisis se basa en la habilidad de los antioxidantes para inactivar el radical ABTS<sup>•+</sup> comparado con la habilidad que presenta el análogo hidrosoluble de la vitamina E (Trolox) (Re *et al.*, 1999). Primero se generó el radical catión ABTS<sup>•+</sup> con la adición de 88  $\mu$ L de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (0.139 mM) en 5 mL de una solución 7 mM de ABTS y se dejó reposar durante 16 h. Posteriormente, se ajustó la absorbancia a  $0.7 \pm 0.02$  diluyéndolo en etanol. Una vez ajustado el radical, se tomaron 245  $\mu$ L de ABTS<sup>•+</sup> y se le adicionaron 5  $\mu$ L del extracto o el estándar Trolox. Posteriormente, las muestras fueron leídas a 734 nm y se monitoreó la absorbancia al minuto 1 y 6 después del mezclado. Los resultados

fueron calculados utilizando una curva estándar de Trolox y expresados como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox (ET)/g PS.

### **Capacidad Antifúngica**

La capacidad antifúngica fue probada contra *Alternaria alternata* usando la técnica de dilución en agar descrita por Feng y Zheng (2007). Para esto, se adicionaron diferentes concentraciones (25, 12.5, 6.25 y 0 mg/mL) del extracto en agar PDA estéril y posteriormente se vació el medio en cajas petri hasta su solidificación. Una vez solidificado el medio, se inoculó en el centro de la caja con el hongo. La eficiencia de los tratamientos fue evaluada a los 5 d de incubación a 25 °C. El área de crecimiento micelial ( $\text{cm}^2$ ) fue calculada por triplicado por medio del análisis digital de la imagen de cada caja utilizando el software UTHSCSA (ImageTool, version 3.0). Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata* al día 5.

### **Capacidad Antibacteriana y Concentración Mínima Inhibitoria**

Se evaluó la habilidad de cada extracto contra *Salmonella Choleraesuis* ATCC 7001, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43890 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 a través de la medición del diámetro de inhibición de acuerdo a la metodología descrita por Weerakkody *et al.* (2010). Primero se procedió con la activación de las cepas, para lo cual se transfirieron con un asa ( $\sim 20 \mu\text{L}$ ) cada una de las mismas a un tubo que contenía 10 mL de caldo ST estéril y se incubó a 37 °C durante 19 h. Posteriormente se ajustó el inóculo a la concentración de trabajo ( $1 \times 10^6$  UFC/mL). En cajas petri con agar MH solidificado se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de

cada inóculo a la concentración de trabajo y se homogenizaron en la superficie de la caja con perlas estériles. Posteriormente, se colocaron discos estériles con un diámetro de 7 mm, a los cuales se les adicionaron 70  $\mu$ L de cada extracto a una concentración de 25 mg/mL. Las cajas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h y finalmente, se midió el diámetro de inhibición. Los resultados fueron expresados como diámetro de inhibición en mm.

Para establecer las MICs se adicionaron 5  $\mu$ L de cada inóculo a la concentración de trabajo en una microplaca. Posteriormente, se añadieron 295  $\mu$ L de cada extracto probando diferentes concentraciones de los mismos (0-33.33 mg/mL) diluidos en caldo ST estéril. Se prepararon también controles a los cuales se les adicionó sólo caldo ST inoculado con cada bacteria sin la exposición a ningún antioxidante. Las microplacas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h y el crecimiento bacteriano se determinó a través de la medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm (Zhao *et al.*, 2003).

### **Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados a través de un análisis de varianza, (ANOVA) bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2, donde el primer factor fue el tipo de solvente (TS: metanol, etanol y agua) y el segundo la condición de la hoja (CH: fresco y seco). Las diferencias entre las medias fueron determinadas mediante la prueba de Tukey-kramer. Además, se determinaron correlaciones de Pearson entre el contenido de FT y la capacidad antioxidante. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado y procesadas en el paquete estadístico NCSS 2007, con un nivel de significancia del 5%.

## Experimento II: Aplicación del Extracto en un Producto Cárnico

Este experimento consistió en evaluar la eficacia del extracto acuoso sin hidrolizar de *A. angustifolia* Haw el cual presentó valores elevados de capacidad antioxidante y los mejores resultados antimicrobianos, para retardar la oxidación lipídica y deterioro microbiológico de hamburguesas de res durante su almacenamiento en refrigeración. El estudio comparó el efecto del extracto de agave con otros tratamientos que ya se ha reconocido su capacidad antioxidante y/o antimicrobiana.

### **Materiales y Reactivos**

Los reactivos utilizados en este experimental, fueron obtenidos de la casa comercial Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri; ácido tricloroacético (TCA), ácido-2-tiobarbitúrico (TBA), y 1,1,3,3 tetrametoxipropano (TMP), fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y fosfatos de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). También se utilizó agar cuenta estándar, obtenido de Difco <sup>TM</sup>.

### **Preparación de las Hamburguesas y Tratamientos**

Para la preparación de las hamburguesas se utilizaron piezas completas del corte comercial pulpa bola de res adquiridas de un productor local con un tiempo aproximado de 48 h *postmortem*. Primero, se molieron (Molino Hobart 4152) aproximadamente 5.6 kg de músculo entero a través de un plato con tamaño de orificio de 3/16" hasta su completa homogenización. La carne molida fue dividida en cuatro porciones iguales para llevar a cabo la fabricación de las



hamburguesas que fueron asignadas a uno de los siguientes cuatro tratamientos experimentales: 1) Control (C), sin antioxidante solo con la adición de 2% de agua pura; 2) adición de 100 ppm de ácido gálico (AG); 3) adición de 100 ppm de BHT; y 4) adición de 1500 ppm de extracto acuoso de hoja fresca de *A. angustifolia* sin hidrolizar (EA). Los tratamientos fueron incorporados manualmente a la carne molida, mezclándolos durante 5 min. Las hamburguesas (70 g) se moldearon en cajas petri (10 cm diámetro y 1 cm grosor). Se prepararon un total de 140 hamburguesas (35 por tratamiento), de las cuales 40 fueron utilizadas en las determinaciones fisicoquímicas, 40 en las microbiológicas y 60 en las sensoriales. Todas las hamburguesas fueron colocadas individualmente en platos de polipropileno y empacadas con una película de PVC ( $\sim 17 \text{ cm}^3/\text{m}^2$  día de permeabilidad al oxígeno y  $< 5 \text{ g}/\text{m}^2$  día de permeabilidad a la humedad) y almacenadas en refrigeración durante 9 d a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  en presencia de luz ( $\sim 70$  candelas). En cada tiempo de muestreo (0, 3, 5, 7 y 9 d) se tomaban 7 hamburguesas por tratamiento, de las cuales 2 eran utilizadas en las determinaciones fisicoquímicas, 2 en las microbiológicas y 3 en las sensoriales.

## **Determinaciones Fisicoquímicas**

Medición de pH. El pH se midió con la homogenización por duplicado de 3 g de cada muestra con 27 mL de agua destilada utilizando un potenciómetro Hanna modelo 211 (USA).

Medición del color. El color se midió en la superficie de cada muestra con un colorímetro (KONICA MINOLTA CR-400, Japón). La medición del color incluyó la determinación de los valores  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , y estimación del ángulo de matiz ( $\text{Hue}^\circ$ ). Donde el parámetro de color  $L^*$  representa la luminosidad o palidez de

la carne y tiene una escala que va desde un valor de 0 que es un negro total, hasta 100, que representa un blanco perfecto. El valor  $a^*$  va de la escala positiva a negativa siendo rojo el positivo y verde cuando es negativo. El valor  $b^*$  que determina el color amarillo si los valores son positivos y azul cuando es negativo (Litter, 1995). El ángulo de matiz o Hue° se calculó con la fórmula  $\tan^{-1}(b^*/a^*)$  (Mc. Lelland *et al.*, 1995).

Determinación de la Oxidación de Lípidos (TBARS). La oxidación de lípidos se realizó determinando las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), de acuerdo con la metodología descrita por Pfalzgraf *et al.* (1995). El procedimiento consistió en la homogenización de 5 g de carne con 15 mL de TCA (10%) (Ultra Turrax T25, IKA-Werke, USA) a 11,000 rpm durante 1 min, evitando el aumento de temperatura, manteniendo los tubos en hielo. Después, la muestra fue filtrada y se tomaron 2 mL de filtrado, los cuales se mezclaron con 2 mL de una solución 20 mM de TBA recién preparada. Posteriormente, los tubos se homogenizaron durante 30 s y se calentaron a 97 °C durante 20 min en baño maría para permitir el desarrollo del color. Después, los tubos se enfriaron en hielo y se realizó la lectura de las muestras a 532 nm (Spectronic Genesis 5, Termo Electrón Corporation, USA). Los resultados fueron calculados utilizando una curva estándar de 1,1,3,3-tetrametoxipropano y expresados como mg de malonaldehído MDA/kg de muestra.

Porcentaje de Metamioglobina (MetMb). La preparación de la muestra se realizó de acuerdo a Lee (1998). Primero, se pesaron 2 g de muestra y se introdujeron en un tubo de polipropileno con capacidad de 50 mL, posteriormente, se le adicionaron 20 mL de buffer fosfato helado (pH=6.8; 40 mM). Se continuó con una homogenización de la muestra (Ultra Turrax T25, IKA-Werke, USA), a 11,300 rpm. Posteriormente, se centrifugó (Beckman refrigerada J2-21) a 5,000 rpm, durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado y la absorbancia fue

leída a 700, 572 y 525 nm, en un espectrofotómetro (Spectronic Genesis 5, Termo Electrón Corporation, USA). El manejo de la muestra se realizó utilizando hielo para evitar el aumento de la temperatura. El porcentaje de MetMb fue determinado usando la formula de Krzywicki (1982):

$$\% \text{ MetMb} = \{1.395 - [(A_{572} - A_{700}) / (A_{525} - A_{700})]\} \times 100$$

## **Determinaciones Microbiológicas**

Cuenta Total de Mesófilos y Psicrófilos Aerobios. En cada intervalo de muestreo se tomaron 2 hamburguesas de cada tratamiento, las cuales fueron abiertas asépticamente y se tomó una porción de 10 g del centro de la pieza. Esta porción fue homogenizada con 90 mL de la solución reguladora de fosfatos (NOM-110-SSA1-1994) durante 1 min para preparar la dilución inicial. Posteriormente, se realizaron diluciones apropiadas ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ), de las cuales se tomó 1 mL y se homogenizó en cajas petri con 15-20 mL de agar cuenta estándar estéril. Después, las cajas solidificadas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante 48 h para mesófilos y a 5 °C durante 7 d para psicrófilos. Las cuentas de las bacterias se realizaron por triplicado y fueron expresadas como  $\log_{10}$  de unidades formadoras de colonias UFC/g de muestra (NOM-092-SSA1-1994).

## **Determinaciones Sensoriales**

Las hamburguesas fueron evaluadas por un panel entrenado de 8 personas utilizando un método de análisis cuantitativo-descriptivo para los diferentes atributos. Aunque los panelistas tienen 8 años realizando este tipo de evaluaciones, se realizaron dos sesiones previas a la evaluación para que se familiarizaran con los atributos a evaluar y la escala utilizada. Se evaluaron

atributos como pérdida de olor y sabor a fresco en hamburguesas cocinadas (72 °C temperatura interna), así como también color y decoloración en la superficie de hamburguesas frescas a través de una escala de cinco puntos (AMSA, 2005). En la escala de olor y sabor, se evaluó la intensidad de olores y sabores asociados con el deterioro de la carne: 1=Nada; 2=Ligero; 3=Poco; 4=Moderado y 5=Extremo. En la escala de color superficial se evaluaron las tonalidades que puede tomar la carne durante su almacenamiento: 1=Rojo cereza brillante; 2=Rojo cereza no brillante; 3=Rojo firme; 4=Café rojizo y 5=Café grisáceo. En la escala de decoloración, se evaluó el porcentaje de decoloración en la superficie: 1=Nada; 2=1-10%; 3=11-20%; 4=21-60% y 5=61-100% (Sánchez-Escalante *et al.*, 2003). El formato de la evaluación sensorial se muestra en el Anexo 1. La evaluación de olor y sabor se realizó utilizando luz roja en el ambiente y se les proporcionó a los panelistas  $\frac{1}{4}$  de la hamburguesa recién cocinada (17.5 g aproximadamente), así como también agua y galleta entre cada muestra para reducir rastros de la muestra anterior. La evaluación de color y decoloración se realizó utilizando luz blanca ambiental y se les proporcionó a los panelistas paletas de color y decoloración comparativas elaboradas por nuestro grupo de trabajo.

### **Análisis Estadístico**

Los resultados fueron analizados a través de un ANOVA de dos vías, bajo un diseño completamiento al azar con arreglo factorial 5x4 donde el primer factor fueron los días de almacenamiento (TA: 0, 3, 5, 7 y 9) y el segundo los tratamientos aplicados (TRAT: AG, BHT, EA y C). Las diferencias entre las medias fueron determinadas mediante la prueba de Tukey-kramer. Además, se determinaron correlaciones de Pearson entre el color rojo ( $a^*$ ), TBARS y % MetMb, así como también entre la decoloración y la pérdida de olor y sabor a fresco. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado y procesadas en el paquete estadístico NCSS 2007, con un nivel de significancia del 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Experimento I

#### **Caracterización de las Hojas de Agave**

Las dimensiones largo y ancho de las hojas de *A. angustifolia* Haw fueron  $108.5 \pm 11.74$  y  $6.43 \pm 1.03$  cm respectivamente. Gentry (1982) caracterizó esta planta y reportó que dichas dimensiones pueden ir desde 50-120 cm de largo y de 4-8 cm de ancho en plantas adultas. Las dimensiones de las hojas utilizadas en el presente estudio, confirma que estas provinieron de plantas adultas con edad suficiente para ser procesadas. Por otro lado, Rodríguez-Garay *et al.*, (2009) reportan que estas plantas poseen entre 120-175 hojas por roseta, asociando este dato con el peso promedio de las hojas (538.9 g), se puede hacer una aproximación de la cantidad de subproductos generados durante el procesado de cada una de estas plantas. También se evaluó el contenido de humedad ( $79.18 \pm 2.73\%$ ) el cual se encuentra cercano al encontrado en hojas de maguey morado (91.5%) (Reyes-Munguía *et al.*, 2009). El pH promedio de las hojas fue  $5.25 \pm 0.05$ .

## Contenido de Compuestos Fenólicos

En el Cuadro 1 se muestra el contenido promedio de FT obtenidos con diferentes solventes (TS) y condición de la hoja (CH). El contenido de FT fue afectado ( $P < 0.05$ ) por los factores TS, CH y su interacción en los tres tipos de extractos. De manera general, se obtuvo un mayor contenido de FT en los extractos sin hidrolizar respecto a los hidrolizados y la materia prima. Esto puede deberse a la diferencia en los métodos de extracción, además posiblemente la hidrólisis empleada no fue suficiente para liberar los polifenoles ligados que se encuentran como constituyentes de las fibras de las hojas de agave (García *et al.*, 2005). Esto muestra que sólo se extrajeron los polifenoles que se encuentran en forma libre, por lo tanto no existió una marcada diferencia entre el contenido de FT de los extractos sin hidrolizar e hidrolizados (Oboh y Rocha, 2007).

En la materia prima (extracto 1), el contenido más alto de FT fue obtenido en la extracción acuosa de HS y el más bajo en la metanólica de HF. Con respecto al efecto de la interacción, en la extracción acuosa, el contenido de FT fue mayor en la HS (10.68 mg EAG/g PS) que en la HF (2.60 mg EAG/g PS). El menor contenido se obtuvo en la extracción etanólica respecto a las otras dos, resultando valores similares ( $P > 0.05$ ) para HF y HS (1.42 y 1.76 mg EAG/g PS respectivamente); mientras que en la extracción metanólica el valor fue mayor en la HS (3.89 mg EAG/g PS) que en la HF (1.15 mg EAG/g PS). En cuanto al contenido de FT en los extractos sin hidrolizar, los valores más altos fueron obtenidos también en la extracción acuosa y se obtuvo un mayor contenido en la HS respecto a la HF (42.84 vs 36.92 mg EAG/g PS). En la extracción etanólica, el contenido de FT fue mayor en la HS que en la HF ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, en la extracción metanólica los valores no sufrieron cambios por la condición de la hoja ( $P > 0.05$ ).

Cuadro 1. Contenido de compuestos fenólicos de extractos de hojas de *A. angustifolia* Haw obtenidos mediante diferentes tipos de solventes y condición de la hoja.

Condición <sup>3</sup>	Tipo de solvente						EEM <sup>2</sup>	TS	Significancia <sup>1</sup>	
	Agua		Etanol		Metanol				CH	TS x CH
	HF	HS	HF	HS	HF	HS				
Fenoles totales <sup>4</sup>										
<i>Materia prima</i>	2.60 <sup>c</sup>	10.68 <sup>a</sup>	1.42 <sup>de</sup>	1.76 <sup>d</sup>	1.15 <sup>e</sup>	3.89 <sup>b</sup>	0.086	**	**	**
<i>E. sin hidrolizar</i>	36.92 <sup>b</sup>	42.84 <sup>a</sup>	20.31 <sup>d</sup>	31.23 <sup>c</sup>	29.93 <sup>c</sup>	30.06 <sup>c</sup>	0.925	**	**	**
<i>E. hidrolizado</i>	42.55 <sup>a</sup>	45.87 <sup>a</sup>	24.31 <sup>c</sup>	33.34 <sup>b</sup>	18.55 <sup>d</sup>	27.96 <sup>c</sup>	0.349	**	**	**

<sup>1</sup> TS: Tipo de solvente, CH: condición de la hoja, TS x CH: Interacción. \* (P≤0.05), \*\* (P≤0.01). NS: no significativo.

<sup>2</sup> EEM: Error estándar de la media.

<sup>3</sup> HF: Hoja fresca, HS: hoja seca.

<sup>4</sup> mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g peso seco (PS).

<sup>abcde</sup> Medias con diferente literal dentro de hilera, indican diferencias (P≤0.05).

Respecto al contenido de FT en los extractos hidrolizados, al igual que en las etapas anteriores, aquellos obtenidos por extracción acuosa fueron más altos que los obtenidos en la extracción etanólica y metanólica, sin embargo no hubo efecto de la condición de la hoja ( $P > 0.05$ ). Por otro lado, en la extracción etanólica se obtuvo un mayor contenido de FT ( $P < 0.05$ ) en la HS respecto a la HF (33.34 vs 24.31 mg EAG/g PS) y de igual forma, en la extracción metanólica los valores de FT fueron mayores en la HS que en la HF.

La obtención de un mayor contenido de FT en la extracción acuosa en los tres tipos de extractos preparados, puede deberse principalmente a la mayor solubilidad que presentan los compuestos fenólicos de las hojas de agave en agua ya que existen algunos de naturaleza lipofílica y otros de naturaleza hidrofílica (Alothman *et al.*, 2009). Por lo tanto, la polaridad del solvente juega un papel muy importante en su solubilidad. Generalmente, los solventes menos polares se utilizan para extraer compuestos fenólicos lipofílicos (Naczki y Shahidi, 2006).

Los resultados encontrados concuerdan con los reportados por Sousa *et al.* (2008) quienes realizaron extracciones en “alcaparras” con dos tipos de solventes, observando que el extracto acuoso presentó mayor contenido de FT que el metanólico (15.48 y 4.86 mg EAG/g PS, respectivamente). Sin embargo, existen otras investigaciones donde el mayor contenido de FT se obtuvo en la extracción metanólica, que la realizada con etanol y agua (Rababah *et al.*, 2010). Por lo tanto, no existe una regla sobre la cantidad de compuestos que se pueden extraer mediante los diferentes solventes, sino que depende también de la naturaleza del material vegetal.

Por otro lado, evaluar las hojas en estas dos condiciones permite hacer comparaciones entre extractos obtenidos de tejidos secos (hierbas, especias) y los obtenidos de tejidos frescos (frutas, verduras). En lo que a esto respecta, se realizó un estudio donde se evaluaron diferentes hierbas de la familia de las Lamiaceae y se reportó que los extractos obtenidos de aquellas que se



encontraban en estado seco presentaron un mayor contenido de FT que las frescas (Capecka *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que existe poca información sobre extractos obtenidos de plantas de Agave o similares, sin embargo en un estudio realizado por Reyes-Munguía *et al.* (2009) en hojas de maguey morado, se encontraron valores de 2.1 y 3.0 mg EAG/mL de infusión para hoja fresca y seca respectivamente, concluyendo que las mejores propiedades antioxidantes se obtuvieron en las hojas secas, lo cual puede deberse a que en estas existe una mayor concentración de compuestos fenólicos debido a la remoción de agua. En otro estudio realizado por Ben-Hamissa *et al.* (2012) en hojas de *A. americana* se realizaron extracciones a diferentes temperaturas y tiempos de extracción, encontrando que conforme incrementa el tiempo y la temperatura, también incrementa el contenido de compuestos fenólicos.

El contenido de flavonoides sólo se evaluó en los extractos sin hidrolizar debido a que en estos se encontró el mayor contenido de FT, y se observa (Cuadro 2) que fue afectado por los factores principales y su interacción. En la extracción acuosa de HS se obtuvo un mayor contenido de flavonoides ( $P < 0.05$ ) respecto a la HF (6.46 vs 4.43 mg EC/g PS). Así mismo, tanto en la extracción etanólica como metanólica se obtuvieron valores más elevados en la HS que en la HF. Debido a que los flavonoides se encuentran dentro de la familia de compuestos fenólicos, las significancias encontradas mostraron un comportamiento similar que las observadas para FT.

En un estudio realizado en frutas tropicales donde se utilizaron diferentes solventes (agua, metanol 90% y etanol 90%), se encontró el mismo comportamiento que el encontrado en esta investigación ya que los extractos acuosos obtenidos a partir de pulpa de piña y banana presentaron la mayor concentración de flavonoides que los extractos metanólicos y etanólicos. Sin embargo, en pulpa de guayaba el extracto etanólico presentó el mayor contenido que los otros dos (Alothman *et al.*, 2009). En otro estudio realizado con hojas de *Limoniastrum monopetalum* se encontró que el extracto etanólico

Cuadro 2. Contenido de flavonoides y capacidad antioxidante de extractos sin hidrolizar de hojas de *A. angustifolia* Haw obtenidos mediante diferentes tipos de solventes y condición de la hoja.

Condición <sup>3</sup>	Tipo de solvente						EEM <sup>2</sup>	TS	Significancia <sup>1</sup>	
	Agua		Etanol		Metanol				CH	TS x CH
	HF	HS	HF	HS	HF	HS				
Flavonoides <sup>4</sup>	4.43 <sup>b</sup>	6.46 <sup>a</sup>	3.27 <sup>c</sup>	5.84 <sup>a</sup>	3.44 <sup>c</sup>	4.59 <sup>b</sup>	0.156	**	**	**
DPPH <sup>5</sup>	280.1 <sup>b</sup>	281.8 <sup>a</sup>	106.2 <sup>c</sup>	105.9 <sup>c</sup>	104.7 <sup>d</sup>	104.2 <sup>d</sup>	0.055	**	NS	**
TEAC <sup>6</sup>	210.3 <sup>b</sup>	213.3 <sup>a</sup>	207.3 <sup>c</sup>	206.2 <sup>cd</sup>	205.2 <sup>d</sup>	207.3 <sup>c</sup>	0.416	**	**	**

<sup>1</sup> TS: Tipo de solvente, CH: condición de la hoja, TS x CH: Interacción. \* (P≤0.05), \*\* (P≤0.01). NS: no significativo.

<sup>2</sup> EEM: Error estándar de la media.

<sup>3</sup> HF: Hoja fresca, HS: hoja seca.

<sup>4</sup> mg equivalentes de catequina (EC)/g PS.

<sup>5</sup> DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil): μmol equivalentes de Trolox (ET)/g PS.

<sup>6</sup> TEAC: μmol equivalentes de Trolox (ET)/g PS.

<sup>abcde</sup> Medias con diferente literal dentro de hilera, indican diferencias (P≤0.05).

80% (4.78 mg EC/g PS) presentó el más elevado contenido de flavonoides que el acuoso y el metanólico 80% (1.07 y 3.35 mg EC/g PS, respectivamente), concluyendo que la adición de agua al solvente contribuye con la extracción de flavonoides (Trabelsi *et al.* 2010).

## Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante también fue medida en los extractos sin hidrolizar, mediante la inhibición del radical estable DPPH<sup>•</sup> y del radical catión ABTS<sup>•+</sup> (TEAC), y los resultados se muestran en el Cuadro 2. En la inhibición del radical DPPH<sup>•</sup> se encontró efecto significativo del TS y la interacción TS x CH (P<0.05). La mayor actividad antirradicaria (DPPH<sup>•</sup>) fue encontrada en la extracción acuosa con valores casi tres veces superiores (280  $\mu\text{mol ET/g PS}$ ) a los obtenidos en la extracción etanólica y metanólica (~104  $\mu\text{mol ET/g PS}$ ). Sólo se observó diferencia de la CH en la extracción acuosa siendo mayor (P<0.05) en la HS que en la HF. Con respecto a la capacidad antioxidante contra el radical ABTS<sup>•+</sup>, se encontró efecto de los factores principales y su interacción (P<0.05), observándose comportamiento similar que para DPPH<sup>•</sup>, con valores mayores (P<0.05) en la extracción acuosa de HS (213.3  $\mu\text{mol ET/g PS}$ ) con respecto a la HF. Mientras que en la extracción etanólica y metanólica, los valores fueron similares y alrededor de 206  $\mu\text{mol ET/g PS}$ .

Diversos estudios han reportado una fuerte correlación positiva entre el contenido de FT y la capacidad antioxidante de los extractos (Turkmen *et al.* 2006; Andarwulan *et al.* 2010). Es por eso que los extractos que presentaron el contenido más elevado de FT, también presentaron la mayor capacidad antioxidante. Se encontraron correlaciones positivas y significativas (P<0.001) entre FT y capacidad antioxidante de los extractos (r=0.81 para DPPH<sup>•</sup> y r=0.72 para TEAC). Los extractos acuosos presentaron mayor eficacia para inhibir los radicales (DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>) que los obtenidos con solventes de menor polaridad

(metanólicos y etanólicos). Por lo tanto, en los extractos de hoja de *A. angustifolia* Haw puede encontrarse una mayor proporción de compuestos bioactivos de naturaleza hidrofílica.

En estudios similares, también se ha presentado una mayor capacidad antioxidante en extractos acuosos que en los metanólicos y etanólicos (Sousa *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Sin embargo, en un estudio realizado con diferentes variedades de zarzamora, los compuestos presentaron mayor afinidad hacia el metanol ya que mostraron mayor capacidad antioxidante (DPPH<sup>\*</sup>=125.96-177.1; ABTS<sup>\*\*</sup>=108.43-146.89  $\mu\text{mol ET/g PS}$  respectivamente) que los obtenidos con agua (DPPH<sup>\*</sup>=90.93-123.37; ABTS<sup>\*\*</sup>=74.92-93.13  $\mu\text{mol ET/g PS}$  respectivamente) (Sariburun *et al.*, 2010). De acuerdo a los resultados reportados en el estudio anterior, se puede observar que la capacidad antioxidante que mostraron las diferentes variedades de zarzamora se encuentra por debajo de la encontrada en los extractos del presente estudio. Por lo tanto, se pueden considerar estos como una potente fuente antioxidante.

### **Actividad Antifúngica y Antibacteriana**

En el Cuadro 2 se muestran los porcentajes de inhibición contra *A. alternata* y los diámetros de inhibición (mm) contra los patógenos estudiados. Para los extractos utilizados a una concentración de 25 mg/mL contra *A. alternata* sólo se encontró efecto de CH ( $P < 0.05$ ), observándose un porcentaje de inhibición de 82.4% del extracto de HS que fue diferente al de HF (32.6%). Para los extractos probados a una concentración de 12.5 mg/mL se observó efecto significativo del TS y de CH ( $P < 0.05$ ). Respecto al tipo de extracción se observó un mayor porcentaje de inhibición en la extracción etanólica (44.6%) el cual fue diferente al de la acuosa y metanólica (37.8 y 35.6% respectivamente). Así mismo los extractos de HS tuvieron un mayor ( $P < 0.05$ ) porcentaje inhibición que los de HF. Para la concentración menor del extracto también se observó

Cuadro 3. Actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de hojas de *Agave angustifolia* Haw obtenidos mediante diferentes tipos de solvente y condición de la hoja.

	Tipo de solvente			Condición de la hoja <sup>1</sup>			Significancia <sup>2</sup>		
	Agua	Etanol	Metanol	HF	HS	EEM <sup>3</sup>	TS	CH	TS x CH
<b>Antifúngica<sup>4</sup></b>									
25	55.3 <sup>a</sup>	60.6 <sup>a</sup>	56.6 <sup>a</sup>	32.6 <sup>y</sup>	82.41 <sup>x</sup>	2.19	NS	**	NS
12.5	37.8 <sup>b</sup>	44.6 <sup>a</sup>	35.59 <sup>b</sup>	14.9 <sup>y</sup>	63.75 <sup>x</sup>	1.45	**	**	NS
6.25	30.0 <sup>b</sup>	36.4 <sup>a</sup>	28.1 <sup>b</sup>	11.9 <sup>y</sup>	51.1 <sup>x</sup>	1.45	**	**	NS
<b>Antibacteriana<sup>5</sup></b>									
<i>E. coli</i>	7.8	8.8	8.4	8.1	8.6	0.16	NS	NS	NS
<i>S. Choleraesuis</i>	8.0	8.4	8.3	8.3	8.2	0.32	NS	NS	NS
<i>S. aureus</i>	8.2	7.8	8.1	8.0	8.1	0.18	NS	NS	NS
<i>L. monocytogenes</i>	8.0	8.8	8.3	8.1	8.5	0.27	NS	NS	NS

<sup>1</sup>HF: Hoja fresca, HS: Hoja seca.

<sup>2</sup>TS: Tipo de solvente, CH: Condición de la hoja, TS x CH: Interacción. \* (P≤0.05), \*\* (P≤0.01). NS: no significativo.

<sup>3</sup>EEM: Error estándar de la media.

<sup>4</sup>Reportada como % de inhibición al día 5 y evaluada contra *Alternaria alternata* a 3 diferentes concentraciones del extracto (mg/ mL).

<sup>5</sup>Diámetro de inhibición en mm.

<sup>ab</sup>Medias con diferente literal dentro de hilera, indican diferencias (P≤0.05) para TS.

<sup>xy</sup>Medias con diferente literal dentro de hilera, indican diferencias (P≤0.05) para CH

efecto del TS y la CH ( $P < 0.05$ ) siendo mayores los valores en la extracción etanólica de hoja seca.

En un estudio realizado por Feng *et al.* (2011) reportaron que el porcentaje de inhibición contra *A. alternata* de aceite esencial de tomillo, aumentó conforme incrementó la concentración del aceite y en la concentración máxima (500  $\mu\text{L/L}$ ) se encontraron porcentajes de inhibición cercanos al 62%, los cuales se encuentran por debajo de los encontrados en esta investigación a una concentración de 25 mg/mL para HS, esto puede deberse a la diferencia en la concentración a la que fueron aplicados.

Se han reportado diversos sitios de acción de los compuestos antifúngicos, entre los que se incluyen la membrana celular, pared celular, el sistema genético, enzimas metabólicas, etc. (Conner, 1993). Su mecanismo de acción depende de las concentraciones utilizadas en los alimentos, causando la inhibición o inactivación de los hongos (Delaquis *et al.*, 2002).

En el caso de la actividad antibacteriana (Cuadro 3), no se observó una dependencia de la sensibilidad de las bacterias hacia los compuestos bioactivos obtenidos mediante los diferentes tipos de solventes y condición de la hoja ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, todos los extractos fueron efectivos para inhibir el crecimiento de los patógenos. En general, no se encontró diferencia entre la inhibición de las bacterias gram-negativas y gram-positivas, mostrando todos los patógenos diámetros de inhibición similares (alrededor de 8 mm). Contrario a esto, se ha reportado que las bacterias gram-negativas son más resistentes que las gram-positivas, lo cual es atribuido a las diferencias en la composición de la pared celular (Negi *et al.*, 2003).

La MIC (por sus siglas en inglés) se refiere a la concentración mínima del extracto (mg/mL) requerida para inhibir el crecimiento microbiano después del periodo de incubación. En el Cuadro 4 se presentan las MICS de los extractos contra los patógenos analizados y se puede observar que en general todos pudieron inhibir su crecimiento. El extracto que presentó las MICS más bajas

Cuadro 4. Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) de extractos de hojas frescas y secas de *A. angustifolia* Haw obtenidos con diferentes solventes contra bacterias patógenas alimentarias

Condición <sup>1</sup>	Tipo de solvente					
	Agua		Etanol		Metanol	
	HF	HS	HF	HS	HF	HS
Patógeno						
<i>E. coli</i>	18.74	>33.33	28.10	29.14	>33.33	22.90
<i>S. Choleraesuis</i>	20.82	>33.33	33.33	28.10	>33.33	32.26
<i>S. aureus</i>	19.50	>33.33	28.90	29.00	>33.33	24.98
<i>L. monocytogenes</i>	19.25	>33.33	28.72	26.50	>33.33	23.94

<sup>1</sup>HF=Hoja fresca; HS=Hoja seca

fue el acuoso de HF con valores que van desde (18.74-20-82 mg/mL). Por otro lado, las MICS más elevadas se encontraron en el extracto acuoso de hoja seca y en el metanólico de hoja fresca con valores por encima de 33.33 mg/mL.

Almajano *et al.* (2008), reportaron diámetros de inhibición contra *E. coli* que van desde 6.2-6.4 mm para extractos de té verde y blanco, aplicados a una concentración de 15 mg/mL. Así mismo, Lee *et al.* (2012) reportaron diámetros de inhibición contra *S. Choleraesuis* de 9.7 mm para extractos de aceite esencial de *Zanthoxylum piperitum*. En extractos de diferentes fracciones de aguacate var “Hass” se han encontrado diámetros de inhibición contra *S. aureus* que van desde 5.80-8.33 mm y contra *L. monocytogenes* desde 5.07-9.27 mm (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en esta investigación se encuentran cercanos a los reportados en estos estudios, por lo que puede considerarse que los extractos de hojas de *A. angustifolia* Haw podrían servir como agentes antimicrobianos en diferentes sistemas alimenticios.

El mecanismo antimicrobiano de los compuestos fenólicos, aún no ha sido bien elucidado. Sin embargo, se ha sugerido que estos compuestos pueden causar cambios en la membrana a través de la interacción con los grupos carboxílicos de los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas de la membrana celular, alterando de esta manera su permeabilidad (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009).

Debido a que el extracto acuoso sin hidrolizar de HS presentó un elevado contenido de FT (36.92 mg EAG/g PS), flavonoides (4.43 mg EC/g PS), capacidad antioxidante (DPPH<sup>\*</sup>=280.1 y TEAC=210.3  $\mu$ mol ET/g PS) y las MICS más pequeñas (18.74-20.82 mg/mL) se seleccionó para su aplicación en hamburguesas de res y demostrar su efectividad para mantener la calidad de las mismas.



## Experimento II

### **Evaluaciones Fisicoquímicas**

Medición del pH. El pH de las muestras fue disminuyendo conforme aumentó el tiempo de almacenamiento (TA) ( $P < 0.05$ ), registrándose valores desde 5.75 en el día cero, hasta 5.48 al día siete, también se encontró un aumento del mismo en el día 9 hasta 5.64. Por otro lado, se observó una disminución del pH debido a la adición de los antioxidantes ( $P < 0.05$ ), ya que el control (pH=5.66) presentó valores más elevados que los demás tratamientos (pH=5.61). Los valores de pH no fueron graficados.

La adición de extractos naturales en hamburguesas ha demostrado disminuir el pH, debido principalmente a la naturaleza ácida de los mismos. En un estudio donde se aplicó puré de ciruela en hamburguesas se encontraron valores de pH para el control de 5.9, mientras que para los demás tratamientos (5, 10 y 15% de puré) se encontraron en el rango de 5.4-5.7 (Yildiz-Turp y Serdaroglu, 2010). También extractos de diferentes partes de la planta *Nelumbo nucifera* redujeron el pH de hamburguesas almacenadas en refrigeración (Huang *et al.*, 2011).

Color de las hamburguesas. El comportamiento del color instrumental ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $Hue^\circ$ ) de hamburguesas almacenadas en refrigeración se muestra en la Figura 1. La Fig. 1A muestra el comportamiento de  $L^*$  y se puede observar que fue afectado ( $P < 0.05$ ) tanto por el TA, los tratamientos (TRAT) aplicados y su interacción. Los cambios en la luminosidad se observaron a partir del día 3, resultando valores más bajos ( $P < 0.05$ ) en el control (39.34) que en los demás tratamientos (39.9-40.2). En el día 7, las muestras presentaron un aumento en

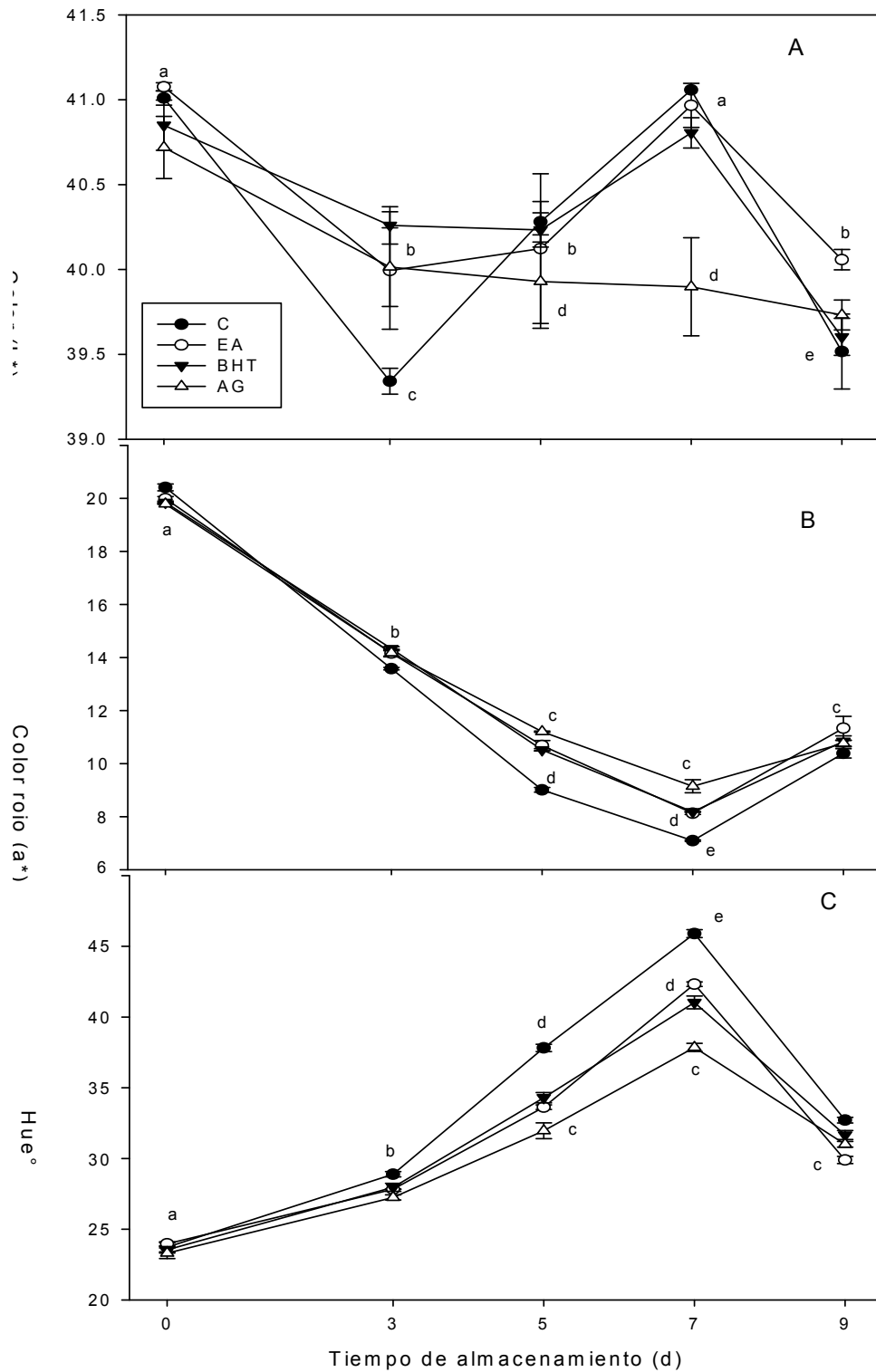


Figura 1. Efecto de los tratamientos (C=Control; EA=Extracto de Agave; BHT y AG=Ácido gálico) sobre L\* (A), a\* (B) y ángulo Hue° (C) de hamburguesas de res almacenadas en refrigeración.

la luminosidad, sin embargo, las hamburguesas con AG fueron perdiendo la misma a través de su almacenamiento. Por otro lado, en el día 9 la luminosidad más elevada se observó en el tratamiento EA ( $P < 0.05$ ).

El comportamiento del color rojo ( $a^*$ ) de las muestras durante el almacenamiento, se observa en la Fig. 1B. En general este, fue afectado por los tratamientos, el tiempo de almacenamiento y su interacción ( $P < 0.05$ ). Los cambios más importantes en el color rojo se observaron a partir del día 5, donde las hamburguesas a las que se les aplicó antioxidantes lo mantuvieron en valores (10.5-11.2) más elevados ( $P < 0.05$ ) que el control (9.01). Por otro lado, en el día 7, las muestras con AG siguieron manteniendo el color rojo igual que en el día 5 ( $P > 0.05$ ) y los tratamientos de BHT y EA presentaron un comportamiento similar entre ellos, estabilizando el color por mayor tiempo ( $P < 0.05$ ) que el control. En el último día de almacenamiento, las muestras retomaron el color rojo hasta valores entre 10.38-11.33, esto puede deberse a las reacciones que puede llevar a cabo la mioglobina con diferentes compuestos como el óxido nítrico y monóxido de carbono manteniendo a la misma en su estado ferroso (Young y West, 2001).

El ángulo Hue° que puede tomar valores desde 0 a 360° y representa la saturación de color, se muestra en la Fig 1C, en la cual se observa que este presentó un comportamiento similar que el valor  $a^*$  debido a que tiene una dependencia de este parámetro. Los cambios significativos se notaron a partir del día 5, presentando una mayor saturación ( $P < 0.05$ ) de color rojo las muestras con antioxidantes respecto a las del grupo control. En el día 7, el EA y el BHT presentaron un comportamiento similar entre ellos, pero diferente ( $P < 0.05$ ) a los demás tratamientos. En el último día, se encontraron valores similares ( $P > 0.05$ ) para los cuatro tratamientos.

A pesar de que esta es la primera investigación que evalúa la incorporación de extractos de Agave en hamburguesas, existen otros antioxidantes naturales que han demostrado estabilizar el color de la carne satisfactoriamente. Por ejemplo, el puré de Noni (*Morinda citrifolia*) evaluado a

tres concentraciones (2, 4 y 6%) estabilizó por más tiempo el color de hamburguesas de res. En esta misma investigación los valores de  $L^*$  decrecieron más en el control respecto a las hamburguesas conteniendo Noni, durante todo el periodo de almacenamiento (Tapp *et al.*, 2012). En otro estudio donde se probó la adición de ascorbato, extracto de semilla de uva y te verde en hamburguesas de res, se observaron resultados distintos al presente estudio, ya que los valores de  $L^*$  no fueron modificados por los tratamientos (Bañón *et al.*, 2007).

En la mayoría de las investigaciones con agentes antioxidantes en carnes, el color rojo de ésta se ha mantenido durante mayor tiempo gracias a la adición de los extractos. Esto se debe principalmente a la capacidad que presentan estos compuestos para donar electrones, atrapar metales, y así, mantener la mioglobina en su estado reducido (Oximioglobina) (Faustman *et al.*, 2010).

En un estudio realizado por Hayes *et al.* (2010), se evaluó el efecto de la adición de luteína, sesamol, ácido elágico y extracto de hoja de olivo en hamburguesas de res. Ellos reportaron que el sesamol no tuvo la habilidad de mantener el color rojo de la carne. Sin embargo, la luteína y el extracto de hoja de olivo si lograron mantener el color rojo durante mayor tiempo comparados con el control. En otro estudio, donde se adicionó extracto de grosella negra (*Ribes nigrum L.*) en hamburguesas de puerco, el color rojo se mantuvo por mayor tiempo que en el control. Además, este comportamiento también fue atribuido al contenido de antocianinas en el extracto de la fruta (Jia *et al.*, 2012). Por tanto, el color rojo de la carne puede ser mantenido durante su almacenamiento, debido al efecto de la concentración o bien a la naturaleza de los extractos utilizados.

Cuando los valores de Hue° son más cercanos a cero, se presenta una mayor saturación de color rojo, por lo tanto, cuando se aplican antioxidantes en hamburguesas, este se mantiene más bajo que el control (Faustman *et al.*, 2010). Un efecto similar al encontrado en esta investigación fue reportado en

hamburguesas de res almacenadas a 2 °C y tratadas con diferentes antioxidantes (carnosina, quercetina, resveratrol y rutina) a diferentes concentraciones, ya que los resultados demostraron que todas las hamburguesas tratadas con antioxidante presentaron valores de Hue° significativamente más bajos que el control durante un periodo de almacenamiento de 9 días (Bekhit *et al.*, 2003).

Oxidación de Lípidos y Porcentaje de MetMb. La oxidación lipídica es uno de los principales factores que afectan la calidad de la carne y su comportamiento en hamburguesas de res adicionadas con EA, BHT y AG se muestra en la Fig. 2A. Se observa que la formación de malonaldehído fue afectada por los tratamientos, el tiempo de almacenamiento y su interacción ( $P < 0.05$ ). Los cambios significativos iniciaron a partir del día 3 de almacenamiento encontrándose valores más bajos ( $P < 0.05$ ) para los tratamientos EA, BHT y AG (0.85-1.54 mg MDA/kg) con respecto al control (2.54 mg MDA/kg) y este comportamiento se mantuvo durante los siguientes días de almacenamiento. Los tratamientos EA y BHT presentaron comportamientos similares en el día 5 y 7, sin embargo, en el día 9 el BHT mantuvo valores más bajos ( $P < 0.05$ ) de TBARS que el EA. Por su parte, las hamburguesas con AG presentaron el menor grado de oxidación durante todo el período de almacenamiento con respecto a la de los otros tratamientos.

El porcentaje de MetMb (Fig. 2B) de las hamburguesas también fue afectado por TA, TRAT y su interacción ( $P < 0.05$ ). Al igual que para TBARS, los cambios ocurrieron a partir del día 3, presentando valores más elevados ( $P < 0.05$ ) en el grupo control que en los demás tratamientos. Los tratamientos más efectivos para retardar la formación de MetMb en el día 5 fueron el BHT y AG (52.69 y 51.58%, respectivamente). Sin embargo, en este mismo día el porcentaje de metamioglobina de EA (55.15%) fue diferente ( $P < 0.05$ ) que el observado en el control (60.38%). Para el día 7, el AG siguió manteniendo los valores más bajos (65.95%) y el EA presentó comportamiento similar al BHT.

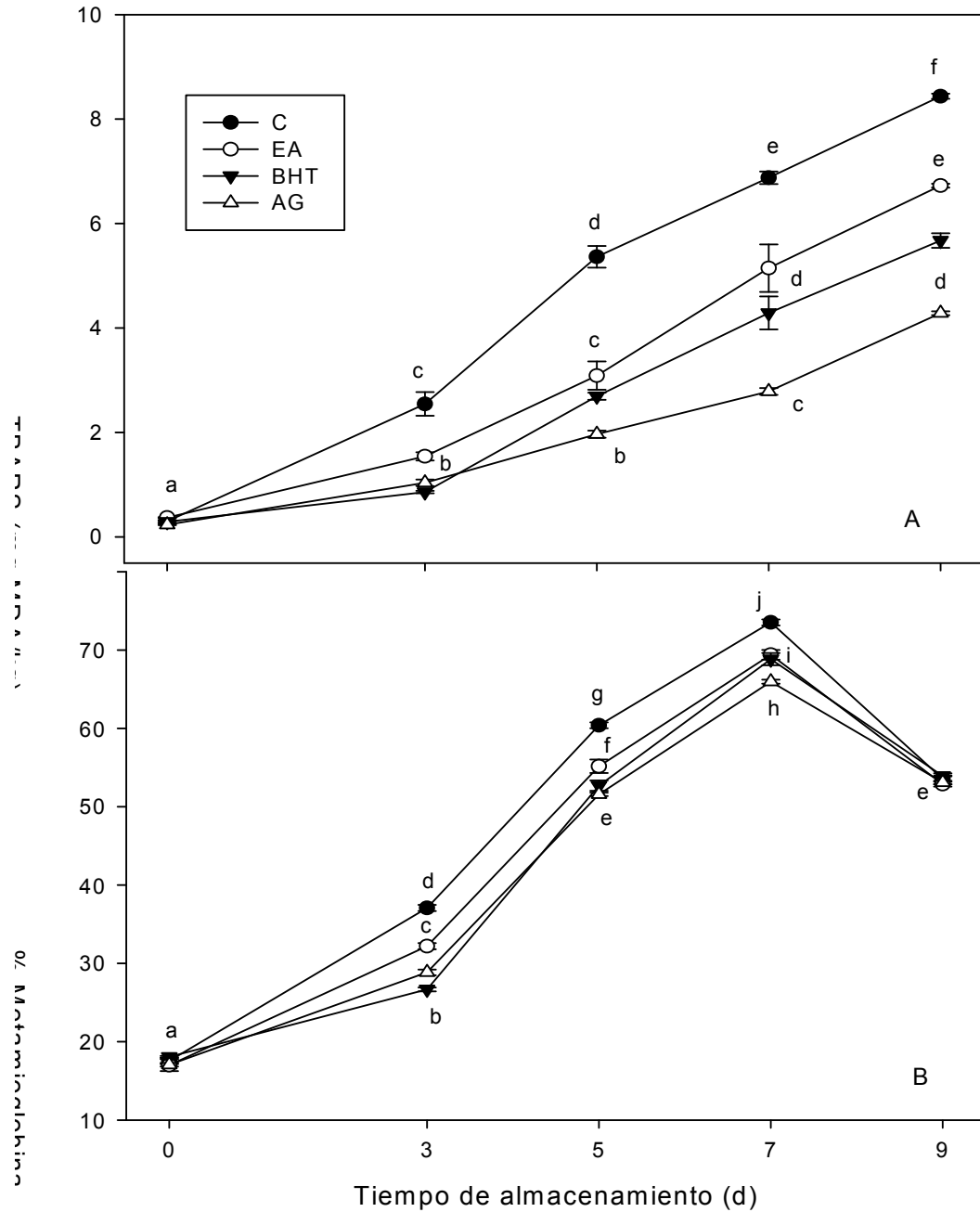


Figura 2. Efecto de los tratamientos (C=Control; EA=Extracto de Agave; BHT y AG=Ácido gálico) sobre TBARS (A) y % de Metamioglobina (B) de hamburguesas de res almacenadas en refrigeración

además, estos fueron diferentes que el control (73.52%). En el último día de almacenamiento todas las muestras de carne presentaron valores similares, y se observó una reducción (52.87-53.93%) en el porcentaje de MetMb respecto al muestreo anterior, lo cual se debe a la conversión de nuevo de metamioglobina a oximioglobina (Faustman *et al.*, 2010).

Para interpretar los cambios sucedidos con la oxidación de la carne durante el almacenamiento y su relación con el comportamiento del color rojo, se establecieron correlaciones entre los valores de  $a^*$ , TBARS y el % de MetMb. Las correlaciones encontradas indican que existe una fuerte asociación negativa ( $r = -0.76$ ,  $P < 0.001$ ) entre el valor  $a^*$  y TBARS, así mismo una correlación de  $-0.96$  ( $P < 0.001$ ) entre  $a^*$  y % MetMb. Estas correlaciones indican que conforme aumenta el grado de oxidación de la carne, se pierde el color rojo de la misma. Esto se debe principalmente a que los radicales formados durante la oxidación lipídica pueden oxidar el átomo central de hierro de la oximioglobina y convertirla en metamioglobina (Faustman *et al.*, 2010).

El principal objetivo de la aplicación de compuestos antioxidantes en la carne es retardar el deterioro oxidativo, por lo que se busca un efecto positivo de la aplicación de estos compuestos. Además del color de la carne, la oxidación lipídica es un parámetro de calidad muy importante a cuidar durante su anaquel, pues puede ser detectado por los consumidores, por lo que también es de interés su reducción. Recientemente, Hayes *et al.* (2010) demostraron que la adición de diferentes antioxidantes como luteína, sesamol, ácido elálgico y extracto de hoja de olivo, retardan la formación de TBARS en hamburguesas de res, y concluyen que existe un comportamiento lineal entre la concentración del extracto y la reducción de la oxidación. Así mismo, la adición de puré de noni retardó el deterioro oxidativo de hamburguesas de res hasta por dos días de almacenamiento en refrigeración (Tapp *et al.*, 2012). Los resultados antes mencionados concuerdan con los encontrados en esta investigación, ya que el EA tuvo la capacidad para inhibir la formación de TBARS hasta por dos días con respecto al control (Fig. 2A).

La formación de MetMb en hamburguesas de res también se ha reducido a través de la adición de diferentes compuestos bioactivos como resveratrol, rutina, quecetina, y carnosina, lo cual se debe principalmente a la capacidad de estos compuestos para estabilizar radicales libres (Bekhit *et al.*, 2003). Estos mismos autores observaron un comportamiento similar al encontrado en la presente investigación en el día 9 de almacenamiento, ya que se redujo la formación de MetMb, lo cual lo atribuyeron al crecimiento bacteriano en las muestras.

### **Determinaciones Microbiológicas**

Cuenta total de mesófilos y psicrófilos aerobios. Los resultados microbiológicos se muestran en la Figura 3. El crecimiento de microorganismos (MO) mesófilos se muestra en la Fig. 3A y se observa que no existió sensibilidad por parte de estos MO hacia los tratamientos aplicados, ya que crecieron de forma similar ( $P > 0.05$ ). De igual manera ocurrió con las bacterias psicrófilas (Fig. 3B), ya que no se presentaron diferencias en los incrementos de las cuentas microbianas entre tratamientos.

Usualmente, la vida de anaquel de la carne fresca, está limitada por el crecimiento microbiano. Dependiendo de la higiene y las condiciones de conservación, las hamburguesas de res, tienen una vida de anaquel de alrededor de 7 días en condiciones de refrigeración (Mitsumoto *et al.*, 2005). Un efecto similar al encontrado en esta investigación fue reportado por Sánchez-Escalante *et al.* (2001), ya que no encontraron efecto de la aplicación de ácido ascórbico, taurina, carnosina y extracto de romero, sobre el crecimiento de microorganismos psicrófilos en hamburguesas de res almacenadas en atmósfera modificada a 4 °C. Sin embargo existen otros extractos que han demostrado tener efecto positivo sobre el crecimiento microbiano. En un estudio



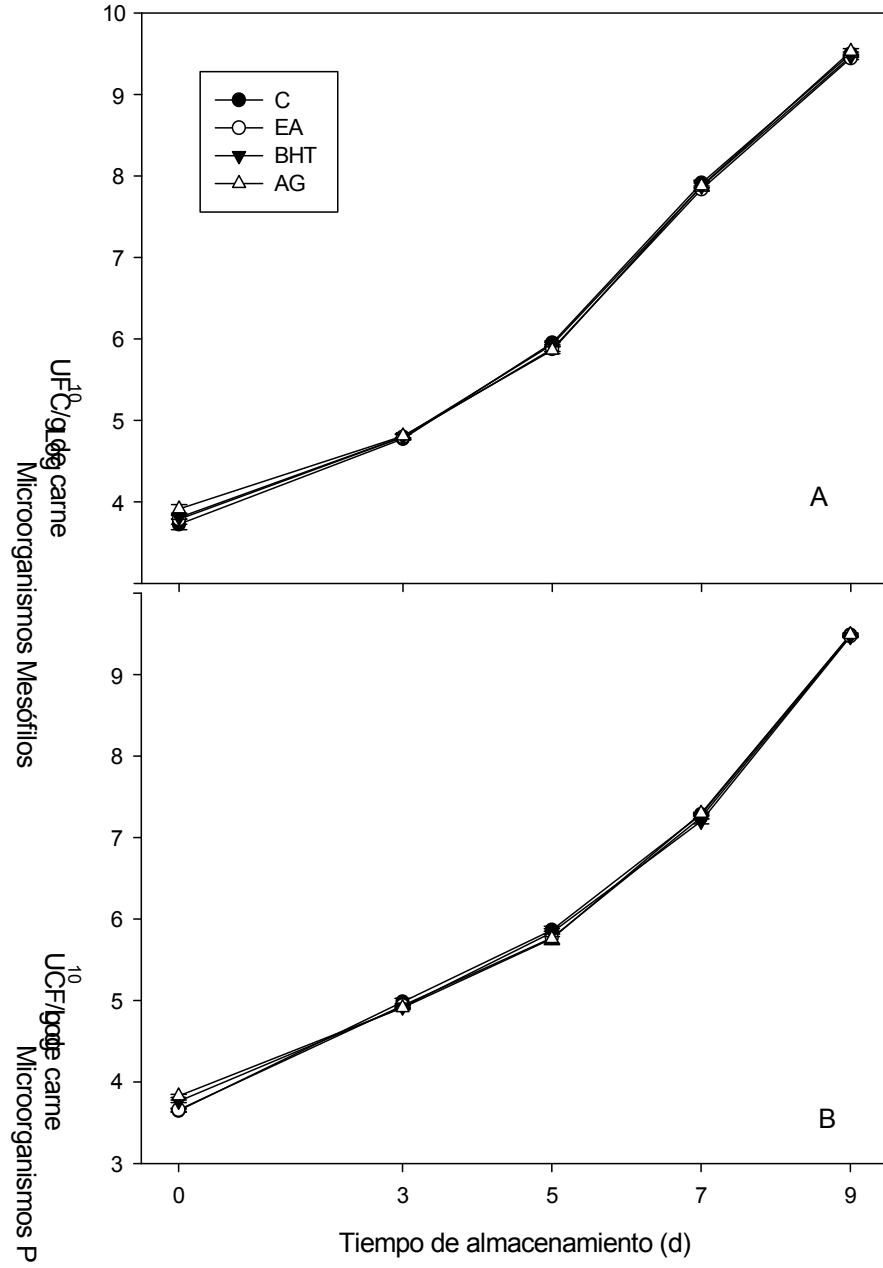


Figura 3. Efecto de los tratamientos (C=Control; EA=Extracto de Agave; BHT y AG=Ácido gálico) sobre el crecimiento de microorganismos mesófilos (A) y psicrófilos (B) en hamburguesas de res almacenadas en refrigeración

donde se evaluó el efecto de luteína, sesamol, ácido elálgico y extracto de hoja de olivo sobre el crecimiento de microorganismos en hamburguesas de res, se encontró que la luteína (200 µg/g carne) redujo la cuenta total de mesófilos en los días 6 y 9 de su almacenamiento. Así mismo, el ácido elálgico (600 µg/g carne) los redujo en el día 6 (Hayes *et al.*, 2010).

Cabe recalcar que los extractos de *A. Angustifolia* presentaron una capacidad importante para inhibir el crecimiento de ciertos patógenos *in vitro* (capacidad antimicrobiana evaluada en el experimento 1). Sin embargo, al ser probados en un sistema alimenticio como las hamburguesas de res, no se manifestó dicho efecto. Debido a que se ha reportado que los compuestos fenólicos actúan a nivel de la membrana celular microbiana, interactuando con proteínas (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009), posiblemente estos compuestos quedaron atrapados en la matriz proteica de las hamburguesas quedando indispuestos para contrarrestar el crecimiento microbiano.

## **Determinaciones Sensoriales**

Las calificaciones promedio de las evaluaciones sensoriales (pérdida de olor y sabor a fresco, y porcentaje de decoloración) de hamburguesas de res adicionadas con antioxidantes se muestran en la Figura 4. En la Fig. 4A se observa como se fueron desarrollando olores a oxidado en la carne cocinada, reflejándose en la pérdida de olor a fresco. En esta ocasión sólo se presentó efecto de TA ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, existe una tendencia hacia la pérdida de olor en mayor grado por parte del control. En el día cero se encontraron valores desde 0.02-0.27, los cuales fueron incrementando con el TA, llegando hasta valores de 1.71 en el último día, representando una ligera pérdida de olor para el control, mientras que los demás tratamientos presentaron valores entre 0.9-1.3, los cuales indican que al final del almacenamiento los panelistas

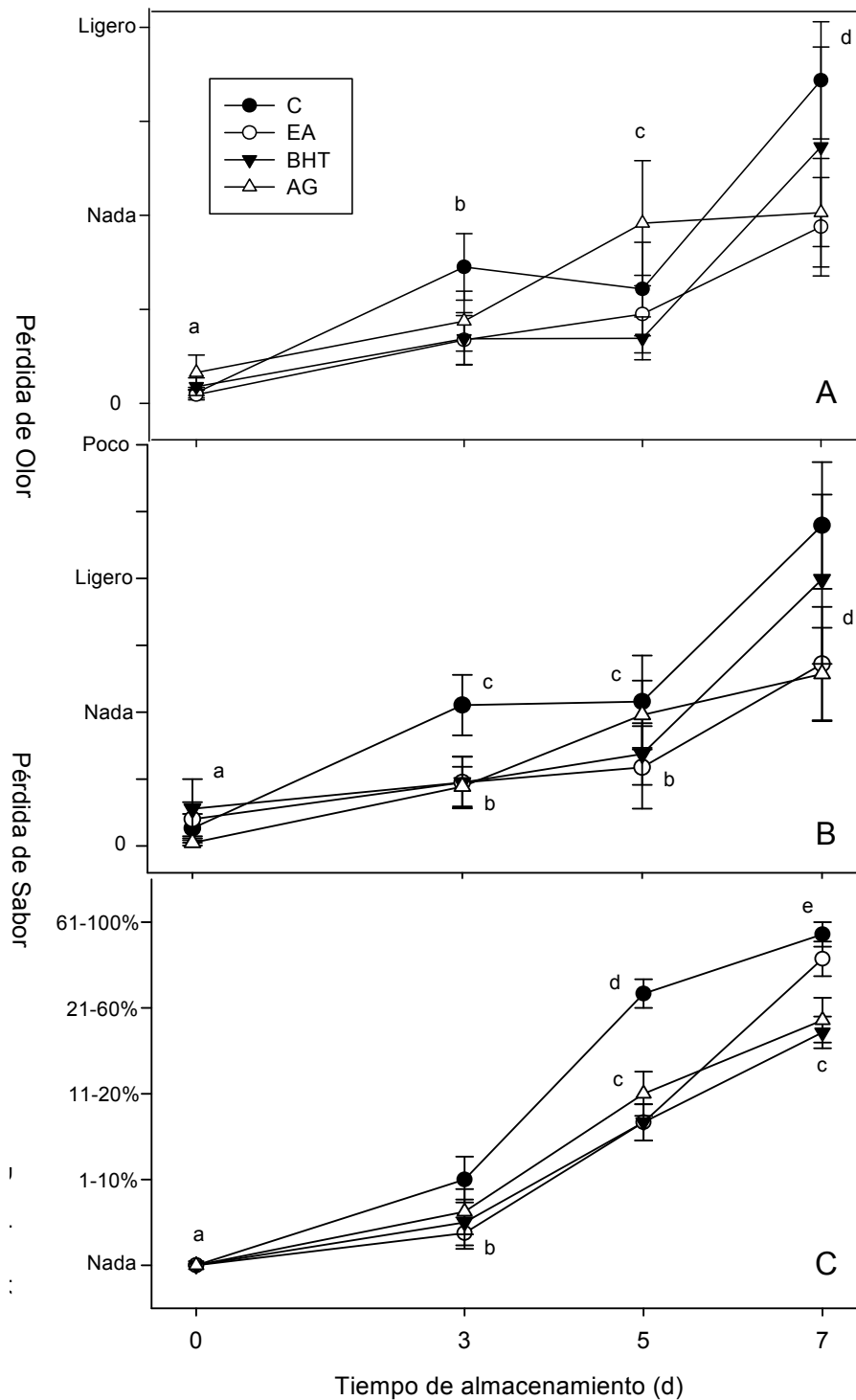


Figura 4. Efecto de los tratamientos (C=Control; EA=Extracto de Agave; BHT y AG=Ácido gálico) sobre las características sensoriales olor (A), sabor (B) y decoloración (C) de hamburguesas de res almacenadas en refrigeración

todavía no detectaron una pérdida importante del olor a fresco en las hamburguesas.

En cuanto a la pérdida de sabor a fresco (Fig. 4B), sólo se presentó efecto de los factores principales TRAT y TA. Al igual que para olor, los cambios en este parámetro se observaron a partir del día 3 de almacenamiento, siendo el control el cual presentó la mayor ( $P < 0.05$ ) pérdida de sabor a fresco con respecto a los otros tratamientos. Aunque en el día 7 se obtuvieron valores similares ( $P > 0.05$ ) para todos los tratamientos, el mayor grado de deterioro se presentó en el control con un registro de 2.39 el cual representa entre ligera y poca pérdida de sabor.

Los valores asignados a la decoloración de la superficie de las hamburguesas se muestran en la Fig. 4C. En este parámetro se observó efecto tanto de los factores principales como su interacción ( $P < 0.05$ ). Todas las hamburguesas iniciaron con una decoloración inapreciable, sin embargo, esta fue aumentando con el tiempo de almacenamiento, llegando hasta un valor de 4.1 en el día 5 para las hamburguesas del control, lo cual representa un porcentaje de decoloración entre 61-100, siendo este diferente ( $P < 0.05$ ) a los demás tratamientos (2.66-3, que representa 21-60% de decoloración).

Por otra parte, se evaluaron correlaciones entre la decoloración y la pérdida de olor y sabor, encontrándose una correlación positiva ( $P < 0.001$ ) de 0.51 entre la decoloración y la pérdida de olor y de 0.56 entre la decoloración y pérdida de sabor, indicando lo anterior que conforme se incrementó la decoloración del producto, también se presenta una pérdida del sabor y el olor a carne fresca.

En la Fig. 5 se muestra el comportamiento del color de las hamburguesas asignado por los panelistas. En general, tal como se presentó con la decoloración, se observa que las muestras tienden a perder el color a través del tiempo de almacenamiento en refrigeración. En el día cero, se presentaron

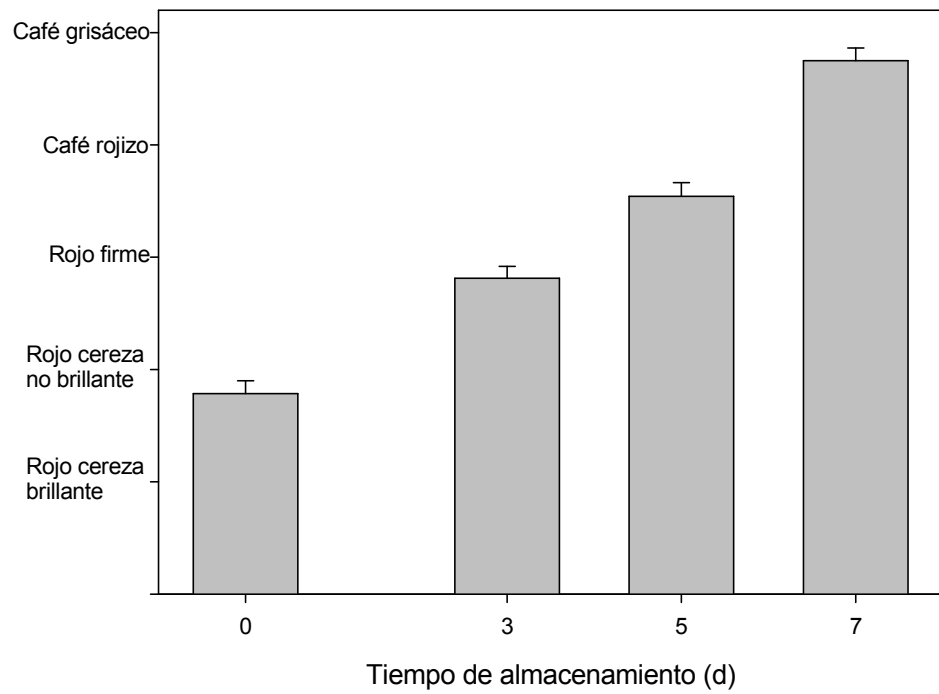


Figura 5. Comportamiento del color de hamburguesas de res durante su almacenamiento en refrigeración obtenido mediante evaluación sensorial

valores de 1.78, que representa un color rojo cereza no brillante, mientras que al final del almacenamiento se registraron valores promedios de 4.75, representando una carne con un color café grisáceo.

Diversos autores han reportado que la pérdida de olor y sabor a fresco se encuentran estrechamente relacionados con la formación de TBARS (Trindade *et al.*, 2009; Sánchez-Escalante *et al.*, 2003). Campo *et al.* (2006) reporta que cuando la carne alcanza valores por encima de 2.3 mg MDA/kg, los panelistas la clasifican como una carne oxidada.

La adición de sulfitos en combinación con ascorbato, extracto de semilla de uva y té verde en hamburguesas de res, demostraron retardar la aparición de sabor a rancio, ya que los panelistas detectaron que al día 3 el control se encontraba ligeramente más oxidado (2.5) que los tratamientos (1.2-1.7) con antioxidantes. Así mismo, al día 3 el control presentó valores de TBARS más elevados (2.47 mg MDA/kg) que los demás tratamientos (0.47-0.84 mg MDA/kg) retardando la aparición de sabor a rancio hasta por tres días (Bañón *et al.*, 2007). Estos resultados concuerdan con los encontrados en esta investigación ya que al día 3 de almacenamiento el control obtuvo los valores más elevados de pérdida de olor y sabor a fresco respecto a los otros tratamientos, y tomando como referencia el valor de 2.4 mg de MDA/kg como umbral para que una carne sea detectada por lo panelistas como oxidada, los resultados indican que las hamburguesas del grupo control se encontraban oxidadas desde el día 3 de almacenamiento, mientras que los tratamientos antioxidantes tuvieron la capacidad para retardar esta oxidación hasta el día 5.

En otra investigación realizada por Sánchez-Escalante *et al.* (2001), se reportó que las hamburguesas adicionadas con extracto de romero sólo y en combinación con ácido ascórbico retardaron por mayor tiempo la aparición de olor a rancio que aquellas tratadas con sólo ácido ascórbico, taurina y carnosina o combinados.

También existe una fuerte relación entre la formación de MetMb y la decoloración de la carne. Algunos autores han reportado que cuando se tiene un 40% de formación de MetMb en la carne, esta es rechazada por los consumidores. De igual manera, Greene *et al.*, (1971), mencionan que cuando los panelistas clasifican las hamburguesas entre 11-20% de decoloración todavía son aceptables, sin embargo cuando presentan un 30% de decoloración estas son rechazadas por los consumidores (Hood y Riordan, 1973). En el estudio realizado por Tapp *et al.* (2012) donde se aplicó puré de noni en hamburguesas de res, se reportó que las hamburguesas control presentaron entre un 21-35% de decoloración en el segundo día de almacenamiento, mientras que los demás tratamientos se encontraban entre 11-20%, llegando hasta 30% en el día 3. Estos resultados concuerdan con los encontrados en esta investigación, ya que el control en el día 5 presentó 21-60% de decoloración y 60% de MetMb, mientras que los demás tratamientos se encontraban entre 11-20% de decoloración y 50% de MetMb.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La cantidad de compuestos fenólicos que se pueden extraer de las hojas de *A. angustifolia* Haw se ve afectado por los diferentes solventes, extrayéndose mayor proporción de estos cuando se utiliza agua. Además, la condición de la hoja juega un papel muy importante, ya que a partir de hoja seca se puede obtener mayor cantidad de compuestos bioactivos.

El extracto acuoso de hoja seca presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Así mismo, los extractos de hoja seca fueron más efectivos para inhibir el crecimiento de *A. alternata*. Sin embargo, todos los extractos presentaron zonas de inhibición similares contra las bacterias patógenas analizadas.

En el estudio de vida de anaquel de las hamburguesas, el extracto de hojas de Agave presentó un comportamiento similar que el BHT, demostrando su efectividad a través de la estabilización del color rojo, reducción de la oxidación y presentando mejores propiedades sensoriales que el control.

Los resultados del presente trabajo sugieren que los extractos de Agave pueden ser aplicados en la industria cárnica teniendo efectividad similar al BHT, presentando la ventaja de ser más seguro y saludable. Las investigaciones futuras se pueden enfocar en el manejo de los factores tiempo y temperatura de extracción, y en la aplicación de estos extractos en otros sistemas alimenticios.



## BIBLIOGRAFÍA

- Ajila, C., Naidu, K., Bhat, S., & Rao, U. (2007). Bioactive Compounds and Antioxidant Potential of Mango Peel Extract. *Food Chemistry*, 105(3), 982-988
- Almajano, M.P., Carbó, R., Jiménez, J.A.L., & Gordon, M.H. (2008). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tea Infusions. *Food Chemistry*, 108(1), 55-63
- Alothman, M., Bhat, R., & Karim, A.A. (2009). Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Selected Tropical Fruits From Malaysia, Extracted with Different Solvents. *Food Chemistry*, 115(3), 785-788
- AMSA. (2005). American Meat Science Association. Meat Evaluation Handbook
- Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D.A., Bolling, B., & Wijaya, H. (2010). Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*, 121(4), 1231-1235
- Arango, C.M. & Restrepo, D.A. (2002). Microbiología de la Carne. <http://es.scribd.com/doc/8717475/Cap-1-Microbiologia-de-La-Carne>. Consulta 21/04/2011
- Banovic, M., Grunert, K.G., Barreira, M.M., & Fontes, M.A. (2009). Beef Quality Perception at the Point of Purchase: A Study from Portugal. *Food Quality and Preference*, 20, 335-342
- Bañón, S., Díaz, P., Rodríguez, M., Garrido, M.D., & Price, A. (2007). Ascorbate, Green Tea and Grape Seed Extracts Increase the Shelf Life of Low Sulphite Beef Patties. *Meat Science*, 77(4), 626-633
- Bayer, E.A., Shimon, L.J., Shoham, Y. & Lamed, R. (1998). Cellulosomes-Structure and Ultrastructure. *Journal of Structural Biology*, 124, 221-234
- 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
- Ben Hamissa, A.M., Seffen, M., Aliakbarian, B., Casazza, A.A., Perego, P., & Converti, A. (2012). Phenolics Extraction from *Agave americana* (L.) Leaves Using High-temperature, High-pressure Reactor. *Food and Bioproducts Processing*, 90(1), 17-21

- Beuchat, L.R. (2000). Use of Sanitizers in Raw Fruit and Vegetable Processing. In Alzamora, S.M., Tapia, M.S., López-Malo, A., editors. Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamental Aspects and Applications. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers Inc. p 63–78
- Campo, M.M., Nute, G.R., Hughes, S.I., Enser, M., Wood, J.D., & Richardson, R.I. (2006). Flavour Perception of Oxidation in Beef. *Meat Science*, 72(2), 303–311
- Capecka, E., Mareczek, A., & Leja, M. (2005). Antioxidant Activity of Fresh and Dry Herbs of Some *Lamiaceae* Species. *Food Chemistry*, 93(2), 223-226
- Cheyrier, V, Sarni-Manchado, P., Le Roux, E., Le Guernevé, C., & Lozano, Y. (2000). Phenolic Composition of Litchi Fruit Pericarp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5995–6002
- Ciriano, M.G., García-Herreros, C., Larequi, E., Valencia, I., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2009). Use of Natural Antioxidants from Lyophilized Water Extracts of *Borago officinalis* in Dry Fermented Sausages Enriched in  $\omega$ -3 PUFA. *Meat Science*, 83(2), 271-277
- Climent, J. (2000). Caracterización del Potencial Antioxidante de Diferentes Extractos de Origen Vegetal. Aplicación en Alimentos. Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Universidad Miguel Hernández
- Conner, D. (1993). Naturally Occurring Compounds. In Davidson P., Branen A.L. editors. Antimicrobials in Foods. New York USA, Marcel Dekker, Inc. pp. 441-468
- Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582
- Davidson, P.M., & Branen, A.L. (2001). Antimicrobials in Foods. Third Edition. New York USA. Marcel Dekker Inc. p 50-200
- Decker, E.A., Faustman, C. & López-Bote, C.J. (2000). Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality. 1ª edición. Ed Wiley-Interscience. pp. 449-500 USA
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial Activity of Individual and Mixed Fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential Oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1–2), 101-109
- Devcich, D.A., Pedersen, I.K., & Petire, K.J. (2007). You are what you Eat: Modern Health Worries and the Acceptance of Natural and Synthetic Additives in Functional Foods. *Appetite*, 48, 333-337
- Doores, S. 1993. Organic Acids. In Davidson P.M., Branen A.L., editors. Antimicrobials in Foods. New York USA. Marcel Dekker Inc. pp 95–136

- Douglas, L. & Farid, M. (2001). Microbiology of Meats. In Hui, Y.H., Nip, W., Rogers, R., & Young, O. editors. Meat Science and Applications. New York USA. Marcel Dekker, Inc. Chapter 7
- Duan, X., Jiang, Y., Su, X., Zhang, Z., & Shi, J. (2007). Antioxidant Properties of Anthocyanins Extracted from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Fruit Pericarp Tissues in Relation to their Role in the Pericarp Browning. *Food Chemistry*, 101(4), 1365-1371
- Escarpa, M & González, M.C. (2001). An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31(2), 57-139
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., & Surendranath, P. (2010). Review: Myoglobin and Lipid Oxidation Interactions: Mechanistic Bases and Control. *Meat Science*, 86, 86–94
- Feng, W., Chen, J., Zheng, X., & Liu, Q. (2011). Thyme Oil to Control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo as Fumigant and Contact Treatments. *Food Control*, 22(1), 78-81
- Feng, W. and X. Zheng (2007). Essential Oils to Control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. *Food Control*, 18(9), 1126-1130
- Frazier, W.C., & Westhoff, D.C. (2003). Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia. Cuarta edición. Zaragoza España
- Fung, D.Y., Hajmeer, M.H., Kastner, C.L., Kastner, J.J., Marsden, J.L., Penner, K.P., Phebus, R.K., Smith, J.S., & Vanier, M.A., (2001). Meat Safety. In Hui, Y.H., Nip, W., Rogers, R.W., & Young, O.A. editors. Meat Science and Applications. New York USA. Marcel Dekker Inc
- García-Mendoza, A. (2002). Distribution of Agave (*Agavaceae*) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal*. (USA) 74(4), 177-187
- García, Y.G., Reynoso, O.G., & Arellano, J.N. (2005). Potencial del Bagazo de Agave Tequilero para la Producción de Biopolímeros y Carbohidrasas por Bacterias Celulolíticas y para la Obtención de Compuestos Fenólicos. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. redalyc. e-Gnosis Vol.3 Art.14
- Gentry, H.S. (1982). Agaves of Continental North America. University of Arizona Press. pp 670-679
- Glass, K., & Sindelar, J. (2010). Controlling *Listeria monocytogenes* in Natural, Ready-to-eat Meat and Poultry Products. Research Report to the American Meat Institute Foundation. <http://amif.org/ht/a/GetDocumentActivity/i/62610>. Accessed 28.03.12

- Glitsch, K. (2000). Consumer Perceptions of Fresh Meat Quality: Cross-national Comparison. *British Food Journal*, 102, 177–194
- González-Aguilar, G.A., Villegas-Ochoa, M.A., Martínez-Téllez, M.A., Gardea, A.A., & Ayala-Zavala, J.F. (2007). Improving Antioxidant Capacity of Fresh-Cut Mangoes Treated with UV-C. *Journal of Food Science*, 72(3), S197-S202
- Greene, B.E., Hsin, I.M., & Zipser, M.W. (1971). Retardation of Oxidative Color Changes in Raw Ground Beef. *Journal of Food Science*, (36), 940–942
- Gutiérrez-Coronado, M., Acedo-Félix, E., & Valenzuela-Quintanar, A. (2007). Industria del Bacanora y su Proceso de Elaboración. In *CYTA-Journal of Food*, vol. 5 (pp. 394-404)
- Hassan, S.M., Haq, A.U., Byrd, J.A., Berhow, M.A., Cartwright, A.L. & Bailey, C.A. (2010). Haemolytic and Antimicrobial Activities of Saponin-rich Extracts from Guar Meal. *Food Chemistry*, 119, 600–605
- Hayes, J.E., Stepanyan, V., Allen, P., O’Grady, M.N., O’Brien, N.M., & Kerry, J.P. (2009). The Effect of Lutein, Sesamol, Ellagic Acid and Olive Leaf Extract on Lipid Oxidation and Oxymyoglobin Oxidation in Bovine and Porcine Muscle Model Systems. *Meat Science*, 83(2), 201-208
- Hayes, J.E., Stepanyan, V., Allen, P., O’Grady, M.N., & Kerry, J.P. (2010). Effect of Lutein, Sesamol, Ellagic Acid and Olive Leaf Extract on the Quality and Shelf-life Stability of Packaged Raw Minced Beef Patties. *Meat Science*, 84(4), 613-620
- Hood, D.E., & Riordan, E.B. (1973). Discoloration in Pre-packaged Beef: Measurement by Reflectance Spectrophotometry and Shopper Discrimination. *Journal of Food Technology*, 8, 333–343
- Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L., Howard, S. (2003). Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production. *African Journal of Biotechnology*, 2, 602-619
- Huang, B., He, J., Ban, X., Zeng, H., Yao, X., & Wang, Y. (2011). Antioxidant Activity of Bovine and Porcine Meat Treated with Extracts from Edible Lotus (*Nelumbo nucifera*) Rhizome Knot and Leaf. *Meat Science*, 87(1), 46-53
- Hui, Y.H., Guerrero, I. y Rosmini, M.R. (2006). Ciencia y Tecnología de Carnes. Editorial LIMUSA. México D.F.
- Hui, Y.H. Wai-Kit, N., Rogers, R.W., & Young, O.A. (2001). Meat Science and Applications: CRC Press. New York USA. Marcel Dekker Inc
- Jia, N., Kong, B., Liu, Q., Diao, X., & Xia, X. (2012). Antioxidant Activity of Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Extract and its Inhibitory Effect on Lipid and

- Protein Oxidation of Pork Patties During Chilled Storage. *Meat Science*, 91(4), 533-539
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., & Cofrades, S. (2001). Healthier Meat and Meat Products: their Role as Functional Foods. *Meat Science*, 59(1), 5-13
- Jongberg, S., Skov, S.H., Tørngren, M.A., Skibsted, L.H., & Lund, M.N. (2011). Effect of White Grape Extract and Modified Atmosphere Packaging on Lipid and Protein Oxidation in Chill Stored Beef Patties. *Food Chemistry*, 128(2), 276-283
- Judge, M., Aberle, E., Forrest, J., Hedrich, H. & Merkel, R. (1989). Principles of Meat Science. Dubuke (Iowa): Kendall and hunt publishing. cap 6 p 125-133
- Kaneda, N., Nakanishi, H., & Staba, J. (1987). Steroidal Constituents of *Yucca schidigera* Plants and Tissue Cultures. *Phytochemistry*, 26, 1425–1429
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of Phenolic Compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 453-464
- Kong, B., Zhang, H., & Xiong, Y.L. (2010). Antioxidant Activity of Spice Extracts in a Liposome System and in Cooked Pork Patties and the Possible Mode of Action. *Meat Science*, 85(4), 772-778
- Krzywicki, K. 1982. The Determination of Haem Pigment in Meat. *Meat Science*, 7, 29-35
- Lee, B.J., Hendricks, D.G., & Cornforth, D.P. (1998). Antioxidant Effects of Carnosine and Phytic Acid in a Model Beef System. *Journal of Food Science*, 63, 394-398
- Lee, J.H., Jang, M., Seo, J., & Kim, G.H. (2012). Antibacterial Effects of Natural Volatile Essential Oil from *Zanthoxylum piperitum* a.p. dc. Against Foodborne Pathogens. *Journal of Food Biochemistry*, 86(1), 57-61
- Litter, C.A. (1995). Off on Tangent. *Journal of Food Science*. 40,410-411
- Lund, M.N., Hviid, M.S., & Skibsted, L.H. (2007). The Combined Effect of Antioxidants and Modified Atmosphere Packaging on Protein and Lipid Oxidation in Beef Patties During Chill Storage. *Meat Science*, 76(2), 226-233
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémesy, C. & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79, 727-747
- McCarthy, T.L., Kerry, J.P., Kerry, J.F., Lynch, P.B. & Buckley, D.J. (2001). Evaluation of the Antioxidant Potential of Natural Food/Plant Extracts as

Compared with Synthetic Antioxidants and Vitamin E in Raw and Cooked Pork Patties. *Meat Science*, 57, 45-52

McLelland, M.R., Lind, L.R. & Kime, R.W. (1995). Hue Angle Determinations and Statical Analysis for Multiquadrant Hunter L\*, a\*, b\* Data. *Journal of Food Quality*, 18,235-240

Mitsumoto, M., O'Grady, M.N., Kerry, J.P., & Buckley, D.J. (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*, 69,773–779

Muthuswamy, S., Rupasinghe, H.P.V., & Stratton, G.W. (2008). Antimicrobial Effect of Cinnamon Bark Extract on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria innocua* and Fresh-Cut Apple Slices. *Journal of Food Safety*, 28(4), 534-549

Naczk, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523-1542

Nawar, W.W. (1996). Lipids in Food Chemistry. In Fennema, O.R. editor. Food Chemistry. 3<sup>ra</sup> Edición. New York USA. Marcel Dekker, Inc. pp.780-781

NCSS. (2007). Number cruncher statistical systems. Programa estadístico para Windows, Hintze JL, EUA

Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., & Jena, B.S. (2003). Antioxidant and Antimutagenic Activities of Pomegranate Peel Extracts. *Food Chemistry*, 80(3), 393-397

NOM-034-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Productos de la Carne. Carne Molida y Carne Molida Moldeada. Envasadas. Especificaciones Sanitarias

NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa

NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico

Oboh, G. & Rocha, J. (2007). Distribution and Antioxidant Activity of Polyphenols in Ripe and Unripe Tree Pepper (*Capsicum pubescens*). *Journal of food biochemistry*, 31(4), 456-473

Over, K.F., Hettiarachchy, N., Johnson, M.G., & Davis, B. (2009). Effect of Organic Acids and Plant Extracts on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* in Broth Culture Model and Chicken Meat Systems. *Journal of Food Science*, 74, M515–M521



- Pfalzgraf, A., Frigg, M., Steinhart, H. (1995). Alpha Tocopherol Contents and Lipid Oxidation in Pork Muscle and Adipose Tissue During Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1339-42
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001). Antioxidants in food. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England
- Qiu, X., & Wu, V.C.H. (2007). Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in Ground Beef with Cranberry Concentrate by Thin Agar Layer Method. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 15, 282-294
- Rababah, T.M., Banat, F., Rababah, A., Ereifej, K., & Yang, W. (2010). Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolics, Antioxidant Activities, and Anthocyanin of Oregano, Thyme, Terebinth, and Pomegranate. *Journal of Food Science*, 75(7), C626-C632
- Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 157-180
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237
- Reyes-Munguía, A., Azúara-Nieto, E., Beristain, C.I., Cruz-Sosa, F. & Vernon-Carter, E.J. (2009). Propiedades Antioxidantes del Maguey Morado (*Rhoeo discolor*). *CyTA – Journal of Food*, 7(3), 209-216
- Robbins, R.J. (2003). Phenolic Acids in Foods: an Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887
- Rodríguez-Carpena, J.G., Morcuende, D., & Estévez, M. (2011). Avocado By-Products as Inhibitors of Color Deterioration and Lipid and Protein Oxidation in Raw Porcine Patties Subjected to Chilled Storage. *Meat Science*, 89(2), 166-173
- Rodríguez-Carpena, J.G., Morcuende, D., Andrade, M.J., Kylli, P., & Estévez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) Phenolics, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation in Porcine Patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5625-5635
- Rodríguez-Garay, B., Lomelí-Senci6n, J.A., Tapia-Campos, E., Guti6rrez-Mora, A., Garc6a-Galindo, J., Rodr6guez-Dom6nguez, J.M., Urbina-L6pez, D., & Vicente-Ram6rez, I. (2009). Morphological and Molecular Diversity of

*Agave tequilana* Weber var. Azul and *Agave angustifolia* Haw. var. Lineño. *Industrial Crops and Products*, 29(1), 220-228

- SAGARPA (2007). Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Proyecciones para el Sector Agropecuario de México. Esenario Base 09-18
- Salazar, S.V., & Mungaray, L.A. (2009). La Industria Informal del Mezcal Bacanora. *Estudios Sociales (Hermosillo, Son.)*, 17(33), 163-198
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrescano, G., Beltrán, J.A., & Roncalés, P. (2001). The Effects of Ascorbic Acid, Taurine, Carnosine and Rosemary Powder on Colour and Lipid Stability of Beef Patties Packaged in Modified Atmosphere. *Meat Science*, 58(4), 421-429
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrescano, G., Beltrán, J.A., & Roncales, P. (2003). Antioxidant Action of Borage, Rosemary, Oregano, and Ascorbic Acid in Beef Patties Packaged in Modified Atmosphere. *Journal of Food Science*, 68(1), 339-344
- Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., & Uylaşer, V. (2010). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars. *Journal of Food Science*, 75(4), C328-C335
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., & Rémesy, C. (2002). Absorption and Metabolism of Polyphenols in the Gut and Impact on Health. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56, 276-282
- Scollan, N., Hocquette, J.F., Nuernberg, K., Dannenberger, D., Richardson, I., & Moloney, A. (2006). Innovations in Beef Production Systems that Enhance the Nutritional and Health Value of Beef Lipids and their Relationship with Meat Quality. *Meat Science*, 74(1), 17-33
- Selani, M., Contreras-Castillo, C., Shirahigue, L., Gallo, C., Plata-Oviedo, M., & Montes-Villanueva, N. (2011). Wine Industry Residues Extracts as Natural Antioxidants in Raw and Cooked Chicken Meat During Frozen Storage. *Meat Science*. 88(1), 397-403
- Shan, B., Cai, Y.Z., 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, 1879-1885
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158
- Smedman, A. & Vessby, B. (2001). Conjugated Linoleic Acid Supplementation in Humans—Metabolic Effects. *Lipids*, 36(8), 773-781



- Sofos, J.N., Busta, F.F., & Allen, C.E. (1979). Botulism Control by Nitrite and Sorbate in Cured Meats: A Review. *Journal of Food Protect*, 42, 739–770
- Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Bento, A., & Pereira, J.A. (2008). Effect of Solvent and Extraction Temperatures on the Antioxidant Potential of Traditional Stoned Table Olives “Alcaparras”. *Food Science and Technology*, 41(4), 739-745
- Tapp, W.N., Yancey, J.W.S., Apple, J.K., Dikeman, M.E., & Godbee, R.G. (2012). Noni Puree (*Morinda citrifolia*) Mixed in Beef Patties Enhanced Color Stability. *Meat Science*, 91(2), 131-136
- Tomás-Barberán, F.A. & Espín, J.C. (2001). Phenolic Compounds and Related Enzymes as Determinants of Quality in Fruits and Vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 853-876
- Tomás-Barberán, F.A. & Gil, M.I. (2008). Improving the Health-Promoting Properties of Fruit and Vegetable Products. Cambridge England. Woodhead Publishing. pp 38-55
- Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Soumaya, B., Hajlaoui, H., & Abdelly, C. (2010). Solvent Effects on Phenolic Contents and Biological Activities of the Halophyte *Limoniastrum monopetalum* Leaves. *Food Science and Technology*, 43(4), 632-640
- Trindade, R.A., Lima, A., Andrade-Wartha, E.R., Oliveira e Silva, A.M., Mancini-Filho, J., & Villavicencio, A.L.C.H. (2009). Consumer's Evaluation of the Effects of Gamma Irradiation and Natural Antioxidants on General Acceptance of Frozen Beef Burger. *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 293–300
- Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y.S. (2006). Effects of Extraction Solvents on Concentration and Antioxidant Activity of Black and Black Mate Tea Polyphenols Determined by Ferrous Tartrate and Folin–Ciocalteu Methods. *Food Chemistry*, 99(4), 835-841
- Vaithyanathan, S., Naveena, B.M., Muthukumar, M., Girish, P.S., & Kondaiah, N. (2011). Effect of Dipping in Pomegranate (*Punica granatum*) Fruit Juice Phenolic Solution on the Shelf Life of Chicken Meat under Refrigerated Storage (4 °C). *Meat Science*, 88(3), 409-414
- Vega-Vega V. (2011). Enriquecimiento de la Capacidad Antioxidante y Protección Antimicrobiana del Mango Fresco Cortado Aplicando Compuestos Fenólicos de sus Subproductos. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México

- Vermerris, W. & Nicholson, R. (2006). Phenolic Compounds Biochemistry. Families of Phenolic Compounds and Means of Clasification. Netherlands. Springer. pp 1-32
- Villena, J.T. (2005). La Calidad de la Carne de Vacunos. Congreso Peruano de la Carne. Sitio Argentino de Producción Animal. [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/carne\\_y\\_subproductos/00carne\\_y\\_subproductos.htm](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/00carne_y_subproductos.htm)
- Vivas, L. (2000). El Enraciamiento y el Papel de los Antioxidantes. Cárnica 2000 enero-febrero
- Warriss, P.D. (2010). Meat Science: an Introductory Text. New York USA. CABI publishing. pp 37-117
- Weerakkody, N.S., Caffin, N., Turner, M.S., & Dykes, G.A. (2010). In vitro Antimicrobial Activity of Less-Utilized Spice and Herb Extracts Against Selected Food-Borne Bacteria. *Food Control*, 21(10), 1408-1414
- Williams, A.A. y Atkins, R.K. (1983). Sensory Quality in Food and Beverages. Chichester UK. Ellis Howood Ltd. pp 272-276
- Xi, Y., Sullivan, G.A., Jackson, A.L., Zhou, G.H., & Zebranek, J.G. (2011). Use of Natural Antimicrobials to Improve the Control of *Listeria monocytogenes* in a Cured Cooked Meat Model System. *Meat Science*, 88, 503–511
- Xiong, Y.L. & Decker, E.A. (1995). Alterations of Muscle Protein Functionality by Oxidative and Antioxidative Processes. *Journal of Muscle Foods*, 6, 139-160
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., & Newmark, H.L. (2001). Inhibition of Carcinogenesis by Dietary Polyphenolic Compounds. *Annual Reviews of Nutrition*, 21, 381-406
- Yanishlieva, N. (2001). Inhibiting Oxidation. In Pokornu, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. editors. Antioxidants in Food: Practical Aplications. Woodhead Publishing. Cambridge, UK. Limited 1a edición. p. 22-70
- Yıldız-Turp, G., & Serdaroglu, M. (2010). Effects of Using Plum Puree on Some Properties of Low Fat Beef Patties. *Meat Science*, 86(4), 896-900
- Young, O.A., & West, J. (2001). Meat Color. In Hui, Y.H., Nip, W., Rogers, R.W., & Young, O.A. editors. Meat Science and Aplications. New York USA. Marcel Dekker Inc
- Zhang, L., Ravipati, A.S., Koyyalamudi, S.R., Jeong, S.C., Reddy, N., Smith, P. T., Bartlett, J., Shanmugam, K., Münch, G., & Wu, M.J. (2011). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Selected Medicinal Plants Containing Phenolic and Flavonoid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12361-12367

- Zhao, W.H., Asano, N., Hu, Z.Q., Shimamura, T. (2003). Restoration of Antibacterial Activity of  $\beta$ -lactams by Epigallocatechin gallate against  $\beta$ -lactamase-producing Species Depending on Location of  $\beta$ -lactamase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55, 735-740
- Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. (1999). The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559

# ANEXOS

## Formato de evaluación para el análisis sensorial

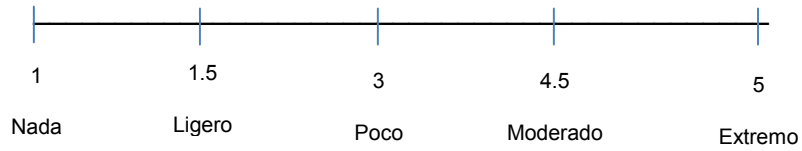
### ANALISIS SENSORIAL DE HAMBURGUESAS

Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

**INSTRUCCIONES:** Marque con una **X** la escala que le asigne en cada una de las muestras de acuerdo a la intensidad de percepción. Pruebe galleta y consuma agua antes de probar cada una de ellas.

Pérdida de **olor** a fresco



Pérdida de **sabor** a fresco



**Observaciones y/o comentarios** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Gracias por su participación

## ANALISIS SENSORIAL DE HAMBURGUESAS

Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

**INSTRUCCIONES:** Marque con una X de acuerdo a la calificación que le otorgue

### Color

1: Rojo cereza brillante \_\_\_\_\_

2: Rojo cereza no brillante \_\_\_\_\_

3: Rojo firme \_\_\_\_\_

4: Café rojizo \_\_\_\_\_

5: Café grisáceo \_\_\_\_\_

### Decoloración

1: Nada \_\_\_\_\_

2: 1-10% \_\_\_\_\_

3: 11-20% \_\_\_\_\_

4: 21-60% \_\_\_\_\_

5: 61-100% \_\_\_\_\_

**Observaciones y/o Comentarios** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Gracias por su participación