

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

**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA  
DE LOS PROPÓLEOS EN HAMBURGUESAS  
DE BOVINO**

*POR:*

**REY DAVID VARGAS SÁNCHEZ**

**TESIS APROBADA POR LA  
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN  
ANIMAL**

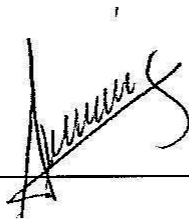
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**HERMOSILLO, SONORA**

**DICIEMBRE DE 2010.**

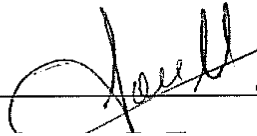
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Rey David Vargas Sánchez, le han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



---

Dra. Armida Sánchez Escalante

Directora de tesis



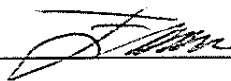
---

Dr. Gastón R. Torrescano Urrutia



---

Dra. Evelia Acedo Félix



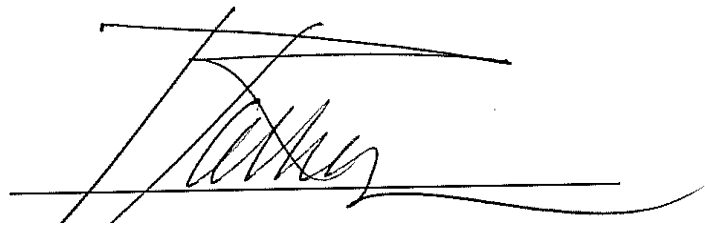
---

Dra. Elizabeth Carvajal Millán

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Pacheco', is written over a horizontal line. The signature is stylized and includes a large, sweeping flourish that extends to the right.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

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

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

Siempre estaré agradecido a mi Directora de tesis, Dra. Armida Sánchez Escalante, por sus consejos, asesoría, amistad, por ser un gran ejemplo a seguir y por su apoyo académico brindado durante estos dos años, con el cual pude concluir en tiempo y forma. Gracias Dra. Armida por ser una valiosa persona.

A mis Asesores de tesis, Dra. Evelia Acedo Félix, Dra. Elizabeth Carvajal Millán y al Dr. Gastón R. Torrescano Urrutia, por su apoyo y aporte de conocimientos para la realización de este trabajo de investigación.

A la Q.B. Erika Javier por su asesoría, entrenamiento, apoyo y disposición de tiempo en los análisis de compuestos fenólicos en el HPLC, color, FT, TBA y DPPH durante mi experimental, así como en el procesamiento de hamburguesas. Gracias Kika neta que me hiciste un gran paro.

Al M.C. Martín Valenzuela Meléndez por su asesoría y entrenamiento en las técnicas de color, medición de TBARS, dienos conjugados, %MetMb así como en la elaboración de las hamburguesas durante mis preliminares. Gracias por tu amistad Martín.

Al Laboratorio de Autenticidad de Productos Lácteos del CIAD, por darme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones, donde se realizó la parte final en la cuantificación de compuestos fenólicos de mis muestras. En especial al cDr. Aarón F. González Córdova y a la Dra. María de Jesús Torres, por su asesoría y por la disponibilidad del equipo facilitado para la realización de esta parte del trabajo.

Al Laboratorio de Aseguramiento de Calidad Microbiológica de los Alimentos del CIAD, por darme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones, donde se realizó la microbiología incluida en este trabajo de investigación.

A la Q.B. Rosalva Pérez Morales por su asesoría en el desarrollo de técnicas microbiológicas (Concentración Mínima Inhibitoria, Cuenta Total de Mesófilos y Psicrótrofos aerobios), así como sus consejos, y por la disponibilidad de las cepas bacterianas necesarias.

Al M.C. Alfonso García Galaz, por su asesoría e impartición de conocimientos en técnicas microbiológicas y moleculares, por poner a mi disposición cepas bacterianas y material de trabajo cuando lo necesité. Saludos Poncho.

Al Laboratorio de Biopolimeros del CIAD, por brindarme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones, donde se realizó parte del análisis de compuestos fenólicos de mi trabajo de tesis.

A la Q.B. Karla G. Martínez por su asesoría para la preparación de solventes, muestras, estándares y en el uso del equipo HPLC, necesarios para completar un objetivo de mi trabajo de investigación.

Al Dr. Javier Hernández Martínez, de la Universidad Veracruzana por su asesoría técnica y por proporcionar algunos de los estándares utilizados en la cuantificación de compuestos fenólicos.

A todo el personal de biblioteca, en especial a Gerardo Reyna, por brindarme su ayuda y facilitarme la bibliografía necesaria para el desarrollo del escrito de mi tesis.

A mis amigos Jeanette Acuña, Chava Carrasco, Priscilia Heredia, Elva J. Guillen, Alejandro Franco, José Salcido, Jesús Sosa, Goyo Polloreña, Samuel, Fabián, Pablo, Oswaldo, Carolina Ley, Sharon, Eli, Julio el “Camarón”, Rachel, Ángeles de la Rosa, Priscilia Saavedra, Adán, Isabel, Candy, Rigo, Ronald, Paco, Carlos, Gabriel, Nidia, cDr. Roberto Rodríguez, Liliana, Sarahí, Monserrat, Lulú, Gabriel, Carlos, Fausto, Moy, Olga, Gelena, Margarita, Hugo, Lucina, Cinthia, Miriam, Ramón Axel (Monchi), José Luis (Nieblas), Elva Yaneth, Priscila Hernández, Liliana Osuna y Dr. Guillermo Barba, quienes convivieron conmigo durante los mejores momentos en esta etapa de mi vida.

## **DEDICATORIAS**

### ***A Jehová Dios***

Por darme paciencia y fortaleza necesaria para salir adelante en uno más de mis objetivos de vida.

### ***A mis padres, Crisanto Vargas Ríos y Armida Sánchez Patrón***

Quienes me dieron la vida, por su gran cariño y apoyo en todas las etapas de mi profesión para poder llegar hasta donde estoy ahora.

### ***A mis hermanos Raúl Crisanto, Yeimi Rocio y Mayra Armida***

Quienes siempre me han apoyado y han sido parte fundamental de mi entusiasmo para lograr muchas cosas.

### ***A mis primos***

Mauro, Samuel, Abimael, Fco. Javier, Güero, Chil, Juan, León, Daniel, Beto, Mauri, Muñeca, Sorullo, Julio César, Joel, Mariana, Xóchitl, Nono, Yukary, Mechudo y sus hijos por formar parte de mi gran familia, quienes se que de una u otra forma siempre me han apoyado en mi vida.



## ÍNDICE GENERAL

	<i><b>Página</b></i>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	4
<b>Oxidación de Lípidos</b> .....	4
Auto-oxidación .....	4
Iniciación .....	5
Propagación.....	6
Terminación .....	6
<b>Antioxidantes</b> .....	7
<b><i>Antioxidantes Sintéticos</i></b> .....	9
<b><i>Antioxidantes Naturales</i></b> .....	10
Propóleos.....	11
Origen de los Propóleos.....	11
Recolección de los Propóleos .....	13
Composición de los Propóleos.....	14
Actividad Antioxidante de los Propóleos .....	16
<b>Crecimiento Microbiano</b> .....	17
<b>Bacterias Patógenas en Carnes</b> .....	18
<i>Salmonella</i> spp .....	19
<i>Scherichia coli</i> O157:H7.....	20
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
<i>Listeria monocytogenes</i> .....	21
Actividad Antimicrobiana de los Propóleos .....	22
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	24
<b>HIPÓTESIS</b> .....	24

	<b><i>Página</i></b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	25
Objetivo General .....	25
Objetivos Específicos.....	25
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
Formulación de las Hamburguesas .....	26
Extractos de Propóleos.....	27
Obtención de los Extractos Etanólicos de Propóleos (EEP) .....	27
Análisis de Compuestos Fenólicos de los Propóleos.....	28
Fenoles Totales .....	29
Actividad DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).....	29
Sustancias Reactivas al Acido Tiobarbitúrico .....	30
Dienos Conjugados.....	31
Metamioglobina.....	32
pH .....	32
Color .....	33
Concentración Mínima Inhibitoria.....	33
Sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
Calidad Microbiológica.....	35
Análisis Estadístico .....	36
<b>RESULTADOS</b> .....	37
Cuantificación e identificación de los Compuestos Fenólicos de los Propóleos .....	37
Contenido de Fenoles Totales de los Propóleos.....	42
Actividad DPPH de los Propóleos.....	45
Medición de las Sustancias Reactivas al Acido Tiobarbitúrico.....	48
Medición de Dienos Conjugados .....	52

	<b><i>Página</i></b>
Médción del porcentaje de Metamioglobina .....	56
Evaluación de pH.....	58
Medición de Color .....	60
Concentración Mínima Inhibitoria del Propóleo.....	71
Evaluación de la Sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	74
Calidad Microbiológica .....	77
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>85</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>87</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<i><b>Página</b></i>
<b>Figura 1.</b> Etapas de auto-oxidación de los lípidos.....	8
<b>Figura 2.</b> Entrada principal de una colmena.....	12
<b>Figura 3.</b> Cromatogramas de los compuestos fenólicos identificados en los extractos de propóleos (340 nm) .....	39
<b>Figura 4.</b> Curvas de calibración para la cuantificación de compuestos fenólicos en los propóleos.....	40
<b>Figura 5.</b> Curva de calibración utilizando ácido gálico (AG) como estándar a 765 nm.....	43
<b>Figura 6.</b> Actividad para atrapar radicales DPPH de los extractos de propóleos (Valores altos de % de inhibición indican mejor capacidad antioxidante).....	46
<b>Figura 7.</b> Efecto de la adición de propóleo sobre la formación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (valores bajos indican mayor capacidad antioxidante) .....	49
<b>Figura 8.</b> Efecto de la adición de propóleo sobre la formación de dienos conjugados (valores bajos indican más capacidad antioxidante).....	53
<b>Figura 9.</b> Efecto de la adición de propóleo sobre la formación de Metamioglobina (valores bajos indican más capacidad antioxidante).....	57

<b>Figura 10.</b> Efecto de la adición de propóleo sobre el valor de pH en las hamburguesas de bovino .....	59
<b>Figura 11.</b> Efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición de propóleos sobre el valor L* en hamburguesas de bovino almacenadas a 2°C .....	61
<b>Figura 12.</b> Efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición de propóleos sobre el valor a* en hamburguesas de bovino almacenadas a 2°C .....	63
<b>Figura 13.</b> Cambios de coloración de las hamburguesas de bovino durante su almacenamiento .....	65
<b>Figura 14.</b> Efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición de propóleos sobre el valor b* en hamburguesas de bovino almacenadas a 2°C .....	66
<b>Figura 15.</b> Efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición de propóleos sobre el valor C* en hamburguesas de bovino almacenadas a 2°C .....	68
<b>Figura 16.</b> Efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición de propóleos sobre el valor h* en hamburguesas de bovino almacenadas a 2°C .....	70

<b>Figura 17.</b> Efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición de propóleos sobre la sobrevivencia de <i>S. aureus</i> hamburguesas de bovino almacenadas a 2°C .....	75
<b>Figura 18.</b> Efecto de la adición de propóleos sobre la cuenta total de mesófilos aerobios en hamburguesas de bovino .....	78
<b>Figura 19.</b> Efecto de la adición de propóleos sobre la cuenta total de psicrótrofos aerobios en hamburguesas de bovino .....	81

## LISTA DE TABLAS

### *Página*

<b>Tabla 1.</b> Contenido de compuestos en extractos de propóleos de diferente origen geográfico ( $\mu\text{g/ml}$ de propóleo).....	15
<b>Tabla 2.</b> Cuantificación de los 10 compuestos fenólicos identificados en los extractos de propóleos).....	38
<b>Tabla 3.</b> Contenido total de fenoles ( $\text{mg/ml}$ ) de los extractos de propóleos de diferente origen .....	44
<b>Tabla 4.</b> Concentración mínima inhibitoria (MIC $\mu\text{g/ml}$ ). Halos de inhibición ( $\text{mm}$ ) de los extractos de propóleos sobre <i>S. aureus</i> y <i>L. monocytogenes</i> ...	72

## RESUMEN

La oxidación de los lípidos y la contaminación bacteriana determinan la pérdida de calidad en productos cárnicos, generando cambios en el color, olor y sabor de los productos. La adición de sustancias naturales con propiedades antioxidantes y antimicrobianas como los propóleos a productos cárnicos, permiten extender su vida de anaquel. Sin embargo, desde la antigüedad el uso del propóleo ha sido exclusivamente farmacéutico, siendo poco utilizado en la conservación de productos cárnicos. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de los propóleos para retardar la degradación oxidativa y el crecimiento microbiano en hamburguesas de bovino almacenadas en refrigeración. Se utilizaron dos extractos comerciales de propóleos (PC1 y PC2) y un tercer extracto (PAP) obtenido en el laboratorio cuyo origen fue la región de Pueblo de Álamos, Sonora (29°07'129''N), a una concentración del 2%. En los extractos se identificaron y evaluaron los compuestos fenólicos, fenoles totales (FT), capacidad antiradical DPPH y la actividad antimicrobiana (concentración mínima inhibitoria, MIC), mientras que en las hamburguesas, evaluadas cada 4 días durante dos semanas, se analizó la formación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), dienos conjugados (DC), metamioglobina (% MetMb), pH, color (L\*, a\*, b\*, C\* y h\*), sobrevivencia de *S. aureus* y calidad microbiológica. Los propóleos presentaron una alta sensibilidad sobre bacterias gram positivas *S. aureus* y *L. monocytogenes*, no encontrándose efecto sobre gram negativas *Salmonella* spp y *E. coli* O157:H7. Sin embargo, inhibieron la población de *S. aureus* inoculado en las hamburguesas de bovino, así como el crecimiento mesófilos y psicrótrofos aerobios de acuerdo al siguiente orden: PAP>PC1>PC2. El PAP mostró los valores más bajos de TBARS, formación de DC, reducción del % MetMb, un alto contenido de FT y un buen porcentaje de



inhibición del radical DPPH, manifestándose en una menor oxidación de lípidos y en la preservación del color rojo característico de la carne fresca. La alta actividad antibacteriana y antioxidante del PAP puede estar relacionada con su alto contenido de FT y su composición, principalmente por la presencia de ácido cinámico, rutina, miricetina, quercetina, crisina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, luteolina y acacetina en el extracto; siendo quercetina, pinocembrina y kaempferol los componentes mayoritarios. De acuerdo con los resultados de esta investigación, la adición de extractos de propóleos es una buena alternativa para su uso como antioxidante y antimicrobiano natural, debido a que protegieron el color de las hamburguesas de bovino durante su almacenamiento por más tiempo, retardaron la oxidación de los lípidos y disminuyeron el crecimiento microbiano. Por lo anterior, los extractos de propóleos pueden utilizarse como una alternativa para extender la vida de anaquel de la carne y sus productos, y para la posible sustitución de antioxidantes y antimicrobianos de origen sintético.

## INTRODUCCIÓN

La apariencia con la que se presenta un alimento es una de las características más importantes para el consumidor al momento de decidir la compra del producto, y puede ser considerada como un indicador fidedigno de la calidad (Fernández-López *et al.*, 2005). Los productos cárnicos están constituidos principalmente por lípidos y proteínas; los primeros al descomponerse por reacciones de degradación oxidativa, y las segundas por desnaturalización, reducen la vida de anaquel de los alimentos y la aceptación del producto (Lölinger y Wille., 1993). Otro de los factores más importantes que determinan la pérdida de calidad en los alimentos es la contaminación bacteriana, la cual puede causar el deterioro en productos cárnicos y problemas en la salud del consumidor, debido a la presencia de microorganismos patógenos (Fernández-López *et al.*, 2005; Tosi *et al.*, 2007).

En México la industria de la carne y los productos cárnicos tiene un alto valor social y económico. De esta actividad económica dependen miles de productores, quienes en el 2009 produjeron alrededor de 1, 705,000 toneladas de carne de bovino en canal permitieron a nuestro país ubicarse como el quinto productor de carne de bovino en el mundo (SIAP, 2009). El incremento en la demanda de carne y la necesidad por adquirir productos cárnicos frescos, ha

generado que se busquen más opciones para prevenir la oxidación de lípidos y la contaminación bacteriana (Fernández-López *et al.*, 2005).

En la investigación realizada por Han y Park (2002), se estudió el efecto antioxidante en salchichas de cerdo curadas tratadas con extractos etanólicos de propóleos (EEP), extractos etanólicos de propóleos secos (DREEP) y extractos acuosos de propóleos (WEP), obteniendo resultados positivos contra a la oxidación lipídica. In-Suk *et al.* (2002), estudiaron el posible potencial antioxidante de los extractos etanólicos de propóleos (EEP 1, 3 y 5 %) sobre la oxidación lipídica de salchichas curadas de cerdo durante su almacenamiento (20 °C), observando una mayor protección contra la oxidación en las salchichas tratadas con estos extractos. Sin embargo, no se ha encontrado evidencia de que los propóleos hayan sido empleados como antioxidante en hamburguesas de bovino.

La flora microbiana de carnes rojas consiste principalmente en bacterias mesofílicas provenientes del animal, suelo, medio ambiente, agua o producto de la contaminación del equipo o mala manipulación durante el procesamiento. Se sabe que la carne y los productos cárnicos son una fuente ideal de nutrientes necesarios para la proliferación del crecimiento microbiano y de bacterias patógenas (Pearson y Dutson, 1990; Tosi *et al.*, 2007). Algunos de los

patógenos emergentes asociados a enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) son *Escherichia coli*. O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus*, los cuales pueden estar presentes en productos refrigerados listos para consumir como carne de pollo, de res, pescados mariscos y lácteos (FDA, 2009a). Choi *et al.* (2006), estudiaron la actividad antimicrobiana de diversos extractos de propóleos de algunas regiones de Corea y encontraron que estos tenían una buena actividad sobre *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* y *C. albicans*. Sin embargo, no existen estudios relacionados con el uso de extractos de propóleos como conservadores alimentarios en productos cárnicos.

Por tanto, este trabajo tiene como propósito estudiar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos propóleos de diferente origen (dos de ellos distribuidos comercialmente y un tercer extracto preparado en el laboratorio) en hamburguesas de bovino.

## **ANTECEDENTES**

### **Oxidación de Lípidos**

La mayoría de los productos alimenticios contienen cierto porcentaje de lípidos, entre ellos, grasas y aceites. Estos lípidos están compuestos por mezclas de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. La degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados es la reacción de mayor importancia en la vida de los productos cárnicos manufacturados (Decker *et al.*, 2000; Löliger y Wille, 1993).

Las reacciones de oxidación de lípidos contribuyen a ciertos atributos positivos en la calidad de los alimentos derivados del músculo, tales como el desarrollo de sabores y olores deseables en carnes cocinadas. Sin embargo, los principales cambios negativos de la oxidación de lípidos en los alimentos derivados del músculo afectan el color, olor, sabor y valor nutritivo del producto (Decker *et al.*, 2000).

### **Autooxidación**

En términos simples, la oxidación de los lípidos es el proceso mediante el cual el oxígeno molecular reacciona con lípidos insaturados para formar

peróxidos. Esta reacción puede ser provocada por iniciadores tales como la temperatura, radiación, oxígeno atmosférico, transición del oxígeno a complejos metálicos o por catalizadores enzimáticos (Decker *et al.*, 2000).

Las propiedades de cada grasa están determinadas por la composición de sus ácidos grasos (Brookman, 1991). En contraste directo con los ácidos grasos saturados, los insaturados son más susceptibles a la oxidación (Löligler y Wille, 1993). Por esta razón, en productos alimenticios, el proceso de auto-oxidación de ácidos grasos insaturados es el más importante en el deterioro de grasas y puede dividirse en tres etapas: iniciación, propagación/ramificación y terminación (Brookman, 1991; Löligler y Wille, 1993).

Iniciación. La primera etapa puede ser afectada por energía como la luz o trazas de metales pesados o peróxidos, los cuales son capaces de producir radicales peróxidos. Este evento ocurre cuando el átomo de hidrógeno se separa de la molécula de ácido graso (LH) para formar un radical libre (L•). La duración de esta fase es una medida directa de la resistencia a la oxidación de los alimentos y/o productos. Esto quiere decir que, entre más corta sea la fase de iniciación de oxidación más rápida será la oxidación del alimento; y mientras más largo sea el proceso de oxidación, más lento será el del alimento (Brookman, 1991; Decker *et al.*, 2000).

Propagación. La segunda fase de la oxidación, la propagación, ocurre cuando los radicales libres ( $L\cdot$ ) reaccionan con el oxígeno para producir radicales peróxidos ( $LOO\cdot$ ). Los radicales tienen la habilidad de atacar otros ácidos grasos produciendo peróxidos y radicales libres, propagando así una reacción en cadena. Los hidroperóxidos lipídicos ( $LOOH$ ) pueden formar radicales alcoxi ( $LO\cdot$ ) e hidroxilos ( $OH\cdot$ ), los cuales son capaces de propagar la oxidación y permitir la reacción en cadena o ramificación. Los peróxidos que se forman durante la oxidación se descomponen a radicales nuevamente, y también a aldehídos, cetonas y alcoholes. Estos son los responsables de la pérdida de olor, usualmente asociada con la rancidez (Brookman, 1991; Decker *et al.*, 2000).

Terminación. La fase final de oxidación identificada como terminación, ocurre cuando los peróxidos, componentes altamente reactivos, comienzan a interactuar entre sí. En esta etapa de la oxidación lipídica, las reacciones en cadena agotan cualquier reactivo antioxidante alcanzándose una menor estabilidad y mayor deterioro en los productos (Brookman, 1991).

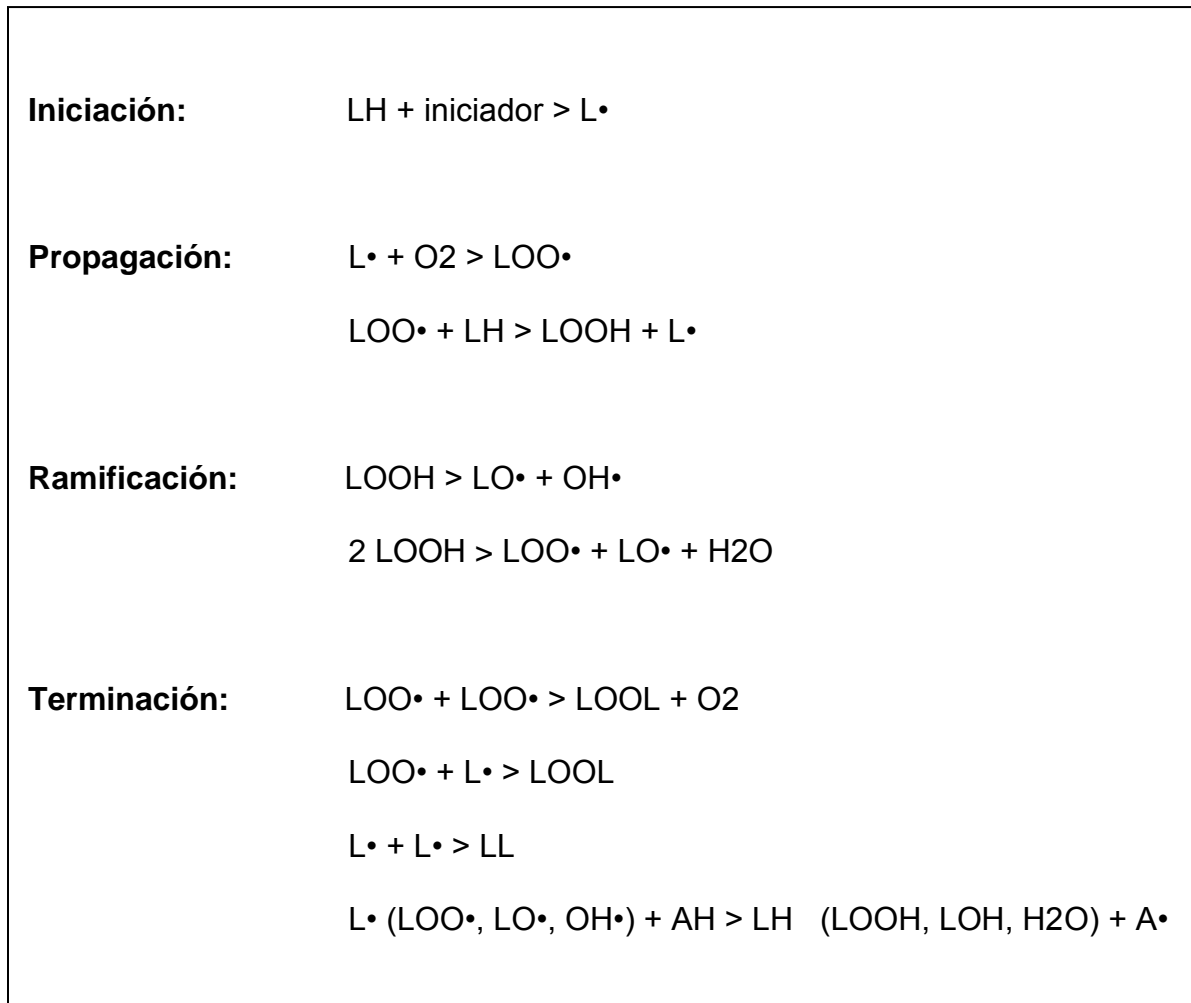
La auto-oxidación es un proceso de deterioro irreversible, no es posible prevenirlo completamente, sólo puede ser retardado. Para retrasar las reacciones de oxidación en los alimentos, se usan medidas preventivas. Por

ejemplo, la adición de antioxidantes, envasar apropiadamente, utilizar fórmulas de gases especiales, evitar el contacto con compuestos metálicos o retirar un porcentaje de oxígeno (Löliker y Wille, 1993). Las reacciones que se llevan a cabo en las tres fases de la autooxidación de los lípidos se muestran en la Figura 1.

### **Antioxidantes**

Los antioxidantes se definen como moléculas orgánicas, de origen sintético o natural, cuyo principal objetivo de uso es retardar las reacciones de degradación oxidativa. Estos aditivos ejercen su actividad, en el contexto de la autooxidación del lípido, atrapando radicales para inhibir la absorción del oxígeno al alimento. De esta forma, reducen la concentración de radicales responsables de la formación de otros radicales libres e impiden la reacción en cadena del proceso oxidativo. Los antioxidantes también tienen la habilidad de quelar o atrapar la transición de metales para retardar la oxidación, debido a que las reacciones de iniciación del radical libre, son retardadas con eficacia por la eliminación de los iones metálicos de transición (Löliker, 1991).





**Figura 1:** Etapas de auto-oxidación de los lípidos (Decker *et al.*, 2000).

Se han designado funcionalmente como quelantes o atrapadores de radicales libres a un gran número de compuestos químicos de diferentes fuentes. Estos se caracterizan por tener en común en su estructura un compuesto fenólico reactivo que funciona como un donante, permitiendo la formación del radical antioxidante fenoxilo (Löligler, 1991). Existen diferentes criterios para establecer una clasificación de las sustancias consideradas como antioxidantes; sin embargo, la clasificación más sencilla es aquella que se establece por el origen del antioxidante: sintéticos y naturales.

### **Antioxidantes Sintéticos**

Los antioxidantes sintéticos fueron desarrollados a partir de la necesidad de obtener una protección más efectiva y al mismo tiempo, más económica, en relación a los naturales. Entre los antioxidantes sintéticos, cuatro de ellos son los más utilizados en la industria alimenticia: BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxianisol), PG (propil galato o galato de propilo) y TBHQ (ter-butil hidroxiquinona) (Löligler, 1991)

En la industria cárnica se empleaban los antioxidantes sintéticos como el BHT, BHA, TBHQ y PG (Antony *et al.*, 2000), por su eficiencia para inhibir

reacciones catalíticas en cadena, las cuales inician y propagan la peroxidación de lípidos. Sin embargo, se ha encontrado que el BHT induce carcinogénesis, causando daño pulmonar en ratones, necrosis del hígado y hemorragia mortal en ratas, y que el BHA induce neoplasia en el estómago de ratas. (Loliger, 1991; Milić *et al.*, 1998).

### **Antioxidantes Naturales**

Una de las ventajas al emplear conservadores naturales en los alimentos, es su fácil aceptación por el consumidor, que aunque no estén regulados legalmente se les considera como compuestos generalmente seguros (Pokorný, 1991). Sin embargo, es necesario realizar trabajos de investigación para determinar las condiciones óptimas de funcionamiento del conservador natural como antioxidante. Se han encontrado diversos productos de origen natural como el cacao, arroz, manzana, cebolla roja, orégano y los propóleos, los cuales contienen diversos compuestos con propiedades antioxidantes, tan eficaces como los comercialmente disponibles (Chaillou y Nazareno, 2009; Geckil *et al.*, 2005; Löliger y Wille, 1993).

## **Propóleos**

Por su naturaleza, los propóleos son considerados antioxidantes y antimicrobianos naturales. Son sustancias naturales recolectadas por las abejas de ciertos árboles y plantas (Choi *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 1995), para usarlas en la colmena como pegamento de estructuras y barrera protectora sobre sus enemigos (Figura 2). Contienen una gran variedad de compuestos químicos cuya composición depende del tipo de planta y origen geográfico de recolección (Mendes da Silva *et al.*, 2006; Russo *et al.*, 2002).

### **Origen de los Propóleos**

Existen dos teorías sobre la procedencia de los propóleos elaborados por las abejas. La primera establece que los propóleos son recolectados por las abejas con sus mandíbulas, tomando las partículas resinosas que hay sobre las yemas de diferentes plantas. Entre las más comunes están el álamo, sauce, abedul, aliso, castaño silvestre, pino, enebro y algunas plantas herbáceas. Después de sujetar la partícula resinosa, es almacenada en la antera de las flores y posteriormente en la colmena. La otra teoría sobre el origen de los propóleos manifiesta que se trata de un producto resultante de la digestión del



**Figura 2.** Entrada principal de una colmena (FAO, 1996).

polen que se lleva a cabo en un pequeño órgano que la abeja posee entre el buche y el intestino medio. La cantidad promedio que puede producirse por colmena durante un año depende de la raza de abeja, y suele estar entre los 150 y 300 g; y su recolección se lleva a cabo al inicio de la primavera, ya que es necesario en la colmena durante la época de frío (Asis, 1996).

### **Recolección de los Propóleos**

Durante la recolección de los propóleos, el apicultor coloca una plancha plástica perforada sobre la colmena; después de la recolección, la plancha se introduce en un congelador hasta que el contenido se congele para poder retirarlo más fácilmente. Luego la plancha se introduce en agua caliente para separar los propóleos de la cera, abejas muertas o restos de otros animales. Al retirarlos del agua caliente los propóleos se presentan como una sustancia similar a una goma de mascar o resina, y posteriormente toma una forma granulosa y floja, de color ligeramente oscuro. Para su óptima conservación, se recomienda utilizar recipientes de vidrio, nunca de plástico, lejos del aire y de la luz (Asis, 1996; FAO, 1996).

## Composición de los Propóleos

La composición de los propóleos es sumamente compleja; sus principales componentes son resinas y bálsamos (50-55%), ceras (25-35%), aceites volátiles (10%), polen (5%), minerales y sustancias orgánicas (5%). Entre estas últimas se han detectado ácidos orgánicos, como benzoico y gálico; ácidos fenólicos, como caféico, cinámico, fenílico, isofenílico y p-cumarínico (Farré *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2003). También se encuentran aldehídos aromáticos (vainillina, isovainillina); cumarinas (esculetol, escopoletol) y flavonoides (Kumazawa *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2003). Además, se pueden encontrar flavonas (acacetina, crisina amarilla, pectolinarigenina, tectocrisina), flavonoles (galangina, izalquinina, kaempférido, quercetina, ramnocitrina), flavononas (pinostrobina, sakuranetina) o flavononoles (pinobanksina). Entre los minerales se encuentran aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, cobre, estaño, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, plomo, selenio, silicio, estroncio, titanio, vanadio y zinc. Mientras que las vitaminas que pueden estar presentes son provitamina A, vitamina B<sub>3</sub>, y otras del grupo B (Asis, 1996; Farré *et al.*, 2004).

La composición de los propóleos, depende de la vegetación presente en el sitio de recolección (Tabla 1); y debido a sus diferencias en cuanto a

**Tabla 1.** Contenido de compuestos en extractos de propóleos de diferente origen geográfico ( $\mu\text{g/ml}$  de propóleo).

Estudio	Propóleos	Concentración ( $\mu\text{g/g}$ propóleo)						
		Qc	Ru	Cri	Kp	Ap	Pn	Ac
1	PU	*	*	0.293	-	-	1.092	0.046
	PAP	*	0.021	0.035	-	-	0.314	0.029
	PC	*	*	0.057	-	-	0.303	*
2	Argentina	0.011	*	*	0.012	0.060	0.344	*
	Australia	0.024	*	*	0.020	0.092	0.294	*
	Brasil	*	*	*	*	*	*	*
	Bulgaria	0.024	*	*	0.025	0.067	0.472	*
	Chile	0.008	*	*	0.007	0.071	0.431	*
	China (Hebei)	0.022	*	*	0.011	0.086	0.274	*
	China (Hubei)	0.019	*	*	0.013	0.086	0.308	*
	China (Zhejiang)	0.004	*	*	0.013	0.072	0.235	*
	Hungarían	0.022	*	*	0.024	0.045	0.256	*
	Nueva Zelanda	0.006	*	*	0.019	0.392	0.499	*
	Sudáfrica	*	*	*	0.005	*	0.349	*
	Tailandia	*	*	*	*	*	*	*
	Ucrania	*	*	*	0.055	0.020	0.046	*
	Uruguay	0.013	*	*	0.013	0.074	0.375	*
	Estados Unidos	0.019	*	*	0.052	0.003	0.234	*
Uzbekistán	0.004	*	*	0.019	0.041	0.223	*	

Quercetina (Qc), Rutina (Ru), Crisina (Cri), Kaempferol (Kp), Apigenina (Ap), Pinocembrina (Pn) y Acacetina (Ac). Propóleo Ures (PU), propóleo Pueblo Álamos (PAP) y propóleo Caborca (PC). (\*) Compuestos no identificados. (-). Compuesto no evaluado en el estudio. (<sup>1</sup>Hernández *et al.*, 2007; <sup>2</sup>Kumazawa *et al.*, 2004).



composición química, las actividades biológicas de los propóleos de diferentes áreas también pueden ser diferentes (Kumazawa *et al.*, 2004). Los propóleos pueden clasificarse en función de su origen geográfico, debido a que su composición cambia ampliamente respecto a la variedad fitogeográfica de las zona de recolección (Farré *et al.*, 2004).

### **Actividad Antioxidante de los Propóleos**

Los propóleos son una fuente natural de compuestos antioxidantes, que protegen a los aceites, ácidos grasos y ceras de la oxidación. Sus propiedades antioxidantes se deben principalmente a la actividad que poseen para retardar la formación de radicales libres en las etapas iniciales de la oxidación de lípidos (Farré *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2003). Russo *et al.* (2003), investigaron la capacidad antioxidante de compuestos presentes en los propóleos, entre ellos el éster fenético del ácido caféico (CAPE) y la galangina, siendo el CAPE el componente que mostró mayor afinidad para atrapar radicales libres, es decir, una alta capacidad antioxidante, sugiriendo que tiene una función muy importante en la actividad antioxidante de los propóleos.

Nagai *et al.* (2003), prepararon diferentes extractos acuosos de propóleos y estudiaron sus propiedades antioxidantes *in vitro*. Encontraron que la actividad para atrapar los radicales libres de estos extractos fue alta, inhibiendo la formación de superóxidos y recomendaron los extractos acuosos de propóleos por su potencial farmacéutico para pacientes con varias enfermedades tales como cáncer, cardiovasculares y diabetes.

Otras de las investigaciones realizadas para medir el efecto antioxidante de los propóleos, fueron reportadas por Mendes da Silva *et al.* (2006), quienes estudiaron extractos etanólicos de propóleos de una región brasileña y midieron su habilidad para atrapar radicales libres. Esta actividad fue correlacionada con su contenido total de flavonoides y compuestos fenólicos, encontrando una alta correlación entre la propiedad antioxidante de los extractos de propóleos con los niveles de compuestos fenólicos.

### **Crecimiento Microbiano**

Los productos derivados de la carne, debido a su composición química constituyen un excelente sustrato para el desarrollo de los microorganismos, por lo que es muy importante considerar la calidad higiénica durante su manejo.

La contaminación de la carne ocurre durante el sacrificio del animal y a partir de su posterior manipulación. Aunque se guarden las medidas higiénicas necesarias, no es posible impedir que los microorganismos lleguen a la carne; su contaminación es inevitable (Ordoñez y Hoz, 1999).

La seguridad microbiana y la vida de anaquel de los alimentos aumentan al minimizar el nivel inicial de microorganismos, destruir la población microbiana y prevenir o controlar el nivel de crecimiento microbiano (Serdengecti *et al.*, 2006). Para evitar el deterioro causado por microorganismos en la carne y productos cárnicos se emplean diferentes métodos de conservación. El efecto conservador de cada método radica en eliminar, restringir y/o inhibir la actividad microbiana, impidiendo las reacciones enzimáticas, químicas y físicas que darían lugar a cambios organolépticos y a la alteración total del alimento (Pearson y Dutson, 1990).

### **Bacterias Patógenas en la Carne**

Los productos cárnicos pueden funcionar como transportadores de microorganismos implícitos en muchas de las enfermedades producidas por los alimentos, debido a que son una fuente ideal de nutrientes para la proliferación

y crecimiento de las bacterias patógenas. La flora microbiana de carnes rojas y aves de corral, consiste en bacterias mesófilas provenientes del animal, suelo, ambiente y agua. Las bacterias también se presentan en productos cárnicos por contaminación del equipo y la mala manipulación durante su procesamiento. Los niveles y frecuencias de las bacterias fluctúan dependiendo de la estación del año, origen del animal, modo de transporte, área de retención y las condiciones de procesamiento (FDA, 2009a; Pearson y Dutson, 1990). Entre algunos de los patógenos más comunes en carnes se encuentran, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus*.

*Salmonella* spp. *Salmonella* spp es una bacteria gram negativa, que no genera esporas, se encuentra comúnmente en carnes rojas, mariscos crudos y aves de corral, y es parte de su flora natural. La incidencia y número de estos microorganismos varían de acuerdo a la especie del animal y condiciones de procesamiento. Las principales enfermedad causada por *Salmonella* spp por consumo de productos cárnicos son la salmonelosis, tifoidea y paratifoidea; provocando náuseas, vómito, calambres abdominales, septicemia, fiebre y diarrea. Su presencia se debe a la pobre higiene durante el procesamiento o manufactura de los alimentos (FDA, 2009b; Pearson y Dutson, 1990).

*Escherichia coli O157:H7*. Se distinguen seis cepas de *E. coli* según su poder patógeno (*virotipos*): *E. coli* enteropatogénica, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* de adherencia difusa y *E. coli* enterohemorrágica o verotoxigénica (Dziva *et al.*, 2004). En este último grupo se encuentra a *E. coli O157:H7*, la cual es una de cientos de cepas de la bacteria *E. coli*. La combinación de letras y números en el nombre de la bacteria se refiere a los marcadores específicos que se encuentran en su superficie, lo cual la distingue de otros tipos de *E. coli*. Contiene el antígeno somático O, proveniente del lipopolisacárido de la pared celular y el antígeno flagelar H. Esta cepa produce una potente toxina y puede ocasionar enfermedades graves como el Síndrome urémico hemolítico (SUH), la cual es una enfermedad infecto-contagiosa que se caracteriza por insuficiencia renal, anemia hemolítica, trombocitopenia, defectos de coagulación en la sangre y problemas neurológicos en los pacientes (Dziva *et al.*, 2004; Nataro y Kaper, 1998; Pearson y Dutson, 1990).

*Staphylococcus aureus*. *S. aureus* es una bacteria esférica, gram positiva, capaz de producir una toxina altamente termoestable; puede encontrarse en aire, polvo, aguas residuales, alimentos o equipo de procesamiento de alimentos, humanos y medio ambiente. La intoxicación estafilocócica es una de

las principales enfermedades producidas por los alimentos en los Estados Unidos, y los síntomas más comunes causados son náusea, vómito y dolor abdominal; aunque algunos individuos pueden no mostrar todos los síntomas. Los alimentos involucrados con frecuencia, incluyen la carne y productos derivados de la carne; productos de las aves de corral y de huevo; ensaladas tales como huevo, atún, pollo, papa y macarrones; pastel, chocolate, rellenos de emparedados, leche y productos lácteos (FDA, 2009c; Pearson y Dutson, 1990).

Listeria monocytogenes. *L. monocytogenes* es una bacteria gram positiva, flagelada, que se puede encontrar en el intestino de los seres humanos (1-10%), mamíferos (domésticos y salvajes), así como en aves, pescados y crustáceos; y puede ser aislada de suelo, ensilaje, y otras fuentes ambientales. La enfermedad aguda que este patógeno provoca es conocida como listeriosis, manifestándose en septicemia, meningitis, encefalitis, e infecciones intrauterinas o cervicales en las mujeres embarazadas, que pueden dar lugar al aborto espontáneo y problemas gastrointestinales. Los alimentos asociados a esta bacteria son: leche cruda (no pasteurizada), quesos (particularmente madurados), helados, salchichas fermentadas, aves de corral crudas y cocinadas, carnes crudas (todos los tipos), pescados crudos y ahumados. Su

capacidad de crecer a temperaturas tan bajas como 3°C permite la multiplicación en alimentos refrigerados (FDA, 2009d; Pearson y Dutson, 1990).

### **Actividad Antimicrobiana de los Propóleos**

Diversas investigaciones han demostrado que los propóleos muestran cierta actividad antimicrobiana sobre diversos microorganismos. Dicha propiedad se atribuye en general a su contenido de flavonoides (Grange y Davey, 1990). Tosi *et al.* (2007) evaluaron la actividad bacteriostática de los propóleos sobre *E. coli*, como un método de preservación de alimentos. En sus resultados concluyeron que los propóleos pueden inhibir el desarrollo de *E. coli*, *in vitro*, y consecuentemente pueden ser utilizados como un conservador natural de los alimentos. Grange y Davey (1990), estudiaron la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de propóleos en diferentes cepas bacterianas entre ellas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus* spp, *Bacillus catarrhalis*, *Corynebacterium* spp, *Bacillus cereus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Micobacterium tuberculosis*, y encontraron mayor efecto inhibitorio sobre bacterias gram positivas que en gram negativas.

Fernandes *et al.* (1995), investigaron la capacidad de los propóleos para inhibir bacterias *in vitro*, tales como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *S. typhimurium*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida guilliermondii* de infecciones humanas, observando que las bacterias gram negativas fueron más susceptibles ya que mostraron una menor inhibición en las bacterias evaluadas. El orden de susceptibilidad de los aislados de patógenos fue: *S. aureus*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *S. typhimurium* y *E. coli*. Sin embargo, no se han reportado investigaciones donde se haya evaluado el comportamiento antimicrobiano por efecto de la adición de de propóleos en productos cárnicos.



## **JUSTIFICACIÓN**

La oxidación de lípidos y la contaminación bacteriana son los dos factores más importantes que determinan la pérdida de calidad en los productos cárnicos. El uso de compuestos naturales con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, permite extender la vida de anaquel de estos productos. Los propóleos han mostrado tener esas propiedades, sin embargo, su aplicación en productos cárnicos no ha sido ampliamente estudiada.

## **HIPÓTESIS**

La adición de extractos de propóleos en hamburguesas de bovino sin cocinar, retarda la oxidación lipídica e inhibe el crecimiento microbiano.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de propóleos de diferentes fuentes, en hamburguesas de bovino sin cocinar y almacenadas a temperatura de refrigeración.

### Objetivos específicos

1. Identificar y cuantificar compuestos fenólicos presentes en los extractos de propóleos.
2. Determinar la capacidad antioxidante de los propóleos (2%) en hamburguesas de bovino sin cocinar, durante su almacenamiento a 2°C, sin iluminación.
3. Evaluar el potencial de los propóleos para preservar el color de hamburguesas de bovino sin cocinar durante su almacenamiento.
4. Determinar el efecto antimicrobiano de los propóleos en *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp, así como su efecto en la sobrevivencia de *S. aureus* inoculado en hamburguesas de bovino

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Formulación de las Hamburguesas

La materia prima utilizada para la formulación de las hamburguesas fue pulpa negra (*M. Semimembranosus*, de bovino) 48 h *postmortem*, la cual se limpió y cortó en trozos, para posteriormente molerse en un molino (Hobart Dayton, México) en un cedazo de tamaño de 1/8" (4.5 mm). Una vez molida la carne se dividió en 4 porciones para definir los diferentes tratamientos: control, propóleo comercial 1 (PC1), propóleo comercial 2 (PC2) y un tercer extracto etanólico de propóleo (PAP), el cual fue recolectado en Pueblo Álamos, Sonora, y obtenido como parte de este trabajo en el laboratorio.

Las hamburguesas de cada tratamiento se formularon con una concentración de 1.5% de NaCl, 20% de grasa de lomo de bovino y 2% de cada extracto de propóleo, a excepción del control, que no contenía propóleos. Posteriormente, se empacaron en emplayado, y se almacenaron a 2°C sin iluminación durante 2 semanas, realizándose los muestreos cada 4 días.

## **Extractos de Propóleos**

Los antioxidantes y antimicrobianos que se utilizaron en los tratamientos de este trabajo de investigación fueron extractos de propóleos de diferentes fuentes, uno de ellos comercializado en el estado de Sonora de la marca comercial “Las mieles de Sonora”, el otro distribuido en el estado de Sinaloa de la marca “Osako”, y un tercer extracto (PAP) obtenido en el laboratorio con material proporcionado por el laboratorio de Biopolímeros de la CTAOA del CIAD, el cual se recolectó en Pueblo de Álamos, Sonora (29°07'129"N), el cual se mantuvo en congelación a -20 °C en la oscuridad.

## **Obtención del Extracto Etanólico de Propóleos**

La obtención del extracto PAP se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Tolosa y Cañizares (2002), la cual consistió en mezclar 20 g de propóleos con 200 ml de etanol absoluto, mezcla que se mantuvo en agitación durante tres días, obteniéndose filtrados cada 24 h. El sólido obtenido en cada filtrado se puso nuevamente en contacto con etanol nuevo y la solución líquida se evaporó a presión reducida en un rotavapor (Büchi R-200). El extracto

etanólico de propóleos obtenido se secó en estufa al vacío a 40°C, siendo este producto seco el extracto final.

### **Análisis de Compuestos Fenólicos de los Propóleos**

El análisis de compuestos fenólicos de los propóleos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo a la metodología planteada por (Chaillou y Nazareno, 2009) en un equipo HPLC (Agilent 1100 series), acoplado a un detector UV-Vis y una columna de fase reversa (Agilent Inc. Ø 3.5 µm). Como fases móviles se utilizaron una solución de ácido fórmico acuoso (5% v/v) (A) y metanol (B) a una velocidad de flujo de 0.25 ml/min. El gradiente de elución fue 0% B (0 min), 30% (10-20 min), 40% (20-30 min), 45% (30-50 min) 60% (50-52 min), 80% (52-65 min) 100% (65-70 min) y 0% (70-71 min). El volumen de inyección de los extractos (5 mg/ml) fue de 10 µL y la longitud de onda seleccionada para monitorear la detección de los compuestos polifenólicos fue de 340 nm.

### **Fenoles totales**

El análisis de fenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo a lo establecido por Kaur *et al.* (2008), con algunas modificaciones, utilizando una solución de ácido gálico (AG) como estándar (0.1 mg/ml), de la cual se tomaron volúmenes de 0 a 320  $\mu\text{L}$  en intervalos de 40  $\mu\text{L}$ , completándose el volumen de cada uno a 1000  $\mu\text{L}$  con agua deionizada. Los extractos (5 mg/ml) se disolvieron en agua deionizada (1:10 v/v) y de esta solución se tomaron 200  $\mu\text{L}$  para después completarse a 1000  $\mu\text{L}$  con agua deionizada. Posteriormente tanto en la curva como en las muestras se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de una solución de Folin-Ciocalteu 1 N y después de 8 min de reposo se adicionaron 0.750  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7%, se mezcló, y se incubó durante 30 min en oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia a 765 nm, y los resultados se expresaron como porcentaje de ácido gálico en cada extracto.

### **Actividad DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)**

La actividad antioxidante de los extractos de propóleos se evaluó mediante el método del radical-libre DPPH descrito por Usia *et al.* (2002). Se prepararon soluciones stock de cada extracto (10 mg/ml etanol) y se evaluaron

a diferentes concentraciones: 800, 400, 200, 100, 50 y 25 µg/ml de muestra. La mezcla de reacción contenía 1.2 ml de cada dilución con 1.2 ml de DPPH (300 µmol), la cual se homogenizó en un Vortex (VWR Vortexer 2) a 1800 rpm por 10 s y después de 30 min de incubación en la oscuridad, la absorbancia fue medida a 517 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 5 Modelo 336001). Como estándares se utilizaron BHT y ácido ascórbico, y como blanco de reacción DPPH con etanol. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición, comparando la absorbancia de la muestra con el blanco de reacción, y a partir de los valores obtenidos se calculó la concentración a la cual la capacidad antioxidante es del 50% (EC<sub>50</sub>). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

### **Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico**

Para conocer los niveles de oxidación de los lípidos en las hamburguesas se realizó la cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) siguiendo la metodología descrita por Pfalzgraf *et al.* (1995). Mediante esta técnica se determinan los productos secundarios de la oxidación lipídica. Esta determinación consistió en homogenizar 10 g de muestra con 20 ml de ácido tricloroacético al 10% por 20 s (11000 rpm)

empleando un homogeneizador Ultraturrax (marca IKA modelo T25). El homogenizado se centrifugó (3500 g) por 5 min en una centrífuga refrigerada (Beckman modelo J2-21). El sobrenadante se decantó y filtró a través de papel filtro Whatman 41. Posteriormente se tomaron 2 ml del sobrenadante y se mezclaron con 2 ml de TBA 20 mM (300 mg de ácido 2-tiobarbitúrico en 100 ml de agua) con un Vortex (VWR Vortexer 2). Esta mezcla se colocó en baño maría (97 °C) por 20 min, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 531 nm en un espectrofotómetro (Thermo. Spectronic Genesys 5 Modelo 336001). La concentración de TBARS fue expresada como mg MA/kg muestra.

### **Dienos Conjugados**

La determinación de dienos conjugados (DC) ó productos primarios de la oxidación lipídica se realizó mediante la metodología de la AOCS 2.501 (1998), la cual consistió en homogenizar 5 g de muestra con 5 ml de agua destilada por 10 s (11000 rpm) con un homogeneizador Ultraturrax (marca IKA modelo T25). Se mezclaron 0.5 ml de la suspensión obtenida con 5 ml de una solución extractora (3:2, hexano:isopropanol) durante 1 min. Posteriormente, se centrifugó la solución (2000 g) por 5 min en una centrífuga refrigerada



(Beckman modelo J2-21). La solución obtenida se leyó a 233 nm y la concentración de DC ( $\mu\text{mol/mg}$ ) se calculó mediante el coeficiente de extinción molar  $25200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### **Metamioglobina**

El porcentaje de formación de metamioglobina durante el almacenamiento, se midió en la superficie de las hamburguesas de acuerdo a la metodología de Stewart *et al.* (1965). Se determinó por medio de la medida espectrofotométrica de la reflectancia a longitudes de onda de 525 y 572 nm, con un espectrofotómetro Minolta CM 2600d, y a partir de las medidas de reflectancia se calculó la relación K/S. El promedio de cada lectura correspondió a 5 mediciones en la superficie de las hamburguesas.

### **pH**

La metodología utilizada para la determinación de pH en las hamburguesas correspondió al procedimiento descrito por Torrescano *et al.* (2003), midiéndose por triplicado con un potenciómetro (modelo 211 HANNA

Instruments) con electrodo de vidrio previamente calibrado, tomando 3 g de muestra y homogenizándose con 27 ml de agua destilada.

### **Color**

La medición del color de las hamburguesas se realizó en el exterior utilizando un espectrofotómetro Minolta (modelo CM 2600d). Se registraron los parámetros CIE (Comisión Internacional de l'Eclairage, 1978) L\* (luminosidad), a\* (índice de rojo) y b\* (índice de amarillo). También se calcularon los parámetros Chroma (C\*) y hue (h). Se realizaron 5 mediciones en la superficie de las hamburguesas, y el promedio de estas lecturas corresponde a una medida.

### **Concentración Mínima Inhibitoria**

La actividad antimicrobiana de los propóleos sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7, se realizó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) utilizando el método de difusión en placa

(NCCLS, 2003). Las cepas bacterianas fueron previamente pre-enriquecidas en agar BHI, hasta lograr una densidad óptica igual a la lectura del estándar 0.5 de MacFarland y posteriormente ser cultivadas sobre la superficie en placas de agar Muller-Hinton e incubadas a  $35\pm 2$  °C por 24 horas. Una vez permitido el crecimiento, las superficies de las placas se perforaron ( $\varnothing$  5 mm) y se agregaron alícuotas de cada extracto a diversas concentraciones: 300, 60, 30, 15  $\mu\text{g/ml}$ . Como control se usó etanol puro, y la actividad antimicrobiana fue determinada por medición de los diámetros de las zonas de inhibición de los extractos. La MIC se definió como la concentración más baja de la muestra a la cual se inhibe completamente el crecimiento microbiano.

### **Sobrevivencia de *Staphylococcus aureus***

Se pre-enriqueció una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en 5 ml de agar BHI (24 h a 37 °C), y posteriormente, la suspensión se transfirió a un matraz con 200 ml de caldo BHI. La suspensión se incubó con agitación a 37 °C, se realizaron lecturas (600 nm) en un espectrofotómetro (Spectronic 20D+) hasta alcanzar una absorbancia de 0.582 nm. Esta última suspensión fue considerada como la población alta de *S. aureus* ( $>10^5$  UFC/ml), se homogenizaron 40 ml de la solución en carne molida tratada con los extractos

de propóleos e inmediatamente se formaron hamburguesas de 90 g cada una, las cuales fueron almacenadas a 2 °C sin iluminación, realizándose muestreos para hacer el recuento de *S. aureus* cada 4 días de acuerdo a la metodología descrita en el Capitulo 12 del Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2001).

### **Calidad Microbiológica**

La calidad microbiológica ( $\log_{10}$  UFC/g) de las hamburguesas de bovino se evaluó mediante la cuenta total de mesófilos y psicrótrofos aerobios (NOM-110-SSA1-1994). Se prepararon diluciones decimales de las muestras con buffer de fosfatos y se inocularon en cajas petri estériles, utilizando como medio de cultivo agar para recuento en placa (PCA) temperado a  $40 \pm 1$  °C. Las cajas se homogenizaron rotándolas cuidadosamente para lograr una distribución uniforme, una vez solidificado el agar, las cajas se invirtieron, y se incubaron a 35 °C por 48 h para mesófilos y a 5 °C durante 7 días para psicrótrofos. Para el cálculo del número de microorganismos presentes en las muestras se contaron las placas con crecimientos de 20-200 colonias. Los resultados fueron expresados como  $\log_{10}$  UFC/g.

## **Análisis Estadístico**

El diseño experimental del estudio fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial en el que se tuvieron 4 tratamientos (control, PC1, PC2 y PAP) y 5 tiempos de muestreo (0, 4, 8, 12 y 16 días). Las evaluaciones de los diferentes parámetros se realizaron por triplicado a excepción de los microbiológicos, los cuales se evaluaron por duplicado. Se aplicó un ANOVA GLM para establecer si existían diferencias en los tratamientos, usando el paquete estadístico NCSS versión 2007. Las diferencias entre tratamientos se determinaron con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

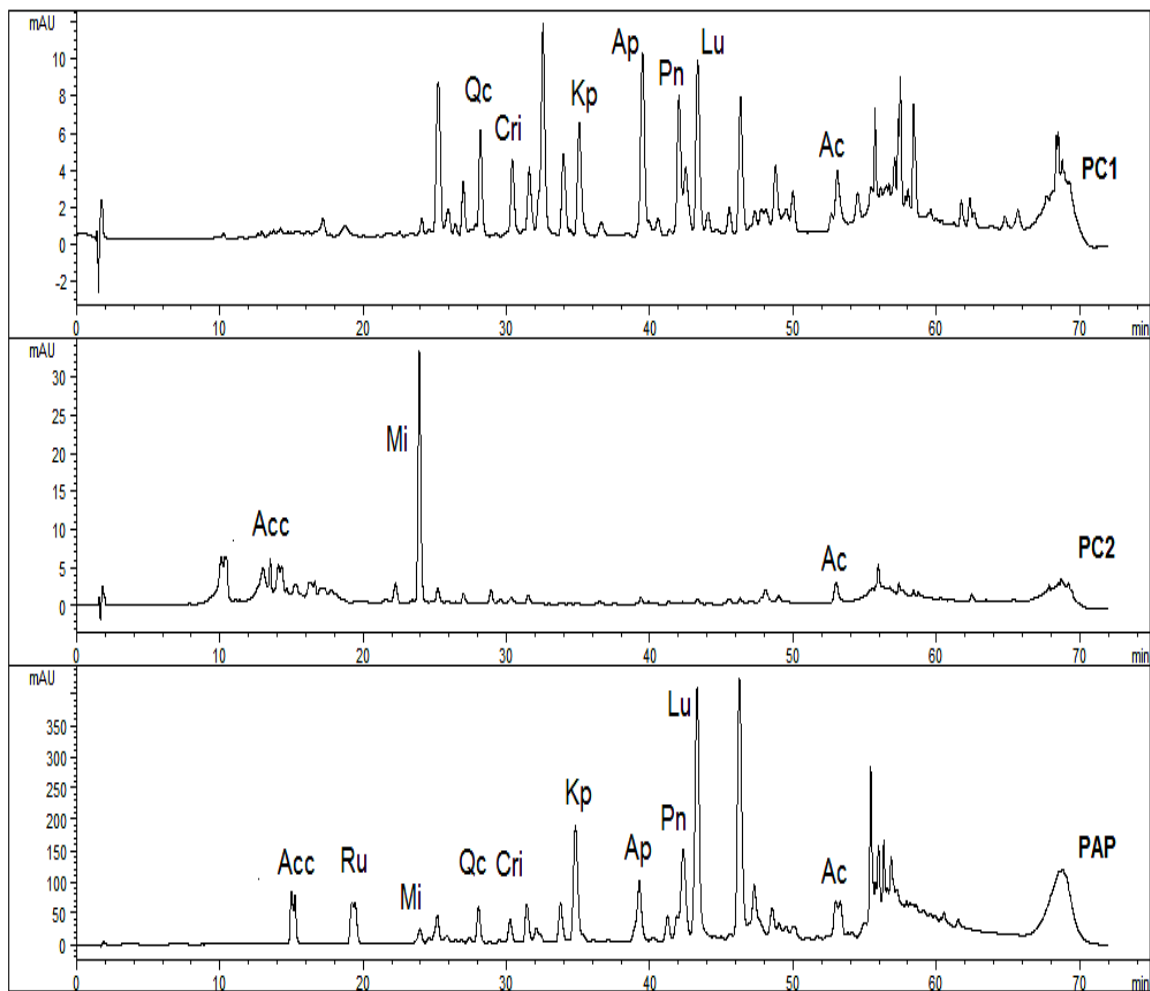
### **Cuantificación e Identificación de Compuestos Fenólicos de los Propóleos**

En la Tabla 2 se muestran los tiempos de retención (tR) de los 10 estándares que se utilizaron para la identificación de los compuestos fenólicos, así como los compuestos que se cuantificaron en los extractos de propóleos. Los tiempos de retención para cada uno de los extractos fueron similares, las diferencias entre los valores de tR excedieron raramente 1 minuto y las secuencias de la elución en los cromatogramas experimentales fueron idénticas, lo cual puede ser observado en la Figura 3. En el cromatograma correspondiente al PC1 de dicha figura, se puede observar que de los 10 estándares no se identificaron ácido cinámico y rutina; en el cromatograma PC2 solamente se identificaron tres compuestos (ácido cinámico, miricetina y acacetina) y en el PAP se encontraron los 10 compuestos. También se puede observar que de los 10 compuestos identificados los que presentaron mayor concentración fueron: quercetina>pinocembrina>kaempferol. Mostrando una concentración de 0.0032, 0.01 y 0.008 mg/100mg de propóleos para el PC1 y 0.392, 0.33 y 0.29 mg/100mg de propóleos para el PAP, siendo el extracto PAP el de mayor contenido. Las curvas de calibración para la cuantificación de compuestos fenólicos se muestran en la Figura 4.

**Tabla 2.** Cuantificación de los 10 compuestos fenólicos identificados en los extractos de propóleos.

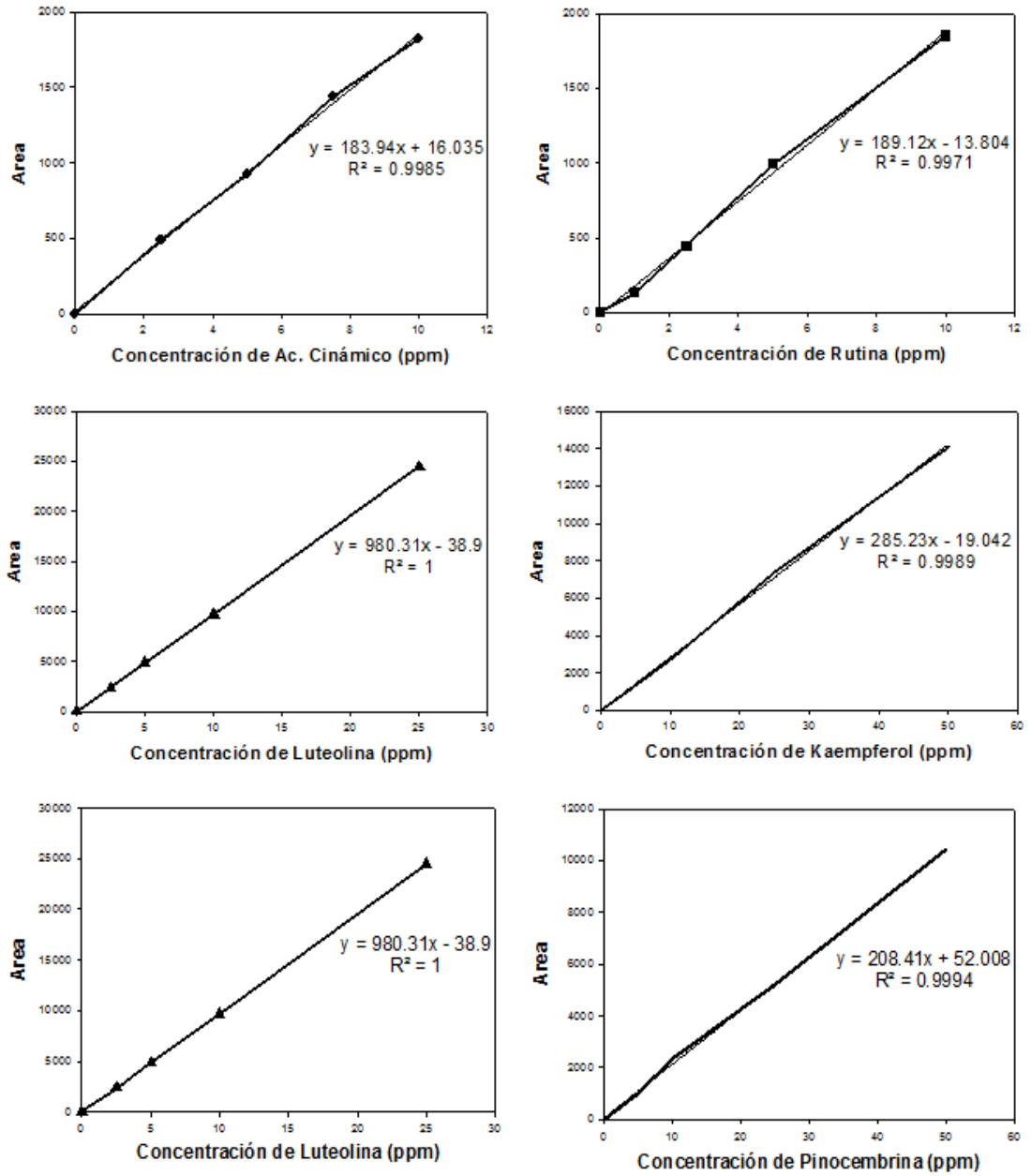
#	Estándar	Abreviación	Tiempo de Retención (min)	mg/ 100 mg propóleos		
				PC1	PC2	PAP
1	Ac. cinámico	<i>Acc</i>	14.68	NE	6E-03	0.108
2	Rutina	<i>Qc</i>	19.18	NE	NE	0.08
3	Miricetina	<i>Mi</i>	23.90	NC	NC	NC
4	Quercetina	<i>Ru</i>	28.05	0.032	NE	0.392
5	Crisina	<i>Cri</i>	31.39	N.C	NE	NC
6	Kaempferol	<i>Kp</i>	34.81	0.01	NE	0.29
7	Apigenina	<i>Ap</i>	39.26	NC	NE	NC
8	Pinocembrina	<i>Pc</i>	42.07	0.008	NE	0.33
9	Luteolina	<i>Lu</i>	43.22	0.004	NE	0.174
10	Acacetina	<i>Ac</i>	52.95	NC	NC	NC

Todos los valores representan la media de tres determinaciones.  
 NC (Compuesto identificado pero no cuantificado).  
 NE (Compuesto no encontrado).



**Figura 3.** Cromatogramas de los compuestos fenólicos identificados en los extractos de propóleos (340 nm).





**Figura 4.** Curvas de calibración para la cuantificación de compuestos fenólicos en los propóleos.

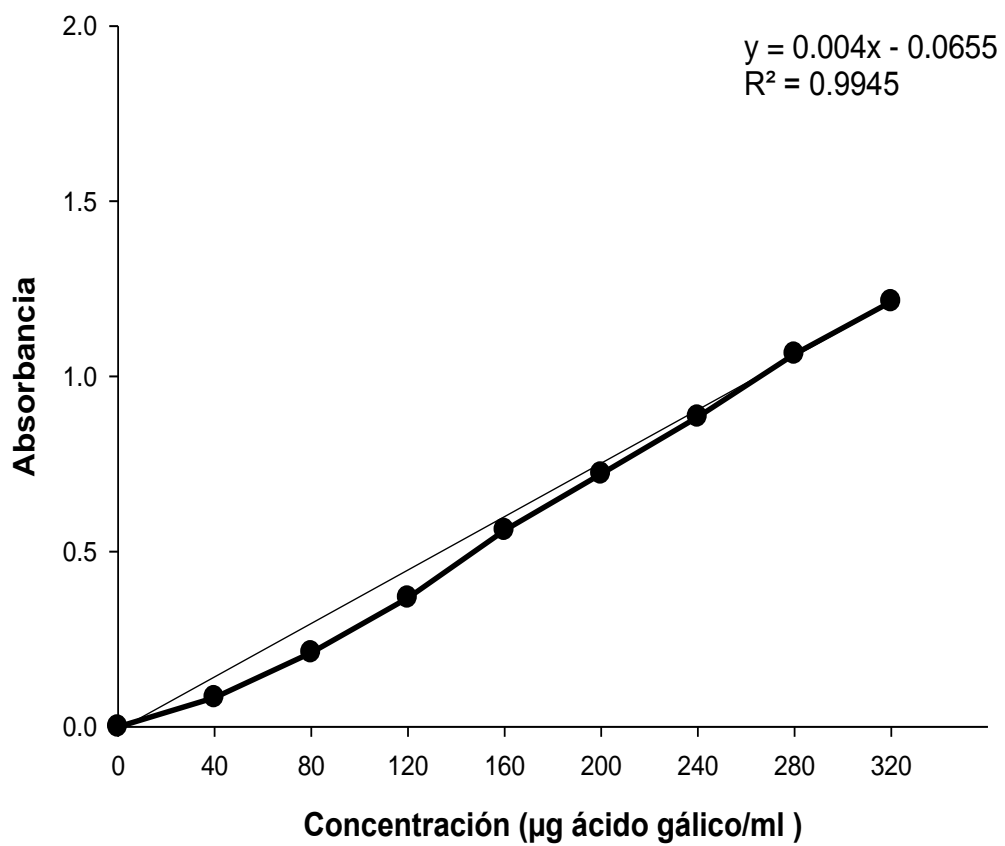
De acuerdo a la literatura los compuestos identificados en los extractos de propóleos, son los responsables de su variable actividad biológica (Farré *et al.*, 2004; Maciejewicz *et al.*, 2001) y la diferencia en la composición química encontrada en los extractos, pudo ser causada por el origen geográfico de la fuente o botánica de los extractos, y/o pérdida de alguno de sus componentes durante la fabricación de los propóleos comerciales (Farré *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2007). Hernández *et al.* (2007) analizaron la composición química y la actividad antiproliferativa en células cancerígenas de los propóleos de tres diferentes regiones áridas y semiáridas de Sonora, México. Ellos cuantificaron los constituyentes químicos mediante HPLC-MS y encontraron que los constituyentes más abundantes de los propóleos sonorenses fueron pinobanksina 3-acetato, crisina y pinocembrina, aunque también en menor proporción acacetina. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos, debido a que el PC1 y PAP son propóleos producidos en Sonora México, y los resultados obtenidos en este estudio demuestran la existencia de altas concentraciones de pinocembrina, así como la presencia de acacetina en los extractos.

Por otro lado Kumazawa *et al.* (2004), estudiaron la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de propóleos de varios orígenes geográficos e identificaron sus constituyentes. Estos investigadores reportan que los componentes identificados en los diferentes propóleos mostraron

diferencias en composición y cuantificación química; los compuestos químicos mayoritarios encontrados en los extractos fueron pinocembrina y crisina (ver Tabla 1).

### **Contenido de Fenoles Totales de los Propóleos**

La curva de calibración obtenida para este análisis se presenta en la Figura 5, de la cual se obtuvo la ecuación  $Y=0.004x-0.0655$  y un  $R^2=0.9945$ , útil para el cálculo de fenoles totales. El contenido de fenoles totales de los tres extractos de propóleos se presenta en la Tabla 3, en la cual se puede observar que los extractos contienen compuestos fenólicos en cantidades significativas ( $p<0.05$ ). Los valores de fenoles totales de cada extracto se presentaron en el siguiente orden:  $48.96\pm 0.02$ ,  $15.08\pm 0.02$  y  $7.37$  mg AG/ml para el PAP, PC1 y PC2 respectivamente, siendo el PAP el extracto que mostró el mayor contenido fenólico, y el único que mostró valores de compuestos fenólicos cercanos al valor mínimo establecido por las normativas argentinas y brasileñas de 50 mg AG/ml (Palomino *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Curva de calibración utilizando ácido gálico (AG) como estándar a 765 nm.

**Tabla 3.** Contenido total de fenoles (mg/ml) de los extractos de propóleos de diferente origen.

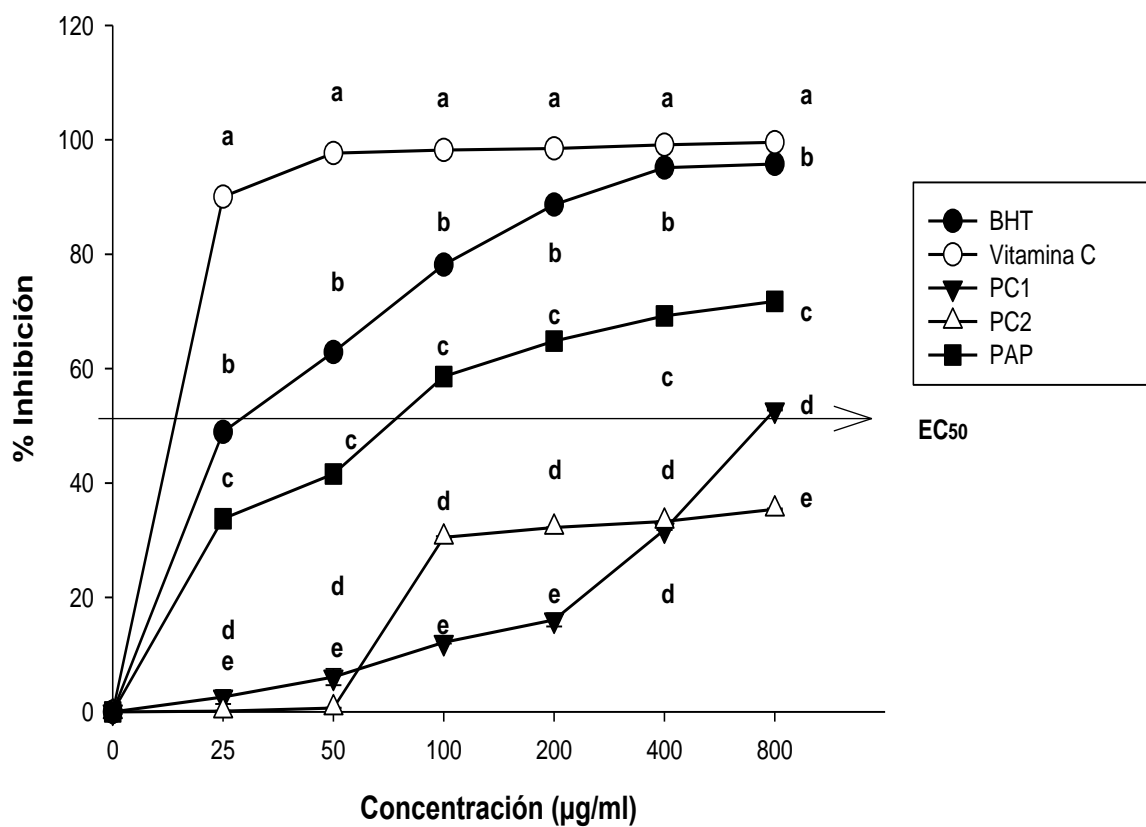
<b>Muestra</b>	<b>Fenoles Totales (mg AG/ml)</b>
<b>PC1</b>	15.08±0.02 <sup>a</sup>
<b>PC2</b>	7.37±0.00 <sup>b</sup>
<b>PAP</b>	48.96±0.02 <sup>c</sup>

*Propóleo comercial 1 (PC1), propóleo comercial 2 (PC2) y propóleo Pueblo Álamos (PAP).  
Diferentes literales indican diferencias significativas (P<0.05).  
Los valores son expresados como equivalentes de ácido gálico.*

Los valores de fenoles totales obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Palomino *et al.* (2009), quienes determinaron el contenido de fenoles totales en extractos etanólicos de propóleos en diferentes regiones de Antioquia (Colombia) y encontraron valores entre los  $22.11 \pm 0.54$  a  $75.22 \pm 1.35$  mg AG/ml. El contenido de fenoles totales en propóleos es un parámetro importante que establece tanto la calidad del material como su potencial biológico, en especial para la actividad antioxidante, en la cual estos compuestos pueden actuar interrumpiendo las reacciones de oxidación de lípidos (Palomino *et al.*, 2009; Velazquez *et al.*, 2007).

### **Actividad DPPH de los Propóleos**

La habilidad que mostraron los diferentes extractos de propóleos para atrapar radicales libres DPPH (1,1-diphenil-2-picrilhidrazil) se muestra en la Figura 6. Se observa que a la más alta concentración (800  $\mu\text{g/ml}$ ) el ácido ascórbico exhibe un 99.5% de inhibición, el BHT 95.7%, PAP 71.7%, PC1 52.8% y PC2 con un 35.4% ( $p < 0.05$ ). A una concentración de 400  $\mu\text{g/ml}$  los tratamientos PC1 y PC2 no fueron diferentes ( $p > 0.05$ ), y a concentraciones de 800, 200, 50 y 25  $\mu\text{g/ml}$  los tratamientos fueron diferentes ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Actividad para atrapar radicales DPPH de los extractos de propóleos (Valores altos de % de inhibición indican mejor capacidad antioxidante).

La más alta actividad para atrapar el radical DPPH en todas las concentraciones evaluadas de los extractos de propóleos se encontró en el PAP, lo cual pudo ser debido a la fuerte habilidad que tiene para donar protones (Aliero *et al.*, 2008) y la concentración a la cual la capacidad antioxidante de las muestras fue del 50% se expresó como EC<sub>50</sub> (µg extracto/ml), la cual se obtuvo por interpolación en un análisis de regresión lineal. El ácido ascórbico mostró un EC<sub>50</sub> de 12.4, el EC<sub>50</sub> para el BHT fue de 26.2, seguido del PAP con 77.0, el PC2 no mostró un EC<sub>50</sub> dentro del rango de concentración del extracto evaluada y finalmente en el PC1 se encontró un valor de 740.5 µg/ml.

Velázquez *et al.* (2007), estudiaron la actividad que tienen los propóleos sonorenses (0-100 µmol<sup>-1</sup>): propóleos de Caborca (CP), propóleos de Ures (UP) y propóleos de Pueblo de Álamos (PAP) para atrapar el radical DPPH; así como de sus constituyentes (0-70 µmol<sup>-1</sup>): rutina, CAPE y galangina. Utilizaron ácido ascórbico y BHT como control, encontrando que el CP exhibió la más alta actividad para atrapar el radical DPPH (86% a 100 µg/ml) respecto a los otros propóleos. El ácido ascórbico mostró un valor de 87.4% y el BHT de 66%.

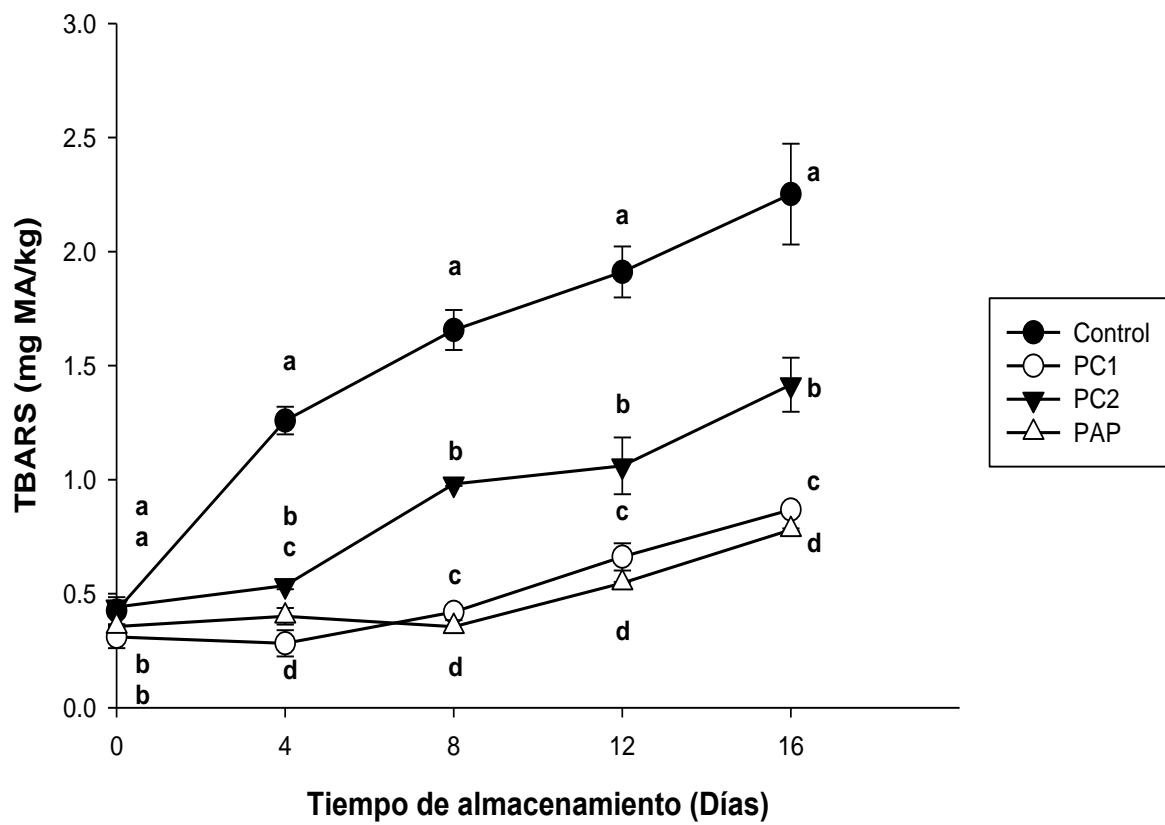
Geckil *et al.* (2005), analizaron la capacidad de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) y extractos acuosos de propóleos (PWE) (1%) para atrapar radicales DPPH y quelar metales, utilizando diferentes volúmenes (0, 20, 50,



100 y 200  $\mu\text{g/ml}$ ), usando como control BHA y BHT. Los resultados muestran que el EEP y el BHA mostraron la misma actividad para atrapar el radical DPPH, mientras que el WEP y el BHT mostraron baja actividad por atrapar el radical a concentraciones de 20 y 50  $\mu\text{g/ml}$ . A concentraciones más altas (100 y 200  $\mu\text{g/ml}$ ) todos los tratamientos mostraron la misma efectividad. Finalmente, estos investigadores sugirieron que el posible mecanismo por el cual el radical DPPH es atrapado es por la reducción (protonación) de este radical por el componente antioxidante a su forma más estable (DPPHH). Los resultados obtenidos anteriormente muestran que la más alta actividad para atrapar el radical DPPH en todas las concentraciones evaluadas la presentó el PAP (71.7%), considerándose por tanto, el extracto con mayor poder antioxidante.

### **Medición de las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico**

Los cambios en los valores de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) a lo largo del almacenamiento se presentan en la Figura 7, en ella se puede observar que los valores de oxidación de lípidos se incrementaron conforme avanzaban los días de almacenamiento en el siguiente orden: control>PC2>PC1>PAP. En el primer día de almacenamiento los tratamientos PC1 y PAP mostraron valores promedios de  $0.33 \pm 0.03$  mg MA/kg siendo estos diferentes ( $p < 0.05$ ) al control y tratamiento PC2, con valores



**Figura 7.** Efecto de la adición de propóleo sobre la formación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (valores bajos indican mayor capacidad antioxidante).

promedios de  $0.43 \pm 0.04$  mg MA/kg. Esto indica que la oxidación lipídica se presentó desde el inicio del almacenamiento, mientras que en los siguientes días (4, 8, 12 y 16) todos los tratamientos fueron diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ).

El almacenamiento en refrigeración es uno de los métodos más importantes de la preservación de la carne y los productos cárnicos. Durante el almacenamiento de las hamburguesas de res, las bajas temperaturas ( $2^{\circ}\text{C}$ ) no previnieron al mínimo muchos de los cambios indeseables que se presentan en la carne (cambios de coloración y olor), debido a que la producción de TBARS fue mucho más rápida en el control, alcanzando valores superiores durante todo el almacenamiento.

Los niveles de TBARS en las hamburguesas tratadas con los extractos de propóleos fueron más bajos ( $p < 0.05$ ), en cualquiera de los días de análisis, siendo el PAP el tratamiento que tuvo significativamente un mejor efecto inhibitorio en la formación de TBARS, y por tanto en la oxidación de lípidos desde que se incorporó en las hamburguesas de bovino, mostrando valores de TBARS de  $0.35 \pm 0.03$  mg MA/Kg de carne hasta el octavo día de almacenamiento.

No se reporta en la bibliografía estudios donde se haya evaluado la formación de TBARS por efecto de la adición de propóleos en hamburguesas de bovino. Sin embargo, In-Suk *et al.* (2002) evaluaron el posible efecto sobre la oxidación de los lípidos de los extractos etanólicos de propóleos (EEP 1, 3 y 5%) y sorbato de potasio (PS 0.15%) en salchichas curadas de cerdo almacenadas en un periodo de 7 días a 20°C y reportaron un incremento gradual de TBARS en todos los tratamientos desde el inicio del experimento, siendo los valores más altos para el control, y los más bajos en las salchichas tratadas con EEP. Los propóleos preparados a la concentración del 3 y 5% mantuvieron valores por debajo del 0.5 mg MA/Kg carne hasta el cuarto día de análisis.

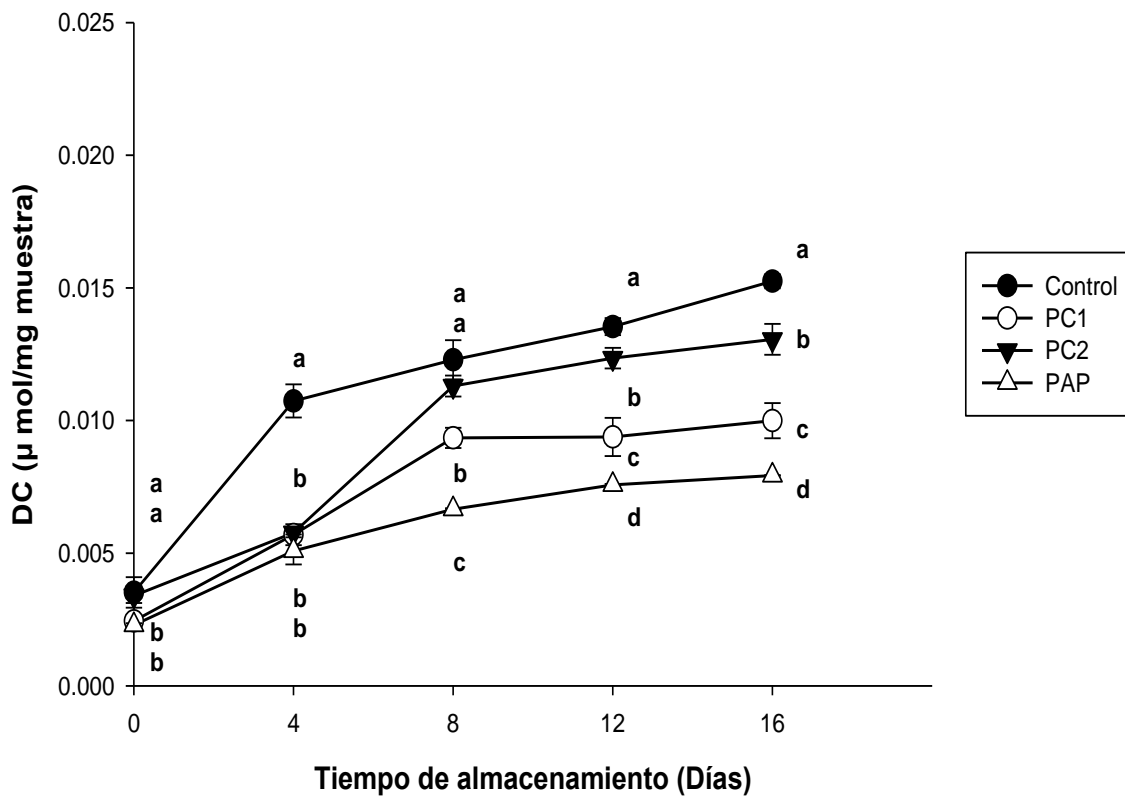
En el estudio de Han y Park (2002) midieron las TBARS en salchichas curadas de cerdo tratadas con extractos etanólicos de propóleos (EEP 0.4%), extractos etanólicos de propóleos secos (DREEP 0.8%), extractos acuosos de propóleos (WEP 0.6%) y sorbato de potasio (PS 0.1%) y evaluaron sus efectos almacenando a 5, 10 y 20 °C después de 0, 2 y 4 semanas. Encontraron incrementos en los valores de TBARS en todos los tratamientos desde el primer día de almacenamiento independientemente de la temperatura; los niveles más altos de TBARS los presentó el control y los niveles más bajos de oxidación se

encontraron en el EEP, el cual a 5°C mostró valores inferiores a 0.5 mg MA/Kg a la segunda semana de almacenamiento.

El mayor efecto antioxidante del PAP puede ser atribuido a las diferencias en la composición química del extracto: contenido total de flavonoides, compuestos fenólicos y a la presencia de compuestos identificados en este extracto tales como la Acc, Ru, Mi, Qc, Cri, Kp, Ap, Pn, Lu y Ac, los cuales pueden inhibir sinérgicamente la formación de radicales libres y propagación de las reacciones de estos radicales a través de la quelación ion-metálica, particularmente con el hierro y cobre (Chaillou y Nazareno, 2009; Fernández-López *et al.*, 2003). Además, puede ser influenciado por la zona geográfica de origen, debido a que las propiedades biológicas de los propóleos de diferentes aéreas también pueden variar (Kumazawa *et al.*, 2004).

### **Medición de Dienes Conjugados**

Los resultados de la medición de dienos conjugados (DC), productos primarios de la oxidación lipídica, se muestran en la Figura 8. En el primer día de almacenamiento, el control y el tratamiento PC2 mostraron los niveles más



**Figura 8.** Efecto de la adición de propóleo sobre la formación de dienos conjugados (valores bajos indican más capacidad antioxidante).

altos de DC con un valor promedio de 0.0035  $\mu\text{mol/mg}$ , siendo estos diferentes ( $p<0.05$ ) al PC1 y al PAP con un valor de 0.0024  $\mu\text{mol/mg}$ .

Los valores de DC se incrementaron (control>PC2>PC1>PAP) conforme avanzaron los días de almacenamiento independientemente de las temperaturas bajas, la cual no retardó la etapa inicial del proceso de oxidación. En el cuarto día de análisis, el control fue el único diferente con un incremento drástico en los niveles de DC (0.01  $\mu\text{mol/mg}$ ). En el octavo día el tratamiento PAP mostró un valor bajo ( $p<0.05$ ) de DC (0.007  $\mu\text{mol/mg}$ ), mientras que en los siguientes días de almacenamiento (12 y 16) todos los tratamientos mostraron diferencias.

No se encontraron investigaciones donde se haya evaluado la formación de DC por efecto de la adición de propóleos en productos cárnicos. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio nos indican que los tratamientos en los que se utilizaron extractos de propóleos mantuvieron niveles de DC más bajos que los encontrados en el control, siendo el PAP el que tuvo un mejor efecto durante la mayor parte del almacenamiento. La actividad antioxidante en las hamburguesas de bovino de este extracto, pudo ser debida a la alta habilidad que tiene para reducir la formación de hidroperóxidos, inactivar radicales libres e interacciones con iones metálicos, o por la

combinación de estas actividades biológicas (Geckil *et al.*, 2005), así como a la presencia de compuestos fenólicos y principalmente alto contenido de quercentina, kaempferol y pinocembrina encontrados en el extracto.

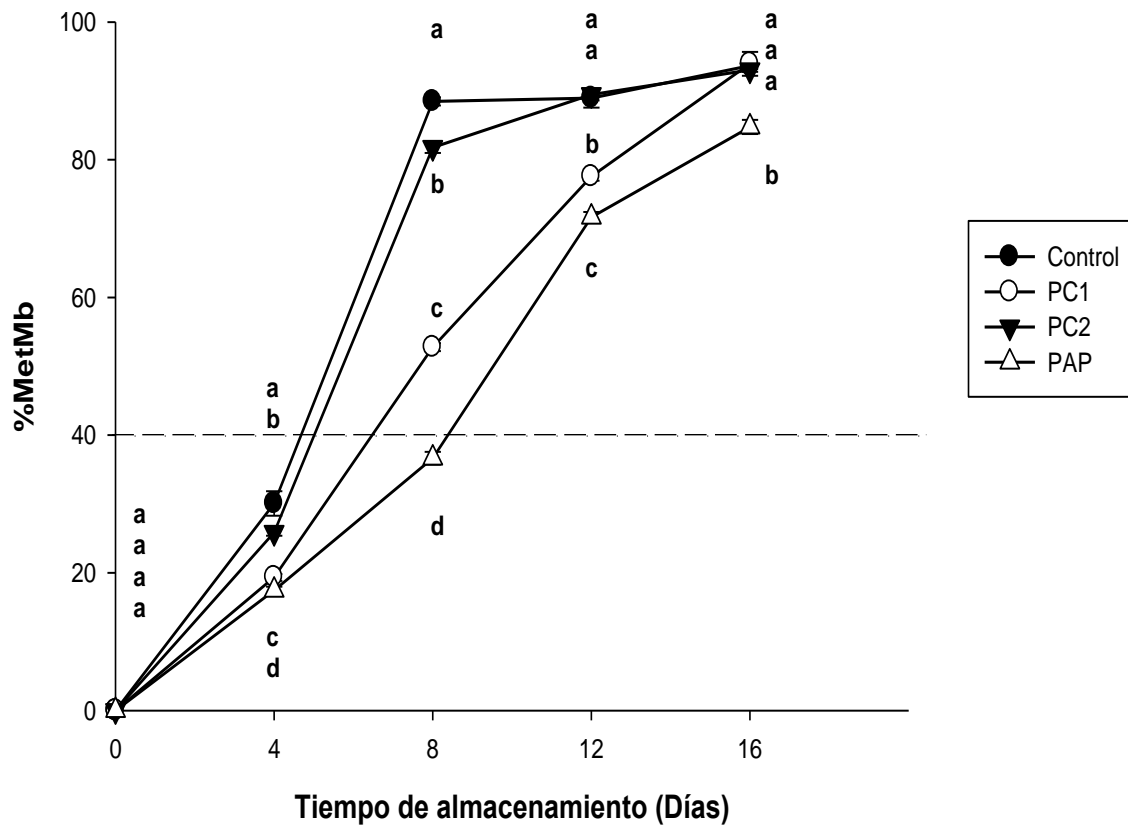
Romero *et al.* (2008), evaluaron las propiedades antioxidantes de extractos de soya utilizados en hamburguesas de pollo cocinadas y almacenadas (8 días) a 6 °C. Se utilizaron diferentes concentraciones del extracto de soya (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 100 g Kg<sup>-1</sup>) para medir el porcentaje de inhibición. Como control se utilizó BHT y se encontró que a todas las concentraciones del extracto incorporadas en las hamburguesas se logró reducir la formación de DC hasta el fin del periodo de almacenamiento. La concentración óptima fue de 30 g/Kg, lo que correspondió al 52% de reducción de oxidación de lípidos como medida de DC, mientras que con el antioxidante sintético se alcanzó un 65% de inhibición, al mismo tiempo. Ellos encontraron que la adición de estos extractos de soya, afectó fuertemente la formación de hidroperóxidos, exhibiendo una moderada influencia sobre la formación de DC.



### **Medición del Porcentaje de Metamioglobina**

El comportamiento correspondiente al incremento en los niveles del porcentaje de metamioglobina (%MetMb) durante el almacenamiento se muestra en la Figura 9, en donde se observa que los valores de %MetMb se incrementaron conforme avanzaron los días de almacenamiento en el siguiente orden: control>PC2>PC1>PAP. En el primer día de almacenamiento no hubo diferencias ( $p>0.05$ ) en los valores del %MetMb, debido a que la estructura química de la oximioglobina (OMb) aun no se había alterado por efecto del ataque del oxígeno en las hamburguesas de bovino.

En el cuarto y octavo día, todos los tratamientos fueron diferentes ( $p<0.05$ ), observándose incrementos drásticos en la formación de MetMb en el control y tratamiento PC2 con valores del 90%, en donde la Mb pasó a un estado de estructura química totalmente oxidada. Greene *et al.* (1971), reportaron que la formación del 40% de metamioglobina causa el rechazo de productos cárnicos por parte del consumidor, y en este estudio en el octavo día los niveles de %MetMb para el tratamiento PAP fueron los más aceptables con valores de  $36.65\pm 0.93$ . En el día 12, el control y el tratamiento PC2 fueron los únicos que no mostraron diferencias, y en el último día de

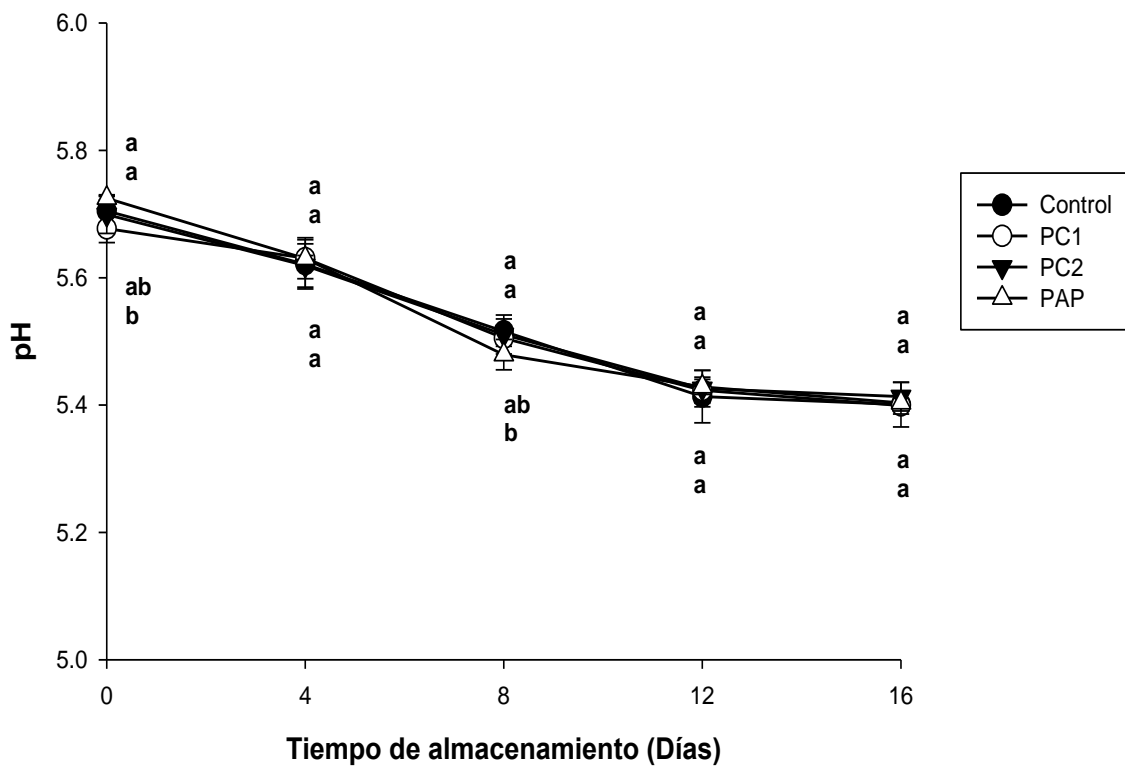


**Figura 9.** Efecto de la adición de propóleo sobre la formación de metamioglobina (valores bajos indican más capacidad antioxidante).

almacenamiento el tratamiento PAP fue diferente, alcanzando el valor más bajo (84% MetMb). Los resultados indican que los extractos de propóleos ejercieron un efecto protector contra la penetración del oxígeno en las hamburguesas de bovino y se impidió así que la Omb se oxidara tan fácilmente por efecto de la exposición prolongada al oxígeno. Por tanto, es necesario mantener a la oximioglobina en su estado químico natural o reducir los niveles de MetMb, lo cual permite extender la vida útil de las hamburguesas.

### **Evaluación de pH**

Los valores de pH se consideraron como un parámetro de la calidad de las hamburguesas (Figura 10). En los primeros cuatro días de almacenamiento no se observaron diferencias entre el control, pero si las mantuvieron contra PC1 y PAP ( $p < 0.05$ ). El pH de los tratamientos PC1 y PAP se ubicó inicialmente entre  $5.68 \pm 0.01$ , valor que está dentro del rango característico de la carne de bovino fresca (Torrescano *et al.*, 2003). Los valores de pH descendieron gradualmente y en los días 12 y 16 de análisis, no destacándose diferencias ( $p > 0.05$ ). En el octavo día, el PAP mostró el valor más bajo de pH ( $5.48 \pm 0.02$ ) y

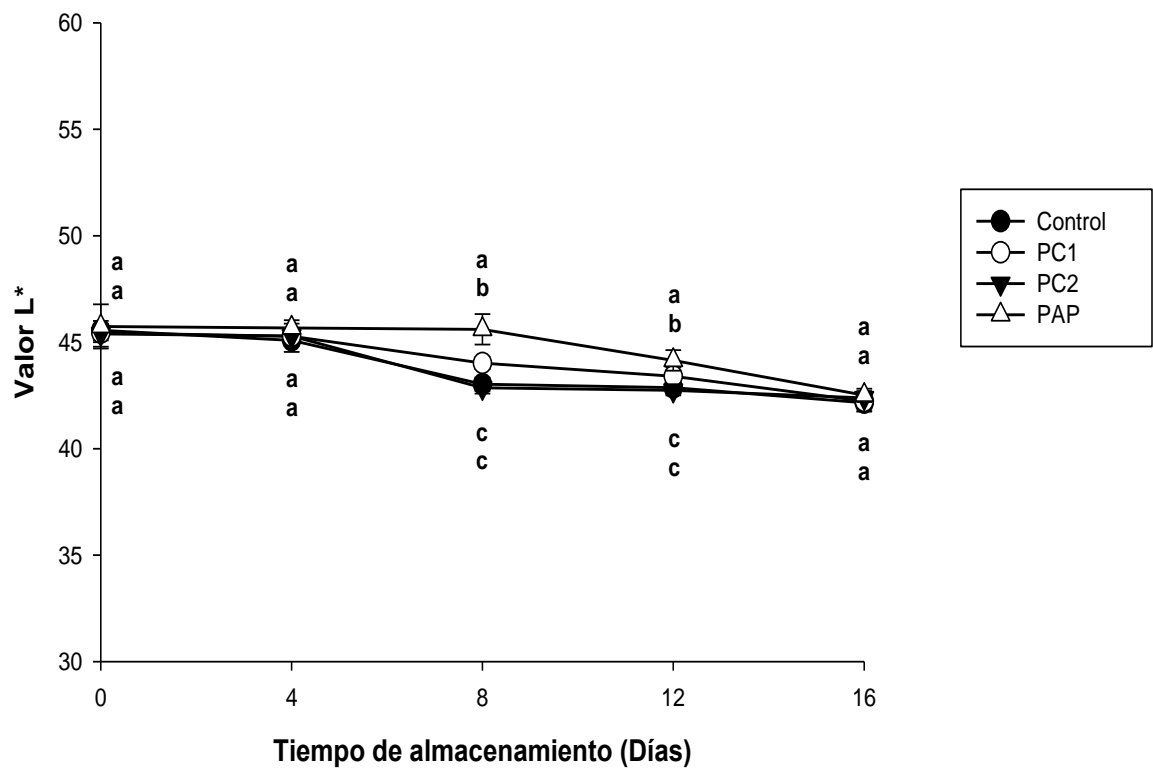


**Figura 10.** Efecto de la adición de propóleo sobre el valor de pH en las hamburguesas de bovino.

en el control, y los tratamientos PC1 y PC2, no se encontraron diferencias ( $p>0.05$ ). En el último día el pH fue de  $5.40\pm 0.02$ . No hay investigaciones donde se haya evaluado el comportamiento del pH en hamburguesas por efecto por efecto de la adición de extractos de propóleos en productos cárnicos. Los valores obtenidos en este experimento difieren a los encontrados por In-Suk *et al.* (2002), quienes estudiaron el efecto de los EEP (1, 3 y 5 %), SN (0.015%) y PS (0.15%) en salchichas curadas de cerdo durante 7 días a una temperatura de almacenamiento de 20°C y reportaron un incremento gradual de pH en todos los tratamientos, mostrando valores de pH más bajos aquellos en los que se utilizaron extractos etanólicos de propóleos (EEP).

### **Medición del Color**

El color es un atributo muy importante al momento de decidir la compra de la carne por parte de los consumidores y sirve como un indicador del envejecimiento y calidad de la misma (Franco *et al.*, 2008). El primer parámetro de color que se reporta es el valor de luminosidad ( $L^*$ ), por lo que en la Figura 11 se puede observar que los valores de  $L^*$  durante los primeros cuatro días se mantuvieron sin diferencia ( $p>0.05$ ) en todos los tratamientos y en el control, con un valor promedio inicial de  $45.53\pm 0.60$ , los cuales descendieron de forma

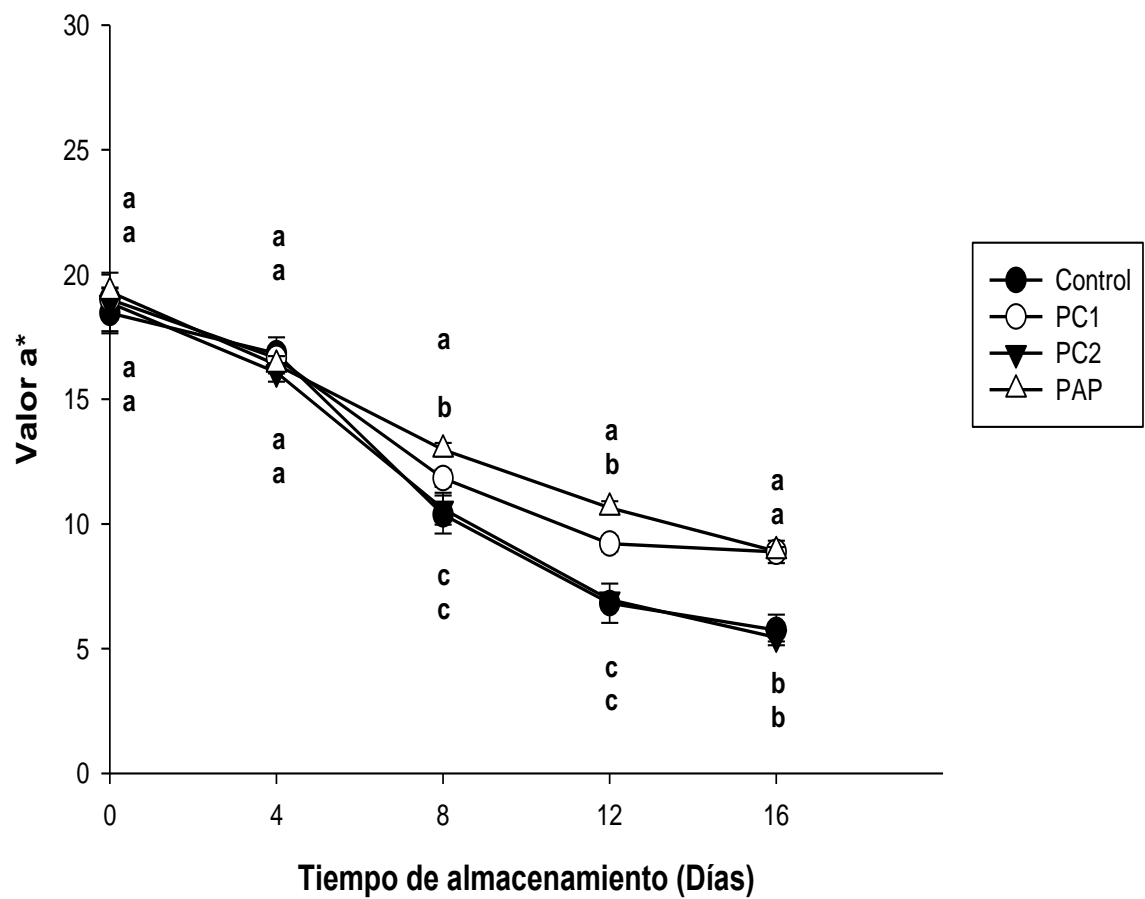


**Figura 11.** Efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición de propóleos sobre el valor L\* en hamburguesas de bovino almacenadas a 2°C.

gradual durante los siguientes días de almacenamiento. En el octavo y doceavo día, el Control y el tratamiento PC2 fueron los únicos que no presentaron diferencias, y en el último día no se reportaron diferencias entre el control y los otros tratamientos.

El PAP y el PC1 fueron los extractos que mantuvieron los valores más elevados en el parámetro  $L^*$ , siendo el PAP más efectivo. La mayor luminosidad estuvo asociada a una menor oxidación de lípidos en las hamburguesas y por la reducción de la pérdida de electrones de la oximioglobina evitando que se formara metamioglobina y consecuentemente el oscurecimiento de las hamburguesas (Andrés *et al.*, 2000; Muriel *et al.*, 2002).

Por otro lado, el almacenamiento prologando de las hamburguesas en presencia de oxígeno y un aumento en la formación de metamioglobina (Franco *et al.*, 2008), provocó que el índice de intensidad de rojo (valor  $a^*$ ) disminuyera progresivamente a lo largo del almacenamiento en todos los tratamientos (ver Figura 12). En los primeros cuatro días no se encontraron diferencias entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ), el valor promedio de  $a^*$  al inicio fue de  $19 \pm 0.64$  y en los siguientes dos días el control y el tratamiento PC2 no mostraron diferencias entre si ( $p > 0.05$ ). En el octavo día de almacenamiento, el PAP mostró los valores más elevados de  $a^*$  ( $13 \pm 0.3$ ), seguido del PC1 con valor de  $12.8 \pm 0.34$ ,



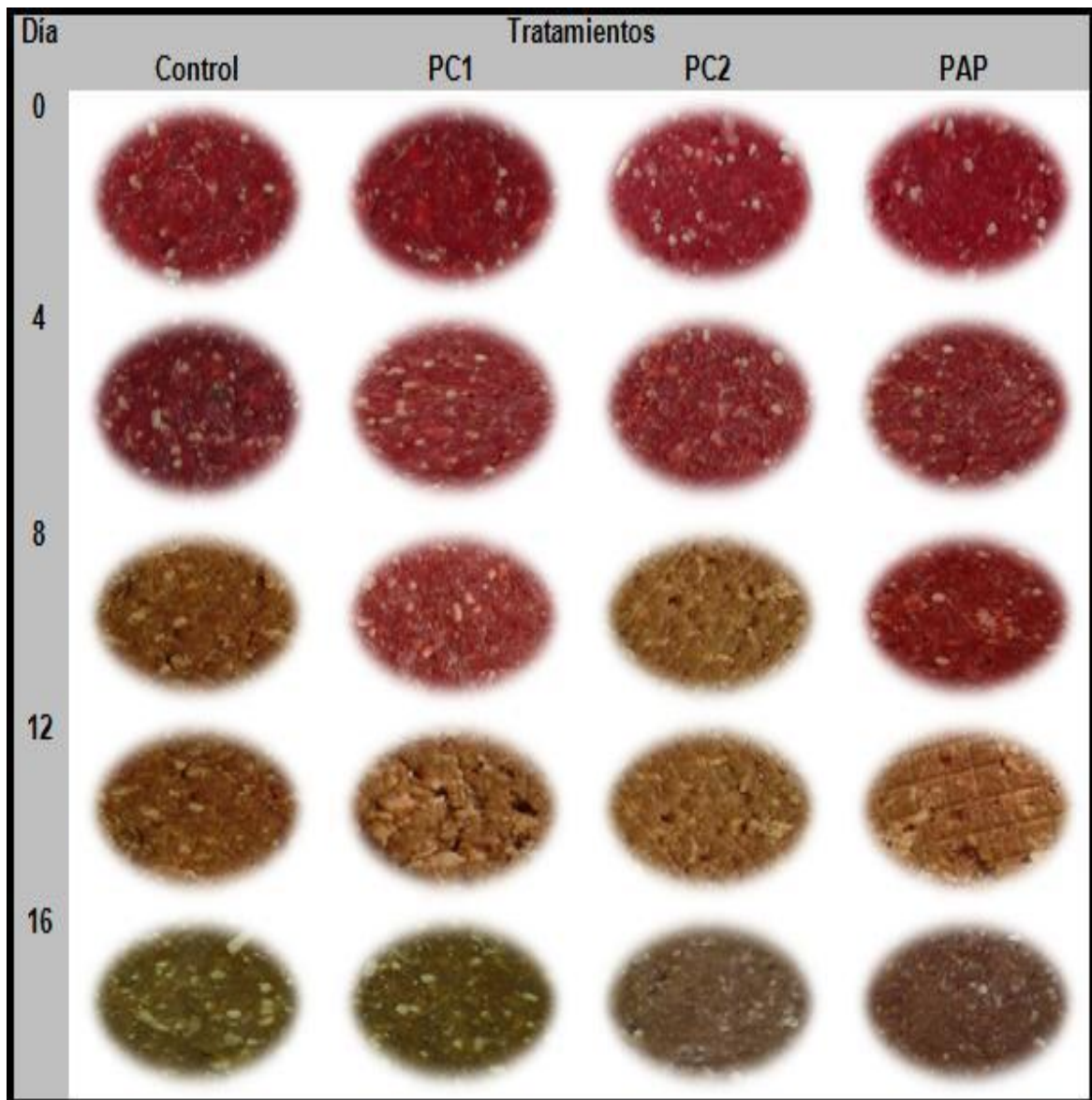
**Figura 12.** Efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición de propóleos sobre el valor a en hamburguesas de bovino almacenadas a 2°C.



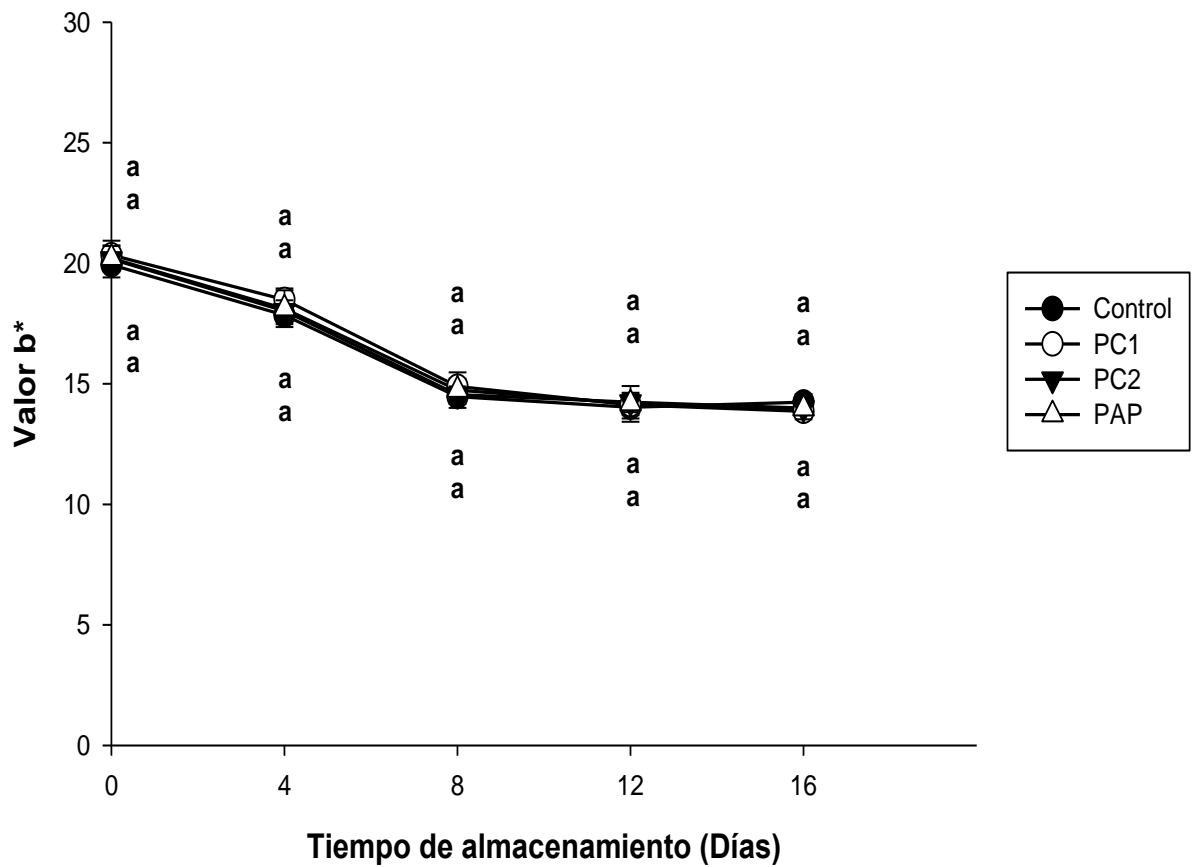
los cuales son valores superiores a 10, indicando que el color de las hamburguesas aun era aceptable (ver Figura 13). Al finalizar el almacenamiento los tratamientos PAP y PC1 no mostraron diferencias entre sí, al igual que el control y PC2, que eran iguales.

El PAP y el PC1 fueron los extractos que mostraron los valores más elevados para el valor  $a^*$ . Esto indica que en las hamburguesas tratadas con estos extractos de propóleos, se tuvo un marcado efecto protector en la estabilidad del color, y por consiguiente un probable aumento en la aceptabilidad del producto.

También se midió el índice de amarillo (valor  $b^*$ ) para observar los posibles cambios de coloración en la grasa de las hamburguesas (Figura 14). Este valor disminuyó durante todo el almacenamiento en los tratamientos, no encontrándose diferencias, lo que indica que el parámetro  $b^*$  no fue influenciado por la adición de extractos de propóleos en las hamburguesas de bovino ni en la grasa utilizada en su formulación. El valor  $b^*$  inicial promedio de los tratamientos fue de  $20.17 \pm 0.5$  y el valor final promedio obtenido fue de  $14 \pm 0.3$ .



**Figura 13.** Cambios de coloración de las hamburguesas de bovino durante su almacenamiento.

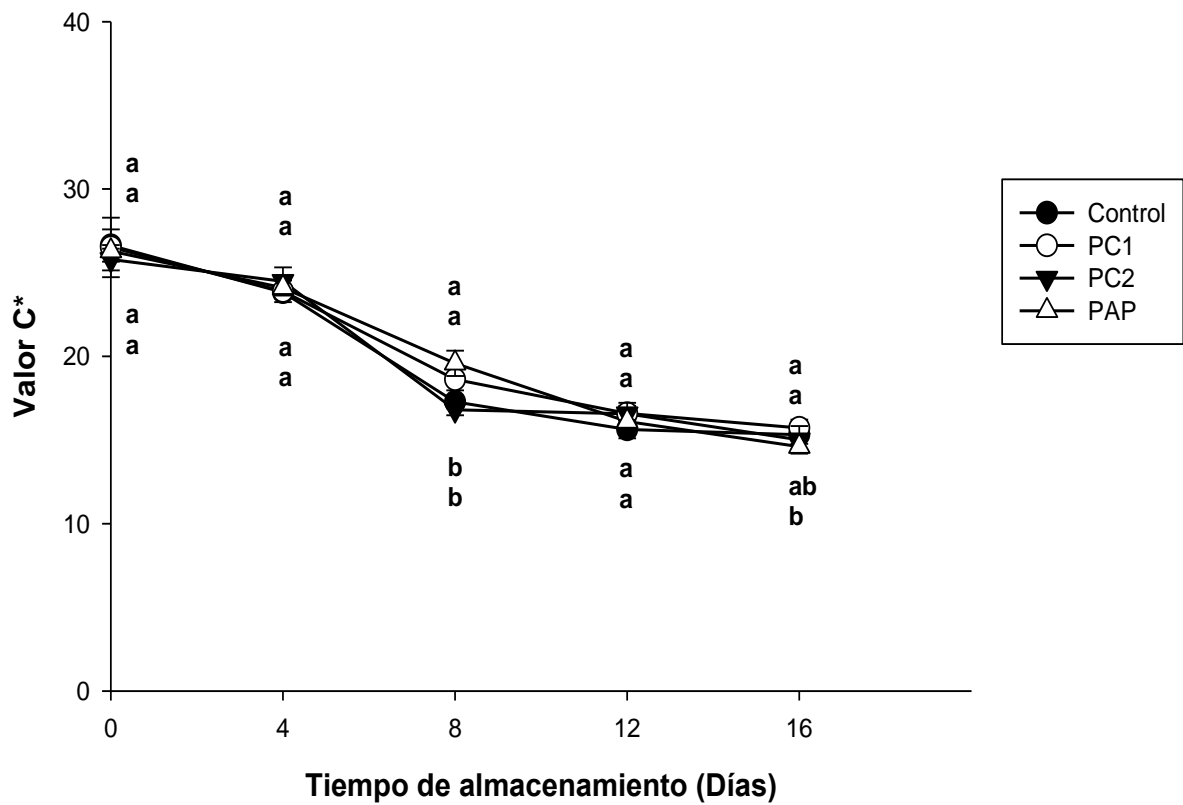


**Figura 14.** Efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición de propóleos sobre el valor b en hamburguesas de bovino almacenadas a 2°C.

Page *et al.* (2001), reportaron que el índice de rojo ( $a^*$ ) es más útil que el índice amarillo ( $b^*$ ) cuando se analiza la estabilidad del color en la superficie, debido a que el valor  $a^*$  mide los cambios de coloración entre rojo y verde, y la oximioglobina al formarse provoca variación en esa gama de colores.

El parámetro  $C^*$  se ha descrito como un buen indicador que caracteriza el cambio de color, debido a que desciende a medida que aparece el color marrón (Franco *et al.*, 2008). La adición de los extractos de propóleos en hamburguesas de bovino influyó en los resultados de los valores de cromaticidad ( $C^*$ ), los cuales descendieron durante el almacenamiento (Figura 15) a medida que se fueron dando los cambios de coloración de rojo a marrón en las hamburguesas, debido a la formación de metamioglobina favorecida por los bajos valores de pH que éstas presentaron (Stewart *et al.*, 1965; Behrends *et al.*, 2003).

El valor promedio inicial de  $C^*$  de los tratamientos fue de  $26.3 \pm 0.9$  y el valor obtenido al final del almacenamiento fue de  $15.2 \pm 0.4$ . En los días 0, 4 y 12 de muestreo los tratamientos no mostraron diferencias ( $p > 0.05$ ); sin embargo, al octavo día los tratamientos PC1 y PAP mostraron los valores más elevados de  $C^*$  ( $p > 0.05$ ), alcanzando un valor promedio de  $19.1 \pm 0.7$ ; mientras que el control y el PC2 mostraron los valores más bajos ( $p > 0.05$ ) respecto correspondientes

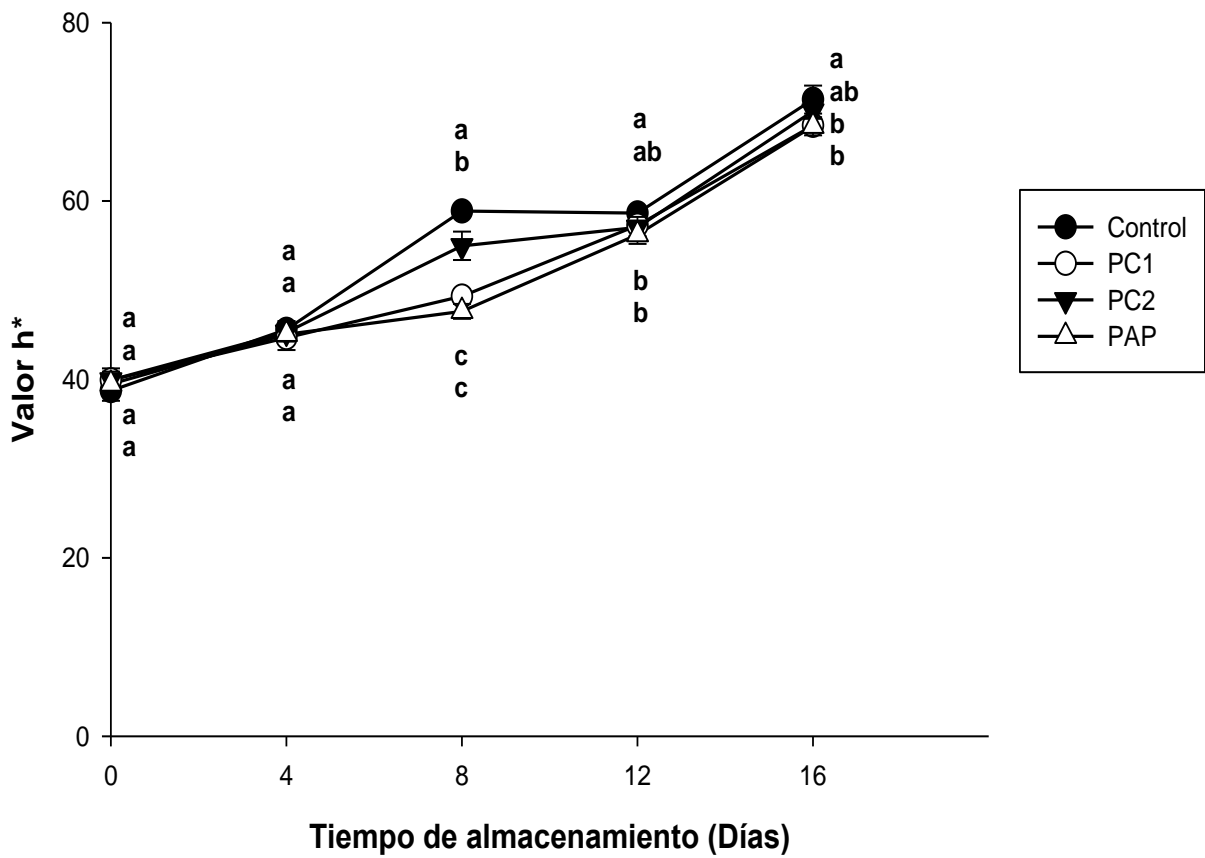


**Figura 15.** Efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición de propóleos sobre el valor C\* en hamburguesas de bovino almacenadas a 2°C.

a este parámetro ( $17.0 \pm 0.35$ ), pero fueron diferentes a los otros dos tratamientos. Al finalizar el almacenamiento, las únicas diferencias encontradas se dieron en el control y tratamiento PC1 con respecto al PAP, el PC2 fue igual a los tratamientos.

El ángulo de matiz (hue o  $h^*$ ) se relaciona con el color y con el estado de los pigmentos en el músculo, el cual a medida que se pierde gradualmente el color ( $C^*$ ) los valores de este parámetro son incrementados (Franco *et al.*, 2008). El incremento en los valores correspondientes a  $h^*$  durante el almacenamiento se muestra en la Figura 16, en la cual se puede observar que durante los primeros 4 días de análisis los tratamientos no fueron diferentes ( $p > 0.05$ ). En el octavo día, los valores más bajos ( $p < 0.05$ ) se presentaron en los tratamientos PC1 y PAP con valores promedios de  $48.5 \pm 0.8$ , y los valores más altos ( $p < 0.05$ ) los presentó el control ( $58.87 \pm 0.2$ ), seguido del tratamiento PC1 con un valor de  $55 \pm 1.6$ .

Los valores de los parámetros  $C^*$  y  $h^*$  pueden estar relacionados con la oxidación de las hamburguesas puesto que se calculan a partir de  $a^*$  y  $b^*$ . Los valores de  $h^*$  más cercanos a  $0^\circ$  indican que el color de las hamburguesas es más rojo y los valores más elevados de  $C^*$  indican que estas poseen una mayor intensidad del color (Muriel *et al.*, 2002).



**Figura 16.** Efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición de propóleos sobre el valor  $h^*$  en hamburguesas de bovino almacenadas a 2°C.

No hay publicaciones en las que se haya estudiado el comportamiento en la estabilidad del color por efecto de la adición de extractos de propóleos de diferente origen en hamburguesas de bovino o en otros productos cárnicos. Los resultados obtenidos en este estudio, indican que los tratamientos en los que se utilizaron extractos de propóleos mantuvieron la estabilidad de color hasta el octavo día de almacenamiento (PAP>PC1). El efecto protector de los extractos pudo estar asociado a la habilidad que estos tienen para quelar las transiciones metálicas involucradas en la generación de radicales libres, lo que retrasa la oxidación de la oximioglobina a metamioglobina (Decker *et al.*, 2000).

### **Concentración Mínima Inhibitoria del propóleo**

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos de propóleos se presenta en la Tabla 4, en la cual se puede observar que la actividad antimicrobiana de los propóleos sobre microorganismos gram (+) fue mejor a la concentración más alta utilizada (300 µg/ml), no encontrándose efecto alguno sobre bacterias gram (-) (*Salmonella spp.* y *Escherichia coli O157:H7*). El PC1 presentó un halo de inhibición efectivo de  $15.33 \pm 0.58$  sobre *S. aureus* y el PC2 un halo de  $7.33 \pm 0.58$ . La MIC fue definida como la concentración más baja de



**Tabla 4.** Concentración mínima inhibitoria (MIC µg/ml). Halos de inhibición (mm) de los extractos de propóleos sobre *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

Muestra	<i>S. aureus</i>				<i>L. monocytogenes</i>			
	300	60	30	15	300	60	30	15
<b>Control</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>PC1</b>	15.33±0.58a	-	-	-	-	-	-	-
<b>PC2</b>	7.33±0.58b	-	-	-	-	-	-	-
<b>PAP</b>	21.97±0.06c	20.03±0.06	15.97±0.06	8.67±0.58	20.7±0.6	12.1±0.1	10	6.7±0.6

Control (Etanol puro), Propóleo comercial 1 (PC1), propóleo comercial 2 (PC2) y propóleo Pueblo Álamos (PAP).

los extractos a la que se restringió el crecimiento de la bacteria, por lo que en ambas muestras la MIC fue de 300 µg/ml.

Por otra parte, el PAP mostró el halo más grande ( $p < 0.05$ ) con un diámetro de  $21.97 \pm 0.06$  mm y este extracto fue el único que presentó inhibición a 60, 30 y 15 µg/ml sobre este patógeno (MIC = 15 µg/ml). Sobre *L. monocytogenes* el único extracto que mostró efecto inhibitorio fue el PAP con halos de inhibición de  $20.7 \pm 0.6$  mm a 300 µg/ml,  $20.03 \pm 0.6$  mm a 60 µg/ml. Un halo de inhibición se considera fuerte cuando este es  $> 20$  mm (Boyanova *et al.*, 2005), por lo que es considerada la concentración más baja a la cual se presentó crecimiento.

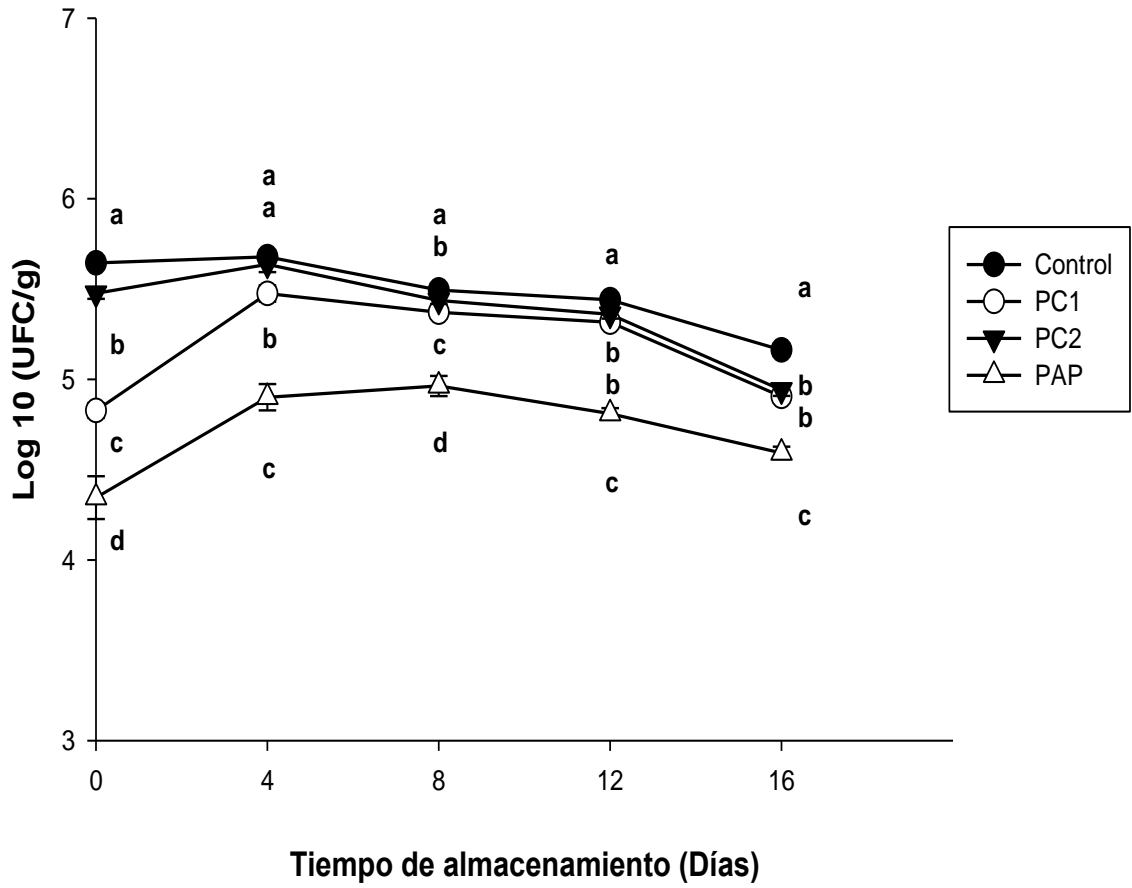
Velázquez *et al.* (2007), estudiaron la actividad antibacteriana de propóleos sonorenses (Propóleo de Ures, Propóleo de Caborca y Propóleo de Pueblo de Álamos) sobre *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. faecalis* a concentraciones de 400, 200, 100, 50 y 0 µg/ml de propóleo. Encontraron que el extracto originario de Ures mostró el mayor efecto inhibitorio, seguido del propóleo de Caborca y Pueblo de Álamos. Este último presentó un alto efecto inhibitorio sobre *S. aureus* a concentraciones de 400 µg/ml, lo cual no concuerda con los resultados mostrados anteriormente en donde la concentración más baja a la cual se presentó inhibición de microorganismos fue

a los 60 µg/ml y en *L. monocytogenes* el extracto de propóleo de Ures mostró la mejor inhibición, no encontrando efecto significativo sobre bacterias gram negativas.

El efecto débil de los propóleos sobre bacterias gram negativas se puede explicar por el hecho de que el propóleo contiene principalmente componentes derivados de las resinas de plantas, y que las resinas son secretadas por las plantas para proteger sobre todo contra los patógenos gram positivos (Garedew *et al.*, 2004). También se ha reportado que en las abejas infectadas por los ácaros de varroa (parásito que puede destruir la colmena) se contaminan principalmente por bacterias gram positivas (Bendel, 2002).

### **Evaluación de la Supervivencia de *Staphylococcus aureus***

En la Figura 17, se detalla el comportamiento de la población de carga alta de *S. aureus* ( $>10^5$  UFC/g), inoculada en las hamburguesas de bovino tratadas con extractos de propóleos. En el primer día, el control y el PC2 mostraron valores superiores a  $5 \log_{10}$  UFC/g, mientras que el PAP y PC1 mostraron una reducción en los valores de la población inicial inoculada en las



**Figura 17.** Efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición de propóleos sobre la sobrevivencia de *S. aureus* hamburguesas de bovino almacenadas a 2°C.

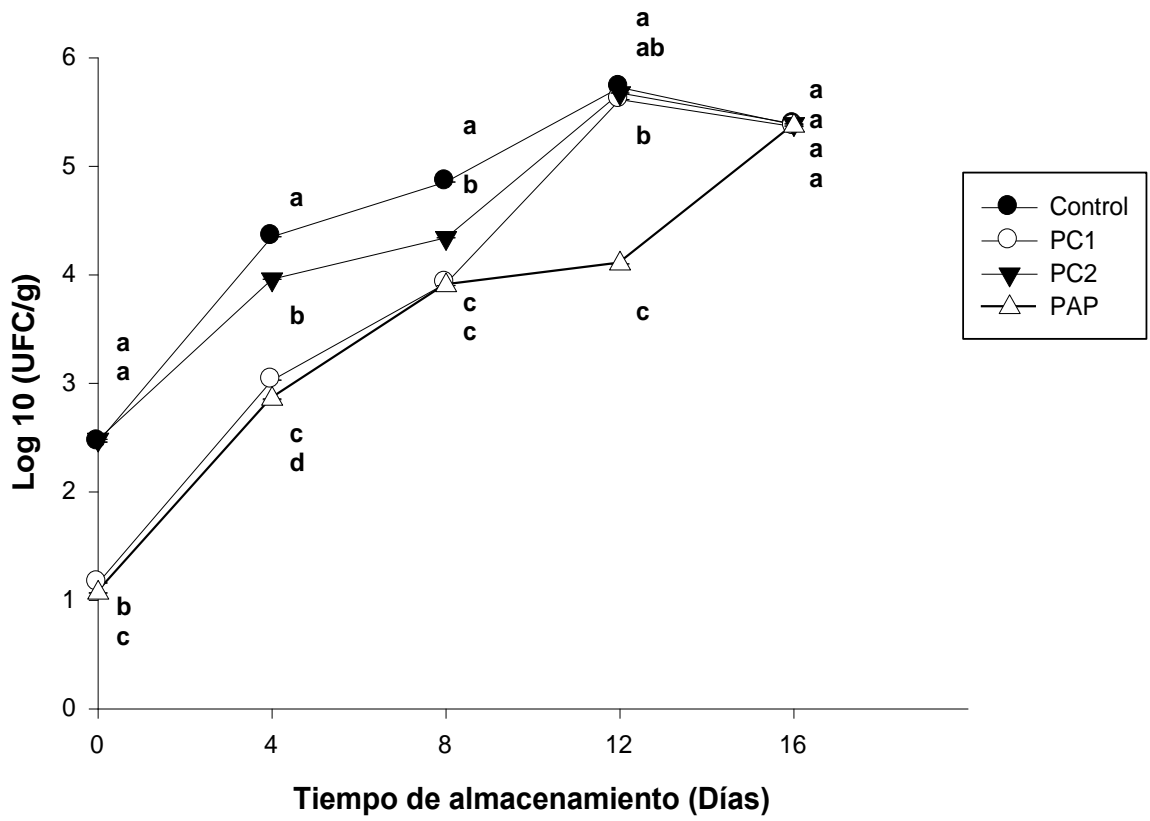
hamburguesas,  $4.3 \log_{10}$  y  $4.8 \log_{10}$  respectivamente. La población bacteriana se incrementó en los tratamientos hasta el cuarto día ( $p < 0.05$ ) y a partir de este la población comenzó a descender a excepción del PAP, el cual mantuvo una fase estacionaria entre los días 4 y 8 para posteriormente descender.

En los días 12 y 16, los tratamientos PC1 y PC2 fueron diferentes al control y al PAP. Los valores más altos se dieron en el orden control > PC2 > PC1 > PAP durante la mayor parte del almacenamiento, siendo el PAP el más efectivo sobre *S. aureus*. El contenido total de fenoles obtenido en este estudio fue más alto para el PAP ( $48.96 \pm 0.02$ ), lo cual se puede correlacionar con su alta actividad antibacteriana. Otro de los factores que pudieran estar determinando el resultado obtenido en la alta efectividad del PAP sobre *S. aureus* en las hamburguesas, puede estar determinando por el tipo y concentración de los compuestos presentes en el extracto (Acc, Ru, Mi, Qc, Cri, Kp, Ap, Pn, Lu y Ac). Los resultados obtenidos permiten evidenciar que la adición de extractos de propóleos mostró una fuerte sensibilidad sobre *S. aureus*, lo cual es un resultado positivo, debido a que la carne y/o los productos cárnicos contaminados con este patógeno representan un riesgo para la salud de los consumidores (FDA, 2009c).

Algunos investigadores citan la reducción *in vitro* en el número de microorganismos (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* and *C. albicans*) y han reportado que el contenido de compuestos fenólicos de diferentes extractos puede inhibir varios patógenos (Velázquez *et al.* 2007; Zhang *et al.*, 2009). Sin embargo, en la literatura no se reportan investigaciones donde se haya evaluado la sobrevivencia de *S. aureus* inoculado en hamburguesas de bovino bajo el efecto de la adición o incorporación de extractos de propóleos como aditivo antimicrobiano en productos cárnicos.

### **Calidad Microbiológica**

El comportamiento correspondiente al desarrollo de la carga mesofílica aerobia de las hamburguesas de bovino se presenta en la Figura 18. En la cual se puede observar que durante la mayor parte del almacenamiento la carga microbiana fue incrementándose en el siguiente orden: control>PC2>PC1>PAP. En el primer día de almacenamiento los tratamientos PC1 y PAP mostraron diferencias entre sí ( $p<0.05$ ), a excepción del PC2 y control los cuales no mostraron diferencia. La cuenta microbiana fue más alta para los tratamientos PC2 y control con una carga promedio de  $2.47\pm 0.002 \log_{10}$  UFC/g, mientras que



**Figura 18.** Efecto de la adición de propóleos sobre la cuenta total de mesófilos aerobios en hamburguesas de bovino.

la carga más baja la presentó el PAP con  $1.07 \pm 0.002 \log_{10}$  UFC/g, y al cuarto día los tratamientos fueron diferentes ( $p < 0.05$ ). Al octavo día de almacenamiento el control y el tratamiento PC2 fueron diferentes, mostrando un carga microbiana de 4.85 y 4.34  $\log_{10}$  UFC/g respectivamente. Los tratamientos PC1 y PAP no fueron diferentes y mantuvieron un valor promedio de 4.0  $\log_{10}$  UFC/g.

En el día 12 el único tratamiento diferente fue el PAP, el cual mostró la carga más baja (4.1  $\log_{10}$  UFC/g), mientras que el resto de los tratamientos mostraron un valor promedio de 5.57  $\log_{10}$  UFC/g, el cual es un valor cercano a los límites considerados como permisibles en la NOM-034-SSA1-1993 de 6  $\log_{10}$  UFC/g. Al final del almacenamiento los tratamientos no mostraron diferencias significativas. El rápido crecimiento de la carga mesófila en el control y el tratamiento PC1 puede ser explicado por los altos valores de pH encontrados en estas hamburguesas durante la primera semana de almacenamiento y a los compuestos fenólicos encontrados en los extractos: Acc, Ru, Mi, Qc, Cri, Kp, Ap, Pn y Lu (Challiou y Nazareno, 2009; Farré *et al.*, 2004).

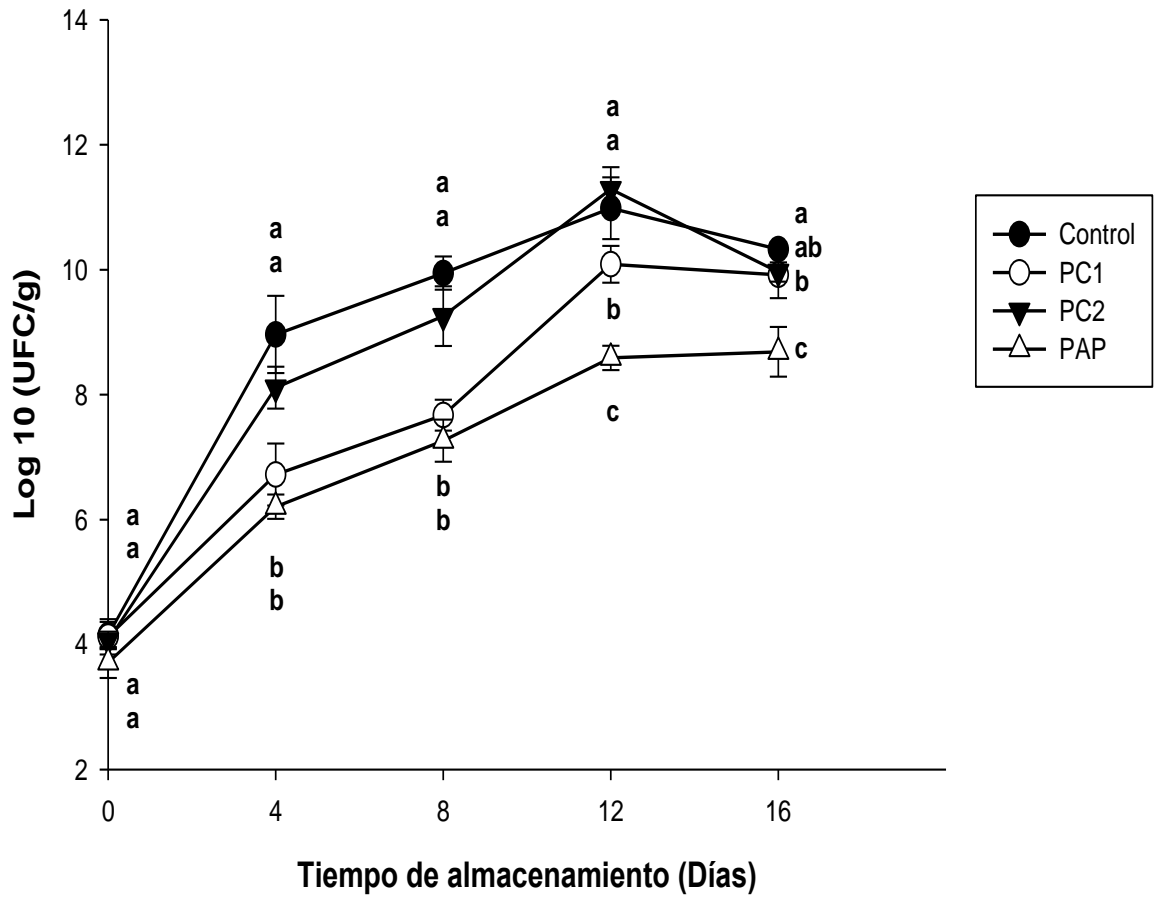
In-Suk *et al.* (2002), evaluaron el efecto de extractos etanólicos de propóleos (EEP) a una concentración de 1, 3 y 5% sobre la cuenta total



mesófilica en salchichas curadas de cerdo durante su almacenamiento por 7 días a 20 °C. Encontraron que la carga bacteriana se fue incrementando en los tratamientos desde el primer día de almacenamiento. En el séptimo día, los niveles más altos de mesófilos los presentó el control ( $4 \log_{10}$  UFC/g) y los más bajos se encontraron en los tratamientos donde se utilizaron extractos de propóleos (propóleo 5% > propóleo 3% > propóleo 1%), con valores inferiores a  $2 \log_{10}$  UFC/g.

Respecto a la carga psicrótrófa, en el primer día de análisis las hamburguesas de bovino mostraron una población promedio de  $4.01 \pm 0.22 \log_{10}$  UFC/g no encontrándose diferencias ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos (Figura 19). En los días cuarto y octavo, el control y el tratamiento PC2 fueron iguales entre sí y diferentes al PC1 y al PAP. Al octavo día el PC1 y PAP ( $7.46 \pm 0.29 \log_{10}$  UFC/g) mostraron la carga bacteriana más baja y la más alta el control y el PC2 con valores superiores a  $8 \log_{10}$  UFC/g ( $p < 0.05$ ), lo cual está relacionado a la presencia de compuestos fenólicos en los extractos de propóleos: Acc, Ru, Mi, Qc, Cri, Kp, Ap, Pn y Lu (Challiou y Nazareno, 2009; Katircioglu y Mercan, 2006; Farré *et al.*, 2004; Yaghoubi *et al.*, 2007).

En los días cuarto y octavo, el control y PC2 fueron iguales entre sí y diferentes al PC1 y al PAP. Los valores más bajos ( $p < 0.05$ ) de psicrótrofos al



**Figura 19.** Efecto de la adición de propóleos sobre la cuenta total de psicrótrofos aerobios en hamburguesas de bovino.

octavo día los mostraron los tratamientos PC1 y PAP ( $7.46 \pm 0.29 \log_{10}$  UFC/g) y los más altos los mostraron el control y el PC2 con valores superiores a  $8 \log_{10}$  UFC/g. Al doceavo día, los tratamientos control, PC1 y PC2 superaron valores de  $8 \log_{10}$ . En el último día de análisis el PC2 fue igual al control y PC1, y el PAP fue diferente a los otros. Las normas oficiales mexicanas (NOM) no especifican los límites considerados como permisibles (UFC/g) para psicrótrofos aerobios en alimentos.

Nagai *et al.* (2006), caracterizaron mieles de diferentes fuentes florales y evaluaron las propiedades funcionales de las mieles, así como productos similares, y los posibles efectos sobre la carga psicrótrofa en carne de res refrigerada. Los productos utilizados fueron: miel comercial, miel pura (China), miel pura (acacia), miel pura (Japonesa) y propóleo; la temperatura de almacenamiento fue de  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y el tiempo de 7 días. Encontraron que la carga microbiana se fue incrementando en los tratamientos durante el almacenamiento. En el séptimo día, los niveles más altos de mesófilos los presentó el control ( $1.1 \times 10^4$  UFC/g) y los más bajos se encontraron en los tratamientos donde se utilizaron los diferentes productos de la miel (propóleos> miel pura de acacia> miel pura Japonesa> miel pura China> miel comercial). El extracto de propóleos mostró el valor más bajo en la carga bacteriana

psicrótrofa (<300 UFC/g) y el valor más alto en el último día lo presentó la miel comercial con valores de  $1.1 \times 10^4$  UFC/g.

Es importante resaltar que los resultados obtenidos en este estudio respecto al efecto antimicrobiano de los extractos, muestran que la adición de los extractos de propóleos en las hamburguesas de bovino presentan una efectiva susceptibilidad (PAP>PC1>PC2) sobre las bacterias gram positivas y una reducción en la carga total bacteriana (mesófilos y psicrótrofos), lo cual permite significativamente extender la vida de las hamburguesas de bovino tratadas con esta clase de extractos. Los resultados de HPLC confirman la presencia de compuestos fenólicos con propiedades antimicrobianas en los extractos evaluados en los tratamientos, tales como: Acc, Ru, Mi, Qc, Cri, Kp, Ap, Pn y Lu (Challiou y Nazareno, 2009; Katircioglu y Mercan, 2006; Farré *et al.*, 2004; Yaghoubi *et al.*, 2007). La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos puede estar asociada a diferentes modos de acción: (1) inhibición de la división celular, (2) destrucción del citoplasma y membrana celular, causando la salida de componentes celulares y cambios en los ácidos grasos y fosfolípidos de la membrana; (3) bacteriólisis, (4) inhibición de la síntesis de proteínas, además de (5) inhibición de la síntesis de ADN y ARN (Shan *et al.*, 2007; Takaisi-Kikuni y Schilcher, 1994).

Kujumgiev *et al.* (1999) compararon la actividad antimicrobiana y la composición química de propóleos de diferentes orígenes geográficos y demostraron que diversas combinaciones de sustancias encontradas en los extractos son esenciales para la actividad biológica del propóleos. Además, Santos *et al.* (2002) indicaron que el mecanismo de acción del propóleos es complejo, y que una simple analogía no puede ser usada como modo de acción al igual que los antibióticos clásicos.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, muestran la presencia de compuestos fenólicos (ácido cinámico, rutina, miricetina, quercetina, crisina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, luteolina y acacetina) en los extractos de propóleos, siendo los componentes mayoritarios la quercetina, pinocembrina y kaempferol, y de acuerdo a su composición el PAP se considera el mejor extracto.

Las hamburguesas conteniendo extractos de propóleos mostraron los valores más bajos de las sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS), formación de dienos conjugados (DC) y porcentaje de metamioglobina, lo cual fue debido al contenido de fenoles totales (FT) y al porcentaje de inhibición del radical DPPH, manifestándose en una menor oxidación de lípidos y en la preservación del color rojo característico de la carne fresca, considerándose el mejor extracto al PAP seguido del PC1.

Los propóleos presentaron una alta sensibilidad sobre bacterias gram positivas (*S. aureus* y *L. monocytogenes*), no encontrándose efecto sobre gram negativas (*Salmonella* spp y *E. coli* O157:H7). Además, inhibieron la población

de *S. aureus* inoculado en las hamburguesas de bovino, así como el crecimiento de mesófilos y psicrótrofos aerobios (PAP>PC1>PC2).

La mayor actividad antibacteriana y antioxidante del PAP puede estar relacionada con su composición, principalmente por la presencia de Acc, Ru, Mi, Qc, Cri, Kp, Ap, Pn, Lu y Ac en el extracto, y a su alto contenido de fenoles totales.

La adición de extractos de propóleos protege el color de la carne por más tiempo, retarda la oxidación de los lípidos y reduce el crecimiento microbiano, por lo que pueden utilizarse para extender la vida de anaquel de la carne.

## REFERENCIAS

1. Aliero A.A., Jimoh F.O., and Afolayan A.J. 2008. Antioxidant and antibacterial properties of *Sansevieria hyacinthoides*. Int. Jor. P. App. Scs, 2(3): 103-110.
2. Andrés A.I., Ruiz J., Mayoral A.I., Tejeda J.F and Cava R. 2000. Influence of rearing conditions and crossbreeding on muscle colour in Iberian pigs. Food Science and Technology International. 6(4): 315-321.
3. Antony S., Rieck J.R. and Dawson P.L. 2000. Effect of dry honey on oxidation in turkey breast meat. Poultry Science, 79: 1846-1850.
4. AOCS. 1998. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (5<sup>th</sup> edition). Champaign, Illinois: American Oil Chemists' Society, ed. D. Firestone.
5. Asis M. 1996. Información no publicable. Apiterapia para todos. Colección Behique. Editorial Ciencia y Técnica. La Habana, Cuba.
6. Behrends J., Mikel W., Armstrong C., and Newman M. 2003. Color stability of *Semitendinosus*, and *Biceps femoris* steaks in a high oxygen modified atmosphere. Journal of Animal Science, 81: 2230-2238.



7. Bendel J.L. 2002. Characterisation of the normal flora of honeybee hives in Central Wisconsin. Univ Wisconsin-La Crosse J Undergrad Res, 5: 437–441.
8. Behrends J., Mikel W., Armstrong C., and Newman M. (2003). Color stability of *Semitendinosus*, and *Biceps femoris* steaks in a high oxygen modified atmosphere. Journal of Animal Science, 81: 2230-2238.
9. Boyanova L., Gergova G., Nikolov R., Derejian S., Lazarova E., Katsarov., Mitov I., and Krastev Z. 2005. Activity of Bulgarian propolis against 94 Helicobacter pylori strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. Journal of Medical Microbiology, 54: 481–483.
10. Brookman P. 1991. Antioxidants and consumer acceptance. Food Technology, 24-28.
11. CIE. 1978. Recommendations of uniform color spaces-color difference equations psychometric color terms. Commission International de l'Éclairage, Paris. Supplement No. 2 to CIE Publication No. 15 (E-1.3.1) 1971/(TC-1.3).

12. Chaillou L.L. and Nazareno M.A. 2009. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT – Food Science and Technology*, 42: 1422-1427.
13. Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M., and Kim J.M. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*, 39: 756-761.
14. Decker E., Faustman C., and Lopez-Bote C.J. 2000. Antioxidants in muscle foods: Nutritional strategies to improve quality. Edition: illustrated. New York. Publicado por Wiley-Interscience. 499 pags.
15. Decker E.A., Livisay S.A., and Zhou S. 2000. A re-evaluation of the antioxidant activity of purified carnosine and histidine. *Biochemistry (Moscow) (Traslacion of Biokhimiya) (Moscow)*, 65:766-770.
16. Dziva F., Van-Diemen P.M., Stevens M.P., Smith A.J., and Wallis T.S. 2004. Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology*, 150: 3631–3645.
17. Farré R., Frassetto I., y Sánchez A. 2004. El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, 45(1): 23-43.

- 18.FAO. 1996. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Value-added products from beekeeping. Bulletin no. 124. Roma.
- 19.Fernandes A., Sugizaki M.F., Fogo M.L., Funari S.R., and Lopes C.A. 1995. In Vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. J. Venom. Anim. Toxins vol.1 n° 2.
- 20.Fernández-López J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Pérez-Alvarez J.A., and Kuri V. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. Meat Science, 69: 371-380.
- 21.FDA. 2001. Bacteriological Analytical Manual (BAM): *Staphylococcus aureus*. Chapter 12. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071429>
- 22.FDA. 2009a. U.S. Food and Drug Administration. Profesionales de la medicina - Los 14 patógenos principales transmitidos por los alimentos.<http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/HealthEducators/ucm091976.htm>.
- 23.FDA. 2009b. U.S. Food and Drug Administration. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook *Salmonella* spp. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodborne>

Illness/FoodborneIllness FoodbornePathogensNaturalToxins/BadBug  
Book/ucm069966.htm.

24.FDA. 2009c. U.S. Food and Drug Administration. Bad Bug Book: Food  
borne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook  
*Staphylococcus aureus*. [http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodborne  
Illness/Foodborne IllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBug  
Book/ucm070064.htm](http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodborne<br/>Illness/Foodborne IllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBug<br/>Book/ucm070064.htm).

25.FDA. 2009d. U.S. Food and Drug Administration. Bad Bug Book:  
Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook  
*Listeria monocytogenes*. [http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodborne  
Illness /FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBug  
Book/ucm070064.htm](http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodborne<br/>Illness /FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBug<br/>Book/ucm070064.htm).

26.Franco J., Feed O., Bianchi G., Garibotto G., Ballesteros F., Nan F.,  
Percovich M., Piriz M., y Bentancur O. 2008. Parámetros de calidad de  
carne en cinco músculos de novillos Holando durante la maduración  
*post-mortem*. II. Evolución del color durante su almacenamiento.  
Agrociencia. Vol. XII N° 1 pág. 69 -73.

27. Garedeu A., Schmolz E., and Lamprecht I. 2004. Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an in vitro approach. *Thermochim Acta*, 422: 115–124.
28. Geckil H., Ates B., Durmaz G., Erdogan S., and Yilmaz I. 2005. Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1(1): 27-31.
29. Grange J.M., and Davey R.W. 1990. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*. Volume 83.
30. Greene B.E., Hsin I.M., and Zipser M.W. 1971. Retardation of oxidative color changes in raw ground beef. *Journal of Food Science*, 36: 940 – 942.
31. Han S.K., and Park H.K. 2002. Accumulation of thiobarbituric acid-reactive substances in cured pork sausages treated with propolis extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 1487-1489.
32. Hernández J., Goycoolea F.M., Quintero J., Acosta A., Castañeda M., Dominguez Z., Robles R., Vazquez-Moreno L., Velazquez E.F., Astiazaran H., Lugo E., and Velazquez C. 2007. Sonoran propolis:

chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines.  
*Planta Med*, 73: 1469-1474.

33. In-Suk O., Dong-Hwan O., Young-Sook C., Kap-Suk K., Mi-Yae S., and Kwon-II S. 2002. Effects of Ethanol Extract of Propolis (EEP) on the Storage of Sausage. *The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 7(2): 35-39.
34. Katircioglu H., and Mercan N. 2006. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (11): 1151-1153.
35. Kaur R., Arora S., and Singh B. 2008. Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis* A. Juss *Bioresour Technol*, 99: 7692-7698.
36. Kujumgiev A., Tsvetkova I., and Serkedjieva Y.U. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*, 64: 235-240.
37. Kumazawa S., Hamasaka T., and Nakayama T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84: 329-339.
38. Löliger J. 1991. Natural Antioxidants. *Lipid Technology*, 58-61.

39. Löliger J., and Wille H.J. 1993. Natural Antioxidants. *Oils & Fats International*, 9(2): 18-22.
40. Maciejewicz W., Daniewski M., Bal K., and Markowski W. 2001. GC-MS Identification of the flavonoid aglycones isolated from propolis. *Chromatographia*, 53(5): 343-346.
41. Mendes da Silva J.F., De Souza M.C., Ramalho Matta S., Ribeiro de Andrade M., and Nova Vidal F.V. 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 99: 431-435.
42. Milić B.L., Djilas S.M., and Čanadanović-Brunet J.M. 1998. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chemistry*, 61: 443-447.
43. Muriel E., Antequera T., y Ruiz J. 2002. Efecto del tipo de músculo sobre parámetros de calidad en carne fresca de cerdo Ibérico. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(4): 241-247.
44. Nagai T., Inoue R., Inoue H., and Suzuki N. 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry*, 80: 29-33.

45. Nataro, J.P., and Kaper, B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol, 11: 142-201.
46. NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa, USA (2003). Documents M7-A6 and 100-S13: NCCLS, 20 (2).
47. NOM-110-SSA1-1994. Norma oficial Mexicana. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
48. Ordoñez J.A., y Hoz L.P. 1999. Carne "Composición General". En: Tratado de Nutrición. Edición: ilustrada. Publicado por Ediciones Díaz de Santos. Pag. 365.
49. Page J., Wulf D., and Schwotzer T. 2001. A survey of beef muscle color and pH. Journal of Animal Science, 79: 678 - 687.
50. Palomino L.R., García P.M., Carlos M., Gil G.H, Rojano B.A., y Durango R.D. 2009. Determinación del Contenido de Fenoles y Evaluación de la Actividad Antioxidante de Propóleos Recolectados en el Departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*. 16(3): 388-395.
51. Pearson A.M., and Dutson T.R. 1990. Meat and Health: Advances in meat research. Volume 6. Ed. Elsevier applied science. New York. Pag 554.



52. Pfalzgraf A., Frigg M., and Steinhart H 1995.  $\alpha$ -Tocopherol contents and lipid oxidation in pork muscle and adipose tissue during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1339-1342.
53. Pokorný J. 1991. Review: natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 223-227.
54. Romero A.M., Doval M.M., Romero M.C., Sturla M.A., and Judis M.A. 2008. Antioxidant properties of soya sprout hydrophilic extracts. Application to cooked chicken patties. *Ejeafche*, (8): 3196.3206.
55. Russo A., Longo R., and Vanella A. 2002. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 73 (1): 21-29.
56. SIAP. 2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Resumen Nacional. Producción, Precio, Valor, Animales Sacrificados y Peso.
57. Santos F.A., Bastos E.M., and Uzeda B. 2002. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol*, 80: 1-7.

58. Serdengeçti N., Yildirim I., and Gökoglu N. 2006. Effects of sodium lactate, sodium acetate and sodium diacetate on microbiological quality of vacuum-packed beef during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 26: 62-71.
59. Shan B., Cai Y. Z., Brooks J. D., and Corke, H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 112–119.
60. Stewart M., Zopser M., and Walts B. 1965. The use of reflectance spectrophotometry for assay of raw meat pigments. *Journal of Food Science*, 30: 464-469.
61. Takaisi-Kikuni N.B., and Schilcher H. 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica*, 60: 222-227.
62. Tolosa L., y Cañizares E. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 43:1-2.

63. Torrecano G., Sánchez-Escalante A., Jiménez B., Roncalés P., and Beltrán J.A. 2003. Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Science*, 64: 85-91.
64. Tosi E.A., Ré E., Ortega M.E., and Cazzoli F.A. 2007. Food preservative on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 104: 1025-1029.
65. Usia T., Banskota A.H., Tezuka Y., Midorikawa K., Matsushige K., and Kadota S. 2002. Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *J. Nat. Prod*, 65: 673-676.
66. Velazquez C., Navarro M., Acosta A., Angulo A., Dominguez Z., Robles R., Robles-Zepeda R., Lugo E., Goycoolea F.M., Velazquez E.F., Astiazaran H., and Hernández J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1747–1756.
67. Yaghoubi S.M., Ghorbani G.R., Soleimani Z.S., and Satari R. 2007. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. *DARU Vol. 15, No. 1*.

68. Zhang H., Kong B., Xiong Y., and Sun X. 2009. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*, 81: 686-692.