



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**PROYECTO DE TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

TEMA:

**EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y APLICACIÓN IN VITRO DE
COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN HOJAS DE BAY-RUM
(*Pimenta racemosa*) COMO AGENTE ANTIMICROBIANO Y APLICADO
EN FILETES DE POLLO**

AUTORES:

**POSLIGUA MEDRANO MELISSA ALEJANDRA
DELGADO BARBERAN ANDRES ELOY**

TUTOR:

ING. ALDO EDUARDO MENDOZA GONZÁLEZ Mgs. SC

MANTA-MANABÍ-ECUADOR

2019

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Los Honorables Miembros del tribunal Examinador luego del debido análisis y su cumplimiento de la Ley aprueban el informe de investigación sobre el tema: **“EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y APLICACIÓN IN VITRO DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN HOJAS DE BAY-RUM (Pimienta racemosa) COMO AGENTE ANTIMICROBIANO Y APLICADO EN FILETES DE POLLO”**.

Ing. María Isabel Mantuano Cusme, Mg.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Juan Robert Mero Santana, Mg.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Edison Greco Lavayen Delgado, Mg.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

CERTIFICACIÓN

En calidad de docente tutor(a) de la Facultad de CIENCIAS AGROPECUARIAS de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, certifico:

Haber dirigido y revisado el trabajo de titulación, cumpliendo el total de 400 horas, bajo la modalidad de tesis, cuyo tema del proyecto es “**Extracción, cuantificación y aplicación in vitro de compuestos fenólicos presentes en hojas de bay-run (*Pimenta racemosa*) como agente antimicrobiano y aplicado en filetes de pollo**”, el mismo que ha sido desarrollado de acuerdo a los lineamientos internos de la modalidad en mención y en apego al cumplimiento de los requisitos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico, por tal motivo CERTIFICO, que el mencionado proyecto reúne los méritos académicos, científicos y formales, suficientes para ser sometido a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.

La autoría del tema desarrollado, corresponde a la Srta. **Melissa Alejandra Posligua Medrano**, y al Sr. **Andrés Eloy Delgado Barberán**, estudiantes de la carrera de **Ingeniería Agroindustrial**, período académico 2018-2019, quienes se encuentran aptos para la sustentación de su trabajo de titulación.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

Manta, 8 de agosto de 2019.

Lo certifico,

Ing. ALDO EDUARDO MENDOZA GONZÁLEZ Mgs. Sc.
Docente Tutor(a)

DECLARACION DE AUTORIA

Nosotros, POSLIGUA MEDRANO MELISSA ALEJANDRA, con C.I. 131659803-4, y DELGADO BARBERAN ANDRES ELOY, con C.I. 131166660-4 declaramos que el presente trabajo de titulación, es de nuestra autoría, y que los resultados del mismo son auténticos, originales y personales, los textos constantes en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Manta, 2019

Posligua Medrano Melissa Alejandra

C.I: 131659803-4

Delgado Barberán Andrés Eloy

C.I: 131166660-4

AGRADECIMIENTO

Melissa,

Agradezco a Dios por ser mi guía, en todo momento de mi vida, gracias a mis hermanas, abuelos y padres principalmente, quienes me han enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre preservar hasta lograr mis metas, agradezco también a mi familia, amigos, personal de laboratorio, docentes por siempre ayudarnos y a mi novio por ser mi apoyo en todo momento y darme fuerzas para seguir adelante y no rendirme.

Del mismo modo agradezco a mi familia biológica y política y a todos que me han ayudado durante todo este proceso de forma directa e indirectamente durante este largo proceso.

Andrés,

Gracias a mis padres por ser mi apoyo en cada momento de mi vida, por confiar en mí y por haberme forjado como la persona que soy, gracias por enseñarme a no rendirme nunca y a que todo se logra con esfuerzo y perseverancia, del mismo modo agradezco a mis hermanos, mi novia y a mi familia por siempre apoyarme.

DEDICATORIA

Melissa,

El presente trabajo va dedicado a Dios, por haberme permitido cumplir una meta más. A mi familia, mi novio y mis padres que, con apoyo incondicional, sacrificio, amor y confianza permitieron que culminen mis estudios.

Andrés,

A mis padres por siempre ser mi apoyo, fortaleza, guías en cada momento de mi vida y mostrarme el camino hacia la superación.

A mis hermanos por siempre escucharme y darme fuerzas para seguir adelante.

Y a mis demás familiares, amigos, docentes que hicieron parte de todo este proceso.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue extraer, cuantificar y evaluar la capacidad antioxidante y el efecto antimicrobiano in vitro de los compuestos fenólicos presentes en Bay-Rum (*Pimenta racemosa*) microencapsulados aplicado en filetes de pollo. Las variables determinadas en las muestras fueron: Cuantificación de fenoles totales, Capacidad Antioxidante, Efecto antimicrobiano in vitro, Recuento de aerobios mesófilos y Presencia/ausencia de *Salmonella spp*. Los resultados indicaron diferencia significativa para los tratamientos y testigo durante los 30 días de almacenamiento, utilizando el test de Tukey y Dunnett con un $p < 0.05$. El tratamiento A1B2, presentó los mejores valores en la cuantificación de fenoles totales con un valor de 40,12mgEAG/g; la capacidad antioxidante evidenció valores de 11,52 TEAC $\mu\text{mol/g}$, en la Inhibición contra *Salmonella* reporto 22 mm a las 24 h y 25 mm a las 48 h de evaluación. El tratamiento A1B2C2 evidencio el menor valor para recuento de aerobios mesófilos fue de $2,5 \times 10^3$, en el análisis de presencia/ausencia de *Salmonella spp*, los tratamientos con quitosano no mostraron presencia de este patógeno mientras que los tratamientos con almidón de yuca y control si mostraron presencia de este microorganismo.

Palabras clave: Conservación, carne, fenoles, antioxidante, extractos

SUMMARY

The objective of this research was to extract, quantify and evaluate the antioxidant capacity and in vitro antimicrobial effect of the phenolic compounds present in microencapsulated Bay-Rum (Pepper racemosa) applied in chicken fillets. The variables identified in the samples were: Quantification of total phenols, Antioxidant Capacity, Antimicrobial effect in vitro, Mesophilic aerobic count and Presence / absence of Salmonella spp. The indicative results differ significantly for the treatments and controls during the 30 days of storage, using the Tukey and Dunnett test with a $p < 0.05$. The A1B2 treatment obtained the best values in the quantification of total phenols with a value of 40.12mgEAG / g; The antioxidant capacity shows values of 11.52 TEAC $\mu\text{mol} / \text{g}$, in the inhibition against Salmonella reported 22 mm at 24 h and 25 mm at 48 h of evaluation. The A1B2C2 treatment shows the lowest value for the mesophilic aerobic count was 2.5×10^3 , in the analysis of presence / absence of Salmonella spp, chitosan treatments in the absence of presence of this pathogen while treatments with cassava starch and control if Presence of presence of this microorganism.

Key words: Conservation, meat, phenols, antioxidant, extracts

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	PROBLEMA	2
1.2.	JUSTIFICACIÓN	5
1.3.	OBJETIVOS	7
	OBJETIVOS GENERAL	7
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
1.4.	HIPÓTESIS	8
II.	MARCO TEÓRICO	9
2.1.	BAY-RUM	9
2.1.1.	GENERALIDADES	9
2.1.2.	COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	10
2.2.	COMPUESTOS FENÓLICOS	10
2.2.1.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS	11
2.2.2.	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	12
2.3.	CARNE DE POLLO	12
2.3.1.	CONSERVACIÓN	13
2.4.	<i>SALMONELLA SPP</i>	15
2.4.1.	CLASIFICACIÓN	15
2.4.2.	PATOGENIA	16
III.	METODOLOGÍA	17
	Factor A. Fuente de extracción	18
	Factor B. Tipo de solvente	18

VARIABLES DEPENDIENTES	19
Factor A. Tipo de recubrimiento.....	19
Factor B. Aplicación de compuestos fenólicos.....	19
Factor C. Temperatura de almacenamiento	19
VARIABLES DEPENDIENTES	19
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
3.5.1. TIPO DE DISEÑO	20
3.5.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
3.6. TRATAMIENTOS	21
3.7. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS.....	22
3.7.1. Extracción de compuestos fenólicos.....	22
3.7.2. Cuantificación de compuestos fenólicos	23
3.7.3. Determinación de la capacidad antioxidante.....	24
3.7.4. Efecto antimicrobiano in vitro	25
3.7.5. Preparación de recubrimiento comestible	25
3.7.6. Metodología de encapsulación	25
3.7.8. Recuento de bacterias aerobias mesófilas	27
3.7.9. Análisis de presencia o ausencia de <i>Salmonella spp.</i>	27
IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	38
BIBLIOGRAFIA	40
ANEXOS	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental °1.....	20
Tabla N°2. Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental °2.....	21
Tabla N°3. Tratamientos de estudio del diseño experimental N°1.....	21
Tabla N°4. Tratamientos de estudio del diseño experimental N°2.....	22
Tabla N°5. Test Tukey en Polifenoles totales (mg EAG /g) en muestras de hojas de Bay-rum (verdes y secas)	28
Tabla N°6. Test Tukey en Capacidad antioxidante (TEAC (µmol/ g) en muestras de hojas de Bay-rum (verdes y secas).	30
Tabla N°7. Test de Tukey en Inhibicion microbiana de extractos de hojas de Bay-rum en cajas petri con cepas de <i>Salmonella spp.</i> 24h de exposición.....	31
Tabla N°8. Test de Tukey en Inhibicion microbiana de extractos de hojas de Bay-rum en cajas petri con cepas de <i>Salmonella spp.</i> 48h de exposición.-----	31
Tabla N°9. Recuento de UFC de aerobios mesófilos en filetes de pollo almacenados a 0°C y 8°C.	34
Tabla N°10. Análisis de detección presencia o ausencia de <i>Salmonella spp.</i> , en filetes de pollo.....	36

INDICE DE FIGURA

Figura 1.- Extracción de compuestos fenólicos.....	50
Figura 2.- Cuantificación de compuestos fenólicos.....	50
Figura 3.- Capacidad antioxidante.....	50
Figura 4.- Efecto inhibitorio in vitro.....	50
Figura 5.- Aplicación en filetes.....	51

I. INTRODUCCIÓN

El creciente interés en los últimos años por el consumo de alimentos que además de nutrir tengan un impacto favorable en la salud, ha incentivado el estudio de componentes naturales como los polifenoles presentes en plantas y frutos, los cuales han recibido especial atención debido a sus propiedades funcionales como antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antitrombóticos, antimutagénicos, antibacteriales y analgésicos (Wollgast y Anklam 2000).

Los metabolitos secundarios en las plantas usualmente se clasifican por sus caminos biosintéticos en tres grandes grupos: fenoles, terpenos y esteroides, y alcaloides (Bourgaud et al., 2001) La mayoría de estos metabolitos de importancia farmacológica, dentro de los que se encuentran los compuestos fenólicos, se aíslan a partir de plantas, porque su síntesis química no es factible económicamente (Oksman-Caldentey y Inzé 2004).

La naturaleza de los compuestos fenólicos en plantas es compleja. Los fenoles se asocian con procesos de maduración de plantas y tejidos, mecanismos de defensa, y características importantes de productos alimenticios derivados de plantas (Niemenak et al., 2006). Los compuestos fenólicos en las plantas se destacan en la actualidad por ser atractivos en el campo de la nutrición, la salud y la medicina, debido a las evidencias de que pueden actuar como potentes antioxidantes, anticancerígenos, antifúngicos o modular rutas importantes in vivo en mamíferos (Rein et al., 2000).

1.1. PROBLEMA

La inocuidad y la calidad de los alimentos constituye, uno de los pilares más relevantes de la seguridad alimentaria mediante su disponibilidad, estabilidad y el acceso de los consumidores (Durango et al. 2004).

Las enfermedades transmitidas por alimentos son el resultado de una amplia variedad de productos comestibles contaminados por microorganismos patógenos, toxinas o sustancias químicas. La prevención de las enfermedades de transmisión alimentaria depende de la manipulación cuidadosa de los productos crudos y de los productos terminados en la cadena de producción. Una óptima calidad y supervisión de los alimentos, se traduce en un ahorro importante de costos sociales, individuales de los consumidores y de los dueños de las industrias que los producen. Garantizar alimentos inocuos y de calidad ha sido una preocupación constante de quienes intervienen en una cadena de alimentos (Vargas et al., 2004; Fuentes et al. 2005).

La carne de pollo es un producto alimenticio muy popular en todo el mundo (Chouliara et. al., 2007), suele ser una de las más recomendadas por médicos y nutricionistas para el consumo, debido a que es fuente de proteínas (fundamentales para el funcionamiento de todas las células del organismo), es baja en grasas (desde un 3% en una pechuga magra sin piel) y que aporta ácido fólico (esencial en el embarazo, la lactancia y la adolescencia), zinc (encargado de reponer tejidos dañados o desgastados), hierro y vitamina B12 (importantes en la prevención de la anemia) (Cormillot, 2015).

Lo que le ha dado la fama de ser un alimento sano y/o apto para la alimentación de todo tipo de público (incluyendo los grupos etarios más susceptibles, como ancianos y niños) (Revista agronomía y forestal UC, 2005).

La carne de pollo cruda o poco cocinada puede contener patógenos, como *salmonella* o *campylobacter*, que deben prevenirse con medidas. Los microorganismos patógenos contenidos en ésta carne cruda pueden multiplicarse de forma fácil a temperaturas que oscilan entre 4°C y 60°C. La mayoría de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos son el resultado de la contaminación de los manipuladores de alimentos, también en el ámbito doméstico. La manipulación higiénica correcta y una adecuada cocción y refrigeración previene estas enfermedades (Chavarria, 2011).

Las tendencias y exigencias actuales del mercado han llevado a aceptar tres conceptos de calidad: calidad higiénico-sanitaria o seguridad del alimento, la calidad organoléptica o sensorial y la calidad nutricional, dictada por el valor nutritivo. De todos modos, hoy en día, la seguridad alimentaria y la palatabilidad son las propiedades en las cuales el consumidor pone más énfasis en el momento de definir la preferencia en la compra de carne de pollo.

El desarrollo que actualmente experimenta la industria avícola hace necesario adecuar los métodos de conservación que permitan asegurar la calidad de los productos durante la cadena de comercialización. La preservación a temperaturas de refrigeración constituye el método más común de conservar las carnes frescas, aunque solo queda limitada a breves períodos de tiempo (Barbut, 2002).

La conservación de la carne de aves (pollo) es un punto de vital importancia, la congelación es considerada la forma más segura y eficiente para mantener su

calidad en almacenamientos a largo plazo (Lee et al., 2008). Sin embargo, se debe tener en cuenta que las carnes congeladas sufren algunos cambios que limitan su tiempo de almacenamiento (Barbut, 2002; Hedrick et al., 1994), por esta razón se debe de buscar nuevas técnicas de conservación que sean menos abrasivas con el producto, que controlen la proliferación de microorganismos, que aporten con propiedades funcionales y que sean amigables con el medio ambiente.

La necesidad de los consumidores por alimentos exentos de carga microbiana y con menor cantidad de aditivos sintéticos ha incrementado la demanda de productos naturales, tales como aquellos que aumentan la vida de anaquel inhibiendo el crecimiento de bacterias, mohos o levaduras. De acuerdo a lo que manifiesta Chavarrías (2011), el uso de un 75% de antimicrobianos químicos y un 25% de extractos de plantas naturales actúa como un importante agente conservador. La opción química, por tanto, se podría sustituir de forma parcial por extractos de plantas naturales.

Se han descubierto propiedades en especies de origen vegetal que contrarrestan la descomposición debida a la actividad microbiana y oxidativa (Ceron et al., 2014). Actualmente se sabe que los compuestos fenólicos y aceites esenciales derivados de plantas y especias tienen efectos antimicrobianos y se ha demostrado que su efecto reside sobre levaduras, mohos y bacterias, con la ventaja de que su extracción, en algunos casos, no daña al medio ambiente (Reyes et al., 2014).

1.2. JUSTIFICACIÓN

La cadena alimentaria, especialmente en su fase primaria o inicial, ha jugado un papel preponderante en el incremento del riesgo epidemiológico de las enfermedades transmitidas por alimentos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen un importante problema de salud pública mundial por su magnitud, impacto socioeconómico y por el surgimiento de patógenos emergentes (Quevedo, 2002). Se estima que entre 15% y 20% de dichas enfermedades están directamente asociadas al consumo de carne de pollo o sus derivados (Alexandre et al., 2000; Boscan et al., 2005).

La inocuidad microbiológica de los alimentos es una condición indispensable para garantizar la salud de los consumidores (FAO, 2008). En el caso de los productos avícolas, las operaciones de beneficio tales como escaldadura, desplumadura, evisceración y despiezo, constituyen los puntos sensibles de contaminación microbiana. Asimismo, la contaminación cruzada de equipos y utensilios, y la manipulación del producto, sirven de vías de transmisión para microorganismos patógenos, especialmente *Salmonella spp.* y el aumento de la carga microbiana (Molina et al., 2010).

El lugar que ocupan las carnes en la alimentación humana es muy importante, tanto desde el punto de vista fisiológico como el biológico. La presencia en la ración de una cantidad determinada de proteínas de origen animal, es absolutamente necesaria, en especial cuando están destinadas a organismos en crecimiento. Al mismo tiempo se ha puesto en evidencia la importancia de ciertos aminoácidos esenciales que se encuentran en elevada proporción en las proteínas

de origen animal y que son imprescindibles para el buen funcionamiento de numerosas glándulas endócrinas, formación de anticuerpos, etc. (Solís, 2000).

La carne de pollo es un alimento extensamente perecedero debido a su riqueza en nutrientes y su elevada humedad superficial, lo que conlleva a una rápida población y un amplio desarrollo de microorganismos de gran potencial alterante, incluso patógeno”, además de la pérdida de calidad en relación a sus características fisicoquímicas. (Fernández, 2011); citado por (Sánchez, 2011).

La alternativa más rentable y eficiente para el negocio en la cadena de distribución, es aumentar la vida de anaquel, esto quiere decir, ampliar en el tiempo las características organolépticas y la inocuidad de la carne, para así ser aceptada por el consumidor (López et al., 2013).

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros. Esta síntesis se da a partir de fenilalanina por la vía del shikimato. Juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina (Dixon y Paiva, 1995), por lo que las plantas presentan un gran número de componentes fenólicos (e.g., flavanoles, flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, coumarinas, lignanos, etc) (Cai et al., 2006).

Los compuestos fenólicos son un gran grupo de antioxidantes naturales; consumo de fuentes importantes, particularmente de frutas, vegetales y cereales presentan efectos benéficos (Naczk y Shahidi, 2006). La asociación entre una dieta rica en frutas y vegetales está relacionada a una disminución de riesgo de enfermedades

cardiovasculares, y ciertas formas de cáncer, según evidencias epidemiológicas (García-Alonso et al., 2004; Arts y Hollman, 2005). Estos fitoquímicos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias que evidencian su rol protector sobre la salud humana (Carratú y Sanzini, 2005).

Diferentes estudios han mostrado que los radicales libres presentes en el organismo humano causan daño oxidativo a diferentes moléculas, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y tiene que ver en la iniciación en algunas enfermedades degenerativas (García-Alonso et al., 2004)⁴. Estos componentes antioxidantes son capaces de neutralizar radicales libres, y pueden jugar un rol importante en la modulación de detoxificación enzimática, estimulación del sistema inmune, disminución de la agregación plaquetaria y modulación del metabolismo hormonal (Carratú y Sanzini, 2005).

Por lo antes expuesto el objetivo de esta investigación fue alargar el tiempo de vida útil de filetes de pollo utilizando como conservantes los compuestos fenólicos presentes en las hojas de Bay-Rum aplicados, libres y encapsulados sobre los filetes, estudiando una nueva alternativa orgánica y biológica en la conservación de alimentos (carne de pollo).

1.3. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERAL

Extraer, cuantificar y evaluar la capacidad antioxidante y el efecto antimicrobiano in vitro de los compuestos fenólicos presentes en Bay-Rum (Pimienta racemosa) microencapsulados aplicado en filetes de pollo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extraer los compuestos fenólicos presentes en hojas de Bay-Rum.
2. Cuantificar los compuestos fenólicos presentes en las hojas de Bay-Rum.
3. Determinar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos extraídos de las hojas de Bay-Rum.
4. Analizar el efecto inhibitorio in vitro de los compuestos fenólicos extraídos en cepas de *Salmonella spp.*
5. Evaluar el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas en los filetes de pollo durante el periodo de almacenamiento.

1.4. HIPÓTESIS

Las hojas de Bay-Rum son fuente de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos extraídos de las hojas de Bay-Rum se pueden utilizar como agentes antimicrobianos para la conservación de pechugas de pollo.

II.MARCO TEÓRICO

2.1. BAY-RUM

La *pimenta racemosa* está compuesta de dos variedades: *Pimenta ozua* (Urban and Ekman) Burret y *Pimenta racemosa var. racemosa* (Miller) J. W. Moore. La variedad racemosa es generalizada pudiendo ser encontradas en las islas de las Antillas como Puerto Rico y también en regiones tropicales de centro y América del sur (Landrun, 1984).

Según la clasificación encontrada la *Pimenta racemosa var. racemosa* es descrita por los botánicos como una planta única, se lo conoce localmente como árbol de la bahía. De hecho, las descripciones se aplican a tres tipos de plantas, idénticas en su morfología externa. Sin embargo, pueden fácilmente ser distinguido con el olor de sus hojas. (Landrun, 1984).

2.1.1. GENERALIDADES

A principios del siglo XX por un método de destilación se extrajo el aceite usando ron y agua para la realización de una colonia denominada “Bay Rum” de ahí el nombre común de la planta. La colonia tiene sus notas especiadas de la bahía y sus tonos ahumados, arbolados del Ron envejecido en barricas. (Top Tropicals, 2015).

La malagueta o el bay-rum entre otros nombres que se le da a (*Pimenta racemosa*) es un árbol de la familia Mirtácea de tamaño mediano oriundo de las Antillas y Guayana, posee un tronco recto y su altura es aproximadamente de 4 a

8 metros y de copa frondosa. Sus hojas son de color verde oscuro, brillante por el haz, sin brillo y pálido por el envés que esta finamente puntuado de glándulas de las cuales emanan su olor aromático. Poseen flores de unos 10 mm, con cáliz de 5 sépalos y pétalos blancos con números estambres. Su fruto es una baya de superficie granulada de color pardo oscuro.

Es un árbol de crecimiento lento con raíces profundas y su vida es bastante larga. Sus hojas contienen aceite aromático que semeja al aceite de clavo de olor. Este aceite esencial se destila de las hojas y se utiliza en perfumerías. (Top Tropicals, 2015).

2.1.2. COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Entre los componentes principales están el eugenol, chavicol, mirceno, linalool, limoneno entre otros que se encuentran en pequeñas proporciones. Siendo el eugenol y el chavicol encontrados en mayor cantidad. (Rojas et al., 2014).

2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo muy amplio, donde se han llegado a identificar más de 8.000 compuestos con estructuras muy variadas. La clasificación de los compuestos fenólicos más utilizada es la que se lleva a cabo según su esqueleto carbonado, donde se pueden distinguir dos grandes grupos en función de su estructura química básica: compuestos fenólicos no flavonoideos y compuestos fenólicos flavonoideos. Además, cabe destacar que estos compuestos comúnmente se presentan asociados a monosacáridos, ácidos orgánicos u otras sustancias que confieren estabilidad a la molécula (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario. Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente (Kähkönen, 2001).

Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (Robbins, 2003).

2.2.1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS

El consumo de compuestos fenólicos en la dieta se ha asociado con efectos beneficiosos para la salud. Así se han descrito distintas actividades biológicas para este grupo de compuestos, tales como una actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y anticancerígena. Debido a estas propiedades, actualmente se está apoyando el empleo de los compuestos fenólicos en la industria farmacéutica, alimentaria o cosmética (Teixeira y col., 2014).

2.2.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Desde un punto de vista biológico, el estrés oxidativo se puede definir como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el H_2O_2 o el $O_2 \bullet-$, y la capacidad del cuerpo humano para eliminarlos. Estos ROS tienen un papel importante en diversos procesos fisiológicos, actuando como señalizadores celulares y reguladores de las citoquinas, factores del crecimiento, de la acción hormonal, la transcripción, como neuromoduladores, inmunomoduladores y durante la apoptosis.

Sin embargo, una sobreproducción de ROS puede provocar daños oxidativos en el DNA, en los lípidos o en las proteínas, teniendo por tanto un papel esencial en el desarrollo del envejecimiento celular, así como en el desarrollo de enfermedades con base oxidativa como el cáncer, la aterosclerosis, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas (Gupta y col., 2014).

2.3. CARNE DE POLLO

La carne de aves en general, y la de pollo en particular, es un vehículo muy importante de microorganismos patógenos para el hombre, principalmente: *Salmonella spp*, *Campylobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Bacillus cereus*.

2.3.1. CONSERVACIÓN

La congelación de la carne se puede llevar a cabo a través de diversos métodos; los más comúnmente utilizados en la industria avícola incluyen congelación por aire (estanco o en movimiento), placas de congelación y líquidos criogénicos (por inmersión o spray). Al respecto, existen diversas variables a controlar para evitar el deterioro del producto, entre ellas, la velocidad de congelación, la que puede afectar la calidad de la carne (Uttaro y Aalhus, 2007), a través de cambios estructurales que ocurren debido a la formación de cristales de hielo. Según el método empleado, puede modificarse dicha velocidad.

Una congelación convencional con aire estanco (-20 °C) conduce a la formación de cristales de hielo irregulares y relativamente grandes (Zhu et al., 2004), lo que provoca daños de las células causando un deterioro estructural de la carne. Por otra parte, altas velocidades de congelación (por ejemplo, usando aire forzado) conducen a la formación de cristales de hielo de menores tamaños y más regulares. Otro factor a considerar de gran importancia es la recristalización, fenómeno que se desarrolla a causa de las oscilaciones térmicas que con frecuencia se producen durante el almacenamiento y transporte de alimentos congelados (Gruda y Postolski, 1986).

Asimismo, durante el almacenamiento de la carne también se pueden producir cambios que alteren las características sensoriales de la misma, por lo tanto, su estudio es fundamental en la conservación de estos alimentos a bajas temperaturas (Renerre, 1990).

El color, la apariencia y la textura de los filetes de pechuga de pollo son importantes atributos que determinan la aceptación del consumidor. Estudios

realizados por Lee et al. (2008) mostraron que filetes de pechuga de pollo, envasados individualmente, luego congelados en túnel a -28 °C y almacenados durante largos periodos a -18 °C, tienden a ser más oscuros, más rojos y menos amarillos que aquellos que no fueron congelados. Además, Teira et al. (2004) observaron una importante correlación entre el pH y el color rojo (coordenada a*) en filetes de pollo sometidos a congelación.

Por otra parte, Galobart y Morán (2004) encontraron ligeras variaciones de L* en carne de pechugas de pollo procedente de lotes con baja o alta luminosidad después de la congelación y descongelación, en comparación con mediciones realizadas 48 horas post mortem en filetes refrigerados. Respecto de la textura, trabajos realizados por Yoon (2002) muestran que no se modificó significativamente la terneza en filetes de pechuga de pollo almacenados durante 10 meses a -20 °C. Industrialmente, suele ser práctica habitual el aplicar soluciones de marinado a este tipo de productos.

Este proceso se emplea para incrementar los rendimientos, mejorar la textura, potenciar el sabor y prolongar la vida útil del producto (Alvarado y McKee, 2007). Las soluciones de marinado que contienen sal y tripolifosfato sódico, son las más comúnmente utilizadas (Lyon et al., 2005). Dichas soluciones se pueden aplicar a la carne a través de inmersión, inyección o masaje, según el tipo de producto cárnico (Smith y Young, 2007). El marinado por inyección multiaguja permite la dosificación de una cantidad exacta de solución, mediante sondas que penetran el músculo, además de garantizar productos homogéneos en cortos tiempos de procesamiento (Xargayó et al., 2001).

La temperatura de almacenamiento de la carne de ave determina en gran medida su tiempo de conservación (Mountey y Parkhurst, 2001). En Argentina, la carne de pollo que se destina al mercado local generalmente se comercializa a

temperaturas de refrigeración, mientras que para mercados de exportación las temperaturas de congelación son fundamentales, debido a que se trata de un producto altamente perecedero.

Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las condiciones de conservación sobre los parámetros de calidad de fillets de pechugas de pollo (marinados y sin marinar), simulando su comercialización en el mercado interno (4 d en refrigeración) y exportación (90 y 180 d en congelación).

2.4. SALMONELLA SPP

La *salmonella* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Su tamaño oscila de 0,3 a 1 μm x 1,0 a 6,0 μm . Son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos, a excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum* (Linder 1995).

En el ámbito mundial, está asociada con mucha frecuencia a las enfermedades diarreicas, las cuales continúan siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad sobre todo en lactantes, niños y ancianos (Mead *et al.* 1999).

2.4.1. CLASIFICACIÓN

En la actualidad el género *Salmonella* consta de sólo dos especies, *S. entérica* y *S. bongori*; la primera está dividida a su vez en seis subespecies: *S. entérica subespecie entérica*, *S. entérica subespecie salamae*, *S. entérica subespecie*

arizonae, *S. entérica* subespecie *diarizonae*, *S. entérica* subespecie 188 houtebaey *S. entérica* subespecie indica (Popoff & Le Minor 1992). *Salmonella spp* es el grupo más complejo de todas las entero bacterias con más de dos mil cuatrocientos serotipos descritos en el esquema Kauffman White, determinados por la composición de los antígenos somáticos (O), flagelares (H), o de superficie Vi(k). *S. entérica* subespecie *entérica* comprende el 99% de los serotipos aislados de muestras clínicas (Popoff & Le Minor 1992).

2.4.2. PATOGENIA

La dosis infectante generalmente es muy alta, normalmente superior a 10^5 ufc, dependiendo de las características del germen y del huésped (Milgrom & Flanagan 1987; Pons 1976). Las salmonellas penetran por vía oral al ingerir alimentos contaminados. Se multiplican ampliamente en las partes altas del intestino delgado, invadiendo posteriormente intestino grueso, ciego y apéndice, sobre todo en los recodos del colon, donde proliferan abundantemente (Pons 1976).

III.METODOLOGÍA

3.1. LOCALIZACIÓN

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de investigación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabì, la materia prima que se uso fue pollo, el cual fue adquirido en el Mercado Central de la ciudad de Manta.

El trabajo se realizó utilizando como variable del primer diseño experimental dos fuentes de extracción de compuestos fenólicos (hojas verdes y secas) donde se midió la cantidad de compuestos fenólicos presentes, y se determinó su capacidad antioxidante y se evaluó el efecto antimicrobiano in vitro. En el segundo diseño experimental se utilizó como variables el tipo de recubrimiento (quitosano y almidón de yuca), la aplicación de compuestos fenólicos (libres y encapsulados) y la temperatura de almacenamiento (8°C y 0°C), se realizó análisis microbiológicos (conteo de bacterias aerobias mesófilas, presencia o ausencia de *Salmonella spp.*).

Los análisis del segundo diseño experimental se realizaron los días 0, 10, 20 y 30 del periodo de almacenamiento.

3.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Los materiales, equipos y reactivos que se utilizaron en la investigación se detallan a continuación:

Hojas verdes y secas de Bay-Rum, matraces de 25-50-500ml, etanol, metanol, agitador magnético (Orbital Shaker), Filtrador (modelo DOA-P704-AA), Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio, papel aluminio, celdas, espectrofotómetro (JENWAY 6320D), Persulfato de potasio, ABTS, Trolox, cajas Petri, Alginato de sodio, Agar Salmonella, Agar Aerobios Mesòfilos, Caldo verde brillante, Peptona, Àcido gálico, Almidòn de yuca, Quitosano, Agitador de hélice, jeringa de 5ml, cloruro de sodio, filetes de pollo 7cm de ancho, 8cm de largo y 1cm de grosor, fundas Ziploc, guantes, mascarillas, micropipetas de 1ml y 5ml , bala magnética.

3.3. FACTORES DE ESTUDIO

Para la investigación se utilizaron dos diseños completamente al azar, el primero con arreglo bifactorial y el segundo con arreglo factorial $2^3 +1$.

3.4. VARIABLES EN ESTUDIO

VARIABLES INDEPENDIENTES (DISEÑO EXPERIMENTAL N° 1)

Factor A. Fuente de extracción

- ✓ A1 Hojas verdes
- ✓ A2 Hojas secas

Factor B. Tipo de solvente

- ✓ B1 Etanol
- ✓ B2 Metanol

VARIABLES DEPENDIENTES

- ✓ Cuantificación de fenoles totales
- ✓ Capacidad Antioxidante
- ✓ Efecto antimicrobiano in vitro

VARIABLES INDEPENDIENTES (DISEÑO EXPERIMENTAL N° 2)

Factor A. Tipo de recubrimiento

- ✓ A1 Quitosano
- ✓ A2 Almidón de yuca

Factor B. Aplicación de compuestos fenólicos

- ✓ B1 Libres
- ✓ B2 Encapsulados

Factor C. Temperatura de almacenamiento

- ✓ C1 8 °C
- ✓ C2 0°C

VARIABLES DEPENDIENTES

- ✓ Recuento de aerobios mesófilos
- ✓ Presencia/ausencia de *Salmonella spp.*

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.5.1. TIPO DE DISEÑO

Para la investigación se utilizaron dos diseños completamente al azar, el primero con arreglo bifactorial y el segundo con arreglo factorial 2^{3+1} .

3.5.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis de varianza ANOVA al 5% y la prueba de comparación de acuerdo al Test de Tukey al 5% para el primer diseño y en el segundo diseño se usó el test de Dunnett's. Todos los datos fueron analizados por triplicado y los resultados fueron procesados por el programa Infostat 2016.

Tabla N° 1. Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental N°1

Fuente de variación		G.L
Total	$(t*r-1)$	11
Tratamientos	$(t-1)$	3
Repetición	$r-1$	2
Factor A	FA-1	1
Factor B	FB-1	1
Interacción (AxBxC)	(FAxFB)	1
Error experimental	$(t-1)(r-1)$	6

Elaborado por. (Delgado & Posligua, 2019)

Tabla N° 2. Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental N°2

Fuente de variación		G.L
Total	(t*r-1)	26
tratamientos	(t-1)	8
Repetición	r-1	2
Factor A	FA-1	1
Factor B	FB-1	1
Factor C	FC-1	1
Internación (AxBxC)	(FAxFBxFC)	1
Control	C-1	1
Error experimental	(t-1)(r-1)	16

Elaborado por. (Delgado & Posligua, 2019)

$$\text{Coeficiente de variación (\%)} CV = \frac{\sqrt{CM\ ERROR}}{\bar{x}} * 100$$

3.6. TRATAMIENTOS

En la tabla N° 3 se muestran los 4 tratamientos de las combinaciones de los factores de estudio tales como; A: fuente de extracción, B: tipo de solvente, y en la tabla N° 4 se muestra los tratamientos del segundo diseño con la combinación de tres factores: A: tipo de recubrimiento, B: Aplicación de compuesto fenólico, C: temperatura de almacenamiento

Tabla N° 3. Tratamientos de estudio del diseño experimental N° 1

N°	Tratamientos	Fuente de extracción	Tipo de solvente
1	A1B1	Hojas verdes	Etanol
2	A1B2	Hojas verdes	Metanol

3	A2B1	Hojas secas	Etanol
4	A2B2	Hojas secas	Metanol

Elaborado por. (Delgado & Posligua, 2019)

Tabla N° 4. Tratamientos de estudio del diseño experimental N° 2

N°	Tratamientos	Tipo de Recubrimiento	Aplicación de Compuesto Fenólico	Temperatura de Almacenamiento
1	A1B1C1	Quitosano	Libre	8°C
2	A1B1C2	Quitosano	Libre	0°C
3	A1B2C1	Quitosano	Encapsulado	8°C
4	A1B2C2	Quitosano	Encapsulado	0°C
5	A2B1C1	Almidón de yuca	Libre	8°C
6	A2B1C2	Almidón de yuca	Libre	0°C
7	A2B2C1	Almidón de yuca	Encapsulado	8°C
8	A2B2C2	Almidón de yuca	Encapsulado	0°C
9	CONTROL	-	-	

Elaborado por. (Delgado & Posligua, 2019)

3.7. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

3.7.1.Extracción de compuestos fenólicos

La extracción de compuestos fenólicos se realizó mediante un proceso de maceración con solventes alcohólicos, utilizando el método propuesto por Mahmood et al. (2011).

Se cortaron las hojas en pequeños pedazos para su posterior congelación a -20°C , después fueron liofilizadas a -40°C , posteriormente las muestras fueron molidas.

Se tomaron 15 g de la muestra en polvo y fueron disueltas en 150 mL de etanol (95%), la mezcla fue sometida a maceración durante 24 horas a temperatura ambiente y con agitación constante. El filtrado obtenido fue evaporado hasta obtener un residuo seco.

3.7.2. Cuantificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos totales se determinaron de acuerdo al método Folin-Ciocalteu propuesto por Mahmood et al. (2011). Del concentrado extraído de cada una de las muestras se tomaron 5 ml de metanol (95% v/v) y agua destilada hasta que se obtuvo un volumen total de 100 ml (Solución madre), de tal solución se tomó 0,1 ml, se añadió 0.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó en reposo 5 minutos, posteriormente se adicionó 1 ml una solución de carbonato de sodio (5%) (5 g de bicarbonato de sodio aforado a 100 ml H_2O d.) a la mezcla y se aforó a 25 ml con agua destilada.

La solución se dejó en reposo en la oscuridad durante 1 hora. De la solución resultante se tomó 3 ml en una celda y se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro de los cuales se obtuvieron los resultados de la absorbancia.

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales se empleó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar (2g de Ac. Gálico/100 ml H_2O d.). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en mg de GAE (equivalente de ácido gálico) / 100 g de la muestra.

Para la realización de la curva de calibración se mezclaron 10 ml de la solución a base de ácido gálico con 5ml de etanol y se aforo a 100 ml con agua destilada (Solución Estándar). Posteriormente se realizaron dos soluciones, para la primera solución (estándar cero) se mezclaron 0 ml de la solución estándar con 0,5 ml de Folin, 1ml de la solución de bicarbonato de sodio y aforado a 25 ml con agua destilada.

Para la segunda solución se mezcló 0.125 de la solución estándar con 0.5ml de Folin y se dejó reposando 5 min, luego se añadió 1ml de la solución de bicarbonato de sodio y se completó con agua destilada hasta que se obtuvo un volumen de 25 ml, las dos soluciones se dejaron reposar en la oscuridad durante 1 hora. La segunda solución se diluyó a 3 concentraciones distintas (1:20, 1:10 y 1:5) y se midió la absorbancia de cada una obteniendo los resultados.

3.7.3. Determinación de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante fue medida en las muestras como compuestos fenólicos totales usando las metodologías desarrollada por Re et al. (1999) y descrita por Kuskoski et al. (2004) con ligeras modificaciones, usando la decoloración por el radical catión ABTS y expresada finalmente como mg Trolox/g muestra. El radical ABTS, se preparó mediante la reacción acuosa de persulfato de potasio 2,45 mM y ABTS 7 mM.

Éste se dejó reposar en la oscuridad por 16h a 20°C. La solución de ABTS●+ obtenida se diluyó con etanol hasta que se obtuvo una absorbancia de 0,70 a 734 nm 30°C. Para la realización de la curva de calibración se colocó en la celda 3 mL de la solución de radical ABTS●+, y se registró la absorbancia inicial.

Entonces se añadió 10 µL de cinco soluciones del estándar Trolox, y se tomó la absorbancia a 734 nm con un blanco a base de etanol. Para la evaluación de la

actividad antioxidante se reemplazó los 10 µL de la solución de Trolox por el extracto de cada tratamiento. La absorbancia fue leída al 1min y 6min de haber incorporado los 10 µL de extracto.

3.7.4. Efecto antimicrobiano in vitro

Para probar la actividad antimicrobiana de los tratamientos se utilizó la metodología propuesta por (Santacruz & Castro, 2018) propuesto por el Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (2009). Se inocularon cajas petri con *Salmonella sp*, en Agar *Shiguella- Salmonella* (SS). Para la inoculación se utilizó 0,5 mL de cultivo de cada microorganismo, se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Las soluciones de los tratamientos se impregnaron en discos de papel filtro Q2 de 5 mm de diámetro y se colocaron tres equidistantes en cada placa petri. Posteriormente las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y se midió el área de la zona de inhibición en (mm).

3.7.5. Preparación de recubrimiento comestible

La preparación del recubrimiento comestible a base de almidón de yuca y quitosano se realizó de acuerdo al método propuesto por Santacruz, Rivadeneira & Castro (2015). Para este proceso se utilizó solución de almidón de yuca y quitosano al 1% (p/v), se calentó a 90 °C en agitación constante durante 5 minutos, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se agregaron las microcápsulas.

3.7.6. Metodología de encapsulación

El método propuesto para conseguir microcápsulas, fue la combinación de la

técnica de extrusión y de emulsión en el cual se usó el agitador de hélice Fisher Scientific, jeringa de 5ml, válvula de compuerta, tubos y un tampón roscable de 2 pulgadas. El método consistió en colocar una solución de cloruro de calcio como base para que las microcápsulas desciendan al final.

En la parte superior se presentó una solución de cloruro de calcio conjuntamente con aceite vegetal en el mismo recipiente. La jeringa se usó como herramienta de goteo y a su vez estas gotas sean micro gotas a medida que se va introduciendo en el agitador de hélice. La compuerta de dos pulgadas se utilizó como llave de paso.

Se preparó cloruro de calcio en solución líquida al 10%, y luego se realizó la formulación al 0,1 molar para el estudio.

Formulación:

$(0,1 \text{ mol de CaCl}_2)/(1 \text{ litro de solución}) \times (110,98 \text{ g CaCl}_2)/(1 \text{ mol}) \times (0,1 \text{ litro solución})/100 \text{ ml} = (1,1098 \text{ g CaCl}_2)/(100 \text{ mL})$

1,1098 g CaCl₂ ----- 10%

X= 11,098 g CaCl₂----- 100 ml

La cantidad en solución líquida de CaCl₂ es 11,098/100ml de agua destilada.

Para la preparación de la solución de alginato de sodio se usó una relación 1,8 g/100ml de agua destilada en un vaso de precipitación se añadió los 100ml de agua destilada seguidamente se procedió a llevarlo al agitador magnético, durante la agitación se agregó los 1,8 g de alginato de sodio en forma lenta a 500

rpm durante 10 minutos aproximadamente.

3.7.7. Aplicación del recubrimiento -cápsulas en los filetes de pollo

Los filetes de pollo se compraron en el Mercado Central de Manta, los tamaños de los filetes fueron de 7cm de ancho, 8cm de largo y 1cm de grosor.

Una vez preparado los recubrimientos con las cápsulas, los filetes se sumergieron en la solución de almidón de yuca y quitosano, libre y encapsulado por 3 segundos, posteriormente se almacenaron en fundas Ziploc a las temperaturas de 8°C y 0°C, posteriormente se tomó una muestra de 3cmx3cm con los cuales se realizaron los análisis de recuento de bacterias aerobias mesófilas y el análisis de presencia o ausencia de *Salmonella spp.*

3.7.8. Recuento de bacterias aerobias mesófilas

Los recuentos microbiológicos se realizaron los días 0, 10, 20 y 30 del período de almacenamiento. El conteo de aerobios mesófilos se realizo de acuerdo con la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-5:2006.

3.7.9. Análisis de presencia o ausencia de *Salmonella spp.*

Los análisis microbiológicos se realizarán los días 0, 10, 20 y 30 del período de almacenamiento. La determinación de presencia o ausencia de *Salmonella* se realizará de acuerdo con la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-15:2009.

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

En los resultados de la cuantificación de fenoles totales mostrados en la tabla 5, se evidencia que el tratamiento A1B2 (Hojas verdes-metanol) mostraron la mayor cantidad de compuestos fenólicos con 40,12 (mg EAG /g), seguido del tratamiento A2B2 (Hojas secas-metanol) con un valor de 29,18 (mg EAG /g), los tratamientos que fueron sometidos a la extracción con etanol presentaron menor compuestos fenólicos.

Las pruebas estadísticas Anova y Test de Tukey 95% de confiabilidad, indican que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos, los cuales la mayor extracción se logró con metanol.

Tabla N° 5. Test Tukey en Polifenoles totales (mg EAG /g) en muestras de hojas de Bay-rum (verdes y secas)

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
A2B1	17,33	3	0,00	A
A1B1	20,11	3	0,00	B
A2B2	29,18	3	0,00	C
A1B2	40,12	3	0,00	D

Elaborado por. (Delgado & Posligua, 2019)

Los compuestos fenólicos se encuentran abundantemente en todas las partes de la planta, como son las ramas, los tallos, las hojas, los frutos, las raíces, las flores, el polen y las semillas (Pratt y Hudson 1990). Existe diferencia en la capacidad de síntesis, acumulación y excreción de metabolitos fenólicos por las plantas. La

cantidad de fenol producido depende del órgano de la planta y su estado de desarrollo (Quiñonez et al., 2013).

En estudios realizados se ha comprobado que las variedades de Bay-Rum contienen principalmente ésteres fenólicos, mientras que el tercero está compuesto principalmente de oxígeno acíclico monoterpenos (Abaul et al., 1995).

Recientemente se ha prestado gran atención sobre el papel de los antioxidantes naturales, en particular los compuestos fenólicos, los cuales pueden actuar reduciendo el contenido de compuestos tóxicos en los alimentos o como suministro al cuerpo humano como antioxidantes exógenos (Mohd et al., 2004). Las sustancias fenólicas poseen una alta actividad antioxidativa y se encuentran mayormente en los frutos y las hojas de los vegetales (Traore y Guiltinan 2006). Muchos de estos fenoles se clasifican en 2 grupos principales: los ácidos fenol carboxílicos y los flavonoides, estos últimos son los más significativos³² y derivados del flavan (2-fenil-benzoildihidropirano) (Quiñonez et al., 2013).

4.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TEAC (MMOL/ G)

En cuanto a la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos de bay-rum mostrados en la tabla 6, se muestra que el tratamiento A1B2 (Hojas verdes-metanol) mostraron la mayor actividad antioxidante de compuestos fenólicos con 11,05 (TEAC $\mu\text{mol /g}$), seguido del tratamiento A2B2 (Hojas secas-metanol) con un valor de 7,03 (TEAC $\mu\text{mol /g}$), se evidencia que los tratamientos sometidos a extracción con etanol presentaron mayor capacidad antioxidante.

Las pruebas estadísticas Anova y Test de Tukey 95% de confiabilidad, muestran que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos, los cuales la mayor captación de radicales libres se logró con la muestra de hojas verdes y solvente metanol, lo que concuerda con la presencia de fenoles totales.

Tabla N° 6. Test Tukey en Capacidad antioxidante (TEAC ($\mu\text{mol/g}$) en muestras de hojas de Bay-rum (verdes y secas)

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
A2B1	3,02	3	0,00	A
A1B1	6,10	3	0,00	B
A2B2	7,03	3	0,00	C
A1B2	11,05	3	0,00	D

Elaborado por. (Delgado & Posligua, 2019)

En los resultados encontrados en esta investigación se puede determinar que existe presencia de polifenoles en mayor proporción en las hojas verdes de Bay-Rum, el cual indica su potencial como agente antimicrobiano y antioxidante.

Los resultados que se obtuvieron proporcionan una información básica prometedora para el uso potencial de extractos etanólicos y metanólicos como antioxidante natural que puede ser utilizado en la industria de alimentos.

Los compuestos antioxidantes pueden detener o inhibir la oxidación de los lípidos o de otras moléculas por la inhibición de la iniciación de la propagación de las reacciones de cambio de oxidación (Quiñonez et al., 2013). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe mayormente a sus propiedades redox, las cuales desempeñan un papel importante en la adsorción y neutralización de radicales libres (Murthy et al., 1998).

4.3. ANÁLISIS ANTIMICROBIANO IN VITRO

En las tablas 7 y 8, se muestran los resultados del análisis de inhibición microbiana en cepas de *Salmonella* spp, mostrando que su mayor efecto lo presentaron a las 48 h de exposición a los extractos de hojas de Bay-Rum, siendo el tratamiento A1B2 (Hojas verdes-metanol) el que evidencio mayor halo de inhibición de 25 mm en contraste con el tratamiento A2B1 (Hojas secas-metanol) el que mostro la menor Inhibicion con 15 mm de halo de inhibición.

Las pruebas estadísticas Anova (anexo 3 y 4) y Test de Tukey 95% de confiabilidad, indican que existió diferencia estadística significativa $P \leq 0,05$ entre los tratamientos, evidenciando que los tratamientos donde se realizó la extracción con etanol fueron más eficaces en el control de *Salmonella* spp, in vitro.

Tabla N° 7. Test de Tukey en Inhibicion microbiana de extractos de hojas de Bay-Rum en cajas petri con cepas de *Salmonella* spp. 24h de exposición.

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
A2B1	15,17	3	0,08	A
A1B1	17,00	3	0,08	B
A2B2	19,00	3	0,08	C
A1B2	22,00	3	0,08	D

Elaborado por. (Delgado & Posligua, 2019)

Tabla N° 8. Test de Tukey en Inhibicion microbiana de extractos de hojas de Bay-Rum en cajas petri con cepas de *Salmonella* spp. 48h de exposición.

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
A2B1	15,00	3	0,36	A
A1B1	18,33	3	0,36	B
A2B2	20,00	3	0,36	C
A1B2	25,00	3	0,36	D

Elaborado por. (Delgado & Posligua, 2019)

Los datos obtenidos en la presente investigación revelaron que los extractos de hojas de Bay-Rum presentan actividad antimicrobiana frente a *Salmonella spp*, lo que corrobora los resultados de la cuantificación de fenoles totales indicando que las hojas verdes tienen mejor comportamiento en cuanto al control de este microorganismo patógeno.

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros (Muñoz et al., 2007). Esta síntesis se da a partir de fenilalanina por la vía del shikimato. Juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina (Dixon y Paiva, 1995), por lo que las plantas presentan un gran número de componentes fenólicos (e.g., flavanoles, flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, coumarinas, lignanos, etc) (Cai et al., 2006).

Los antimicrobianos continúan estando entre los aditivos alimentarios más importantes. Actualmente, debido a la demanda por parte del consumidor de productos frescos mínimamente tratados como son las frutas frescas y frescas cortadas envasadas bajo diferentes atmósferas y refrigeradas, está aumentando el interés por los antimicrobianos de origen natural que puedan extraerse para ser utilizados con el fin de prolongar la vida útil y la seguridad para el consumidor (Blanchard, 2000).

La mayor parte de los antimicrobianos alimentarios solamente son bacteriostáticos (sistemas de conservación que impiden el desarrollo de gérmenes) o fungistáticos, en lugar de bactericidas (sistemas de conservación que destruyen los gérmenes) o fungicidas, por lo que su efectividad sobre los alimentos es limitada. Por otra parte,

debido a que algunos microorganismos pueden no verse inhibidos o destruidos por las dosis convencionales de antimicrobianos utilizados individualmente, puede ser preferible utilizar una combinación de ellos, ampliando así el espectro de cobertura en la preservación de frutas o alimentos en general (Blanchard, 2000).

4.4. RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS

En la tabla 9, se presentan los resultados del análisis de recuento de UFC de aerobios mesófilos en muestras de pechugas de pollo, estos datos muestran que, su mayor efecto se evidencio en el día 10 de almacenamiento, debido a que existió disminución en el conteo de UFC/g de bacterias aerobias mesófilas pasando de un promedio de $5,0 \times 10^2$ UFC/g para el día 0, siendo el tratamiento A1B2C2 (recubrimiento de quitosano + extracto de bay-rum encapsulado + conservación a 0°C) el que mayor disminución mostro con un valor de $2,5 \times 10^3$ UFC/g en comparación con la muestra control la cual evidencio el valor más alto con $4,6 \times 10^6$ en el día 10 del periodo de estudio.

A partir del día 16 se observó una coloración verdosa y un olor desagradable en todas las muestras lo que fue corroborado con los análisis realizados al día 20 y 30 dado como resultado recuentos de UFC muy altos que sobrepasaron los límites de la norma INEN 1338, la cual afirma que el rango de contaminación microbiológica permisible máximo en filetes de carne fresca en microorganismos aerobios mesófilos 1.0×10^7 UFC, *staphilococcus aureus* 1.0×10^4 UFC y por último *Escherichia coli* con un máximo de 1.0×10^2 . UFC. (Palacios y Vélez 2017).

Tabla N° 9. Recuento de UFC de aerobios mesófilos en filetes de pollo almacenados a 0°C y 8°C.

Tratamientos	Día 0 UFC/g	Día 10 UFC/g	Día 20 UFC/g	Día 30 UFC/g
A1B1C1	5,3x10 ²	2,4X10 ⁵	2,5x10 ⁸	5,0X10 ¹⁰
A1B1C2	5,0x10 ²	1,8X10 ⁴	3,2X10 ⁷	6,4X10 ⁹
A1B2C1	5,2X10 ²	7,4X10 ³	4,6X10 ⁷	8,7X10 ⁹
A1B2C2	5,5X10 ²	2,5X10 ³	1,1X10 ⁷	4,4X10 ⁹
A2B1C1	5,0X10 ²	3,3X10 ⁴	6,0X10 ⁸	8,3X10 ¹⁰
A2B1C2	5,4X10 ²	2,9X10 ⁴	5,4X10 ⁸	9,0X10 ⁹
A2B2C1	5,1X10 ²	2,0X10 ⁴	7,1X10 ⁸	8,4X10 ⁹
A2B2C2	5,4X10 ²	1,7X10 ⁴	4,0X10 ⁸	5,2X10 ⁹
CONTROL	5,0X10 ²	4,6X10 ⁶	8,5X10 ⁸	7,0X10 ¹⁰

Elaborado por. (Delgado & Posligua, 2019)

La carne de pollo es un producto muy alterable por lo que se debe manejar con especial cuidado en todas las operaciones de procesado. La alteración se inicia pronto después de la sangría, como resultado de acciones microbianas, químicas y físicas. (Palacios y Vélez 2017).

Es probable que, en las muestras analizadas, algunas de las etapas con probabilidades de contaminación microbiológica hayan sido la desolladura, el despiece, la condimentación o el empaque del pollo. Además, el recuento elevado en los indicadores microbiológicos predice el deterioro precoz del producto estudiado.

En investigaciones previas se han reportado resultados en el que la deficiente calidad sanitaria de algunos productos avícolas que se expenden comercialmente es evidente y constituye un riesgo para la salud de los consumidores (Boscan et al., 2005; Durango et al., 2004; León et al., 1996).

La carne de aves en general, y la de pollo en particular, es un vehículo muy importante de microorganismos patógenos para el hombre, principalmente:

Salmonella spp, *Campylobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Bacillus cereus* (Acevedo et al., 2015).

En el caso del pollo, embandejado en condiciones aerobias y almacenado en refrigeración, son las *Pseudomonas* (Psicótrofos) los microorganismos indicadores y responsables de su deterioro (Dainty and Mackey, 1992; Fung Daniel, 2003; Nutreco PRRC, 2004), produciéndose malos olores a niveles de 10^7 pseudomonas/cm² y aparición de sustancias limosas en superficie y lipólisis de la fracción grasa cuando se alcanza 10^8 pseudomonas/cm²

4.4. PRESENCIA O AUSENCIA DE *SALMONELLA SPP*

Los datos mostrados en la tabla 10, indican la presencia/ausencia de *salmonella spp*, en muestras de pechugas de pollo, estos datos indican que, los tratamientos (A1B1C1; A1B1C2; A1B2C1; A1B2C2), los cuales estaban conformado por recubrimiento de quitosano y los extractos de hojas de bay-rum libres y encapsulados fueron más eficaces en cuanto al control antimicrobiano de este patógeno en contraste con los tratamientos A2B1C1; A2B2C1 los cuales estaban conformado por recubrimiento de almidón de yuca y los extractos de hojas de bay-rum libres y encapsulados y la muestra CONTROL los cuales mostraron presencia de *Salmonella*, cabe indicar que las muestras que fueron tratadas con almidón de yuca y conservadas a 0°C no indicaron presencia de este patógeno, evidenciándose presencia en las muestras almacenadas a 8°C.

Tabla N° 10. Análisis de detección presencia o ausencia de *Salmonella spp*, en filetes de pollo.

Tratamientos	Día 0 presencia/ausencia	Día 10 presencia/ausencia	Día 20 presencia/ausencia	Día 30 presencia/ausencia
A1B1C1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
A1B1C2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
A1B2C1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
A1B2C2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
A2B1C1	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
A2B1C2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
A2B2C1	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
A2B2C2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
CONTROL	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia

Elaborado por. (Delgado & Posligua, 2019)

Los microorganismos patógenos en la carne de pollo cruda pueden multiplicarse de forma fácil a temperaturas que oscilan entre 4°C y 60°C (Acevedo et al., 2015). La manipulación higiénica correcta y una adecuada cocción y refrigeración previene estas enfermedades. Los patógenos pueden transmitirse a través de los jugos de las aves crudas si entran en contacto con otros alimentos. La carne de ave cruda puede contener bacterias como salmonella y otros agentes patógenos (Chavarrias, 2011).

La presencia de 15 a 20 células de *Salmonella spp* en un alimento puede producir infecciones intestinales y aunque no compite con otros microorganismos a temperaturas de refrigeración, se desarrolla cuando se producen abusos de temperatura (15 a 20 °C). (Tirado et al., 2005).

Un factor que debe considerarse respecto al manejo de productos refrigerados es el almacenamiento en el hogar del consumidor. Se aconseja que la temperatura de un refrigerador doméstico no exceda 5 °C. Sin embargo, estudios realizados en EUA encontraron que el 21 % de los refrigeradores domésticos operaban por arriba de 10 °C (James y James, 2002).

El ciclo de crecimiento de una población de microorganismos consta de las fases latencia (lag en inglés), exponencial, estacionaria y declinación. Los investigadores de microbiología predictiva se han enfocado a modelar el efecto de la fluctuación de temperatura sobre las primeras dos fases bajo la premisa de que, si la población microbiana alcanza la fase estacionaria, el producto está deteriorado o presenta riesgos para la salud del consumidor.

La fase de latencia corresponde al período de adaptación del microorganismo a nuevas condiciones del entorno. Almonacid-Merino et al. (1993) asumieron que este esfuerzo intracelular corresponde en su mayoría al necesario para aumentar la concentración de ácido ribonucleico (ARN), indicador del estado fisiológico de la célula, el cual llega a su máximo valor cuando el microorganismo inicia la fase exponencial. La síntesis de ARN no es el único factor que explica el periodo de latencia.

Una vez que las células se han adaptado a las condiciones del entorno, comienza la fase de crecimiento exponencial. Simpson et al. (1989) señalan que la velocidad de crecimiento se ve afectada por las condiciones del medio y la disponibilidad de sustrato, más que por los rangos de temperatura de interés.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

• CONCLUSIONES

- Se logró extraer fenoles totales en las muestras de hojas secas y verdes de Bay-Rum utilizando como solventes de extracción etanol y metanol.
- En cuanto a la cuantificación de fenoles presentes en las hojas de Bay-Rum se determinó que existe mayor presencia de compuestos fenólicos en las hojas verdes y se logra una mayor extracción utilizando como solvente el metanol.
- Se determinó que la mayor capacidad antioxidante la presentó la muestra de hojas verdes con extracción mediante solvente metanol (A1B2).
- En cuanto al efecto inhibitorio in vitro se evidenció que la muestra extraída de las hojas verdes con metanol presentó el mejor efecto antimicrobiano frente a cepas de *Salmonella spp.*
- En cuanto al crecimiento de bacterias aerobias mesófilas todos los tratamientos fueron efectivos en el control microbiano hasta el día 10, a partir del día 20 ningún tratamiento tuvo efecto debido a que todas las muestras y control sobrepasaron los límites permisibles.

- **RECOMENDACIONES**

- ❖ Se recomienda realizar análisis sensorial para determinar si existe influencia en el sabor del producto.
- ❖ Se debe de probar los extractos sin recubrimiento comestible debido a que este puede afectar su efectividad.
- ❖ Se recomienda utilizar el extracto de Bay-Rum en otros tipos de alimentos.
- ❖ En base a los resultados obtenidos en este estudio se recomienda encapsular los compuestos fenólicos, debido a que se ha demostrado que tienen mayor capacidad antimicrobiana cuando se los encapsula.

BIBLIOGRAFIA

- Abaul, J., Bourgeois, P & Bessiere, M. Chemical composition of the essential oils of different kinds of *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (Bois d'Inde) of Guadeloupe Island. *Flav. Fragr. J.*, 10, 319-321 (1995).
- Acevedo, D., Montero, P. M., & Jaimes, J. D. (2015). Determinación de antibióticos y calidad microbiológica de la carne de pollo comercializada en Cartagena (Colombia). *Información tecnológica*, 26(1), 71-76.
- Alexandre, M., Pozo, C., González, V., Martínez, M. C., Prat, S., Fernández, A., & Heitmann, I. (2000). Detección de *Salmonella enteritidis* en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Región Metropolitana. *Revista médica de Chile*, 128(10), 1075-1083.
- Almonacid-Merino, S. F.; David, R. T.; Torres, J. A. 1993. Numerical and statistical methodology to analyze microbial spoilage of refrigerated solid foods exposed to temperature abuse. *Journal of Food Science* 58(4), 914-920.
- Alvarado, C.; Mckee, S. (2007). Marination to improve functional properties and safety of poultry meat, en: *Journal Applied of Poultry Research*, 16:113-20.
- Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005, 81(suppl): 317S – 325S.
- Barbut, S. (2002). Poultry products: formulations and gelation. *Poultry Products Processing. An Industry Guide*. CRC Press, New York, USA, 467-511.
- Blanchard J., 2000. Los antimicrobianos naturales refuerzan la seguridad en los alimentos. Disponible en: <http://www.directoalpaladar.com/2006/10/28-los-antimicrobianos-naturales-refuerzan-la-seguridad-en-los-alimentos> [Consulta 13/May./2019]
- Boscán, L., Arzálluz, A., Ugarte, C., Sánchez, D., Díaz, D., Wittum, T., & Hoet, A. (2005). Aislamiento de *Salmonellas* de importancia zoonótica en vísceras de pollos beneficiados en el estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, 15(6).
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 2001;161:839-51.

- Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Science*. 2006, 78(25): 2872 – 2888.
- Carratú B, Sanzini E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Ann. Ist. Super Sanita*. 2005,41: 7 – 16.
- Castro, M., Mantuano, M. I., Coloma, J. L., & Santacruz, S. (2017). Utilisation of Cassava starch edible films containing salicylic acid on papaya (*Carica papaya* L.) preservation. *Revista Politécnica*, 39(1), 7-12.
- Ceron T., Munguía R., García S., Santiesteban A. 2014. Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (*capsicum*). Mex, Puebla. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. pp 2334-2501.
- Chavarrías, M. 2011. Alternativas naturales a los conservantes artificiales. consultado el 6 de agosto del 2016. formato HTML. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-ytecnologia/2011/02/02/198658.php>
- Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2007). Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 C. *Food Microbiology*, 24(6), 607- 617.
- CLSI (2009). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline-Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI document M44–A2.
- Cormillot A. 2015. Todo lo que tenés que saber sobre cómo conservar el pollo. Consultado el 08 de agosto del 2016. Formato HTML. Disponible en: http://www.clarin.com/buena-vida/salud/tenes-saber-conservarpollo_0_1439856322.html.
- Davidson, P.M. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. En: *Food Microbiology: and Fundamentals and frontiers*, 2 Ed. Doyle MP, LR Beuchat, TJ Montville (Eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA. Chap. 29: 593-627.
- Dainty, R.H. and Mackey, B.M., 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, vol 73, pp: 1038-1048.

- Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 1995, 7: 1085 – 1097.
- Durango, J.; Arrieta, G.; Mattar, S. 2004. Presencia de Salmonella spp. en un área del Caribe Colombiano: un riesgo para la salud pública. *Biomédica*. 24:89-96.
- FAO. (2008). Organización para la Agricultura y la Alimentación. FAO. Inocuidad y calidad de los alimentos. Buenas prácticas y garantía de calidad. 2008. Fecha de consulta: 21 de febrero de 2009. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/agn/agns>.
- Fernández, Idoya. 2011. Tecnología de los alimentos. [En línea] 24 de febrero de 2011. [Citado el: 12 de octubre de 2016.] <http://www.agenciasinc.es/Noticias/Un-recubrimiento-comestible-lograconservar-productos-como-la-pechuga-durante-13-dias>.
- Fuentes, A.; Campas, O.; Meza, M. 2005. Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de ciudad de Obregón, Sonora, México. *Rev. Salud Pública y Nutrición*. 6(3):8-17.
- Fung Daniel, Y.C, 2003. Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria. II Workshop. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Galobart, J.; Moran, E.T. JR. (2004). Freeze-Thaw and Cooking Effects on Broiler Breast Fillets with Extreme Initial L* Values, en: *Poultry Science*, 83: 2093-2097.
- García-Alonso M, De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Evaluation of the antioxidant properties of fruit. *Food Chemistry*. 2004, 84: 13 – 18.
- Gruda, Z.; Postolski, J. (1986). Tecnología de la congelación de los alimentos. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Gupta, R.K.; Patel, A.K.; Shah, N.; Chaudhary, K.A.; Jha, U.K.; Yadav, U.C.; Gupta, P.K. y Pakuwal, U. (2014). Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15, 4405-4409.
- Hedrick, H. B., Aberle, E. D., Forrest, J. C., Judge, M. D., & Merkel, R. A. (1994). Nutritive value of meat. In *Principles of meat science* (pp. 289-298). Kendall Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa.

- James, S. J.; James, C. 2002. Meat refrigeration. 347p. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4076-4082.
- Landrum, L. R. (1984). Taxonomic implications of the discovery of calyptrate species of *Myrceugenia* (Myrtaceae). *Brittonia*, 36(2), 161-166.
- Lee, Y.S.; Saha, A.; Xiong, R.; Owens, C.M.; Meullenet, J.F. (2008). Changes in Broiler Breast Fillet Tenderness, Water-Holding Capacity, and Color Attributes during Long- Term Frozen Storage, en: *Journal of Food Science*, 73(4): 162-168.
- León A, Infante D, Noguera C, Herrera A, Valdillo P. Detección de *Salmonella* spp. en pollos congelados en el Estado Aragua. *Veter Trop*. 1996;21:75-84.
- López, Humberto y Braña, Diego y Hernández, Isabel. 2013. Estimación de la Vida de Anaquel de la Carne. Ajuchitlán: s.n., 2013. ISBN: 978-607-370092-4.
- Lyon, B.G.; Smith, D.P.; Savage, E.M. (2005). Descriptive sensory analysis of broiler breast fillets marinated in phosphate, salt, and acid solutions, en: *Poultry Science*, 84:345- 349.
- Mahmood, A., Ngah, N., & Omar, M. N. (2011). Phytochemicals constituent and antioxidant activities in *Musa x Paradisiaca* flower. *European Journal of Scientific Research*, 66(2), 311-318.
- Mead, P.S. et al., 1999. Food related-illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 607-625.
- Mohd Zin Z, Abdul Hamid A, Osman A, Saari N. Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Food Chemistry*. 2004;94:169-78.
- Molina, N., Millán, B., & Araque, M. (2010). Indicadores de calidad sanitaria y fenotipificación de *Salmonella enterica* aislada de pollo crudo comercializado en el área urbana de Mérida, Venezuela. *Infectio*, 14(3), 174-185.
- Mountey, G.J.; Parkhurst, C.R. (2001). *Poultry Products Technology*. Zaragoza: Acribia.

- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena P. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 1998;34(6):267-75.
- Muñoz Jáuregui, A. M., Ramos-Escudero, D. F., Alvarado-Ortiz Ureta, C., & Castañeda Castañeda, B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(3), 142-149.
- Naczki M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, 41: 1523 –1542.
- Nutreco PRRC, 2004. Fresh life of fresh raw poultry products.
- Niemenak N, Rohsius C, Elwers S, Ndoumoua DO Liebereib R. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *J Food Composition Analysis*. 2006;19(6-7):612-9.
- Ochoa C, Ayala A. Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos. *Ingeniería y Competitividad: Revista de Divulgación del Desarrollo Científico y Tecnológico*. 2004; 6 (2): 93 -104.
- Oksman-Caldentey KM, Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*. 2004;9:433-40.
- Palacios Valencia, J. A., & Vélez Alcívar, C. R. (2017). Efecto bioconservador del aceite esencial de orégano (*Origanum Vulgare* L.) aplicado en filetes de pollo almacenado a diferentes temperaturas (Bachelor's thesis, Calceta: ESPAM).
- Pratt DE, Hudson B. J. F. Natural oxidants not exploited commercially. *Food Antioxidants*. In: Hudson B. J. F., editor. *Food antioxidants*. Amsterdam. New York, U. S. A: Ed. Elsevier; 1990. p. 171-92.
- Quevedo, F. (2002). Enfermedades Emergentes y Re-Emergentes transmitidas por los alimentos. *Ciencia e Investigación*, 5(2), 25-35.
- Quiñones Gálvez, J., Trujillo Sánchez, R., Capdesuñer Ruiz, Y., Quirós Molina, Y., & Hernández de la Torre, M. (2013). Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L.(cacao). *Revista cubana de plantas medicinales*, 18(2), 201-215.

- Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, et al. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:30-5.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Renner, M. (1990). Factors involved in the discolouration of beef meat, en: *International Journal of Food Science and Technology*, 25: 613–630.
- Revista agronomía y forestal UC. 2005. Importancia y prevención de su oxidación. Pontífera Universidad Católica de Chile. N° 2.
- Reyes F., Palou E., López A. 2014. Metodo de evaluacion de la actividad microbiana y de determinacion de los componentes quimicos de los aceites esenciales. consultados el 8 de agosto del 2016. formato PDF. disponible en: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-81-Reyes-Jurado-et-al2014.pdf>.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications (Vol. 1)*. John Wiley & Sons.
- Robbins, R. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric.Food Chem.* Vol. 51, 2866-2887.
- Rojas, J., Contreras, B., Celis, M., Rojas, L., Méndez, L., & Landrum, L. (2014). Componentes volátiles de las hojas de *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (Mill.) JW Moore (Myrtaceae) de Táchira–Venezuela. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(3).
- Sánchez, Marcos. 2011. *Las pechugas vivirán más*. Pamplona: Diario de Navarra, 2011.
- Santacruz, S., & Castro, M. (2018). Viability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* incorporated to cassava starch edible films and its application to Manaba fresh white cheese. *LWT*, 93, 570-572.
- Simpson, R.; Li, K. Y.; Torres, J. A. 1989. A management tool to improve the microbial quality of refrigerated foods. In *Proceedings of the International Conference on Technical Innovations in Freezing and Refrigeration of Fruits and Vegetables*, Davis, California, Julio 9-12, EUA.

- Smith, D.P.; Young, L.L. (2007). Processing, products, and food safety. Marination Pressure and Phosphate Effects on Broiler Breast Fillet Yield, Tenderness, and Color, en: *Poultry Science*, 86:2666-2670.
- Solís, R. 2000 Producción de Camélidos Sudamericanos. 2da Ed. Cerro de Pasco-Huancayo – Perú. 45 p.
- Teira, G.; Perlo, F.; Bonato, P.; Fabre, R. (2004). Estudio de mermas por descongelación en fillets de pollo, en: *Ciencia, Docencia y Tecnología*, XV (28): 203-215.
- Teixeira, A.; Baenas, N.; Domínguez-Perles, R.; Barros, A.; Rosa, E.; Moreno, D.A. y García-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 15638-15678.
- Tirado, J., Paredes, D., Velazquez, G., & Torres, J. A. (2005). Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados microbial growth in refrigerated meat products crecimiento microbiano en productos cárnicos refrixerados. *Cyta-Journal of Food*, 5(1), 66-76.
- TopTropicals. (2015). Obtenido de: http://toptropicals.com/catalog/uid/Pimenta_racemosa.htm.
- Traore A, Guiltinan MJ. Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. *Hort Science*. 2006;41(3):753-8.
- Uttaro, B.; Aalhus, J.L. (2007). Effect of thawing rate on distribution of an injected salt and phosphate brine in beef, en: *Meat Science*, 65(3): 480-486.
- Vargas, J.; Clavo, N.; Máttar, S. 2004. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* sp en cerdos del departamento de Córdoba. *Rev. MVZ Córdoba*. 9(1):386-392.
- Wollgast J Y Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufactured of chocolate methodology for identification and quantification. *Food Res Int*. 2000; 33: 423-447.
- Xargayó, M.J.; Lagares, E.; Fernández, E., Ruiz, D.; Borrell, D. (2001). Marination of fresh meats by means of spray effect: influence of spray injection on the quality of marinated products. Disponible en: <http://en.metalquimia.com/upload/document/article-en-7.pdf> [01-11-2014].

- Yoon, K.S. (2002). Texture and Microstructure Properties of Frozen Chicken Breasts Pretreated with Salt and Phosphate Solutions, en: Poultry Science, 81: 1910-1915.
- Zhu, S.; Bail, A.; Ramaswarny, H.S.; Chapleau, N. (2004). Characterization of ice crystals in pork muscle formed by pressure-shift freezing as compared with classical freezing methods, en: Journal of Food Science, 69(4): 190–197.

ANEXOS

Anexo N° 1. Anova de cuantificación de fenoles totales en muestra de extractos de hojas de Bay-rum.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
FENOLES TOTALES	12	1,00	1,00	3,7E-07	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	952,41	3	317,47	32540809717006600,00	<0,0001
TRATAMIENTOS	952,41	3	317,47		sd sd
Error	0,00	8	0,00		
Total	952,41	11			

Anexo N° 2. Anova de capacidad antioxidante en muestra de extractos de hojas de Bay-rum.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	12	1,00	1,00	2,5E-07	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	98,80	3	32,93	112832408705129000,00	<0,0001
TRATAMIENTOS	98,80	3	32,93		sd sd
Error	0,00	8	0,00		
Total	98,80	11			

Anexo N° 3. Anova de Inhibición microbiana in vitro de muestra de extractos de hojas de Bay-rum frente a cepas de *Salmonella spp*, en 24 h de exposición.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
INHIBICION MICROBIANA 24h	12	1,00	1,00	0,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	77,06	3	25,69	1233,00	<0,0001
TRATAMIENTOS	77,06	3	25,69	1233,00	<0,0001
Error	0,17	8	0,02		
Total	77,23	11			

Anexo N° 4. Anova de Inhibición microbiana in vitro de muestra de extractos de hojas de Bay-rum frente a cepas de *Salmonella spp*, en 48 h de exposición.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
INHIBICION MICROBIANA 48h	12	0,98	0,97	3,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	156,25	3	52,08	131,58	<0,0001
TRATAMIENTOS	156,25	3	52,08	131,58	<0,0001
Error	3,17	8	0,40		
Total	159,42	11			

Figura 1.- Extracción de compuestos fenólicos.



Figura 2.- Cuantificación de compuestos fenólicos.



Figura 3.- Capacidad antioxidante.



Figura 4.- Efecto inhibitorio.



Figura 5.- Aplicación en filetes.

