



UNIVERSIDAD DE BURGOS

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS
ALIMENTOS**

TESIS DOCTORAL

Estudio de diferentes plantas autóctonas de Ecuador para su
aplicación como conservantes naturales en productos alimenticios.

AUTOR

Jorge Felipe Reyes Bueno

Burgos, abril de 2024

Estudio de diferentes plantas autóctonas de Ecuador para su aplicación
como conservantes naturales en productos alimenticios.

Memoria presentada por

Jorge Felipe Reyes Bueno

para optar al grado de Doctor

por la Universidad de Burgos



UNIVERSIDAD
DE BURGOS

Dra. MARÍA ISABEL JAIME MORENO y Dra. ANA MARÍA DIEZ MATÉ, Catedrática y Profesora Titular del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos,

Como Directoras de la Tesis Doctoral “Estudio de diferentes plantas autóctonas de Ecuador para su aplicación como conservantes naturales en productos alimenticios” desarrollada por **D. Jorge Felipe Reyes Bueno**.

INFORMAN

Favorablemente la presentación de dicha tesis, ya que reúne las condiciones necesarias para su defensa en cuanto a la realización de la fase experimental y la elaboración de la memoria.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, se firma el presente informe,

En Burgos, a 17 de abril de 2024

Fdo.: María Isabel Jaime Moreno

Fdo.: Ana María Diez Maté



UNIVERSIDAD
DE BURGOS

DON JOSÉ MANUEL BENITO MORENO, COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO “AVANCES EN CIENCIA Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS” DE LA UNIVERSIDAD DE BURGOS.

CERTIFICA

Que la memoria titulada “**Estudio de diferentes plantas autóctonas de Ecuador para su aplicación como conservantes naturales en productos alimenticios**” presentada por **D. Jorge Felipe Reyes Bueno**, Graduado en Ingeniería en Industrias Agropecuarias, ha sido realizada en el Área de Tecnología de los Alimentos bajo la dirección de la Dra. MARÍA ISABEL JAIME MORENO y de la Dra. ANA MARÍA DIEZ MATÉ, y en representación de la Comisión del Título, autoriza su presentación para ser defendida como Tesis Doctoral.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado,

En Burgos, a 17 de abril de 2024

Fdo. José Manuel Benito Moreno

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a la Universidad de Burgos por el invaluable apoyo y orientación proporcionados por mis directores Ana, Isabel y Jordi, su calidad profesional y humana fueron fundamentales para mi aprendizaje académico y personal. Desde mi llegada, me brindaron una cálida bienvenida y me hicieron sentir parte del equipo, convirtiendo mi estadía en España en una experiencia inolvidable. Agradezco especialmente su comprensión frente a mi situación laboral, así como su flexibilidad y eficiencia en la gestión, aspectos cruciales dada la complejidad del trabajo desarrollado en ambos países. Además, quiero reconocer el invaluable apoyo de Esther, Miriam, Carolina, Irene, Henar, Ioana, y Patricia que fue fundamental para el desarrollo del trabajo en el laboratorio. Así mismo, también les agradezco por los momentos compartidos fuera del ámbito académico, cada conversación, cada café, no solo fortaleció nuestros lazos, sino que también proporcionó un espacio para el intercambio de ideas y mi enriquecimiento cultural. Estos momentos de camaradería y compañerismo fueron tan importantes como las horas dedicadas al trabajo académico y quedarán grabados en mi memoria como parte integral de esta experiencia.

Mi reconocimiento a la Universidad Técnica particular de Loja, institución a la que me enorgullece pertenecer y cuyo apoyo económico hizo que este anhelo se haga realidad. También quiero agradecer a mis compañeros quienes tuvieron que asumir la carga adicional que implica que uno de sus integrantes delegue su trabajo.

Quiero dedicar un agradecimiento especial a mis hijos y a mi esposa por su inmenso sacrificio y comprensión durante todo este tiempo. Su apoyo incondicional y su comprensión han sido fundamentales para que pudiera concentrarme en mis estudios y avanzar en mi carrera académica. A pesar de los desafíos y las dificultades que enfrentaron al quedarse solos mientras yo viajaba para estudiar, siempre estuvieron ahí, brindándome su amor, ánimo y apoyo en todo momento. Su paciencia y sacrificio no pasan desapercibidos y valoro enormemente el esfuerzo y la dedicación que han demostrado. Son mi fuente de inspiración y motivación, y les estoy profundamente agradecido por ser mi roca en este viaje. Sin su amor y respaldo, este logro no habría sido posible.

A mi mamá por su apoyo incansable e incondicional a lo largo de esta travesía y que junto a mi familia en Ecuador brindaron el apoyo que mi esposa e hijos necesitaban. A mis hermanas, sobrinos y cuñado en España, les agradezco de corazón por brindarme un hogar lejos de casa. Su cálida acogida, su disposición para escucharme, animarme, enseñarme y celebrar

mis logros han sido un verdadero consuelo en esta travesía, su generosidad ha significado más de lo que las palabras pueden expresar.

Finalmente, quiero agradecerles a todos los amigos que hice en esta encantadora tierra por su hospitalidad y por hacerme sentir parte de sus vidas y de sus familias.

JORGE FELIPE REYES BUENO

RESUMEN

Ecuador, debido a su ubicación geográfica privilegiada que abarca la cordillera de los Andes, zonas costeras, amazónicas e insulares, posee una biodiversidad excepcional. Además, cuenta con un valioso legado de conocimientos ancestrales sobre el uso de plantas medicinales por parte de sus comunidades indígenas. A pesar de ello, gran parte de este acervo cultural y natural no ha sido estudiado o aprovechado, lo que representa un riesgo ya que pueden perderse importantes recursos para la sociedad y la ciencia. Parte de la investigación científica actual se ha enfocado en explorar el potencial de ciertas plantas con el propósito de evitar el deterioro de los alimentos y extender su vida útil, lo que abre inmensas posibilidades tomando en cuenta la diversidad de especies existente. Además, esto coincide con las tendencias emergentes del mercado, especialmente con el concepto de *clean label* en el procesamiento de alimentos, lo que implica la elaboración de productos con ingredientes naturales y reconocibles, en respuesta a la creciente demanda de opciones saludables por parte de los consumidores.

Por tanto, esta tesis tuvo como objetivo evaluar la composición química, así como la capacidad antimicrobiana y antioxidante de extractos de tres especies de plantas pertenecientes a la biodiversidad ecuatoriana y de los países andinos, empleando tanto métodos *in vitro*, como ensayos en modelos alimentarios, para comprender mejor su efectividad y potencial aplicación en la industria alimentaria.

Se investigó el perfil volátil de *Simira ecuadorensis* (guápala), *Piper carpunya* (guaviduca) e *Ilex guayusa* (guayusa) para identificar los compuestos volátiles presentes en la planta y comprender su potencial uso en la industria alimentaria. Para ello se obtuvieron cuatro tipos de extractos: dos extraídos con agua, uno que posteriormente se liofiliza (H₂O) y otro que se atomiza (ATOM); uno extraído con etanol (ETOH) y otro con etanol-agua (ETOH-H₂O). Mediante cromatografía de gases, se determinó que *P. carpunya* tenía la mayor cantidad de compuestos volátiles, seguida por *S. ecuadorensis* e *I. guayusa*. Los terpenos (monoterpenos) fueron los compuestos predominantes en todas las plantas.

La evaluación del potencial antimicrobiano de los cuatro extractos para cada una de las tres especies se realizó mediante el método de difusión en agar, frente a un total de 20 cepas patógenas y de deterioro alimentario. Se encontró que los extractos de *S. ecuadorensis* inhibieron efectivamente el crecimiento de siete cepas bacterianas, destacando su efecto sobre *Campylobacter jejuni* y *Shewanella putrefaciens*. Por otro lado, los extractos de *P. carpunya*, exhibieron una eficacia similar, inhibiendo el crecimiento de ocho cepas bacterianas, entre las

que se destacan *Clostridium perfringens* y *C. jejuni*. En el caso de *I. guayusa*, se observó una actividad inhibitoria frente a cuatro bacterias, destacando su actividad frente a *Shewanella* sp.

El estudio del potencial antimicrobiano de los extractos se complementó con la aplicación de los extractos en alimentos modelo conservados bajo condiciones comerciales. En el caso de *S. ecuadorensis*, el extracto ATOM mostró una baja inhibición de *C. jejuni* en hamburguesas de pollo, pero una alta actividad en caldo de pollo, mientras que el extracto ETOH-H₂O exhibió una alta actividad contra *Shew. putrefaciens* en productos de pescado. Respecto a los extractos ETOH-H₂O y H₂O de *P. carpunya*, ambos presentaron efecto sobre *C. perfringens* inoculado en *risotto*, pero el ETOH-H₂O demostró una mayor eficacia frente a *C. perfringens*, bacterias aerobias mesófilas (AMB) y psicrófilas.

La investigación también evaluó la capacidad antioxidante de extractos de *S. ecuadorensis*, *P. carpunya* e *I. guayusa*, mediante los métodos *in vitro* DPPH, FRAP, ABTS y contenido fenólico total. Se observó que los extractos ETOH-H₂O de *P. carpunya* y *S. ecuadorensis* mostraron la mayor capacidad antioxidante, mientras que los de *I. guayusa* mostraron la menor, a excepción del extracto H₂O, que presentó el mayor contenido fenólico total. Utilizando hamburguesas de cerdo como modelo alimentario, se encontró que la incorporación de estos extractos redujo significativamente la oxidación lipídica en las hamburguesas de cerdo hasta el día 14 de almacenamiento. Según los resultados obtenidos las tres especies poseen un contenido fenólico y una actividad antioxidante media - alta. La aplicación de los extractos de estas tres especies en matrices alimentarias también tiene efecto sobre sus valores de pH y Aw.

Los resultados indican que los extractos de hojas de las tres especies estudiadas tienen el potencial de ser valiosos ingredientes naturales en la industria alimentaria. Además de contribuir a la seguridad microbiológica de los alimentos, estos extractos mejoran la estabilidad oxidativa y aportan fitoquímicos bioactivos. De este modo, la incorporación de extractos de plantas medicinales puede ofrecer beneficios significativos para la salud de los consumidores, lo que los convierte en una opción prometedora para el desarrollo de productos alimenticios saludables y seguros.

ABSTRACT

Ecuador, due to its privileged geographical location covering the Andean Mountain range, coastal areas, Amazon rainforest, and islands, has exceptional biodiversity. Additionally, it holds a valuable legacy of ancestral knowledge regarding the use of medicinal plants by indigenous communities. Despite this, a large part of this cultural and natural heritage has not been studied or used, which represents a risk since important resources for society and science may be lost. Current scientific research has focused on exploring the potential of certain plants to prevent food deterioration and extend shelf life, opening vast possibilities given the existing species diversity. Furthermore, this coincides with emerging market trends, especially with the clean label concept in food processing, which implies the production of products with natural and recognizable ingredients, in response to the growing demand for healthy and conscious options by consumers.

Therefore, this thesis aimed to evaluate the chemical composition, as well as the antimicrobial and antioxidant capacity of extracts from three species of plants belonging to the Ecuadorian biodiversity and the Andean countries, using both in vitro methods and tests in food models to better understand its effectiveness and potential application in the food industry.

The volatile profile of *Simira ecuadorensis* (guápala), *Piper carpunya* (guaviduca), and *Ilex guayusa* (guayusa) was investigated to identify the volatile compounds present in the plant and understand their potential use in the food industry. Four types of extracts were obtained: two extracted with water, one subsequently freeze-dried (H₂O), and one spray-dried (ATOM); one extracted with ethanol (ETOH), and another with ethanol-water (ETOH-H₂O). Gas chromatography determined that *P. carpunya* had the highest number of volatile compounds, followed by *S. ecuadorensis* and *I. guayusa*. Terpenes (monoterpenes) were the predominant compounds in all plants.

The evaluation of the antimicrobial potential of the four extracts for each of the three species was carried out using the agar diffusion method, against a total of 20 pathogenic and food spoilage strains. It was found that *S. ecuadorensis* extracts effectively inhibited the growth of seven bacterial strains, highlighting its effect on *Campylobacter jejuni* and *Shewanella putrefaciens*. On the other hand, *P. carpunya* extracts exhibited similar efficacy, inhibiting the growth of eight bacterial strains, among which *Clostridium perfringens* and *C. jejuni* stand out. In the case of *I. guayusa*, an inhibitory activity was observed against four bacteria, highlighting its activity against *Shewanella* sp.

The study of the antimicrobial potential of the extracts was complemented by the application of the extracts in model foods preserved under commercial conditions. In case of *S. ecuadorensis*, the ATOM extract showed low inhibition of *C. jejuni* in chicken burgers but high activity in chicken broth, while the ETOH-H₂O extract exhibited high activity against *Shew. putrefaciens* in fish products. Regarding the ETOH-H₂O and H₂O extracts of *P. carpunya*, both showed an effect on *C. perfringens* inoculated in *risotto*, but ETOH-H₂O demonstrated greater efficacy against *C. perfringens*, aerobic mesophilic bacteria (AMB) and psychrophiles.

The research also evaluated the antioxidant capacity of extracts from *S. ecuadorensis*, *P. carpunya*, and *I. guayusa* using in vitro methods DPPH, FRAP, ABTS, and total phenolic content. It was observed that the ETOH-H₂O extracts of *P. carpunya* and *S. ecuadorensis* showed the highest antioxidant capacity, while those of *I. guayusa* showed the lowest, except for the H₂O extract, which had the highest total phenolic content. Using pork burgers as a food model, it was found that the incorporation of these extracts significantly reduced lipid oxidation in pork burgers up to day 14 of storage. According to the results, all three species have a medium to high phenolic content and antioxidant activity. The application of the extracts of these three species in food models also has an effect on their pH and Aw values.

The results indicate that leaf extracts of the three studied species have the potential to be valuable natural ingredients in the food industry. In addition to contributing to the microbiological safety of food, these extracts improve oxidative stability and provide bioactive phytochemicals. Thus, the incorporation of medicinal plant extracts can offer significant benefits to consumer health, making them a promising option for the development of healthy and safe food products.

Tabla de contenidos

Resumen.....	i
Abstract.....	iii
Tabla de contenidos.....	v
1. Revisión bibliográfica.....	13
Guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes.).....	16
Guaviduca (<i>Piper carpunya</i>).....	19
Guápala (<i>Simira ecuadorensis</i>).....	21
Comentarios finales.....	23
2. Objetivos del estudio.....	25
3. Referencias bibliográficas.....	25
Capítulo 1: Caracterización volátil de <i>Simira ecuadorensis</i>, <i>Piper carpunya</i> e <i>Ilex guayusa</i>, con potencial aplicación como conservantes y antioxidantes naturales en la industria alimentaria.....	30
1. Introducción.....	31
2. Materiales y Métodos.....	34
2.1 Plantas.....	34
2.1.1 Obtención de las plantas.....	34
2.1.2 Preparación de las hojas.....	35
2.2 Obtención de los extractos.....	35
2.3 Análisis de los compuestos volátiles de los extractos obtenidos.....	36
2.4 Análisis estadístico.....	37
3. Resultados y Discusión.....	37
3.1 Rendimientos de extracción.....	37
3.2 Perfil volátil.....	38
4. Conclusiones.....	54
5. Referencias bibliográficas.....	54
Capítulo 2: Efecto antimicrobiano de extractos de <i>Simira ecuadorensis</i> y su impacto en la mejora de la vida útil en productos de pollo y pescado.....	59
1. Introducción.....	60
2. Materiales y Métodos.....	61
2.1 Materiales.....	61
2.1.1 Plantas.....	61
2.1.2 Preparación de extractos.....	61
2.2 Esquema experimental.....	62
2.3 Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	62
2.3.1 Especies microbianas.....	62
2.3.2 Determinación de la actividad antimicrobiana.....	62
2.4 Pruebas de desafío.....	64
2.4.1 Preparación del inóculo.....	64
2.4.2 Productos de pollo y pescado.....	65
2.4.3 Análisis Microbiológicos.....	65
2.4.4 Determinación de pH.....	66
2.5 Análisis estadístico.....	66
3. Resultados y Discusión.....	66
3.1 Actividad antimicrobiana.....	66
3.2 Efecto del extracto atomizado sobre el crecimiento microbiano en hamburguesas de pollo durante el almacenamiento.....	69

3.3	Efecto del extracto atomizado sobre el crecimiento microbiano en caldo de pollo, durante el almacenamiento.....	71
3.4	Efecto del extracto etanol-agua sobre el crecimiento microbiano en hamburguesas de pescado durante el almacenamiento.....	73
3.5	Efecto del extracto etanol-agua sobre el crecimiento microbiano en caldo de pescado durante el almacenamiento.....	75
4.	Conclusiones.....	77
5.	Referencias bibliográficas.....	78

Capítulo 3: Actividad antimicrobiana de extractos de <i>Piper carpunya</i> y su efecto sobre la vida útil en modelos alimentarios.....		84
1.	Introducción.....	85
2.	Materiales y Métodos.....	87
2.1	Materiales.....	87
2.1.1	Plantas.....	87
2.1.2	Preparación de extractos.....	88
2.2	Fases de la etapa experimental.....	88
2.3	Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	88
2.3.1	Especies microbianas.....	88
2.3.2	Determinación de la actividad antimicrobiana.....	90
2.4	Pruebas de desafío.....	90
2.4.1	Preparación del inóculo.....	90
2.4.2	Preparación del producto.....	91
2.4.3	Análisis microbiológicos.....	92
2.4.4	Determinación de pH.....	92
2.4.5	Determinación de la actividad de agua (Aw).....	92
2.4.6	Oxidación lipídica.....	92
2.5	Análisis estadístico.....	93
3.	Resultados y Discusión.....	93
3.1	Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	93
3.2	Efecto antimicrobiano de los extractos liofilizado y etanol-agua de <i>P. carpunya</i> en <i>risotto</i> durante el almacenamiento.....	96
3.3	Efecto de los extractos liofilizado y etanol-agua de <i>P. carpunya</i> sobre el pH de <i>risotto</i> durante el almacenamiento.....	99
3.4	Efecto de los extractos liofilizado y etanol-agua de <i>P. carpunya</i> sobre la actividad de agua (Aw) de <i>risotto</i> durante el almacenamiento.....	101
3.5	Efecto de los extractos liofilizado y etanol-agua de <i>P. carpunya</i> sobre la oxidación de <i>risotto</i> durante el almacenamiento.....	101
4.	Conclusiones.....	102
5.	Referencias bibliográficas.....	103

Capítulo 4: Actividad antioxidante de extractos de <i>Simira ecuadorensis</i>, <i>Piper carpunya</i> e <i>Ilex guayusa</i> y su potencial uso para evitar la oxidación lipídica en alimentos.....		109
1.	Introducción.....	110
2.	Materiales y Métodos.....	112
2.1	Materiales.....	112
2.1.1	Plantas.....	112
2.1.2	Preparación de las hojas.....	113
2.1.3	Preparación de los extractos.....	113
2.2	Determinación de actividad antioxidante y fenoles totales.....	114

2.2.1	Contenido de fenoles totales.....	114
2.2.2	Método DPPH.....	115
2.2.3	Método FRAP.....	115
2.2.4	Método ABTS.....	116
2.3	Evaluación de la vida útil de las hamburguesas de carne de cerdo.....	117
2.3.1	Preparación de hamburguesas de carne de cerdo.....	117
2.3.2	Oxidación lipídica.....	117
2.3.3	Determinación de pH.....	118
2.4	Análisis estadístico.....	118
3.	Resultados y Discusión.....	118
3.1	Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	118
3.1.1	<i>Piper carpunya</i>	118
3.1.2	<i>Simira ecuadorensis</i>	119
3.1.3	<i>Ilex guayusa</i>	122
3.2	Efecto de los extractos sobre la oxidación de hamburguesas de cerdo durante el almacenamiento.....	123
3.2.1	<i>Piper carpunya</i>	124
3.2.2	<i>Simira ecuadorensis</i>	125
3.2.3	<i>Ilex guayusa</i>	128
3.3	Efecto de los extractos sobre el pH de hamburguesas de cerdo durante el almacenamiento.....	128
3.3.1	<i>Piper carpunya</i>	128
3.3.2	<i>Simira ecuadorensis</i>	130
3.3.3	<i>Ilex guayusa</i>	133
4.	Conclusiones.....	135
5.	Referencias bibliográficas.....	135
	Discusión general.....	141
	Desafíos futuros.....	149
	Referencias bibliográficas.....	151
	Conclusiones del trabajo.....	159
	Apéndice.....	162
	Apéndice 1.....	162
	Apéndice 2.....	163

Lista de tablas

Capítulo 1: Caracterización volátil de <i>Simira ecuadorensis</i>, <i>Piper carpunya</i> e <i>Ilex guayusa</i>, con potencial aplicación como conservantes y antioxidantes naturales en la industria alimentaria.....	30
Tabla 1. Rendimiento tras la extracción de hojas frescas de <i>S. ecuadorensis</i> , <i>P. carpunya</i> e <i>I. guayusa</i>	37
Tabla 2. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en <i>S. ecuadorensis</i>	38
Tabla 3. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en <i>P. carpunya</i>	41
Tabla 4. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en <i>I. guayusa</i>	46
Tabla 5. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de las familias químicas de los compuestos volátiles analizados en las tres plantas para el extracto H ₂ O (extraído con agua y liofilizado).....	50
Tabla 6. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de las familias químicas de los compuestos volátiles analizados en las tres plantas para el extracto ATOM (extraído con agua y atomizado).....	50
Tabla 7. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de las familias químicas de los compuestos volátiles analizados en las tres plantas para el extracto ETOH (extraído con etanol).....	51
Tabla 8. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de las familias químicas de los compuestos volátiles analizados en las tres plantas para el extracto ETOH-H ₂ O (extraído con etanol-agua).....	51
Capítulo 2: Efecto antimicrobiano de extractos de <i>Simira ecuadorensis</i> y su impacto en la mejora de la vida útil en productos de pollo y pescado.....	59
Tabla 1. Cepas bacterianas elegidas para este estudio.....	63
Tabla 2. Actividad antimicrobiana de extractos de <i>Simira ecuadorensis</i> expresados como el diámetro del área de inhibición (mm).....	67
Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos de <i>Simira ecuadorensis</i> (mg/ml).....	68
Tabla 4. Crecimiento de AMB (log ufc/g) en hamburguesas de pollo durante 10 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con 8 % de extracto atomizado (E); con inóculo (I); con 8% de extracto e inóculo (EI).....	70

Tabla 5.	<i>Crecimiento de C. jejuni (log ufc/g) en hamburguesas de pollo durante 10 días de almacenamiento: con inóculo (J); con 8 % de extracto atomizado e inóculo (EJ).....</i>	70
Tabla 6.	<i>pH en hamburguesas de pollo durante 10 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con 8 % de extracto atomizado (E); con inóculo (J) y con 8 % de extracto atomizado e inóculo (EJ).....</i>	71
Tabla 7.	<i>Crecimiento de AMB (log ufc/g) en caldo de pollo durante 85 días de almacenamiento: con 8 % de extracto atomizado (E); con 8 % de extracto atomizado e inóculo (EJ).....</i>	72
Tabla 8.	<i>Crecimiento de C. jejuni (log ufc/g) en caldo de pollo durante el almacenamiento por 85 días: con inóculo (J); con 8 % de extracto atomizado e inóculo (EJ).....</i>	72
Tabla 9.	<i>Crecimiento de AMB (log ufc/g) en hamburguesas de pescado durante 14 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con inóculo (S); con extracto de etanol-agua al 8 % (E); con 8 % de extracto e inóculo (ES).....</i>	73
Tabla 10.	<i>Crecimiento de Shew. putrefaciens (log ufc/g) en hamburguesas de pescado durante 14 días de almacenamiento: con inóculo (S); con 8 % de extracto etanol-agua e inóculo (ES).....</i>	74
Tabla 11.	<i>pH en hamburguesas de pescado para 14 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con extracto de etanol-agua al 8 % (E); con inóculo (S) y con 8 % de extracto e inóculo (ES).....</i>	75
Tabla 12.	<i>Crecimiento de AMB (log ufc/g) en caldo de pescado durante 131 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con extracto de etanol-agua al 8 % (E); con inóculo (S) y con 8 % de extracto e inóculo (ES).....</i>	76
Tabla 13.	<i>Crecimiento de Shew. putrefaciens (log ufc/g) en caldo de pescado durante el almacenamiento por 131 días: con inóculo (S); con 8 % de extracto etanol-agua e inóculo (ES).....</i>	77
Capítulo 3: Actividad antimicrobiana de extractos de <i>Piper carpunya</i> y su efecto sobre la vida útil en modelos alimentarios.....		84
Tabla 1.	<i>Cepas bacterianas elegidas para este estudio y condiciones de cultivo.....</i>	89
Tabla 2.	<i>Actividad antimicrobiana de extractos de P. carpunya expresada como el diámetro del área de inhibición (mm). Valores promedio de tres repeticiones (n = 3).....</i>	94
Tabla 3.	<i>Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos de P. carpunya (mg/ml). Valores promedio de tres repeticiones (n = 3).....</i>	95

Tabla 4.	<i>Crecimiento de C. perfringens (log ufc/g) en risotto durante 30 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con 8 % de extracto etanol-agua (E); con 8 % de extracto liofilizado (L); con inóculo (P); con 8 % de extracto etanol-agua e inóculo (EP); con 8 % de extracto liofilizado e inóculo (LP).....</i>	98
Tabla 5.	<i>Crecimiento de AMB (log ufc/g) en risotto durante 30 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con 8 % de extracto etanol-agua (E); con 8 % de extracto liofilizado (L); con inóculo (P); con 8 % de extracto etanol-agua e inóculo (EP); con 8 % de extracto liofilizado e inóculo (LP).....</i>	98
Tabla 6.	<i>Crecimiento de bacterias psicrofílas (log ufc/g) en risotto durante 30 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con 8 % de extracto etanol-agua (E); con 8 % de extracto liofilizado (L); con inóculo (P); con 8 % de extracto etanol-agua e inóculo (EP); con 8 % de extracto liofilizado e inóculo (LP).....</i>	100
Tabla 7.	<i>pH en risotto durante 30 días de almacenamiento: Control sin extractos (C); con 8 % de extracto etanol-agua (E) y con 8 % de extracto liofilizado (L).....</i>	100
Tabla 8.	<i>Aw en risotto durante 30 días de almacenamiento: control sin extractos (C); con 8 % de extracto etanol-agua (E) y con 8 % de extracto liofilizado (L).....</i>	101
Tabla 9.	<i>Malondialdehído (mg/kg) en risotto durante 30 días de almacenamiento: control sin extractos (C); con 8 % de extracto etanol-agua (E) y con 8 % de extracto liofilizado (L).....</i>	102
Capítulo 4: Actividad antioxidante de extractos de <i>Simira ecuadorensis</i>, <i>Piper carpunya</i> e <i>Ilex guayusa</i> y su potencial uso para evitar la oxidación lipídica en alimentos.....		109
Tabla 1.	<i>Rendimiento tras la extracción de hojas frescas de guápala (S. ecuadorensis), guaviduca (P. carpunya) y guayusa (I. guayusa).....</i>	114
Tabla 2.	<i>Contenido fenólico total y capacidad antioxidante de extractos de P. carpunya.....</i>	121
Tabla 3.	<i>Contenido fenólico total y capacidad antioxidante de extractos de S. ecuadorensis.....</i>	121
Tabla 4.	<i>Contenido fenólico total y capacidad antioxidante de extractos de I. guayusa.....</i>	121
Tabla 5.	<i>Evolución de los valores de TBARS (mg MDA/kg de producto) de hamburguesas de cerdo con eritorbato de sodio y diferentes extractos de P. carpunya durante el almacenamiento en refrigeración.....</i>	126

Tabla 6.	<i>Evolución de los valores de TBARS (mg MDA/kg de producto) de hamburguesas de cerdo con eritorbato de sodio y diferentes extractos de S. ecuadorensis durante el almacenamiento refrigerado.....</i>	127
Tabla 7.	<i>Evolución de los valores de TBARS (mg MDA/Kg de producto) de hamburguesas de cerdo con eritorbato de sodio y diferentes extractos de I. guayusa durante el almacenamiento refrigerado.....</i>	129
Tabla 8.	<i>Evolución de los valores de pH de hamburguesas de cerdo con eritorbato de sodio y diferentes extractos de P. carpunya durante el almacenamiento refrigerado.....</i>	131
Tabla 9.	<i>Evolución de los valores de pH de hamburguesas de cerdo con eritorbato de sodio y diferentes extractos de S. ecuadorensis durante el almacenamiento en refrigeración.....</i>	132
Tabla 10.	<i>Evolución de los valores de pH de hamburguesas de cerdo con eritorbato de sodio y diferentes extractos de I. guayusa durante el almacenamiento en refrigeración.....</i>	134
Apéndice.....		168
Tabla A1.	<i>Actividad antimicrobiana de extractos de I. guayusa expresada como el diámetro del área de inhibición (mm). Valores promedio de tres repeticiones (n = 3).....</i>	168
Tabla A2.	<i>Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos de I. guayusa (mg/ml). Valores promedio de tres repeticiones (n = 3).....</i>	168

Lista de figuras

Revisión Bibliográfica

Figura 1.	<i>Espécimen de guayusa (Ilex guayusa) cultivada en Ecuador.....</i>	17
Figura 2.	<i>Ejemplo de una planta silvestre de guaviduca (Piperaceae, Piper carpunya).....</i>	20
Figura 3.	<i>Espécimen de Simira ecuadorensis.....</i>	22
Figura 4.	<i>Uso de Simira ecuadorensis en las comunidades de bosque seco en Zapotillo. Queso de cabra en hoja de guápala.....</i>	22

Capítulo 1: Caracterización volátil de *Simira ecuadorensis*, *Piper carpunya* e *Ilex guayusa*, con potencial aplicación como conservantes y antioxidantes naturales en la industria alimentaria

Figura 1.	<i>Esquema de preparación de extractos.....</i>	35
-----------	---	----

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los países que integran la Región Andina son considerados los países con más biodiversidad del mundo, lo que representa un enorme potencial de negocios asociados al uso sostenible de estos recursos. Lamentablemente gran parte de estos no han sido estudiados, otros no han sido aprovechados y algunos de los que sí, se están perdiendo por el poco cuidado ambiental.

Ecuador es un país en el confluyen varios factores como, estar atravesado por la línea ecuatorial, presencia de la cordillera de los Andes, zonas costeras e insulares y sus pisos climáticos, representados por sus cuatro regiones Amazónica, Andina, Costera y Galápagos [1]. Aunque su territorio representa tan solo el 0,06 % de la superficie terrestre global, alberga un asombroso conjunto biológico. Este rincón del planeta es hogar de cerca del 16 % de las especies de aves a nivel mundial, el 8 % de los anfibios, el 5 % de los reptiles y el 8 % de los mamíferos. Además, cuenta con más de 25000 especies de plantas científicamente descritas, entre las cuales 5348 son endémicas. Cabe destacar que muchas otras especies aún esperan ser formalmente catalogadas [1]. Esta gran diversidad podría explicar el conocimiento ancestral que se ha desarrollado sobre medicina tradicional (MT) y el amplio uso que poblaciones, principalmente indígenas, han dado y siguen dando, a muchas especies en el ámbito de la salud y como ingrediente alimentario [2,3]. Para el ser humano, en las diferentes regiones del mundo, el uso de plantas con propiedades medicinales es una muestra de su desarrollo como civilización.

La inequidad y dificultad de acceso, principalmente económica, a la medicina convencional, la influencia cultural e histórica, son algunas de las razones importantes por las que muchas personas eligen como alternativa la medicina tradicional (MT), llegando a ser en varios países incluso la principal fuente de atención médica. La Organización Mundial de la Salud (OMS) [4] menciona que alrededor de 88 % de los países en el mundo recurren a esta alternativa.

Así mismo, hay grandes preocupaciones relacionadas, como la poca información generada en algunas de las especies usadas en la medicina tradicional y su escasa valoración en lo que se refiere a su uso sostenible [5]. Otros aspectos importantes, están relacionados con la normativa y regulación de estos productos, los derechos de protección de la propiedad intelectual y el control de las especies en peligro de extinción [4] que permitan evitar casos como el de la Cascarilla o Quina (*Cinchona officinalis*), usada para tratar la malaria (o paludismo), la cual por la sobreexplotación se ha reducido a unos pocos especímenes en toda la provincia de Loja (Ecuador) [5,6].

Las preocupaciones expresadas son legítimas y reflejan los esfuerzos de los países por fortalecer y legalizar el uso de estos conocimientos. Es esencial asegurar que el saber tradicional no se pierda y continúe respaldando tanto el sistema de salud como el entorno alimentario de cada región.

Se estima que en Ecuador aproximadamente el 80 % de la población utiliza la medicina tradicional, y por ende plantas o productos naturales, para cuidar su salud básica y su bienestar [7]. Esta tendencia no es exclusiva de Ecuador; según datos de la OMS (2013) [4], más de 100 millones de europeos utilizan la MT y el número de usuarios es mayor en África, Asia, Australia y América del Norte. La situación reglamentaria de cada país hace que sea muy difícil establecer el mercado mundial de la MT, pero los datos disponibles indican la importancia mundial que está tomando este mercado, para ejemplificarlo, solamente en Estados Unidos en 2007 se gastaron alrededor de \$ 33,9 billones en MT, de los cuales aproximadamente el 44 % (unos \$14,8 billones), se destinaron a productos naturales diferentes a vitaminas y minerales [8]. En el caso de Perú, el 45 % de las plantas medicinales exportadas proceden de la Amazonía, el 39 % de los Andes y el 16 % de la costa del país. A nivel mundial, los principales mercados para plantas medicinales son Alemania, China, Japón, España, Estados Unidos, Francia, Italia y Reino Unido [9].

Según un informe emitido por *Infinium Global Research* y citado por Wise y Negrin [10] existe un gran interés a nivel internacional por los tés de hierbas y sus propiedades para promover la salud y se pronostica para el período 2018–2024 una tasa de crecimiento anual compuesta para este rubro de 4,5 % en el mercado mundial.

Una de las áreas de investigación destacadas, que ha recibido considerable atención a nivel global, se centra en explorar el potencial de ciertas plantas como conservantes alimentarios. Estos compuestos químicos, que se incorporan a los alimentos, desempeñan un papel crucial en prevenir el deterioro y prolongar la vida útil de los productos, abarcando propiedades como la seguridad microbiológica y las características sensoriales. Esta categoría incluye antimicrobianos, antioxidantes y agentes antipardeamiento [11]. Los agentes antimicrobianos evitan y/o controlan la contaminación de microorganismos alterantes o patógenos de los alimentos, los antipardeamiento evitan el pardeamiento (enzimático y no enzimático) que se puede dar en las etapas de procesamiento de los alimentos y los antioxidantes previenen la oxidación de las moléculas, evitando el enranciamiento, cambios de color, etc. Los antioxidantes, a pesar de haber mejorado con el tiempo, siguen envueltos en la controversia de su seguridad al momento de usarse en alimentos. La abundancia de información

disponible actualmente ha convertido a los consumidores en críticos exigentes respecto a los alimentos que eligen. Están particularmente preocupados por el uso de aditivos sintéticos y buscan activamente productos que prescindan de ellos o que los sustituyan por aditivos de origen natural, en línea con la tendencia de los productos *clean labels*.

A nivel global, se han llevado a cabo investigaciones científicas sobre especias y otros condimentos cuyo uso en la alimentación y sus propiedades conservantes han sido respaldados a lo largo de los años, siendo comunes en los hogares. Ejemplos de estos incluyen el ajo, la canela, el orégano, el romero, entre otros [12]. Esta realidad abre perspectivas enormes, especialmente al considerar el conocimiento y la aplicación tradicional que las comunidades indígenas de la región andina y amazónica han dado a ciertas plantas medicinales para mejorar las características sensoriales de los alimentos y prolongar su conservación [2]. Estos principios se reflejan en prácticas culinarias regionales, como el "Maito", un plato característico de la región amazónica ecuatoriana que emplea las hojas de *Piper carpunya* (guaviduca) como condimento. Además, se evidencia en el uso de la hoja de *Simira ecuadorensis* (guápala) para envolver quesos de cabra y mejorar su conservación y palatabilidad [13]. Aunque se ha comenzado a explorar este potencial, aún queda mucho por descubrir en la caracterización de la biodiversidad en Ecuador y la región Andina.

La constitución de la República del Ecuador [14], reconoce los saberes ancestrales traducidos como conocimientos, prácticas, innovaciones y expresiones culturales de las nacionalidades y pueblos indígenas, afroecuatorianos y montubios. Los artículos 385 al 388 establecen la obligación del Estado de proveer recursos, proteger y promover los conocimientos, saberes y técnicas ancestrales, fomentar su investigación, difusión y aplicación, así como, reconocer el derecho de las comunidades, pueblos y nacionalidades a la propiedad intelectual colectiva de sus conocimientos, saberes y expresiones culturales.

Estas disposiciones buscan recuperar y valorizar los saberes ancestrales, promoviendo la investigación y generación de conocimientos, reconociendo su importancia como parte del patrimonio cultural y natural del Ecuador, y buscando garantizar su protección, promoción y transmisión a las generaciones presentes y futuras.

Se han desarrollado varias investigaciones respecto al uso de especies vegetales en Ecuador y principalmente en la zona sur. Tene *et al.* [6] estudiaron 275 especies de las provincias ecuatorianas de Loja y Zamora Chinchipe, encontrando 68 diferentes usos terapéuticos. Entre estas se encontraron *Ilex guayusa* Loes. y cinco especies del género *Piper*, de las cuales se usan principalmente las hojas en infusión y sus aplicaciones terapéuticas son como desinfectantes,

cicatrizantes de heridas, dolor de cabeza, dolor de estómago, dermatitis, fertilidad en mujeres, resaca, entre otras.

Armijos *et al.* [2] por su parte consideraron plantas de 23 familias botánicas, usadas en medicina tradicional en el sur del Ecuador, para obtener 64 extractos orgánicos, a los cuales se determinó el contenido fenólico y su capacidad antioxidante, encontrando que ocho especies tenían capacidad antioxidante elevada.

Otras investigaciones se han enfocado en la obtención de aceites esenciales, su caracterización, estudiando su composición y su actividad antibacteriana y antifúngica, tal es el caso de *Baccharis latifolia*, *Croton ferrugineus*, *Piper lenticellosum*, *Dacryodes peruviana*, entre otras.

En la presente investigación se ha considerado el estudio de tres especies vegetales, dos de las cuales tienen un amplio uso tradicional en Ecuador (*P. carpunya* e *I. guayusa*) y una que ha sido muy poco estudiada (*S. ecuadorensis*). Esta última crece principalmente en el cantón Zapotillo y la región de Tumbes del Perú y tiene variedad de usos por las comunidades que habitan la mancomunidad bosque seco.

A continuación, se revisan los estudios que se han realizado previamente de estas especies, que contribuyeron al planteamiento de los objetivos de este trabajo.

Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.)

I. guayusa es una de las plantas medicinales más conocidas y usadas en el Ecuador [15] y con un gran interés y proyección comercial para los mercados mundiales. Frecuentemente se prepara como un té, es decir como infusión caliente con hojas secas picadas y presenta propiedades estimulantes y antioxidantes [16]. Está distribuida en torno a la cuenca alta del Amazonas, en Colombia, Ecuador y Perú, llegándose a encontrar restos arqueológicos en el altiplano boliviano [10,16]. Esta planta y su preparación es una expresión del conocimiento ancestral de muchas comunidades indígenas del Ecuador principalmente de la región Amazónica, ya que ha formado y sigue formando parte muy importante en sus rituales y ceremonias. Su uso está relacionado con sus propiedades estimulantes, curativas, eméticas y se cree que ayuda a la fertilidad [16,17].

Pertenece a la familia *Aquifoliaceae*, con alrededor de 600 especies distribuidas mundialmente, 300 de las cuales se encuentran en el neotrópico [16], el rango de altitud en la que se puede encontrar esta especie varía entre los 200 a 2600 metros sobre el nivel del mar (m s. n. m) [16,18,19].

Es un árbol perenne de corteza grisácea y rugosa, sus hojas son alternas, ovales de color verde oscuro con longitud de entre 8 y 20 cm (Figura 1), produce flores blancas y frutos rojos de 6 mm de diámetro [20]. Puede crecer de 20 a 30 m [16], aunque los individuos domesticados crecen de 6 a 10 m de altura [16,19]. Su reproducción es asexual, tallos sin las hojas son plantados para su propagación [20], en suelo de preferencia arcilloso.



Figura 1. *Espécimen de guayusa (Ilex guayusa) cultivada en Ecuador. Tomado de Dueñas et al. [16].*

La guayusa es un producto obtenido de sistemas agroforestales indígenas, en sus chacras la cultivan sin el uso de pesticidas o maquinaria pesada. En Ecuador algunas empresas exportan las hojas obteniéndolas de comunidades indígenas, pero existe el riesgo de que con el aumento de la demanda se pueda optar por prácticas menos amigables con la conservación [10].

Después de aproximadamente 3 años de crecimiento del árbol, por las condiciones propias de la Amazonía (ciclo de luz constante, altas precipitaciones y temperaturas), las hojas se pueden cosechar, generalmente de forma manual dos veces al año, ya que el rebrote de las hojas en esas condiciones climáticas es rápido [10].

El proceso para preparar las hojas consiste en limpieza, secado y molienda [10]. García-Ruiz *et al.* [18] indican que en los procesos industriales se pueden considerar otras dos etapas, una de blanqueado o escaldado (inmersión de las hojas en agua caliente o vapor para inactivación de enzimas) y la otra de fermentación (reposo para marchitar las hojas con enzimas endógenas).

I. guayusa es una especie poco estudiada. La información que se encuentra está referida principalmente a su composición química, contenido de cafeína y a la comprobación de algunas de las cualidades que por años se le han atribuido, es decir capacidad antioxidante, antimicrobiana, y su incidencia sobre la fertilidad en mujeres.

Es uno de los pocos árboles que contiene cafeína [17,18], característica que ha despertado un gran interés y ha hecho que en pocos años su uso a nivel mundial como infusión

o bebida energética se haya extendido. Cadena-Carrera *et al.* [21] mencionan que las hojas secas de esta especie contienen $12,20 \pm 3,45$ mg de cafeína por gramo, valor próximo al reportado por Wise y Santander [22] de $19,08 \pm 0,31$ mg/g.

Respecto a su capacidad antioxidante, Pardau *et al.* [23] encontraron que la guayusa es una buena fuente de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, reportaron contenidos polifenólicos totales de entre 54,39 y 67,23 mg GAE por g de masa seca y capacidad de captura de radicales peroxilo (ORAC) entre 1773,41 y 2019 $\mu\text{mol TE}$ por g de masa seca, los cuales son valores cercanos a los reportados por García-Ruiz *et al.* [18] (1540,30 $\mu\text{mol TE}$ por g de masa seca), que, además, indican valores de DPPH de 32,98 mmol Trolox por 100 g de materia seca.

Rodríguez Aguirre *et al.* [24] realizaron una extracción de hojas de guayusa con solventes de diferente polaridad (etanol, diclorometano y acetato de etilo), encontrando que el extracto etanólico presentó mayor actividad antioxidante tanto en el método DPPH como en el ABTS con valores de IC_{50} de 4,58 y 3,82 ppm, respectivamente. García-Ruiz *et al.* [18] encontraron que escaldando las hojas de guayusa aumentó la concentración de compuestos fenólicos, y permanecieron similares la de algunos carotenoides y su capacidad antioxidante, al compararlos con lo obtenido para la hoja verde sin tratar; mientras que, un proceso de fermentación redujo el contenido de estos compuestos bioactivos y mostró menor capacidad antioxidante. Villacís-Chiriboga *et al.* [25] identificaron 14 compuestos fenólicos (sobresalen el ácido clorogénico y la quercetina-3-O-hexosa), siete carotenoides (luteína como compuesto principal), y concluyeron que el contenido fenólico y capacidad antioxidante de las hojas de guayusa dependen de su edad, es decir, son mayores en hojas jóvenes.

También se ha realizado varios estudios para determinar la actividad antimicrobiana de esta especie, Busman *et al.* [26] estudiaron 141 especies de plantas de uso tradicional en el norte del Perú y encontraron que la concentración mínima inhibitoria (CMI) para un extracto acuoso de *I. guayusa* frente a *Escherichia coli* fue de 120 mg/ml, mientras que para el extracto etanólico frente a *Staphylococcus aureus* fue de 16 mg/ml. Por el contrario, Villacís-Chiriboga *et al.* [25] concluyeron que extractos acuosos e hidroalcohólicos de *I. guayusa* no presentan actividad antimicrobiana frente a estas mismas bacterias.

Cadena-Carrera *et al.* [21] realizaron la comparación del efecto antibacteriano (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y antifúngico (*Aspergillus fumigatus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Rhizopus* sp., *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y la levadura *Candida albicans*) de extractos de hojas de guayusa usando CO_2 supercrítico como solvente (SFE), y etanol como cosolvente (a diferentes condiciones de

temperatura y presión), además, el método Soxhlet usando como solventes hexano, acetato de etilo y etanol, encontrando principalmente, que la mayoría de los extractos (obtenidos mediante método Soxhlet con acetato de etilo y etanol, y con SFE a 60 °C - 15 MPa y 60 °C - 20 MPa) presentaron actividad antifúngica principalmente frente a *T. rubrum* y que ningún extracto mostró actividad antibacteriana (CMI > 1,00 mg/ml) hasta la concentración máxima probada.

Se han documentado estudios en los que extractos etanólicos de *I. guayusa* demostraron eficacia al inhibir el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*. Estas investigaciones buscan opciones naturales para reducir la presencia de estos microorganismos en la cavidad bucal, con el objetivo de mitigar el riesgo de desarrollar periodontitis crónica [27].

Kapp *et al.* [17] evaluaron la toxicidad de *I. guayusa* y concluyeron que no hay evidencia de que el té o bebidas formuladas con guayusa causen efectos adversos para la salud de los consumidores.

La infusión de hojas de *I. guayusa* ha sido utilizada ancestralmente por poblaciones indígenas para el tratamiento de la infertilidad en mujeres [6,20,28]. Estudios realizados por Contero *et al.* [29] exploraron esta propiedad, identificando que los extractos de guayusa exhibieron actividad estrogénica en ratas, evidenciada por los niveles aumentados de estradiol en la sangre.

Guaviduca (*Piper carpunya*)

Otra planta de la Amazonía ecuatoriana con uso etnomedicinal es *Piper carpunya* [11], tradicionalmente se realizan infusiones con sus hojas frescas o secas. En Ecuador se conoce como guaviduca, en Perú como carpundia y en Colombia como cordoncillo aromático u oloroso [30]. Se le atribuyen efectos antiinflamatorios, antiulcerosos, antidiarreicos, antimicrobianos, antiparasitarios y cicatrizantes [31,32].

Pertenece a la familia *Piperaceae* (Figura 2), se la encuentra distribuida entre los 0 y 2000 m s. n. m. entre los Andes y la Región Amazónica [31,32]. Se han reportado 275 especies de *Piper* en Ecuador, de las cuales 75 son endémicas [32,33].

Es un arbusto perenne de unos 2 - 3 m de alto y 3 o más cm de diámetro, corteza externa de color verde pálido. Las hojas son de 9 - 17 cm de largo y 5 - 11 cm de ancho, ovalado elípticas, simples, alternas y dísticas, de color verde oscuro en el haz y verde más pálido en el envés, inflorescencias en espigas de color blanco hasta verde, erguidas, de 7 - 11 cm de longitud y 3 mm de diámetro [3,31].



Figura 2. Ejemplo de una planta silvestre de guaviduca (*Piperaceae*, *Piper carpunya*). Tomada de Yáñez *et al.* [34]

Ballesteros *et al.* [31] determinaron 21 compuestos del aceite esencial de hojas de guaviduca, destacando la piperitona (26,20 %), limoneno (9,50 %), elemicina (7,20 %) y β -felandreno (5,60 %). Por su parte Vargas *et al.* [30] encontraron además α -terpineno (12,10 %), p-cimeno (10,90 %), 1,8-cineol (13,00 %), safrol (14,90%) y espatulenol (9,80 %) como los constituyentes mayoritarios. Las diferencias encontradas entre los trabajos mencionados, Ballesteros *et al.* [31] las atribuyen a que provienen de áreas geográficas diferentes. Valarezo *et al.* [32] reportaron compuestos parecidos a los descritos anteriormente para aceite esencial de *P. carpunya*, pero encontraron valores diferentes en hojas recolectadas en invierno y verano. En este mismo trabajo se ha establecido la composición de una bebida tipo infusión con estas hojas, encontrando 14 mg/l de 1,8-cineol y 2,43 mg/l de safrol como los compuestos mayoritarios.

En un estudio realizado por Ballesteros *et al.* [31] se evaluó la capacidad antioxidante del aceite esencial de *P. carpunya* utilizando el ensayo *in vitro* de DPPH. Los resultados mostraron un valor de 159,80 $\mu\text{g/ml}$ de IC_{50} , el cual fue menor que el del compuesto puro de piperitona, que se consideró por ser uno de los componentes mayoritarios del aceite esencial (26,20 %), lo que indica una alta bioactividad atribuible posiblemente a interacciones sinérgicas entre moléculas o a la significativa actividad biológica de los compuestos minoritarios. Por su parte, Valarezo *et al.* [32] califican como baja la capacidad antioxidante del aceite esencial de esta especie, además, indican que la actividad antioxidante *in vivo* comprobada de ciertos componentes como el 1,8-cineol, posiblemente está siendo antagonizada por otros compuestos presentes en el aceite esencial.

En cuanto a la actividad antimicrobiana de esta planta se han encontrado varios trabajos con ciertas aplicaciones, como es el caso de la aplicación en cultivos de rosas. En Ecuador el cultivo de rosas representa un rubro muy importante para su economía, que está amenazado por enfermedades fúngicas. Cárdenas *et al.* [35] demostraron la eficiencia de un extracto alcohólico de *P. carpunya* como control biológico contra el hongo *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* causante de una de las más importantes enfermedades de estos cultivos. Por su parte, Rondón *et al.* [33] probaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial de hojas de esta planta, encontrando actividad moderada frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* con valores de CMI de 100, 200 y 300 µl/ml, atribuyéndolo principalmente al contenido de piperitona del aceite esencial. Un valor parecido para *K. pneumoniae* ha sido encontrado por Valarezo *et al.* [32] que reportan una CMI de 500 mg/ml, atribuyendo este potencial a la alta concentración de 1,8-cineol.

En varios estudios se ha encontrado, además, actividad anticolinesterasa para el aceite esencial de esta especie [32], actividad citotóxica que clasifica el extracto alcohólico de *P. carpunya* como extremadamente tóxico en estudios con *Artemia salina*, diferente a lo que reportan Ballesteros *et al.* [31] que indican seguridad en cuanto a la genotoxicidad aplicando el test de Ames.

Guápala (*Simira ecuadorensis*)

El género *Simira* pertenece a la familia *Rubiaceae*, en América alrededor de 229 géneros y 5200 especies representan a esta familia [36].

En Ecuador una de las principales representantes de este género crece en los bosques secos ecuatorianos, su nombre científico es *Simira ecuadorensis*, su nombre común es guápala en la provincia de Loja, colorado o chuzo en Guayas y colorado sabanero en Manabí [13]. Brota a partir de la primera semana de diciembre, alcanzando su mayor expresión en el mes de abril [37].

S. ecuadorensis es un arbusto o árbol pequeño (Figura 3), crece hasta 10 m de altura, un aspecto característico de esta especie es que adquiere una coloración rojiza cuando se cortan y exponen al aire, son ramificados y a veces con muchos tallos [13,36]. Tiene hojas simples, grandes de hasta 15 cm de longitud por 8 cm de ancho; con flores pequeñas, fruto en cápsula, con dos cavidades y numerosas semillas aladas en un extremo [13].

Espinoza y Cabrera [38] encontraron que *S. ecuadorensis* es una de las tres especies más abundantes del bosque seco Tumbesino. Es de las más usadas por las comunidades del sector, su tronco y ramas, como madera para construcción, cercos, entre otras; y sus hojas frescas como forraje y para envolver quesos de cabra (Figura 4), con lo cual, según los comuneros, lo conserva

por mayor tiempo y mejora sus características sensoriales [36]. Crece en laderas, orillas de cultivos, ríos y quebradas en bosque seco [37].



Figura 3. *Espécimen de Simira ecuadorensis*

En Ecuador, los bosques secos, predominantemente localizados en el centro y sur al oeste de los Andes, abarcando las provincias de Imbabura, Esmeraldas, Manabí, Guayas, El Oro y Loja [39], se encuentran entre los más amenazados. Factores como la extracción de madera, la expansión de la frontera agrícola, los incendios forestales, el sobrepastoreo de ganado caprino y bovino, la caza y la aplicación inapropiada de métodos de cosecha de miel contribuyen a su deterioro [40]. El bosque seco de la provincia de Loja forma parte de la Región Tumbesina, situada entre el Océano Pacífico y la Cordillera de los Andes. Esta región abarca el extremo suroeste de Ecuador y el extremo noreste de Perú, caracterizándose por altitudes que oscilan entre 0 y 1000 m. s. n. m. y una rica diversidad de especies [13,40].



Figura 4. *Uso de Simira ecuadorensis en las comunidades de bosque seco en Zapotillo. Queso de cabra en hoja de guápala. Tomado de Hostería Mandango Vilcabamba [41]*

Existe muy poca bibliografía y literatura relacionada a los compuestos que brinda la guápala. Rondón *et al.* [39] realizaron la evaluación fitoquímica de un extracto etanólico de *S. ecuadorensis*, el cual mostró abundante presencia de alcaloides y en menor proporción taninos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, terpenos y saponinas.

En cuanto a la participación de esta especie en investigaciones sobre su capacidad antibacteriana, Moreira *et al.* [36] indican que diversas especies del género *Simira* poseen actividad antimicrobiana, la cual está correlacionada con la presencia de sus metabolitos secundarios. Por ejemplo, Fonseca *et al.* [42] y citado por Moreira *et al.* [36], indican que al evaluar la actividad biológica de extractos de las especies *Simira glaziovii* y *Simira sampaioana*, estos no fueron efectivos frente a *Mycobacterium fortuitum* y *M. malmoense*. Ramos *et al.* [43] por su parte, establecieron una CMI de más de 100 µg/ml de extractos de estas mismas especies frente a *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium kansasii*. Además, se encontraron reportes en los que extractos metanólicos de corteza, flores, frutos, hojas y tallos de *S. glaziovii* y *S. sampaioana* fueron probadas frente al hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, causante de antracnosis en frijol, pero no inhibieron el crecimiento del hongo [44]. Asimismo, los hallazgos de Rondón *et al.* [39] demostraron que el extracto etanólico de *S. ecuadorensis* exhibió efectividad contra *Vibrio parahaemolyticus*, con una CMI de 40 ppm.

Comentarios finales

La región Andina por sus condiciones geográficas presenta una alta biodiversidad. Dentro de ella destaca Ecuador que es considerado un país megadiverso cuya flora y fauna está muy poco estudiada, pero posee un gran conocimiento ancestral desarrollado por sus pueblos originarios. Se ha logrado documentar los usos curativos o alimentarios de varias especies, principalmente de plantas, que en esta zona se dan. Hay un interés mundial por investigar y comprobar las propiedades curativas que se otorgan a las plantas medicinales y sus extractos. Se ha podido constatar que su uso, principalmente se da como infusión y que comercialmente, las hierbas usadas para este fin tienen un crecimiento importante en los mercados mundiales. Algunas especies han sido poco o nada estudiadas, más aún si se trata de aplicaciones en alimentos, que buscan prevenir la contaminación alimentaria y preservar su calidad. En esta revisión se ha evidenciado que los extractos de plantas poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas, por lo que pueden ser alternativas viables a los conservantes sintéticos.

En varias investigaciones se ha evidenciado el efecto inhibitor sobre microorganismos patógenos y de deterioro, así como su capacidad para neutralizar radicales libres y proteger a los alimentos contra reacciones de oxidación que tienen diversas plantas medicinales y especias,

como: manzanilla, hierba mate, sábila, romero, orégano, ajo, cebolla, etc. Los extractos de plantas se pueden obtener por varios métodos de extracción y usar de diferente forma como aceites esenciales, infusiones, extractos acuosos, extractos etanólicos, etc.

Los extractos de plantas ofrecen ventajas adicionales en términos de mercado, alineándose con la creciente preferencia del consumidor por lo natural, su preocupación por la seguridad y sostenibilidad, a diferencia de los conservantes sintéticos. Además, destacan por su fácil acceso, ya que se cultivan extensamente en diversas regiones, a veces incluso mediante la aplicación de prácticas agroproductivas ancestrales.

Sin embargo, como se ha mencionado en varias ocasiones en este capítulo, hay especies de las que se tiene escasa información científica, otras que para poder aplicarse como extractos en alimentos requieren más investigaciones y estudios para comprobar su eficacia en diferentes tipos de alimentos y condiciones de almacenamiento. Además, es imprescindible, sobre todo si se piensa en una incorporación a productos industriales, considerar aspectos relacionados con la estabilidad, la dosificación y aceptabilidad sensorial de los alimentos formulados con extractos de plantas.

2. Objetivos del estudio

Objetivo general de la investigación

Contribuir al estudio de la biodiversidad ecuatoriana, a través de pruebas *in vitro* y en modelos alimentarios de extractos de tres plantas medicinales de la región sur del Ecuador, determinando su potencial antioxidante y antimicrobiano.

Este objetivo general puede dividirse en tres objetivos específicos que se materializan a través de los capítulos descritos en este trabajo, de la siguiente forma:

Objetivo 1: Determinar la composición de compuestos volátiles de cuatro extractos de hojas de *I. guayusa*, *P. carpunya* y *S. ecuadorensis*, plantas provenientes de la región Andina y Amazónica.

Objetivo 2: Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro*, de cuatro extractos de hojas de *I. guayusa*, *P. carpunya* y *S. ecuadorensis* y su eficacia para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y/o alterantes en modelos alimentarios.

Objetivo 3: Medir el efecto antioxidante de extractos de *I. guayusa*, *P. carpunya* y *S. ecuadorensis* *in vitro* y durante el almacenamiento en matrices alimentarias a las que se incorporaron como ingredientes.

3. Referencias bibliográficas

1. Mestanza-Ramón, C.; Henkanaththegedara, S.M.; Vásquez Duchicela, P.; Vargas Tierras, Y.; Sánchez Capa, M.; Constante Mejía, D.; Jiménez Gutiérrez, M.; Charco Guamán, M.; Mestanza Ramón, P. In-Situ and Ex-Situ Biodiversity Conservation in Ecuador: A Review of Policies, Actions and Challenges. *Diversity* 2020, 12, doi:<https://doi.org/10.3390/d12080315>.
2. Armijos, C.; Guamán Balcázar, M.D.C.; Meneses, M.; Suarez, A.I. Antioxidant properties of medicinal plants used in the Southern Ecuador. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2018, 1.
3. Jørgensen, P.M.; León-Yáñez, S. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. St. Louis* 1999, 75, 1-1182.

4. World Health, O. *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023*; World Health Organization: Geneva, 2013.
5. Armijos Riofrio, C.; Vita Finzi, P.; Gilardoni, G.; Borja Espín, D.; Goetschel Gómez, M.L.; Radice, M.; Guerrini, A.; Scalvenzi, L.; Terán Soto, R.; Aguirre, J.S.; *et al. Productos naturales Investigación y Perspectivas en Ecuador*, Primera ed.; Editorial Abya-Yala: 2022.
6. Tene, V.; Malagón, O.; Finzi, P.V.; Vidari, G.; Armijos, C.; Zaragoza, T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology* 2007, *111*, 63-81, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032>.
7. Romero-Tapias, O.Y.; Perilla-Benítez, J.C.; Cedeño-Tapia, S.J.; Tapiero-Rojas, J.D.; Tamayo-Ortiz, J.L. Ancestral traditional medicine in the Ecuadorian health system. *Sapienza: International Journal of Interdisciplinary Studies* 2022, *3*, 272-286, doi:<https://doi.org/10.51798/sijis.v3i8.587>.
8. Barnes, P.; Bloom, B.; Nahin, R.; Stussman, B. Costs of complementary and alternative medicine (CAM) and frequency of visits to CAM practitioners, United States, 2007. 2009.
9. Organización Panamericana de la Salud, O. Situación de las plantas medicinales en Perú. Informe de reunión del grupo de expertos en plantas medicinales. 2019.
10. Wise, G.; Negrin, A. A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: a stimulant and antioxidant novel food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2020, *60*, 2393-2404, doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1643286>.
11. Carocho, M.; Barreiro, M.F.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R. Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2014, *13*, 377-399, doi:<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>.
12. Shelef, L.A. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety* 1984, *6*, 29-44, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1984.tb00477.x>.
13. Aguirre, Z. *Especies Forestales de los Bosques Secos de Ecuador. Guía Dendrológica para su Identificación y Caracterización. Proyecto Manejo Forestal Sostenible ante el Cambio Climático. MAE/FAO-Finlandia*; Quito, Ecuador, 2012; p. 140 p.
14. Asamblea Constituyente de la República del Ecuador. Constitución de la República del Ecuador. Artículo 385-388. 2008.
15. Saltos, R.V.A.; Vásquez, T.E.R.; Lazo, J.A.; Banguera, D.V.; Guayasamín, P.D.R.; Vargas, J.K.A.; Peñas, I.V. The use of medicinal plants by rural populations of the Pastaza province in the Ecuadorian Amazon. *Acta Amazonica* 2016, *46*.

16. Dueñas, J.F.; Jarrett, C.; Cummins, I.; Logan-Hines, E. Amazonian Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview. *Economic Botany* 2016, *70*, 85-91, doi:<https://doi.org/10.1007/s12231-016-9334-2>.
17. Kapp, R.W.; Mendes, O.; Roy, S.; McQuate, R.S.; Kraska, R. General and Genetic Toxicology of Guayusa Concentrate (*Ilex guayusa*). *International Journal of Toxicology* 2016, *35*, 222-242, doi:<https://doi.org/10.1177/1091581815625594>.
18. García-Ruiz, A.; Baenas, N.; Benítez-González, A.M.; Stinco, C.M.; Meléndez-Martínez, A.J.; Moreno, D.A.; Ruales, J. Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2017, *97*, 3929-3936, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.8255>.
19. Arteaga-Crespo, Y.; Radice, M.; Bravo-Sanchez, L.R.; García-Quintana, Y.; Scalvenzi, L. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon* 2020, *6*, doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>.
20. Sequeda-Castañeda, L.; Costa, G.; Celis, C.; Gamboa, F.; Gutierrez, S.; Luengas, P. *Ilex guayusa* (Aquifoliaceae): Amazon and Andean Native Plant. *Pharmacologyonline* 2016, *3*, 93-202.
21. Cadena-Carrera, S.; Tramontin, D.P.; Bella Cruz, A.; Bella Cruz, R.C.; Müller, J.M.; Hense, H. Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) obtained by supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent. *Journal of Supercritical Fluids* 2019, *152*, doi:<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104543>.
22. Wise, G.; Santander, D.E. Comparative Composition Analysis of the Dried Leaves of *Ilex guayusa* (Loes.). *Journal of Food and Nutrition Research* 2018, *6*, 638-644, doi:<https://doi.org/10.12691/jfnr-6-10-4>.
23. Pardau, M.D.; Pereira, A.S.P.; Apostolides, Z.; Serem, J.C.; Bester, M.J. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Ilex guayusa* tea preparations: a comparison to *Camellia sinensis* teas. *Food & Function* 2017, *8*, 4601-4610, doi:<https://doi.org/10.1039/C7FO01067B>.
24. Rodríguez Aguirre, O.E.; Castañeda Villate, J.C.; Hernández Roa, M.J.; Cárdenas Tavera, C.F.; Pombo Ospina, L.M.; Borrego Muñoz, P. High polarity extracts obtained from *Ilex guayusa* Loes. leaves, exhibit antioxidant capacity. *Vitae* 2022, *29*, doi:<https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v29n1a347297>.
25. Villacís-Chiriboga, J.; García-Ruiz, A.; Baenas, N.; Moreno, D.A.; Meléndez-Martínez, A.J.; Stinco, C.M.; Jerves-Andrade, L.; León-Tamariz, F.; Ortiz-Ulloa, J.; Ruales, J. Changes in phytochemical composition, bioactivity and *in vitro* digestibility of guayusa leaves (*Ilex*

- guayusa* Loes.) in different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2018, 98, 1927-1934, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.8675>.
26. Bussmann, R.W.; Malca-García, G.; Glenn, A.; Sharon, D.; Chait, G.; Díaz, D.; Pourmand, K.; Jonat, B.; Somogy, S.; Guardado, G.; *et al.* Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 2010, 132, 101-108, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.048>.
 27. Gamboa, F.; Muñoz, C.-C.; Numpaque, G.; Sequeda-Castañeda, L.G.; Gutierrez, S.J.; Tellez, N. Antimicrobial Activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease. *International Journal of Microbiology* 2018, 2018, 4147383, doi:<https://doi.org/10.1155/2018/4147383>.
 28. Armijos, C.; Ramírez, J.; Salinas, M.; Vidari, G.; Suárez, A.I. Pharmacology and Phytochemistry of Ecuadorian Medicinal Plants: An Update and Perspectives. *Pharmaceuticals* 2021, 14, 1145.
 29. Contero, F.; Abdo, S.; Vinuesa, D.; Moreno, J.; Tuquinga, M.; Paca, N. Estrogenic activity of ethanolic extracts from leaves of *Ilex guayusa* Loes. and *Medicago sativa* in *Rattus norvegicus*. *Pharmacologyonline* 2015, 2, 95-99.
 30. Vargas, L.; Velasco-Negueruela, A.; Perez-Alonso, M.J.; Pala-Paul, J. Essential oil composition of the leaves and spikes of *Piper carpunya* Ruiz et Pavon (Piperaceae) from Peru. *Journal of essential oil research* 2004, 16, doi:<https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698669>.
 31. Ballesteros, J.L.; Tacchini, M.; Spagnoletti, A.; Grandini, A.; Paganetto, G.; Neri, L.M.; Marengo, A.; Angiolella, L.; Guerrini, A.; Sacchetti, G. Rediscovering Medicinal Amazonian Aromatic Plants: *Piper carpunya* (Piperaceae) Essential Oil as Paradigmatic Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019, 2019, 6194640, doi:<https://doi.org/10.1155/2019/6194640>.
 32. Valarezo, E.; Rivera, J.X.; Coronel, E.; Barzallo, M.A.; Calva, J.; Cartuche, L.; Meneses, M.A. Study of Volatile Secondary Metabolites Present in *Piper carpunya* Leaves and in the Traditional Ecuadorian Beverage Guaviduca. *Plants* 2021, 10, 338.
 33. Rondón, M.E.; Velasco, J.; Cornejo, X.; Fernández, J.; Morocho, V. *Chemical composition and antibacterial activity of Piper lenticillosum C.D.C essential oil collected in Ecuador*; Issue: 8: 2016; Volume Volume: 6, pp. 156-159.
 34. Yáñez, P. Consideraciones para el diseño y aplicación de Planes de Manejo de especies vegetales silvestres no maderables de interés comercial. *Qualitas* 2012, 4, 32-41.

35. Cárdenas, C.; Pozo, W.; Rojas, M.; Roque, A.; Mihai, R. Antifungal Activity of two Botanical Extracts on Rose Crop (*Rosa* L. Sp.), Against *Sphaerotheca Pannosa* Var. *Rosae*. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2016, 10, 465-474, doi:<https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.09.017>.
36. Moreira, V.; Vieira, I.; Braz-Filho, R. Chemical Constituents and Biological Activities of *Simira* Genus: A Contribution to the Chemotaxonomic of Rubiaceae Family. *The Natural Products Journal* 2014, 4, 290-298, doi:<http://dx.doi.org/10.2174/2210315505666141211225600>.
37. Jumbo, Y.; Montesinos, D. Estudio de la dinámica y manejo de la guápala *Simira ecuadorensis* (Standl) Steyermer en el bosque seco de la reserva natural tumbesina la ceiba, cantón Zapotillo. Universidad Nacional de Loja, Loja-Ecuador, 2007.
38. Espinosa, C.I.; Cabrera, O.; A.L., L.; Escudero, A. What Factors Affect Diversity and Species Composition of Endangered Tumbesian Dry Forests in Southern Ecuador? *Biotropica* 2011, 43, 15-22, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2010.00665.x>.
39. Rondón, M.; Moncayo, S.; Cornejo, X.; Santos, J.; Villalta, D.; Siguencia, R.; Duche, J. Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University - Science* 2017, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.03.009>.
40. Aguirre, Z.; Córdova, C.; Quizhpe, W. Bosque seco de la parroquia Mangahurco, Zapotillo, Loja, estudio de su composición florística, estructura y endemismo. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar* 2021, 5, 7162-7182, doi:https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i5.838.
41. Hostal Mandango Vilcabamba. Queso de cabra en hoja de huapala. 2019.
42. Fonseca, T.; Groll, A.; Leitão, G.; Scaini, C.; Soares, D.; Silva, P. Actividad antimicobacteriana de extractos vegetales frente a *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium malmoeense*. *Vittalle* 2008, 1, 65-71.
43. Ramos, D.; Leitão, G.; Costa, F.; Abreu, L.; Villarreal, J.; Leitão, S.; Fernández, S.; Silva, P. Investigación de la actividad antimicobacteriana de 36 extractos de plantas de la Mata Atlántica brasileña. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008, 44.
44. Andrade Pinto, J.M.; Souza, E.A.; Oliveira, D.F. Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. *Crop Protection* 2010, 29, 838-842, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.03.006>.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN VOLÁTIL DE *SIMIRA ECUADORENSIS*, *PIPER CARPUNYA* E *ILEX GUAYUSA*, CON POTENCIAL APLICACIÓN COMO CONSERVANTES Y ANTIOXIDANTES NATURALES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Simira ecuadorensis, *Piper carpunya* e *Ilex guayusa* son plantas medicinales nativas de Ecuador y los países andinos, que son conocidas por sus nombres comunes como guápala, guaviduca y guayusa, respectivamente. Sus hojas son usadas para preparar infusiones, a las que se les atribuyen diferentes beneficios para la salud, y en el caso de la primera se utiliza para envolver quesos de cabra frescos para su conservación y almacenamiento. En el presente trabajo, se estudió el perfil volátil de extractos de las plantas mencionadas anteriormente con la finalidad de tener un conocimiento más detallado de su potencial empleo como aditivos de origen natural en la industria alimentaria. Se obtuvieron cuatro extractos a partir de las tres plantas mediante diferentes procesos, denominándose como liofilizado (H₂O), atomizado (ATOM), etanol (ETOH) y etanol-agua (ETOH-H₂O). El estudio de composición volátil se realizó por cromatografía de gases, observándose diferencias en la cantidad de compuestos volátiles entre las tres plantas, siendo los compuestos volátiles mayoritarios para las tres los monoterpenos. Terpenos, ésteres, alcoholes y fenoles volátiles fueron los principales compuestos identificados, encontrándose diferencias significativas entre las tres plantas consideradas. Guaviduca fue la planta que presentó los contenidos más altos de compuestos volátiles, destacando sus altos niveles de terpenos, aldehídos, fenoles volátiles y safrol. Guápala presentó un contenido más bajo de compuestos, comparados con la primera, siendo los mayoritarios terpenos, ésteres, alcoholes y fenoles volátiles. Guayusa por su parte fue la que presentó el contenido de compuestos volátiles más bajo, siendo los principales terpenos, norisoprenoides, ésteres y alcoholes. Según el método de extracción, el extracto etanólico presentó el perfil volátil más amplio y el más limitado el extracto etanol-agua.

1. Introducción

El procesamiento de alimentos a nivel global se realiza en instalaciones que cuentan con tecnología avanzada para asegurar la calidad de los productos durante su transporte y distribución, incluso cuando se destinan a mercados alejados del centro de procesamiento. Este proceso implica el uso frecuente de diversas tecnologías combinadas, como la pasteurización, el envasado, la refrigeración y/o congelación. Al emplear estas tecnologías junto con ciertas sustancias químicas, se logra mantener o mejorar la conservación de los alimentos, optimizando los costos del proceso. En este contexto, los aditivos alimentarios han adquirido una importancia significativa al representar métodos más económicos y facilitar el cumplimiento de los requisitos legales y de mercado [1,2]. El *Codex Alimentarius* define como aditivo alimentario a *“cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características”* [3]. Los aditivos alimentarios son sustancias utilizadas en los alimentos o en el procesamiento de alimentos, cuya cantidad no supera el 2 % del peso total del alimento [4].

El uso de aditivos sintéticos en alimentos ha generado controversia debido a preocupaciones sobre la seguridad y salud a largo plazo. Existen inquietudes sobre posibles efectos adversos, incluyendo reacciones alérgicas, la percepción de que algunos fabricantes podrían usar aditivos para disfrazar la baja calidad de ingredientes, la interpretación variable de estudios de seguridad que implica diferentes interpretaciones por los gobiernos, entre otras [2]. Existen estudios en los que se ha informado que el consumo durante tiempo prolongado de alimentos con algunos aditivos alimentarios sintéticos puede afectar la salud y causar efectos secundarios como náuseas, reacciones alérgicas, obesidad, cáncer, enfermedades cardíacas, entre otros [5]. Este fenómeno desconcierta a los consumidores, y en respuesta, se han creado organizaciones que regulan y controlan rigurosamente el uso adecuado de aditivos alimentarios. Entre las entidades clave se encuentran la comisión del *Codex Alimentarius*, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), y la Administración de Alimentos y Medicamentos

(FDA) de Estados Unidos, las cuales colaboran estrechamente para a nivel internacional generar normas y regulaciones que comprueben y garanticen la seguridad de los aditivos alimentarios para el consumo humano [1].

Desde hace algún tiempo los aditivos naturales han venido ganando popularidad, tanto en consumidores como en fabricantes de alimentos. Esto es debido a los cambios en las tendencias de los mercados, lo que va ligado a un mayor conocimiento y conciencia del efecto adverso que algunos de sus análogos sintéticos causan. Por tanto, el actual consumidor está buscando alimentos sin aditivos, pero en el caso de no existir esa posibilidad, optan por los que contienen aditivos naturales en su formulación. Los aditivos naturales comprenden compuestos, grupos de compuestos o aceites esenciales de plantas que la población ha empleado tradicionalmente por razones gustativas [2]. La mayoría de estos compuestos no se puede usar directamente ya que se encuentran en cantidades limitadas en la naturaleza, por tanto, es necesario aislarlos de plantas y hongos. Los aditivos naturales más estudiados son antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, colorantes y edulcorantes, que son metabolitos secundarios y aceites esenciales [2,4].

Las plantas representan una de las principales fuentes de aditivos alimentarios naturales, especialmente en países con una amplia diversidad biológica. En estas regiones, gran parte de la flora ha sido utilizada históricamente con propósitos medicinales y alimentarios [6,7]. A pesar de esta larga tradición, aún existe una carencia de estudios que respalden de manera concluyente los efectos beneficiosos de estas plantas, como sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antifúngicas, entre otras, así como la identificación precisa de los compuestos responsables de tales propiedades.

La caracterización de compuestos volátiles, por ejemplo, es crucial para comprender la composición química de las plantas medicinales y cómo sus componentes volátiles pueden contribuir a su actividad biológica. Además, permite comprender las variaciones de dichos componentes en función del entorno geográfico, estacionalidad, edad fisiológica de la planta, época de cosecha, entre otras condiciones. Para la caracterización y cuantificación de los componentes volátiles de plantas medicinales se usan técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y su importancia radica en que permite identificar los componentes activos, verificar la calidad y autenticidad de la planta de origen, establecer estándares para el cultivo, recolección y procesamiento adecuado de una planta, desarrollo de medicamentos y aditivos alimentarios, y comprender la actividad biológica de la planta.

Algunas especies de plantas se usan en la medicina tradicional de países de la Región Andina, en este trabajo se han estudiado tres de ellas, *Piper carpunya*, *Ilex guayusa* y *Simira ecuadorensis*.

P. carpunya (guaviduca) ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional para tratar diversas afecciones digestivas, incluyendo problemas estomacales y carminativos, para reducir la hinchazón, las irritaciones de la piel y como antimicrobiano [8]. Además de estas aplicaciones, al igual que otras especies pertenecientes al mismo género, se han empleado para tratar diversas patologías como bronquitis, dismenorrea, enfermedades renales [9,10], también se usan como antidiarreicos, antiparasitarios y por mostrar actividad insecticida, bactericida, larvicida, molusquicida, anticolinesterásica y leishmanicida [9,11,12].

I. guayusa (guayusa) es otra especie muy usada, que se destaca por sus propiedades estimulantes y antioxidantes. Las hojas de esta planta han sido tradicionalmente usadas en infusión para aliviar diversas afecciones, incluyendo dolor de estómago, congestión respiratoria, fiebre, enfermedades venéreas, hiperglucemia, esterilidad femenina y disentería [13-15].

S. ecuadorensis (guápala) forma parte del género *Simira* y pertenece a la familia *Rubiaceae*. Estudios previos sobre este género han identificado diversas propiedades beneficiosas, tales como, antifebriles, tónicas, purgantes, tratamiento para infecciones de la piel, analgésico, capacidad antimicrobiana y antiinflamatoria. Además de estas aplicaciones medicinales, la planta también se utiliza en la práctica de envolver quesos de cabra, miembros de comunas indígenas, sugieren que esta práctica no solo contribuye a mejorar el sabor del queso, sino que también prolonga su duración [16,17].

En la sección anterior, se han destacado las aplicaciones medicinales de estas plantas en la medicina tradicional. Varios estudios han proporcionado explicaciones que vinculan estas aplicaciones con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiparasitarias, entre otras, las cuales son atribuidas a la presencia de componentes bioactivos particulares en dichas plantas. Así, en diversas especies de *Piper* se han identificado compuestos antiparasitarios, tales como chalconas, dihidrochalconas, derivados del ácido benzoico y neolignanós [18]. Estudios anteriores han demostrado que el aceite esencial extraído de las hojas está compuesto principalmente por α -terpineno (12,10 %), p-cimeno (10,90 %), 1,8-cineol (13,00 %), safrol (14,90 %) y espatulenol (9,80 %) [8,19]. Adicionalmente, se encontró que los compuestos presentes en una infusión de hojas de la misma especie guardaban similitud en su naturaleza química (monoterpenos y sesquiterpenos) que los identificados en los aceites esenciales [19].

En el marco de este estudio, no se dispone de informes que detallen la identificación de compuestos volátiles específicos de *S. ecuadorensis*. No obstante, se ha documentado

previamente la presencia de marcadores taxonómicos en el género *Simira*, los cuales comprenden compuestos como diterpenos, sitosterol, estigmasterol, campesterol, coniferaldehído, vainillina, pinosresinol y el alcaloide Harman (alcaloide de indol β -carbolínico) [16,20,21].

Los compuestos bioactivos más destacados identificados en las hojas de diversas especies del género *Ilex* comprenden ácidos cafeoilquínicos, como el ácido clorogénico, así como flavonoles como la quercetina y el kaempferol, junto con sus glucósidos [22,23]. En el caso particular de *I. guayusa*, se han identificado un total de 14 compuestos fenólicos. Entre ellos, el ácido clorogénico y la quercetina-3-O-hexosa destacan como los principales representantes de los ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, respectivamente. Además, se identificaron cinco carotenoides, siendo la luteína la más abundante en contenido. A todo lo anterior, se añade su notable concentración de cafeína [24]. La capacidad antioxidante de las hojas de guayusa, junto con algunas de sus propiedades han mostrado una correlación positiva con su contenido de polifenoles y carotenoides. Sin embargo, entre los dos, el contenido de compuestos fenólicos fue superior, atribuyéndose a estos la responsabilidad principal de la capacidad antioxidante, especialmente a los isómeros de ácido mono y dicafeoilquínico presentes [24].

Como se ha mencionado, el interés mundial por los compuestos bioactivos que se encuentran en extractos de plantas ha crecido de manera importante. Bien sea para comprobar sus beneficios y aplicaciones, y/o como aditivos naturales en los alimentos. Por tanto, el objetivo principal de este estudio fue conocer el perfil volátil de extractos obtenidos por cuatro métodos diferentes de tres plantas nativas de Ecuador, *Simira ecuadorensis*, *Piper carpunya* e *Ilex guayusa*. Es especialmente relevante, en el caso de *S. ecuadorensis* que es el primer estudio que se realiza de este tipo, siendo la bibliografía existente de las otras dos especies muy limitada.

2. Materiales y Métodos

2.1 Plantas

2.1.1 Obtención de las plantas

La obtención del material vegetal para esta investigación se realizó en Ecuador el mes de diciembre de 2019.

Las hojas frescas de *Simira ecuadorensis* (Standl.) Steyer (guápala), se recolectaron en el cantón Zapotillo. Las de *Piper carpunya* (guaviduca) en la parroquia rural Gualiel del cantón Loja, ambos ubicados en la provincia de Loja. Las hojas de *Ilex guayusa* (guayusa), se recolectaron en el cantón Yantzaza perteneciente a la provincia amazónica de Zamora Chinchipe.

2.1.2 Preparación de las hojas

Las hojas de las tres especies tuvieron el mismo proceso, se limpiaron con agua y se secaron utilizando un secadero de bandejas (DY-110H, Daeyeong E&B CO., Ltd., Asan, Corea del Sur) a 40 °C durante 12 horas. Una vez secas, se molieron, tamizaron (tamaño de partícula < 350 µm) y almacenaron en refrigeración hasta la extracción de los compuestos.

2.2 Obtención de los extractos

Los extractos fueron obtenidos siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 1. Para ello, se llevó a cabo una maceración estática de las hojas secas en recipientes ámbar con tres disolventes diferentes: agua, etanol y una mezcla de etanol-agua (50:50 v/v). La maceración se realizó durante tres días en refrigeración utilizando una proporción de cinco litros de cada disolvente por kilogramo de hojas secas.

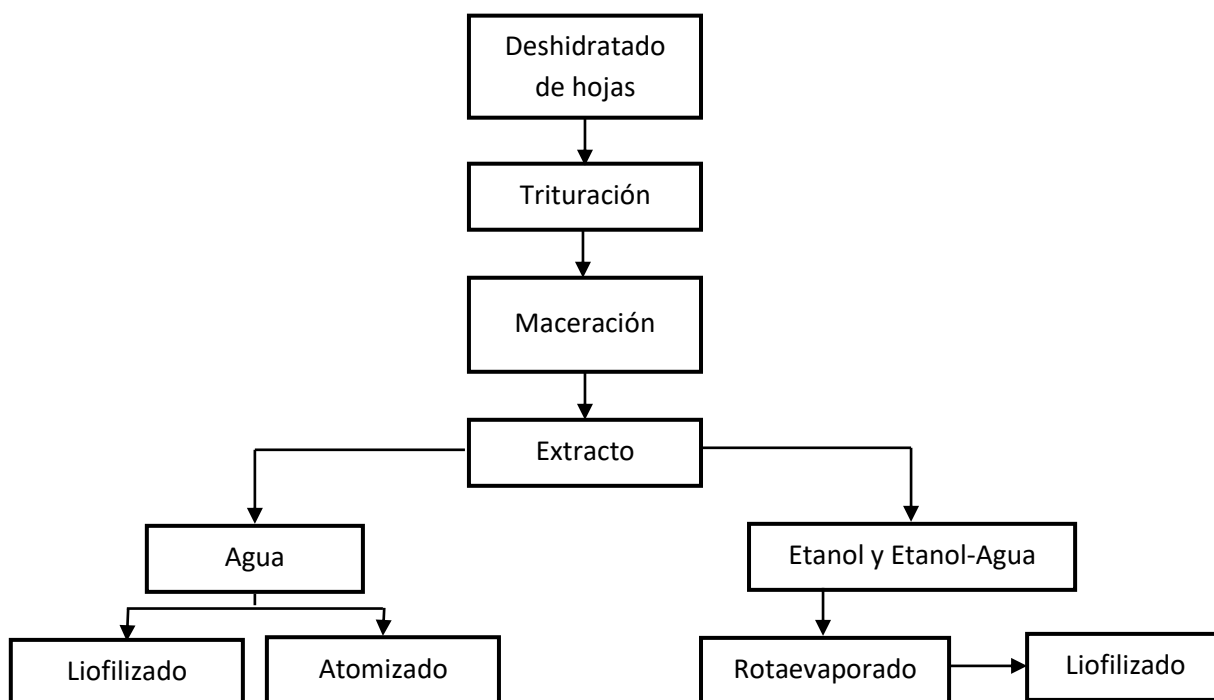


Figura 1. Esquema de preparación de extractos.

Del extracto acuoso una parte se destinó para secarse por atomización para lo cual se mezcló con 3 % de maltodextrina y se usó el Mini Spray Dryer (marca BÜCHI, modelo B-290) a 120 °C y flujo de alimentación de 6 ml/min y la otra parte se congeló a -40 °C y se liofilizó con las siguientes condiciones: presión = 0,180 mbar; temperatura = -50 °C por 72 horas en un liofilizador (Labconco, Kansas City, MO, USA). De estos dos procesos se obtuvieron los extractos que se designarán como extracto atomizado (**ATOM**) y extracto liofilizado (**H2O**).

En lo relacionado a los extractos etanólicos, una vez cumplido el tiempo de maceración las mezclas se filtraron a vacío, se evaporó el etanol en un rotavapor (G1, Heidolph, Schwabach, Alemania) a 40 °C y 150 rpm, se congelaron a -40 °C y se liofilizaron en las mismas condiciones mencionadas en el párrafo anterior. De esta forma se obtuvieron los extractos: etanol (**ETOH**) y etanol-agua (**ETOH-H₂O**).

2.3 Análisis de los compuestos volátiles de los extractos obtenidos

La extracción de los compuestos volátiles se realizó mediante extracción en fase sólida dinámica por espacio de cabeza (HS-SPDE). El equipo empleado fue un CTC-CombiPAL (Bender y Hobein, Zurich, Suiza). Se siguió el método propuesto por Corcuera *et al.* [25], con algunas modificaciones. Para la preparación de las muestras 0,08 g de cada extracto fueron disueltos en 1 ml de agua que se introdujeron en viales de 10 ml (Chromacol Ltd. Herts, Reino Unido), junto con 5 µl del patrón interno, (1 ml of ciclopentanona en 9 ml de diclorometano) y un pequeño agitador. Los viales fueron cerrados herméticamente con una cápsula de aluminio y un septum de clorobutilo/tetrahidro fluoroetileno (Chromacol Ltd. Herts, Reino Unido). La extracción se realizó en un horno a 55 °C con un tiempo de pre equilibrado de la muestra de 7,26 minutos. La jeringa empleada estaba provista de una fibra PDMS/AC (90 % de polidimetilsiloxano y 10 % de carbón activado) previamente acondicionada mediante calentamiento a 200 °C durante una hora. Se realizaron 60 ciclos de extracción de 2,50 ml cada uno a una velocidad de 100 µl/s. Durante el tiempo, las muestras siempre se mantuvieron en agitación a 500 rpm.

Seguidamente los compuestos volátiles retenidos en la fibra de la jeringa fueron desorbidos en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard HP 6890 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) acoplado a un detector de masas de la misma marca y modelo HP5973. La temperatura del inyector fue de 250 °C y el modo de inyección utilizado fue *splitless* (sin división de flujo). El gas portador empleado fue helio a un flujo constante de 1 ml/min. La separación de los compuestos volátiles se realizó mediante una columna Carbowax 20M (60 m × 0,32 mm, 0,25 µm de espesor de película) de Quadrex Corporation (Symta, Madrid, España). La temperatura inicial del horno fue de 40 °C durante 5 minutos para luego ir aumentando 3 °C por minuto hasta llegar a los 240 °C.

El espectrómetro de masas estaba equipado con una fuente de ionización de electrones, que se fijó en 70 eV. El rango de relación masa-carga (*m/z*) estudiado fue de 29 a 280 *m/z*. La temperatura de la línea de transferencia se fijó en 230 °C. Los compuestos volátiles aislados se identificaron por comparación con espectros de masas en las bases datos espectrales de masas de Wiley 7th. Únicamente se consideraron aquellos picos con una coincidencia superior al 80 %.

La determinación de las áreas se realizó considerando el área del ion mayoritario de cada compuesto.

Todos los análisis se realizaron por triplicado.

2.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó el paquete Statgraphics 19 (Statpoint Technologies, Warrenton, EE.UU.). Se realizó el análisis de varianza simple (ANOVA) para conocer el efecto del factor tipo de extracción sobre cada uno de los compuestos volátiles analizados en cada una de las tres plantas estudiadas. Además, para saber entre que tipos de extractos existían diferencias significativas se aplicó la prueba LSD (*Least Significant Difference*) de Fisher con un nivel de confianza de 95 % ($p < 0,05$).

3. Resultados y Discusión

3.1 Rendimientos de extracción

En la Tabla 1 aparecen recogidos los rendimientos de los extractos obtenidos para cada planta con cada uno de los procedimientos de extracción empleados. Para su cálculo se tuvo en cuenta que en todos los casos se partió de 500 g de hojas frescas.

Tabla 1. Rendimiento tras la extracción de hojas frescas de *S. ecuadorensis*, *P. carpunya* e *I. guayusa*.

Extractos**	Rendimiento %		
	<i>S. ecuadorensis</i>	<i>P. carpunya</i>	<i>I. guayusa</i>
H2O	15,2	7,3	7,5
ATOM	17,4	18,6	4,7
ETOH	5,0	0,6	1,2
ETOH-H2O	11,6	11,5	0,8

** H2O (extraído con agua y liofilizado), ATOM (extraído con agua y atomizado), ETOH (extraído con etanol) y ETOH-H2O (extraído con etanol-agua)

Para *S. ecuadorensis* y *P. carpunya* los rendimientos más altos se obtienen en la extracción con agua y posterior atomización, mientras que, para *I. guayusa* los valores más altos se alcanzan con la extracción con agua seguida de liofilización. Sin embargo, el rendimiento más alto para *I. guayusa* fue considerablemente inferior en comparación con las otras plantas. Es relevante destacar también que la extracción con etanol produjo un rendimiento bajo para las tres plantas.

3.2 Perfil volátil

La identificación de los compuestos que están presentes en los cuatro extractos de las tres plantas consideradas en este estudio se presenta en este apartado y se han agrupado los compuestos químicos en sus correspondientes familias, las cuales corresponden a terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos), norisoprenoides, cetonas, furanos, aldehídos, ésteres, ésteres de ácidos grasos de cadena larga, alcoholes, fenoles volátiles y otros compuestos no incluidos en estas.

A continuación, en las Tablas 2, 3 y 4, se presentan los datos correspondientes a los compuestos volátiles de los extractos de las tres plantas.

Tabla 2. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en *S. ecuadorensis*.

Compuestos	EXTRACTOS											
	H2O			ATOM			ETOH			ETOH-H2O		
TERPENOS (monoterpenenos)												
l-felandreno	1,70	± 0,28	a	0,81	± 0,32	a	1,24	± 0,13	a	1,34	± 0,27	a
α-terpineno	3,74	± 0,66	a	1,85	± 0,29	b	nd			3,08	± 0,54	a
L-limoneno	2,41	± 1,00	a	4,49	± 1,73	a	6,65	± 2,13	a	4,24	± 0,54	a
γ-terpineno	2,89	± 0,55	b	1,28	± 0,09	c	4,45	± 0,17	a	nd		
β-ocimeno	nd			0,42	± 0,10	c	1,33	± 0,16	a	0,88	± 0,22	b
Cimeno	15,50	± 1,70	b	9,90	± 1,36	c	24,50	± 1,30	a	9,69	± 1,57	c
α-terpinoleno	nd			0,51	± 0,04	b	1,22	± 0,61	a	nd		
p-cimeno	8,23	± 3,01	a	1,79	± 0,21	c	5,45	± 0,72	ba	2,31	± 0,66	bc
Linalol	nd			nd			0,46	± 0,04	a	0,35	± 0,12	a
4-terpineol	nd			nd			0,69	± 0,01	a	0,45	± 0,13	a
Piperitona	110,00	± 29,00	a	28,60	± 7,90	c	69,30	± 5,20	b	35,30	± 9,90	bc
Total	144,47	± 36,20	a	49,65	± 12,04	b	115,29	± 10,47	a	57,64	± 13,95	b
TERPENOS (sesquiterpenos)												
Guayano	nd			nd			0,75	± 0,02	b	1,07	± 0,03	a
Total	nd			nd			0,75	± 0,02	b	1,07	± 0,03	a
NORISOPRENOIDES												
β-damascenona	1,02	± 0,23	b	0,40	± 0,11	c	nd			1,45	± 0,06	a
β-ionona	nd			nd			9,19	± 1,04	a	1,56	± 0,11	b
β-ciclocitral	nd			nd			2,08	± 0,31	a	0,69	± 0,08	b
Total	1,02	± 0,23	c	0,40	± 0,11	c	11,27	± 1,35	a	3,70	± 0,25	b
CETONAS												
6-metil-5-hepten-2-ona	3,48	± 0,69	a	nd			4,18	± 0,70	a	nd		
espiro-4,5-decan-6-ona	nd			0,37	± 0,04	b	nd			0,63	± 0,03	a
Total	3,48	± 0,69	a	0,37	± 0,04	b	4,18	± 0,70b	a	0,63	± 0,03	b

Tabla 2. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en *S. ecuadorensis*.

Compuestos	EXTRACTOS											
	H2O			ATOM			ETOH		ETOH-H2O			
FURANOS												
Furano 2-pentil	8,01	± 1,71	b	1,14	± 0,21	c	19,20	± 3,40	a	6,23	± 0,69	b
cis-2-(2-pentenil)-furano	12,20	± 0,90	a	1,47	± 0,24	c	3,71	± 0,61	b	4,46	± 0,65	b
Total	20,21	± 2,61	a	2,61	± 0,45	c	22,91	± 4,01	a	10,69	± 1,34	b
ALDEHÍDOS												
2-hexenal	10,80	± 2,30	a	4,61	± 0,63	b	2,35	± 0,23	b	3,05	± 0,20	b
nonanal	nd			0,27	± 0,01	c	1,57	± 0,23	a	0,82	± 0,11	b
2,6-nonadienal	0,98	± 0,28	a	nd			0,80	± 0,12	a	Nd		
aldehído-cumínico	nd			0,37	± 0,08	b	1,79	± 0,03	a	0,69	± 0,23	b
Safranal	0,90	± 0,14	b	nd			0,64	± 0,09	b	1,71	± 0,15	a
Benzaldehido	7,22	± 0,24	b	12,50	± 3,50	a	2,41	± 0,33	c	2,69	± 0,12	c
Total	19,90	± 2,96	a	17,75	± 4,23	a	9,56	± 1,03	b	8,96	± 0,81	b
ÉSTERES												
Éster etílico del ácido 3-hexenoico	nd			nd			1,44	± 0,19	b	107,0	± 14,00	a
Éster etílico del ácido octanoico	nd			0,26	± 0,03	b	nd			6,39	± 0,66	a
Éster dietílico del ácido butanodioico	nd			0,78	± 0,17	c	6,71	± 0,57	a	5,08	± 1,04	b
Éster metílico del ácido 2-hidroxibenzoico	8,70	± 3,99	b	0,59	± 0,06	c	32,80	± 4,90	a	32,70	± 2,40	a
Salicilato de etilo	nd			nd			1,64	± 0,25	b	2,86	± 0,26	a
Éster etílico del ácido tetradecanoico	nd			nd			0,72	± 0,11	a	0,70	± 0,23	a
Salicilato de cis-3-hexenilo	nd			0,45	± 0,13	a	0,59	± 0,03	b	0,82	± 0,08	a
Éster etílico del ácido hexanodioico	0,73	± 0,23	bc	0,50	± 0,15	c	2,26	± 0,36	a	1,20	± 0,32	b
Éster etílico del ácido pentadecanoico	0,73	± 0,23	bc	0,50	± 0,15	c	2,26	± 0,36	a	1,20	± 0,32	b
Salicilato de bencilo	nd			3,91	± 1,25	a	nd			6,04	± 0,44	a
Éster bis(2-etilhexílico) del ácido hexanodioico	0,33	± 0,04	a	0,31	± 0,07	a	0,48	± 0,12	a	0,50	± 0,14	a
Total	10,49	± 4,49	c	6,26	± 2,01	c	48,91	± 6,89	b	164,5	± 19,89	a

Tabla 2. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en *S. ecuadorensis*.

Compuestos	EXTRACTOS											
	H2O			ATOM			ETOH		ETOH-H2O			
ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA												
Palmitato de etilo	0,85	± 0,40	c	0,55	± 0,05	c	19,50	± 4,20	a	7,08	± 2,38	b
Linoleolato de etilo	nd			nd			0,43	± 0,08	a	0,37	± 0,09	a
Total	0,85	± 0,40	c	0,55	± 0,05	c	19,93	± 4,28	a	7,45	± 2,47	b
ALCOHOLES												
2-Penten-1-ol	4,34	± 0,74	a	0,43	± 0,04	c	2,61	± 0,76	b	0,57	± 0,22	c
Cis-2-pentenol	4,35	± 0,72	a	0,45	± 0,03	c	2,57	± 0,68	b	nd		
1-Hexanol	50,60	± 6,00	a	5,10	± 1,13	c	12,80	± 2,70	b	5,05	± 1,12	c
3-Hexen-1-ol	56,70	± 8,45	a	8,13	± 1,96	c	28,60	± 6,50	b	9,12	± 1,44	c
3-Octanol	0,50	± 0,01	a	nd			nd			0,33	± 0,02	b
2-Hexen-1-ol	62,00	± 10,30	a	5,00	± 1,28	b	11,60	± 2,10	b	4,95	± 1,12	b
Alcohol de bencilo	14,00	± 3,90	a	5,70	± 1,26	b	3,66	± 0,54	b	3,60	± 0,14	b
Alcohol fenetílico	20,10	± 5,40	a	9,19	± 1,81	b	16,60	± 1,90	a	3,74	± 0,70	b
Total	212,59	± 35,52	a	34,00	± 7,51	c	78,44	± 15,18	b	27,36	± 4,76	c
FENOLES VOLÁTILES												
Eugenol	11,70	± 4,00	a	2,47	± 0,96	b	2,54	± 0,25	b	4,07	± 0,39	b
3-alil-6-metoxifenol	11,70	± 4,10	a	2,47	± 0,98	b	2,42	± 0,13	b	4,36	± 0,27	b
Methyl-isoeugenol	5,57	± 0,66	a	0,60	± 0,06	b	5,86	± 0,16	a	0,78	± 0,11	b
m-timol	6,20	± 1,17	a	1,16	± 0,21	b	4,75	± 0,94	a	1,46	± 0,48	b
Carvacrol	4,23	± 1,37	a	0,93	± 0,33	b	4,24	± 0,98	a	1,06	± 0,37	b
P-timol	6,17	± 1,17	a	1,09	± 0,23	c	4,60	± 0,67	b	1,93	± 0,31	c
m-cresol	nd			0,19	± 0,01	b	0,29	± 0,05	a	nd		
2-metoxi-4-metilfenol	0,83	± 0,27	a	0,23	± 0,04	b	nd			0,37	± 0,06	b
4-metilfenol	0,37	± 0,17	a	0,22	± 0,03	a	0,38	± 0,04	a	0,36	± 0,09	a
Fenol, 2,4-bis-(1,1-dimetiletilo)	0,90	± 0,37	a	0,74	± 0,05	a	nd			0,52	± 0,00	a
Total	47,66	± 13,28	a	10,15	± 2,90	c	25,08	± 3,22	b	14,91	± 2,09	bc
OTROS												
Safrol	nd			1,45	± 0,31	b	47,70	± 5,50	a	3,14	± 1,05	b
Benzotiazol	nd			0,30	± 0,04	b	2,40	± 3,01	a	nd		
4-Acetil-1-metil-1-ciclohexeno	0,42	± 0,05	b	nd			9,77	± 1,69	a	0,80	± 0,13	b
cis-3-metil-4-octanolida	3,26	± 0,66	a	0,78	± 0,20	c	nd			2,22	± 0,17	b
Megastigma-3,5-dien-9-ol	5,74	± 0,37	a	0,43	± 0,10	d	3,65	± 0,22	b	0,93	± 0,16	c

Tabla 2. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en *S. ecuadorensis*.

Compuestos	EXTRACTOS									
	H2O		ATOM		ETOH		ETOH-H2O			
	OTROS									
Isoelemicina	1,73	± 0,56	a	0,47	± 0,08	b	1,84	± 0,19	a	nd
Total	11,15	± 1,64	b	3,43	± 0,73	b	65,36	± 10,61	a	7,09 ± 1,51 b

ETOH (extraído con etanol), ETOH-H2O (extraído con etanol-agua), ATOM (extraído con agua y atomizado) y H2O (extraído con agua y liofilizado) Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar (n=3).

a-d la misma letra dentro de la misma fila indica que no hay diferencias estadísticas para $p < 0,05$. nd: No detectado

En la Tabla 2 se indican los valores medios de los compuestos volátiles correspondientes a los extractos de *S. ecuadorensis*, se puede observar que al compararlos existen diferencias significativas en todas las familias de compuestos. La mayor cantidad de compuestos volátiles se ha obtenido en el extracto H2O y la mayor diversidad de compuestos en los extractos ETOH-H2O y ETOH (en ese orden). Los valores más altos de alcoholes, monoterpenos, fenoles volátiles se obtuvieron en el extracto H2O y en el caso de los extractos etanólicos (ETOH-H2O y ETOH) el resto de los grupos volátiles. Las familias de norisoprenoides y cetonas son en general las de menor peso para los cuatro extractos, y los ésteres de ácidos grasos de cadena larga en el caso de los extractos con agua (liofilizado y atomizado). Entre los monoterpenos destaca la piperitona, en los fenoles el eugenol y el 3-alil-6-metoxifenol, y en los ésteres el éster etílico del ácido 3-hexenoico. En el caso de los alcoholes el 3-octanol sólo se encontró en dos de las muestras. 1-Hexanol y 3-Hexen-1-ol forman casi el total de la familia de los alcoholes.

La escasa información previa sobre la composición química de *S. ecuadorensis*, constituye una fortaleza de esta investigación. Se ha encontrado que en un estudio sobre extractos etanólicos de guápala se identificaron cualitativamente compuestos volátiles, incluyendo terpenos no especificados [21]. Además, se ha informado sobre el contenido de estos compuestos en varias especies del género *Simira* [16].

Tabla 3. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en *P. carpunya*.

Compuestos	EXTRACTOS										
	H2O				ATOM			ETOH			
TERPENOS (monoterpenenos)											
α-pineno	321,00	±	141,00	a	61,00	±	7,20	b	nd		
2-β-pineno	138,00	±	68,00	a	13,50	±	1,00	b	9,50	± 1,90	b
Sabineno	79,60	±	32,00	a	4,20	±	0,60	b	6,60	± 1,90	b

Tabla 3. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en *P. carpunya*.

Compuestos	EXTRACTOS											
	H2O			ATOM			ETOH					
	TERPENOS (monoterpenenos)											
L-felandreno	426,00	±	156,00	a	70,10	±	26,40	b	155,00	±	40,00	b
β-irceno	nd				73,10	±	10,90	a	134,00	±	43,00	a
α -terpineno	1782,00	±	654,00	a	263,00	±	9,00	b	508,00	±	132,00	b
L-limoneno	253,00	±	71,00	a	114,00	±	7,00	b	134,00	±	38,00	b
1,8-cineol	1438,00	±	44,00	a	105,00	±	7,00	c	167,00	±	27,00	b
γ-terpineno	516,00	±	223,00	a	143,00	±	3,00	b	444,00	±	84,00	a
β-ocimeno	72,40	±	15,80	a	28,70	±	0,80	b	77,10	±	12,90	a
Cimeno	1442,00	±	442,00	a	589,00	±	33,80	b	2493,00	±	697,00	a
α-terpinoleno	75,10	±	17,30	a	22,10	±	1,00	b	60,50	±	8,40	a
p-cimeno	135,00	±	7,00	b	118,00	±	4,00	b	515,00	±	142,00	a
Linalool	317,00	±	30,00	a	90,70	±	10,10	c	235,00	±	25,00	b
4-terpineol	113,00	±	4,00	a	26,30	±	4,10	c	86,40	±	19,10	b
Allo ocimeno	4,90	±	0,00	a	2,60	±	0,20	b	5,80	±	1,00	a
1,3,8-p- metatrieno	21,70	±	2,60	b	4,20	±	0,60	b	77,80	±	17,40	a
Alcanfor	1,60	±	0,30	a	0,40	±	0,00	b	nd			
6-OH-p-menta-1- ene-3-ona	nd				5,80	±	0,60	b	24,90	±	4,00	a
Geraniol	13,10	±	1,00	a	3,50	±	0,40	c	10,90	±	0,80	b
Perilla-alcohol	0,80	±	0,00	b	0,60	±	0,10	b	3,10	±	0,80	a
p-Menta-1,4- dien-7-ol	6,30	±	0,20	b	2,40	±	0,20	b	28,70	±	5,70	c
Piperitona	nd				957,00	±	101,00	c	306,00	±	40,00	b
p-Menta-2,7-ol	133,00	±	1,00	a	30,30	±	5,20	b	nd			
p-Menta-1,5- dien-7-ol	6,70	±	0,40	b	nd				22,50	±	4,00	a
Total	7296,20	±	1910,60	a	2728,50	±	234,20	b	5504,80	±	1345,90	a
TERPENOS (sesquiterpenos)												
α-cubebeno	nd				4,10	±	0,50	b	10,40	±	1,80	a
Ylangeno	nd				1,80	±	0,60	a	11,20	±	5,60	a
δ-cadineno	38,60	±	19,00	a	9,80	±	1,80	a	nd			
α-copaeno	22,80	±	0,90	b	6,60	±	1,60	c	39,20	±	5,30	a
Copaeno	nd				0,60	±	0,20	b	6,80	±	1,60	a
Calareno	15,70	±	7,00	a	nd				4,10	±	0,90	a

Tabla 3. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en *P. carpunya*

Compuestos	EXTRACTOS						
	H2O		ATOM		ETOH		
TERPENOS (sesquiterpenos)							
β-cubebeno	nd			1,10 ± 0,40	b	13,70 ± 1,90	a
Trans-cariofileno	nd			2,30 ± 0,70	b	32,70 ± 9,40	a
β-farneseno	nd			2,80 ± 0,70	b	38,80 ± 6,60	a
α-amorfeno	nd			8,80 ± 1,80	b	96,20 ± 18,30	a
Ledeno	33,60 ± 15,00	a		1,40 ± 0,30	b	nd	
δ-selineno	44,60 ± 19,50	a		nd		19,90 ± 1,80	a
α-muuroleno	19,60 ± 9,30	a		nd		64,90 ± 16,90	a
Espatulenol	nd			0,40 ± 0,10	b	4,90 ± 1,20	a
Total	174,90 ± 70,70	a		39,70 ± 8,70	b	342,80 ± 71,30	a
NORISOPRENOIDES							
β-ionona	2,90 ± 0,40	b		nd		14,00 ± 4,40	a
β-ciclocitral	1,90 ± 0,70	a		1,20 ± 0,20	a	nd	
Total	4,80 ± 1,10	b		1,20 ± 0,20	b	14,00 ± 4,40	a
CETONAS							
Anisil-acetona	0,80 ± 0,10	b		nd		1,50 ± 0,30	a
3,4-dimetoxifenilacetona	2,60 ± 0,00	b		1,00 ± 0,20	b	24,90 ± 7,10	a
Total	3,40 ± 0,10	b		1,00 ± 0,20	b	26,40 ± 7,40	a
ALDEHÍDOS							
Benzaldehído	7,60 ± 1,20	a		11,10 ± 4,30	a	nd	
Safranal	nd			3,50 ± 0,50	a	16,70 ± 7,80	a
Cuminaldehído	55,90 ± 9,90	b		99,40 ± 33,50	b	202,00 ± 30,00	a
Total	63,50 ± 11,10	b		114,00 ± 38,30	b	218,70 ± 37,80	a
ÉSTERES							
2-metoxibenzoato de metilo	nd			3,00 ± 0,60	b	8,90 ± 2,20	a
Éster etílico del ácido 3-hexenoico etilhexanedioato	1,30 ± 0,10	b		1,10 ± 0,20	b	4,20 ± 0,10	a
Etilpentadecanoato	1,30 ± 0,10	b		1,00 ± 0,20	b	4,20 ± 0,10	a
Éster bis(2-etilhexílico) del ácido hexanodioico	0,20 ± 0,00	a		0,20 ± 0,00	a	0,20 ± 0,00	a

Tabla 3. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en *P. carpunya*.

Compuestos	EXTRACTOS								
	H2O		ATOM			ETOH			
ÉSTERES									
Aspidinol	0,80	± 0,00	b	nd			6,90	± 1,30	a
Total	3,60	± 0,20	b	5,30 ± 1,00		b	24,40	± 3,70	a
ÉSTRES DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA									
Etil-palmitato	2,10	± 1,00	b	1,10 ± 0,10		b	25,40	± 7,60	a
Total	2,10	± 1,00	b	1,10 ± 0,10		b	25,40	± 7,60	a
ALCOHOLES									
1-Hexanol	2,40	± 0,10	a	2,10 ± 1,00		a	1,70	± 0,10	a
3-Hexen-1-ol	7,70	± 0,30	b	3,00 ± 0,50		c	12,90	± 1,70	a
Fenetil-alcohol	3,20	± 0,10	a	4,40 ± 1,10		a	nd		
Total	13,30	± 0,50	a	9,50 ± 2,60		b	14,60	± 1,80	a
FENOLES VOLÁTILES									
Fenol-4-metil	nd			12,70 ± 0,60		b	67,10 ± 24,90		a
Eugenol	154,00	± 3,00	a	5,20 ± 2,10		c	50,10 ± 13,00		b
Metil-isoeugenol	1288,00	± 39,00	a	136,00 ± 20,00		b	1727,00 ± 531,00		a
m-timol	124,00	± 1,00	b	76,50 ± 9,50		b	765,00 ± 224,00		a
Carvacrol	130,00	± 3,00	b	88,70 ± 5,60		b	671,00 ± 194,00		a
p-timol	127,00	± 6,00	b	92,60 ± 8,20		b	573,00 ± 85,00		a
Isoeugenol acetato	0,80	± 0,20	b	nd			98,00 ± 28,30		a
2-alil-4-metilfenol	0,90	± 0,00	b	1,60 ± 0,20		b	6,90 ± 1,90		a
Fenol, 3-metil-5-(1-metiletilo)-	nd			1,30 ± 0,20		b	9,50 ± 0,40		a
Isohomogenol	56,60	± 4,40	a	6,20 ± 0,70		b	nd		
Total	1881,30	± 56,60	b	420,80 ± 47,10		b	3967,60	± 1102,50	a
OTROS									
Safrol	571,00	± 93,00	b	205,00 ± 23,00		b	1314,00 ± 285,00		a
Pentadecano	nd			10,50 ± 2,60		b	587,00 ± 208,00		a
1-Metoxi-1,3-ciclohexadieno	4,00	± 1,00	a	4,20 ± 0,20		a	8,30 ± 2,70		a
Cadalin	nd			1,40 ± 0,10		a	1,60 ± 0,10		a
Megastigma-3,5-dien-9-ol	420,00	± 16,20	a	nd			601,00 ± 158,00		a
Isoelemicin	458,00	± 10,90	ab	87,10 ± 12,40		b	690,00 ± 274,00		a

Tabla 3. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en *P. carpunya*.

Compuestos	EXTRACTOS											
	H2O			ATOM			ETOH					
OTROS												
Elemicin	526,00	±	6,00	a	24,20	±	4,50	c	210,00	±	72,00	b
Trans-anetol	29,30	±	8,10	a	0,70	±	0,10	b	nd			
Total	2008,30	±	135,20	a	333,10	±	42,90	b	3411,90	±	999,80	a

ETOH (extraído con etanol), ATOM (extraído con agua y atomizado) y H2O (extraído con agua y liofilizado). Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar ($n=3$). a-c La misma letra dentro de la misma fila indica que no hay diferencias estadísticas para $p < 0,05$. nd: No detectado

En cuanto a los resultados de *P. carpunya*, en la Tabla 3 se presentan los datos para los extractos H2O, ATOM y ETOH. Sin embargo, no se pudo llevar a cabo el análisis de los compuestos volátiles del extracto ETOH-H2O debido a la insuficiente cantidad de muestra disponible. Se decidió priorizar su uso en el estudio en modelos alimentarios, dada su demostrada actividad antimicrobiana y antioxidante *in vitro*.

El extracto ETOH fue el que presentó el contenido más alto de compuestos volátiles de todas las familias estudiadas, salvo el caso de los monoterpenos que estadísticamente fueron iguales que los del extracto H2O. Por otro lado, el extracto ATOM fue el que presentó mayor diversidad de compuestos volátiles, aunque presentó una menor extracción.

Se puede notar que todas las familias de compuestos presentan diferencias significativas al realizar la comparación entre los extractos. Destacan las familias de monoterpenos, fenoles volátiles y en “otros” sobre todo el contenido en safrol, seguido de elemicina e isoelemicina, los tres para los extractos H2O y ETOH.

Los compuestos α -terpineno, cimeno y 1,8-cineol fueron los mayoritarios dentro de los monoterpenos, familia en la cual se encuentran en cantidades importantes pero menores a los primeros, piperitona, L-limoneno y linalool. El metil-isoeugenol, por su parte, fue el mayoritario de los extractos H2O y ETOH de la familia de los fenoles volátiles donde también destacaron, pero en menor cantidad m-timol y carvacrol, del extracto etanólico.

Varios estudios previos han identificado componentes similares a los reportados en esta investigación, como piperitona, limoneno, elemicina, eugenol, metil-isoeugenol y 1,8-cineol [10,19,26,27]. Sin embargo, existen discrepancias en cuanto a su contenido, posiblemente debido a la capacidad de adaptación de la guaviduca a diversas condiciones ambientales [26].

Tabla 4. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en *I. guayusa*.

Compuestos	EXTRACTOS															
	H2O			ATOM			ETOH		ETOH-H2O							
TERPENOS (monoterpenenos)																
L-felandreno	4,00	±	1,10	a	2,60	±	0,10	a	3,60	±	0,90	a	nd			
β-mirceno	21,40	±	0,40	a	5,10	±	0,30	b	5,50	±	1,30	b	nd			
α-terpineno	10,40	±	0,90	a	5,20	±	0,30	b	6,50	±	1,90	b	10,50	±	2,00	b
L-limoneno	15,70	±	1,00	a	5,40	±	0,40	b	10,10	±	0,90	a ^b	17,30	±	8,40	b
γ-terpineno	5,70	±	0,60	b	3,20	±	0,10	b	13,60	±	4,40	a	7,20	±	0,70	b
β-ocimeno	23,90	±	1,50	a	2,40	±	0,10	c	7,40	±	0,90	b	6,30	±	1,00	b
Cimeno	26,60	±	3,10	b	20,10	±	1,60	b	61,30	±	17,60	a	84,20	±	15,30	a
α-terpinoleno	5,30	±	0,30	a	1,30	±	0,20	d	3,40	±	0,30	b	2,50	±	0,60	c
p-cimeno	5,90	±	1,30	b	4,90	±	0,40	b	30,80	±	7,50	a	11,90	±	2,30	b
Oxido de cis-linalool (furano)	1,90	±	0,20	a	nd				1,60	±	0,00	a	nd			
Linalol	13,90	±	2,40	a	1,30	±	0,20	c	12,80	±	1,40	a	7,20	±	0,70	b
Pinocarvona	2,70	±	0,20	b	nd				1,70	±	0,40	c	5,10	±	0,00	a
4-terpineol	0,80	±	0,30	c	0,80	±	0,10	c	5,20	±	0,10	a	1,70	±	0,10	b
Trans-pinocarveol	31,30	±	3,00	b	2,90	±	1,00	c	33,10	±	5,30	b	56,60	±	2,10	a
Isoterpinoleno	Nd				nd				3,30	±	0,20	a	1,10	±	0,30	b
Mirtenol	6,90	±	0,40	b	nd				5,00	±	0,70	c	10,20	±	0,30	a
Piperitona	48,90	±	13,10	c	66,30	±	5,00	c	262,00	±	21,00	a	99,60	±	20,30	b
Total	225,30	±	29,80	c	121,50	±	9,80	d	466,90	±	64,80	a	321,40	±	54,10	b
NORISOPRENOIDES																
Teaspirano-b	182,00	±	20,00	a	22,30	±	1,90	c	23,90	±	5,80	c	113,00	±	22,00	b
β-Damascenona	2,00	±	0,20	a	0,10	±	0,00	d	0,60	±	0,00	c	1,60	±	0,00	b
α-Ionona	nd				nd				8,50	±	1,90	a	4,70	±	0,20	a
β-Ionona	1,20	±	0,10	c	nd				8,30	±	1,40	a	4,30	±	0,40	b
β-ciclocitral	0,70	±	0,10	b	nd				3,40	±	0,80	a	1,80	±	0,00	b
Total	185,90	±	20,40	a	22,40	±	1,90	c	44,70	±	9,90	c	125,40	±	22,60	b
ALDEHÍDOS																
2-Hexenal	2,90	±	0,1	b	1,70	±	0,30	b	12,60	±	3,30	a	nd			
Nonanal	nd				0,50	±	0,10	b	3,20	±	0,70	a	nd			

Tabla 4. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en *I. guayusa*.

Compuestos	EXTRACTOS											
	H2O		ATOM		ETOH		ETOH-H2O					
	ALDEHÍDOS											
Benzaldehído	1,40	± 0,0	b	1,20	± 0,00	b	7,00	± 1,40	a	3,00	± 0,40	b
Aldehído cumínico	1,20	± 0,4	c	1,80	± 0,10	c	12,30	± 1,20	a	3,90	± 1,10	b
Total	5,50	± 0,50	b	5,20	± 0,50	b	35,10	± 6,60	a	6,90	± 1,50	b
ÉSTERES												
Éster etílico del ácido 3-hexenoico	nd			nd			2,90	± 0,70	a	0,70	± 0,30	b
Éster etílico del ácido 2-hexenoico	0,80	± 0,10	a	nd			1,00	± 0,30	a	0,60	± 0,30	a
Éster metílico del ácido 2-hidroxibenzoico	1,00	± 0,20	b	1,30	± 0,60	b	117,00	± 32,00	a	5,40	± 2,00	b
Salicilato de etilo	0,60	± 0,00	c	1,70	± 0,30	b	1,00	± 0,20	c	2,20	± 0,30	a
Éster etílico del ácido hexanodioico	1,00	± 0,10	b	0,80	± 0,10	b	1,20	± 0,20	a	1,00	± 0,00	a b
Éster etílico del ácido pentadecanoico	1,00	± 0,10	b c	0,80	± 0,10	c	1,30	± 0,10	a	1,00	± 0,00	b
Éster bis(2-etilhexílico) del ácido hexanodioico	0,40	± 0,10	a	0,30	± 0,20	a	0,60	± 0,20	a	0,40	± 0,00	a
Éster dietílico del ácido butanodioico	1,00	± 0,30	a	1,00	± 0,20	a	1,70	± 0,30	a	1,30	± 0,10	a
Total	5,80	± 0,90	b	5,90	± 1,50	b	126,70	± 34,00	a	12,60	± 3,00	b
ÉSTERES ÁCIDOS DE CADENA LARGA												
Palmitato de etilo	1,40	± 0,20	b	1,00	± 0,30	b	5,30	± 1,30	a	1,30	± 0,40	b
Total	1,40	± 0,20	b	1,00	± 0,30	b	5,30	± 1,30	a	1,30	± 0,40	b
ALCOHOLES												
Alcohol isoamílico	16,40	± 0,80	a	2,00	± 0,20	b	nd			nd		
2-penten-1-ol	nd			nd			2,70	± 1,00	a	2,20	± 0,20	a
Cis-2-pentenol	nd			nd			2,20	± 0,20	a	2,20	± 0,10	a
1-Hexanol	123,00	± 5,00	b	12,10	± 3,70	c	116,00	± 22,00	b	190,00	± 18,00	a
3-hexen-1-ol	19,90	± 1,10	b	2,50	± 0,50	c	28,40	± 5,70	a	29,10	± 0,40	a
3-octanol	16,60	± 1,00	a	0,40	± 0,10	c	nd			4,60	± 1,30	b

Tabla 4. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de los compuestos volátiles encontrados en *I. guayusa*.

Compuestos	EXTRACTOS															
	H2O			ATOM			ETOH			ETOH-H2O						
ALCOHOLES																
2-hexen-1-ol	79,20	±	3,50	b	9,80	±	3,20	c	74,10	±	16,90	b	148,00	±	12,00	a
1-octanol	0,60	±	0,00	c	nd			1,20 ± 0,10			a	1,00 ± 0,00			b	
Alcohol de bencilo	1,60	±	0,00	b	1,00 ± 0,10			c	2,00 ± 0,20			a	1,00 ± 0,10			c
Alcohol fenetílico	13,90	±	0,70	a b	7,30 ± 0,90			b	20,10 ± 7,00			a	9,70 ± 1,10			b
Total	271,20	±	12,10	b	35,10 ± 8,70			c	246,70 ± 53,10			b	387,80 ± 33,20			a
FENOLES VOLÁTILES																
Fenol-4-metil	nd			nd			1,20 ± 0,30			a	0,40 ± 0,00			b		
Cis-metil-isoeugenol	0,30	±	0,10	b	nd			9,80 ± 0,90			a	nd				
Trans-metil-isoeugenol	nd			0,60 ± 0,20			b	12,30 ± 4,40			a	1,50 ± 0,40			b	
Fenol-4-etil	7,40	±	0,10	a	2,70 ± 0,30			b	nd			nd				
m-timol	1,40	±	0,20	c	2,80 ± 0,40			bc	22,00 ± 1,90			a	5,00 ± 1,70			b
Carvacrol	1,00	±	0,30	c	2,10 ± 0,40			c	17,90 ± 0,90			a	4,50 ± 1,00			b
p-timol	1,00	±	0,30	c	2,10 ± 0,50			c	18,00 ± 0,90			a	4,50 ± 1,00			b
Total	11,10	±	1,00	b	10,30 ± 1,80			b	81,20 ± 9,30			a	15,90 ± 4,1			b
OTROS																
Safrol	3,90	±	0,60	b	7,00 ± 1,10			b	68,90 ± 21,60			a	23,00 ± 4,50			b
Benzotiazol	nd			0,80 ± 0,10			b	4,00 ± 1,00			a	nd				
Megastigma-3-5-dien-9-ol	1,30	±	0,10	b	2,60 ± 0,70			b	21,30 ± 6,80			a	9,30 ± 1,80			b
Cadalín	0,30	±	0,0	a	nd			nd			0,40 ± 0,00			a		
Total	5,50	±	0,70	b	10,40 ± 1,90			b	94,20 ± 29,40			a	32,70 ± 6,30			b

ETOH (extraído con etanol), ETOH-H2O (extraído con etanol-agua), ATOM (extraído con agua y atomizado) y H2O (extraído con agua y liofilizado) Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar ($n=3$). a-d La misma letra dentro de la misma fila indica que no hay diferencias estadísticas para $p < 0,05$. nd: No detectado.

En la Tabla 4, se han agrupado los resultados de la composición de los compuestos volátiles de *I. guayusa*. En todas las familias de compuestos existen diferencias significativas entre los extractos. El extracto etanólico es el que presenta mayor cantidad y diversidad de compuestos volátiles, para la mayoría de las familias de compuestos. Destacan la familia de los monoterpenos, siendo piperitona y cimeno los compuestos que presentaron los valores más altos, siguen los ésteres y los alcoholes, siendo el éster metílico del ácido 2-hidroxibenzoico y 1-hexanol, respectivamente, los compuestos mayoritarios en estas familias. Se han realizado varios estudios con extractos de *I. guayusa* que coinciden en destacar la presencia de terpenos en la determinación de sus compuestos volátiles [13,28], así como polifenoles (ácidos hidroxicinámicos y flavonoides) [22,24,29].

En términos generales, se ha observado que *P. carpunya* exhibe el contenido más elevado de compuestos volátiles. Se identificaron diferencias significativas entre las familias de compuestos de las tres especies estudiadas: especialmente *P. carpunya* mostró la presencia de sesquiterpenos, *S. ecuadorensis* presentó furanos, mientras que en *I. guayusa* se observó la ausencia de cetonas. En *S. ecuadorensis* sobresalen las familias de monoterpenos, ésteres, alcoholes y fenoles volátiles. Por otro lado, en *P. carpunya* se destacan los monoterpenos, fenoles volátiles, safrol y aldehídos, especialmente los tres primeros.

En el caso de *I. guayusa*, se observan monoterpenos, norisoprenoides, ésteres y alcoholes. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el diferente efecto antimicrobiano y antioxidante de estas plantas, aspectos que se encuentran documentados en los capítulos 2, 3 y 4 en este trabajo. Es importante también mencionar que los norisoprenoides, familia común en las tres especies estudiadas, son compuestos que se encuentran en distintas plantas frutales [30]. En la presente investigación dentro de este grupo de compuestos se encontraron β -ionona, α -ionona y β -damascenona, entre otros.

En las siguientes Tablas (5 a 8), se resumen los valores globales de las diferentes familias químicas identificadas para las tres plantas estudiadas y según el método de extracción empleado.

Tabla 5. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de las familias químicas de los compuestos volátiles analizados en las tres plantas para el extracto H₂O (extraído con agua y liofilizado).

FAMILIAS	<i>S. ecuadorensis</i>				<i>P. carpunya</i>				<i>I. guayusa</i>			
Terpenos monoterpenos	144,47	±	36,20	a	7296,20	±	1910,60	b	225,30	±	29,80	a
Terpenos sesquiterpenos	nd				174,90	±	70,70	a	nd			
Norisoprenoides	1,02	±	0,23	a	4,80	±	1,10	a	185,90	±	20,40	b
Cetonas	3,48	±	0,69	a	3,40	±	0,10	a	nd			
Furanos	20,21	±	2,61	a	nd				nd			
Aldehídos	19,90	±	2,96	a	63,50	±	11,10	b	5,50	±	0,50	a
Ésteres	10,49	±	4,49	b	3,60	±	0,20	a	5,80	±	0,90	a
Ésteres de ácidos grasos de cadena larga	0,85	±	0,40	a	2,10	±	1,00	a	1,40	±	0,20	a
Alcoholes	212,59	±	35,52	b	13,30	±	0,50	a	271,20	±	12,10	c
Fenoles volátiles	47,66	±	13,28	a	1881,30	±	56,60	b	11,10	±	1,00	a
Otros	11,15	±	1,64	a	2008,30	±	135,20	b	5,50	±	0,75	a

Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar (n=3). a-c La misma letra dentro de la misma fila indica que no hay diferencias estadísticas para $p < 0,05$. nd: No detectado.

Tabla 6. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de las familias químicas de los compuestos volátiles analizados en las tres plantas para el extracto ATOM (extraído con agua y atomizado).

FAMILIAS	<i>S. ecuadorensis</i>				<i>P. carpunya</i>				<i>I. guayusa</i>			
Terpenos monoterpenos	49,65	±	12,04	b	2728,50	±	234,20	a	121,50	±	9,80	b
Terpenos sesquiterpenos	nd				39,70	±	8,70		nd			
Norisoprenoides	0,40	±	0,11	b	1,20	±	0,20	b	22,40	±	1,90	a
Cetonas	0,37	±	0,04	b	1,00	±	0,20	a	nd			
Furanos	2,61	±	0,45		nd				nd			
Aldehídos	17,75	±	4,23	b	114,00	±	38,30	a	5,20	±	0,50	b
Ésteres	6,26	±	2,01	a	5,30	±	1,00	a	5,90	±	1,50	a
Ésteres ácidos de cadena larga	0,55	±	0,05	b	1,10	±	0,10	a	1,00	±	0,30	a
Alcoholes	34,00	±	7,51	a	9,50	±	2,60	b	35,10	±	8,70	a
Fenoles volátiles	10,15	±	2,90	b	420,80	±	47,10	a	10,30	±	1,80	b
Otros	3,43	±	0,73	b	333,10	±	42,90	a	10,40	±	1,90	b

Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar (n=3). a-b La misma letra dentro de la misma fila indica que no hay diferencias estadísticas para $p < 0,05$. nd: No detectado.

Tabla 7. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de las familias químicas de los compuestos volátiles analizados en las tres plantas para el extracto ETOH (extraído con etanol).

FAMILIAS	<i>S. ecuadorensis</i>			<i>P. carpunya</i>			<i>I. guayusa</i>		
Terpenos monoterpenos	116,04	± 10,49	b	5504,80	± 1345,90	a	466,90	± 64,80	b
Terpenos sesquiterpenos	0,75	± 0,02	b	342,80	± 71,30		nd		
Norisoprenoides	11,27	± 1,35	b	14,00	± 4,40	b	44,70	± 9,90	a
Cetonas	4,18	± 0,70	b	24,40	± 3,70	a	nd		
Furanos	22,91	± 4,01		nd			nd		
Aldehídos	9,56	± 1,03	b	218,70	± 37,80	a	35,10	± 6,60	b
Ésteres	48,91	± 6,89	b	24,30	± 3,70	b	126,70	± 34,00	a
Ésteres de ácidos grasos de cadena larga	19,93	± 4,28	a	25,40	± 7,60	a	5,30	± 1,30	b
Alcoholes	78,44	± 15,18	b	14,60	± 1,80	c	246,70	± 53,10	a
Fenoles volátiles	25,08	± 3,22	b	3967,60	± 1102,50	a	81,20	± 9,30	b
Otros	65,36	± 10,61	b	3411,90	± 999,80	a	94,20	± 29,40	b

Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar (n=3). a-c La misma letra dentro de la misma fila indica que no hay diferencias estadísticas para $p < 0,05$. nd: No detectado.

Tabla 8. Áreas relativas ($\times 10^{-3}$) de las familias químicas de los compuestos volátiles analizados en las dos plantas para el extracto ETOH-H₂O (extraído con etanol-agua).

FAMILIAS	<i>S. ecuadorensis</i>			<i>I. guayusa</i>		
Terpenos monoterpenos	58,71	± 13,98	b	321,40	± 54,10	a
Terpenos sesquiterpenos	1,07	± 0,03	b	nd		
Norisoprenoides	3,70	± 0,25	b	125,40	± 22,60	a
Cetonas	0,63	± 0,03	b	3,70	± 0,30	a
Furanos	10,69	± 1,34		nd		
Aldehídos	8,96	± 0,81	a	6,90	± 1,50	a
Ésteres	164,49	± 19,89	a	12,60	± 3,00	b
Ésteres de ácidos grasos de cadena larga	7,45	± 2,47	a	1,30	± 0,40	b
Alcoholes	27,36	± 4,76	b	387,80	± 33,20	a
Fenoles volátiles	14,91	± 2,09	a	15,90	± 4,10	a
Otros	7,09	± 1,51	b	32,70	± 6,30	a

Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar (n=3). a-b La misma letra dentro de la misma fila indica que no hay diferencias estadísticas para $p < 0,05$. nd: No detectado.

La cantidad más abundante de compuestos volátiles se encuentra en los extractos de *P. carpunya*, donde la mayoría de las familias muestran valores significativamente más elevados en comparación con los extractos de las otras especies estudiadas. No obstante, se observan algunas excepciones, como en el caso de la familia de los alcoholes, cuyo contenido fue significativamente mayor en todos los extractos de *S. ecuadorensis* e *I. guayusa* en comparación con los de *P. carpunya*. Este patrón también se observó en el extracto H₂O de *S. ecuadorensis* con los ésteres y en el ETOH con los norisoprenoides, destacando estos últimos en *I. guayusa*.

Otra particularidad que se puede observar es que el extracto ETOH de las tres plantas presenta diferencias significativas entre todas las familias de compuestos, mientras que el extracto ATOM solo las presenta en los ésteres. En cambio, el extracto H₂O y ETOH-H₂O presentan diferencias para la mayoría de las familias, exceptuando para cetonas y ésteres ácidos de cadena larga en el caso del extracto H₂O y, ni en aldehídos ni fenoles volátiles en las muestras ETOH-H₂O.

Las diferencias encontradas entre los extractos de cada especie se pueden deber a polaridad de los disolventes, lo cual permite separar compuestos bioactivos diferentes en función de su afinidad con el solvente [31,32].

Es crucial entender la composición de las plantas medicinales, especialmente cuando se busca verificar sus propiedades, como su capacidad antimicrobiana y antioxidante. Algunos estudios han informado sobre la capacidad antibacteriana de los extractos etanólicos de *S. ecuadorensis* contra *V. parahaemolyticus* en concentraciones moderadas, lo que podría estar asociado a la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, terpenos y saponinas [21]. Además, en este estudio, se observa la presencia de safrol, lo que podría contribuir a esta actividad antimicrobiana [33]. Asimismo, su actividad antioxidante podría estar relacionada con la presencia de compuestos fenólicos [21]. Algunos estudios que han evaluado la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *P. carpunya* sugieren que esta propiedad podría estar vinculada principalmente a su elevado contenido de 1,8-cineol [34] y safrol [12,33] ambos compuestos característicos del género *Piper* y que también se identificaron como componentes mayoritarios en nuestro estudio. Además, investigaciones previas sobre otras especies de *Piper* han relacionado la actividad antimicrobiana con la presencia de piperitona, así como monoterpenos como α -pineno y β -pineno [35,36].

Para *Ilex guayusa* se ha encontrado que los extractos etanólicos presentan una importante actividad antimicrobiana contra dos bacterias patógenas (*Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*) que causan inflamación periodontal y que los autores la asocian con su

contenido de coumarinas [29]. Villacis *et al.* [37], por el contrario, indican que los extractos acuosos e hidroalcohólicos de esta especie no presentaron actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus*, lo que coincide con lo reportado para *I. paraguariensis* (yerba mate) cuyo extracto etanólico no inhibió a *E. coli*, pero fue efectivo inhibiendo *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* y lo asocian con su contenido de compuestos fenólicos [38].

Por otro lado, el estrés oxidativo generalmente se considera el punto de partida para la aparición de varias enfermedades [26] y conociendo que varias plantas medicinales, incluyendo las de este estudio, se usan ancestralmente para el tratamiento de inflamaciones, es necesario conocer el potencial de su capacidad antioxidante en los extractos estudiados.

En caso de aceite esencial de *P. carpunya*, asumiendo que su bioactividad debe principalmente a los terpenos presentes, se ha encontrado que su actividad antioxidante fue moderadamente interesante con valores inferiores a sus controles positivos (timol y Trolox), pero mayores al compararlos con compuestos puros de piperitona, limoneno, 1,8-cineol y metileugenol, compuestos que forman parte de su composición. Este resultado los autores lo asocian a sinergias entre moléculas o a la bioactividad de compuestos menos abundantes [26]. Valarezo *et al.* [19] coinciden en la ausencia de actividad antioxidante, ya que a pesar de comprobar la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos, indican que existe un antagonismo con otros compuestos presentes en el aceite esencial.

Las hojas de guayusa presentan una alta capacidad antioxidante [24,37], aunque es significativamente afectada por la edad de la hoja, siendo mayor cuanto más joven es esta. Además, en un estudio comparativo de la actividad antioxidante entre hojas frescas de *I. guayusa* y hojas sometidas a dos tratamientos industriales diferentes (escaldado y fermentación), se observó que la actividad antioxidante de las hojas escaldadas era similar a la de las hojas frescas sin tratar. Sin embargo, el proceso de fermentación redujo esta actividad, probablemente debido a las modificaciones en la composición de compuestos bioactivos y antioxidantes ocasionadas por el proceso industrial [24].

Los compuestos fenólicos podrían estar involucrados en la alta capacidad antioxidante de las hojas de guayusa, y particularmente los derivados del ácido hidroxicinámico, isómeros del ácido mono y dicafeoilquínico (ácido 5-O-cafeoilquínico) [22,24,37].

Los resultados referentes a la actividad antioxidante coinciden en general con los encontrados para la actividad antimicrobiana, lo que podría suponer que los compuestos responsables de la actividad antioxidante y antimicrobiana son los mismos, por lo tanto, los terpenos y fenoles volátiles también aportan a la actividad antioxidante [39].

Los hallazgos previamente mencionados por diversos autores subrayan la importancia de investigar el efecto conservante de los extractos de las plantas estudiadas en este trabajo. Dada la variabilidad en su composición de compuestos volátiles, estas plantas podrían manifestar diversos efectos en la conservación de los productos alimenticios.

4. Conclusiones

El presente estudio se enfocó en conocer de manera exhaustiva la composición volátil de tres plantas: *S. ecuadorensis*, *P. carpunya* e *I. guayusa*. Terpenos, ésteres, alcoholes y fenoles volátiles fueron los principales compuestos identificados, encontrándose diferencias significativas entre las tres plantas consideradas. *P. carpunya* fue la planta que presentó los contenidos más altos de compuestos volátiles, destacando sus altos niveles de terpenos, aldehídos, fenoles volátiles y safrol. *S. ecuadorensis* presentó un contenido más bajo de compuestos, comparados con la primera, siendo los mayoritarios terpenos, ésteres, alcoholes y fenoles volátiles. *I. guayusa* por su parte fue la que presentó el contenido de compuestos volátiles más bajo, siendo los principales, terpenos, norisoprenoides, ésteres y alcoholes. Al realizar la comparación de los solventes usados para la extracción, se determinó que el etanol es el que permitió extraer el mayor número y contenido de compuestos volátiles. Los hallazgos de este estudio apuntan hacia la necesidad de llevar a cabo investigaciones complementarias para determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana, tanto *in vitro* como a través de la aplicación en modelos alimentarios, de extractos naturales. Esto permitirá evaluar el potencial conservador de cada planta, temas que se exploran en los capítulos siguientes.

5. Referencias bibliográficas

1. Caroch, M.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R. Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology* 2015, 45, 284-295, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>.
2. Caroch, M.; Barreiro, M.F.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R. Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2014, 13, 377-399, doi:<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>.
3. FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. *General standards for food additives, codex stan 192–1995*; Food and Agriculture Organization (FAO): Roma, 2015.

4. Flórez-Méndez, J.; López, J. Food Additives: Importance, classification, and adverse reactions in humans. In *Natural Additives in Foods*, Valencia, G.A., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2023; pp. 1-31.
5. Giri, N.A.; Gaikwad, N.N.; Raigond, P.; Damale, R.; Marathe, R.A. Exploring the potential of pomegranate peel extract as a natural food additive: A Review. *Current Nutrition Reports* 2023, 12, 270-289, doi:<https://doi.org/10.1007/s13668-023-00466-z>.
6. Dueñas, J.F.; Jarrett, C.; Cummins, I.; Logan-Hines, E. Amazonian Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.): A historical and ethnobotanical overview. *Economic Botany* 2016, 70, 85-91, doi:<https://doi.org/10.1007/s12231-016-9334-2>.
7. Saltos, R.V.A.; Vásquez, T.E.R.; Lazo, J.A.; Banguera, D.V.; Guayasamín, P.D.R.; Vargas, J.K.A.; Peñas, I.V. The use of medicinal plants by rural populations of the Pastaza province in the Ecuadorian Amazon. *Acta Amazonica* 2016, 46.
8. Vargas, L.; Velasco-Negueruela, A.; Perez-Alonso, M.J.; Pala-Paul, J. Essential oil composition of the leaves and spikes of *Piper carpunya* Ruiz et Pavon (Piperaceae) from Peru. *Journal of essential oil research* 2004, 16, doi:<https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698669>.
9. Rondón, M.E.; Velasco, J.; Cornejo, X.; Fernández, J.; Morocho, V. *Chemical composition and antibacterial activity of Piper lenticellosum C.D.C essential oil collected in Ecuador*; Issue: 8: 2016; Volume Volume: 6, pp. 156-159.
10. D'Armas Regnault, H.; Montesino, K.; Jaramillo Jaramillo, C.; León, R. Composición química de aceites esenciales de las hojas de ocho plantas medicinales cultivadas en Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2018, 2.
11. Mgbeahuruike, E.E.; Yrjönen, T.; Vuorela, H.; Holm, Y. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. *South African Journal of Botany* 2017, 112, 54-69, doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.007>.
12. Sauter, I.P.; Rossa, G.E.; Lucas, A.M.; Cibulski, S.P.; Roehe, P.M.; da Silva, L.A.A.; Rott, M.B.; Vargas, R.M.F.; Cassel, E.; von Poser, G.L. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products* 2012, 40, 292-295, doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.025>.
13. Wise, G.; Negrin, A. A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: a stimulant and antioxidant novel food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2020, 60, 2393-2404, doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1643286>.
14. Cadena-Carrera, S.; Tramontin, D.P.; Bella Cruz, A.; Bella Cruz, R.C.; Müller, J.M.; Hense, H. Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) obtained by

- supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent. *Journal of Supercritical Fluids* 2019, 152, doi:<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104543>.
15. Sequeda-Castañeda, L.; Costa, G.; Celis, C.; Gamboa, F.; Gutierrez, S.; Luengas, P. *Ilex guayusa* (Aquifoliaceae): Amazon and Andean Native Plant. *Pharmacologyonline* 2016, 3, 93-202.
 16. Moreira, V.; Vieira, I.; Braz-Filho, R. Chemical Constituents and Biological Activities of *Simira* Genus: A Contribution to the Chemotaxonomic of Rubiaceae Family. *The Natural Products Journal* 2014, 4, 290-298, doi:<http://dx.doi.org/10.2174/2210315505666141211225600>.
 17. Aguirre, Z. *Especies Forestales de los Bosques Secos de Ecuador. Guía Dendrológica para su Identificación y Caracterización. Proyecto Manejo Forestal Sostenible ante el Cambio Climático. MAE/FAO-Finlandia*; Quito, Ecuador, 2012; p. 140 p.
 18. Moura do Carmo, D.F.; Amaral, A.C.F.; Machado, G.M.C.; Leon, L.L.; Silva, J.R.d.A. Chemical and Biological Analyses of the Essential Oils and Main Constituents of Piper Species. *Molecules* 2012, 17, 1819-1829.
 19. Valarezo, E.; Rivera, J.X.; Coronel, E.; Barzallo, M.A.; Calva, J.; Cartuche, L.; Meneses, M.A. Study of Volatile Secondary Metabolites Present in *Piper carpunya* Leaves and in the Traditional Ecuadorian Beverage Guaviduca. *Plants* 2021, 10, 338.
 20. de Araújo, M.F.; Curcino Vieira, I.J.; Braz-Filho, R.; de Carvalho, M.G. Simiranes A and B: erythroxylenes diterpenes and other compounds from *Simira eliezeriana* (Rubiaceae). *Natural Product Research* 2011, 25, 1713-1719, doi:<https://doi.org/10.1080/14786419.2011.560575>.
 21. Rondón, M.; Moncayo, S.; Cornejo, X.; Santos, J.; Villalta, D.; Siguencia, R.; Duche, J. Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University - Science* 2017, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.03.009>.
 22. Pardau, M.D.; Pereira, A.S.P.; Apostolides, Z.; Serem, J.C.; Bester, M.J. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Ilex guayusa* tea preparations: a comparison to *Camellia sinensis* teas. *Food & Function* 2017, 8, 4601-4610, doi:<https://doi.org/10.1039/C7FO01067B>.
 23. Filip, R.; López, P.; Giberti, G.; Coussio, J.; Ferraro, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 2001, 72, 774-778, doi:[https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00331-8](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00331-8).
 24. García-Ruiz, A.; Baenas, N.; Benítez-González, A.M.; Stinco, C.M.; Meléndez-Martínez, A.J.; Moreno, D.A.; Ruales, J. Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid

- composition and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2017, 97, 3929-3936, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.8255>.
25. Corcuera, M.E.; Wilches, D.; Martinez, R.; Beltran, S.; Rovira, J.; Jaime, I. *Effect of high hydrostatic pressure on volatile profile of cooked turkey breast meat*; Cambridge: Royal Society of Chemistry: 2010; pp. 201-206.
 26. Ballesteros, J.L.; Tacchini, M.; Spagnoletti, A.; Grandini, A.; Paganetto, G.; Neri, L.M.; Marengo, A.; Angiolella, L.; Guerrini, A.; Sacchetti, G. Rediscovering Medicinal Amazonian Aromatic Plants: *Piper carpunya* (Piperaceae) Essential Oil as Paradigmatic Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019, 2019, 6194640, doi:<https://doi.org/10.1155/2019/6194640>.
 27. Orlo, E.; Nerín, C.; Lavorgna, M.; Wrona, M.; Russo, C.; Stanzione, M.; Nugnes, R.; Isidori, M. Antioxidant activity of coatings containing eugenol for flexible aluminium foils to preserve food shelf-life. *Food Packaging and Shelf Life* 2023, 39, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101145>.
 28. Chóez-Guaranda, I.; Viteri-Espinoza, R.; Barragán-Lucas, A.; Quijano-Avilés, M.; Manzano, P. Effect of solvent-solvent partition on antioxidant activity and GC-MS profile of *Ilex guayusa* Loes. leaves extract and fractions. *Natural Product Research* 2022, 36, 1570-1574, doi:<https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1882455>.
 29. Gamboa, F.; Muñoz, C.-C.; Numpaque, G.; Sequeda-Castañeda, L.G.; Gutierrez, S.J.; Tellez, N. Antimicrobial Activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease. *International Journal of Microbiology* 2018, 2018, 4147383, doi:<https://doi.org/10.1155/2018/4147383>.
 30. Aloum, L.; Alefishat, E.; Adem, A.; Petroianu, G. Ionone Is More than a Violet's Fragrance: A Review. *Molecules* 2020, 25, doi:<https://doi.org/10.3390/molecules25245822>.
 31. Rodriguez Aguirre, O.E.; Castañeda Villate, J.C.; Hernández Roa, M.J.; Cárdenas Tavera, C.F.; Pombo Ospina, L.M.; Borrego Muñoz, P. High polarity extracts obtained from *Ilex guayusa* Loes. leaves, exhibit antioxidant capacity. *Vitae* 2022, 29, doi:<https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v29n1a347297>.
 32. Arteaga-Crespo, Y.; Radice, M.; Bravo-Sanchez, L.R.; García-Quintana, Y.; Scalvenzi, L. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon* 2020, 6, doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>.
 33. Dognini, J.; Meneghetti, E.K.; Teske, M.N.; Begnini, I.M.; Rebelo, R.A.; Dalmarco, E.M.; Verdi, M.; de Gasper, A.L. Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from

- Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. *Journal of Essential Oil Research* 2012, 24, 241-244, doi:<https://doi.org/10.1080/10412905.2012.676768>.
34. Hendry, E.R.; Worthington, T.; Conway, B.R.; Lambert, P.A. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009, 64, 1219-1225, doi:<https://doi.org/10.1093/jac/dkp362>.
 35. Morales, A.; Rojas, J.; Moujir, L.M.; Araujo, L.; Rondón, M. Chemical composition, antimicrobial and cytotoxic activities of piper hispidum SW. Essential oil collected in venezuela. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2013, 3, 16-20, doi:<https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3603>.
 36. Marzouk, B.; Fredj, M.B.H.; Chraief, I.; Mastouri, M.; Boukef, K.; Marzouk, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 2008, 6, 78-82.
 37. Villacís-Chiriboga, J.; García-Ruiz, A.; Baenas, N.; Moreno, D.A.; Meléndez-Martínez, A.J.; Stinco, C.M.; Jerves-Andrade, L.; León-Tamariz, F.; Ortiz-Ulloa, J.; Ruales, J. Changes in phytochemical composition, bioactivity and *in vitro* digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2018, 98, 1927-1934, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.8675>.
 38. Prado Martin, J.G.; Porto, E.; de Alencar, S.M.; da Glória, E.M.; Corrêa, C.B.; Ribeiro Cabral, I.S. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. *Revista Argentina de Microbiologia* 2013, 45, 93-98, doi:[https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70006-3](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70006-3).
 39. Šojić, B.; Milošević, S.; Savanović, D.; Zeković, Z.; Tomović, V.; Pavlić, B. Isolation, bioactive potential, and application of essential oils and terpenoid-rich extracts as effective antioxidant and antimicrobial agents in meat and meat products. *Molecules* 2023, 28, doi:<https://doi.org/10.3390/molecules28052293>.

CAPÍTULO 2

EFFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE *SIMIRA ECUADORENSIS* Y SU IMPACTO EN LA MEJORA DE LA VIDA ÚTIL EN PRODUCTOS DE POLLO Y PESCADO

En este capítulo se presentan los resultados de la evaluación del potencial antimicrobiano de diferentes extractos de *Simira ecuadorensis*, una planta característica de Ecuador y la validación de su potencial como conservante alimenticio. Se analizaron cuatro extractos obtenidos mediante diferentes procesos, denominados como etanol, etanol-agua (50:50 v/v), atomizado y liofilizado. Inicialmente, se evaluó su actividad antimicrobiana frente a un amplio grupo de microorganismos conformado por 20 cepas microbianas patógenas y de deterioro de los alimentos, empleando el método de difusión en agar. Los cuatro extractos inhibieron el crecimiento de *Campylobacter jejuni* y *Shewanella putrefaciens* con una CMI de 80 mg/ml. El extracto etanólico además inhibió a *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium perfringens* y *Leuconostoc mesenteroides*.

Después, se seleccionaron los extractos con los mejores rendimientos y propiedades antimicrobianas, para determinar su efecto en alimentos modelo conservados en condiciones comerciales normales a través de *challenge test* o pruebas de desafío. Se probaron los extractos atomizado y etanol-agua para determinar su efectividad para inhibir el crecimiento de *C. jejuni* y *Shew. putrefaciens* en productos de pollo y pescado, respectivamente, ya que estos microorganismos, uno patógeno y otro de deterioro, se encuentran con frecuencia en estos alimentos. Se escogieron como alimentos modelo uno sólido y otro líquido: hamburguesa y caldo, respectivamente. Mientras que el extracto atomizado provocó una baja inhibición de *C. jejuni* en hamburguesas de pollo, fue bastante efectivo para esta misma cepa en caldo de pollo. El extracto etanol-agua mostró mayor actividad frente *Shew. putrefaciens* en los productos de pescado. La aplicación del extracto atomizado disminuyó significativamente el pH de las hamburguesas de pollo mientras que el extracto etanólico tuvo un ligero impacto sobre el pH de las hamburguesas de pescado. Dichos efectos antibacterianos revelaron que los extractos de *S. ecuadorensis* podrían ser potencialmente utilizados en conservación de alimentos como antimicrobiano natural.

1. Introducción

Ecuador es considerado uno de los países con más diversidad del mundo [1]. Gran parte de la población mundial, especialmente de los países en vía de desarrollo usa hierbas para tratar algunas de sus dolencias y Ecuador no es la excepción [2]. Por el momento, varias especies ya se están comercializando y entre ellas se pueden encontrar interesantes ejemplos como el de la horchata lojana, la cual es una popular bebida aromática que se prepara como infusión de una mezcla de entre 26 a 60 plantas medicinales locales [3,4]. Estas mezclas (o tongos) se encuentran disponibles en los mercados de la ciudad, ya que es una bebida barata, asequible, fácil de preparar y que se consume a diario desde hace cientos de años. En la medicina tradicional se le atribuyen propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antiespasmódicas y como tónico cerebral [3,5]. Su versión con plantas deshidratadas se comercializa en el mercado internacional. Otro ejemplo importante es la guayusa, a la cual ya se hizo referencia en el capítulo de introducción. Es la planta medicinal con mayor crecimiento comercial en los mercados internacionales, que se produce y cosecha empleando conocimientos ancestrales. Así mismo, hay varias publicaciones en las que se muestran, los primeros estudios que se han realizado sobre diversas especies que en las comunidades principalmente indígenas del Ecuador se usan con fines medicinales y alimentarios [6].

Uno de los grupos de aditivos químicos más utilizados en la industria alimentaria son los conservantes, los cuales se aplican para mantener la calidad de los alimentos, mejorando su estabilidad microbiológica y química, lo que permite prolongar su vida útil y evitar pérdidas económicas [7,8]. Sin embargo, en la actualidad, hay un creciente interés de consumidores y procesadores de alimentos para desarrollar productos libres de aditivos químicos sintéticos, debido a varios efectos adversos que tienen sobre la salud de las personas (alergias, dolor de cabeza, entre otros).

Esto ha hecho que cada vez tome más fuerza la tendencia hacia los productos *clean label* o de etiqueta limpia, siendo una de sus características la declaración de productos libres de aditivos artificiales, los cuales pueden ser reemplazados por alguno de origen natural [9-13]. Bondi *et al.* [11] y da Cruz Cabral *et al.* [14] presentan varias investigaciones que atribuyen actividades antimicrobianas y antioxidantes a los extractos de plantas, aceites esenciales e ingredientes funcionales, los cuales contienen compuestos como fenoles, polifenoles, flavonoides, alcaloides y taninos, que les otorgan cierta acción fisiológica sobre las células [15]. En la literatura científica se identifican al menos tres mecanismos de acción antimicrobiana de los compuestos fenólicos: (i) alteración de la permeabilidad de las membranas celulares, formación de gránulos citoplasmáticos y ruptura de la membrana citoplasmática; (ii)

modificación de diversas funciones intracelulares mediante enlaces de hidrógeno de los compuestos fenólicos a enzimas a través de sus grupos OH; y (iii) interacciones con las membranas celulares que resultan en cambios de la morfología fúngica [11,12,16].

Simira ecuadorensis (Standl.) Steyermer es un árbol pequeño característico del bosque seco ecuatoriano [17], crece hasta 10 m de altura, ramificado a veces con muchos tallos, brota a partir de diciembre [18]. Su madera se utiliza para construcciones rurales, sus ramas y tallos para cercos de huertas y leña, sus hojas se utilizan para envolver quesos de cabra para conservarlos y darles sabor/color [14]. Rondón *et al.* [19] cuantificaron el contenido fenólico total y evaluaron la capacidad antibacteriana de muestras de *S. ecuadorensis* obtenidas del bosque seco de la provincia del Guayas-Ecuador; siendo el extracto etanólico de las hojas de esta especie uno de los más activos en los ensayos antibacterianos, principalmente frente a *Vibrio parahaemolyticus* en concentraciones moderadas. Esta capacidad antibacteriana podría atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, cumarinas, quinonas), además los autores recomiendan ampliar la investigación estudiando un mayor número de bacterias. La literatura científica relacionada con los componentes y aplicación de esta planta son muy escasos; por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de extractos de *S. ecuadorensis* en el crecimiento bacteriano *in vitro* y su aplicación en sistemas alimentarios reales.

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Plantas

Las hojas frescas de *Simira ecuadorensis* (Standl.) Steyermer, “guápala” se recolectaron el mes de diciembre del 2019 del cantón Zapotillo en la provincia de Loja-Ecuador. El tratamiento postcosecha consistió en un lavado de las hojas y su posterior secado usando un secador de bandejas (DY-110H, Daeyeong E&B CO., Ltd., Ansan, South Korea) a 40 °C por alrededor de 12 horas. Posteriormente, las muestras secas se molieron, tamizaron y homogenizaron (tamaño de partícula < 350 µm) y se almacenaron en condiciones de refrigeración hasta que se llevó a cabo el proceso de extracción.

2.1.2 Preparación de extractos

Las hojas secas molidas se extrajeron con agua, etanol y etanol-agua (50:50 v/v) como solventes; se utilizaron cinco litros de solvente por cada kilogramo de hojas. Se aplicó el método de maceración estática, que consistió en dejar reposar la mezcla en recipientes ámbar durante tres días a temperatura de refrigeración, revolviendo al menos una vez por día, posteriormente

la mezcla se filtró al vacío. En el caso de los extractos etanólicos, el etanol se evaporó en un rotaevaporador (G1, Heidolph, Schwabach, Alemania) a 40 °C y 150 rpm, y el agua se eliminó por liofilización en un liofilizador (Labconco, Kansas City, MO, USA) con las siguientes condiciones: presión = 0,180 mbar; temperatura = -50 °C por 72 horas. Estos extractos se designan en lo sucesivo como ETOH y ETOH-H₂O. En cuanto a los extractos acuosos, una parte se congeló a -40 °C y se liofilizó (utilizando las mismas condiciones mencionadas anteriormente) y la otra parte se mezcló con maltodextrina (3 %) y se secó por atomización (Büchi Mini Spray Dryer B-290, Suiza) a 120 °C y un flujo de alimentación de 6 ml/min. La denominación que se dio a estos extractos fue H₂O y ATOM, respectivamente.

Los rendimientos de los extractos ETOH, ETOH-H₂O, H₂O y ATOM fueron 1,04 %, 3,99%, 6,98 % y 12,41 %, respectivamente.

2.2 Esquema experimental

Inicialmente, dado que la información sobre la actividad antimicrobiana de *S. ecuadorensis* es escasa se planeó el primer estudio *in vitro* para generar una base de datos, probando el efecto de los extractos frente a 20 especies de microorganismos patógenos y de deterioro que se encuentran en los alimentos.

En un segundo paso, se estudió el efecto de los extractos sobre las especies donde se observó efecto antimicrobiano en la fase *in vitro* (*C. jejuni* y *Shew. putrefaciens*) inoculadas en alimentos modelo. Los alimentos considerados para realizar las pruebas de desafío se seleccionaron en función de aquellos en los que estos microorganismos se encuentran con mayor frecuencia (productos de pollo y pescado, respectivamente).

2.3 Actividad antimicrobiana *in vitro*

2.3.1. Especies microbianas

La actividad antimicrobiana de *S. ecuadorensis* se evaluó frente a 20 especies de microorganismos obtenidos de la colección española de cultivos tipo (CECT), del *International Life Science Institute* (ILSI) y del Hospital Universitario de Burgos-Universidad de Burgos (HUBU-UBU), en la Tabla 1 se hace constar la lista.

2.3.2 Determinación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de todos los extractos se evaluó mediante el método de difusión en agar [7], con algunas modificaciones. Las bacterias de prueba se usaron en una concentración de 8 log ufc/ml, la suspensión bacteriana se distribuyó en las placas con medio sólido. Después de la solidificación del medio, se hicieron pocillos de 7 mm de diámetro en las placas utilizando una pipeta esterilizada. Los extractos fueron diluidos a 80 mg/ml, usando agua

Tabla 1. Cepas bacterianas elegidas para este estudio

Microorganismo	Cepa bacteriana	Gram	Temperatura de Incubación (°C)	Caldo	Agar
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	HUBU-UBU 72732	-	37	TSB	Muller Hinton
<i>Escherichia coli</i>	CECT 501	-	37	BHI	Muller Hinton
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 457	-	37	TSB	Muller Hinton
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CECT 559	-	37	TSB	Muller Hinton
<i>Vibrio alginolyticus</i>	CECT 521	-	30	Nutrient caldo + 2 % NaCl	Nutrient agar + 2 % NaCl
<i>Campylobacter jejuni</i>	CECT7572	-	37	BHI	Nutrient + sangre 5 %
<i>Clostridium perfringens</i>	CECT 376	+	42	BHI	Nutrient + sangre 5 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 30	+	37	BHI	Muller Hinton
<i>Listeria monocytogenes</i>	ILSI-4	+	37	BHI	Muller Hinton
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910	+	37	BHI	Muller Hinton
<i>Bacillus cereus</i>	CECT 148	+	30	BHI	Muller Hinton
<i>Enterococcus faecalis</i>	CECT 481	+	37	BHI	Nutrient + sangre 5 %
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	CECT 847	+	26	TSB + Lev 0,60 %	Muller Hinton
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CECT 394	+	30	MRS	MRS
<i>Weissella viridescens</i>	CECT 283	+	30	MRS	MRS
<i>Pseudomonas putida</i>	CECT 3241	-	30	TSB	Muller Hinton
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CECT 378	-	30	TSB	Muller Hinton
<i>Aeromona caviae</i>	CECT 838	-	30	TSB	Muller Hinton
<i>Shewanella putrefaciens</i>	CECT 5346	-	30	TSB	Muller Hinton
<i>Shewanella sp.</i>	CECT 4640	-	30	TSB	Muller Hinton

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; ILSI: *International Life Science Institute*; HUBU-UBU: Hospital de Burgos-Universidad de Burgos

desionizada y dimetil sulfóxido (DMSO) en una proporción de 1:1. Posteriormente, se introdujeron 40 µl en los pocillos, las placas se incubaron por 24 a 48 horas y la actividad antimicrobiana de las muestras se determinó midiendo el diámetro del halo de inhibición (perímetro libre de colonias), usando un calibre. Se usó la solución agua-DMSO como control negativo, mientras que como control positivo se usó una solución de hipoclorito de sodio (0,94 %). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las características y condiciones de análisis de los microorganismos seleccionados se presentan en la Tabla 1.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó sólo con los microorganismos que presentaron zonas de inhibición. Los extractos de *S. ecuadorensis* fueron diluidos en agua-DMSO para preparar las concentraciones de prueba: 40, 20, 10, 5 mg de extracto/ml, y se aplicó el método de difusión en agar, descrito en el apartado anterior. La concentración más baja (mg/ml) de extracto que inhibió visiblemente el crecimiento de las bacterias analizadas se consideró como el valor CMI. Los ensayos se hicieron por triplicado.

2.4 Pruebas de desafío

Para evaluar el efecto de los extractos, se usaron caldos comerciales (Aneto, España) y filetes congelados (Carrefour, España) de pollo y merluza como productos alimentarios modelo.

2.4.1 Preparación del inóculo

Se cultivaron en las condiciones descritas anteriormente (Tabla 1) dos cepas de referencia de *C. jejuni* CECT 7572 y ATCC 11118, junto con la cepa HUBU-UBU 410 aislada de un caso clínico en el hospital de Burgos. Las placas se incubaron a 42 °C durante 48 h en una atmósfera microaerófila (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) generada por CampyGen® de Oxoid LTD (Hampshire, Reino Unido). Una colonia de una placa con medio Nutrient agar con 5 % de sangre de cordero de Oxoid LTD (Hampshire, Reino Unido) se transfirió a caldo BHI de Oxoid LTD (Hampshire, Reino Unido) y se incubó como se describió anteriormente. A continuación, los cultivos se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó y el sedimento se suspendió en 10 ml de agua estéril mediante agitación con el vórtex para lograr una población de células viables de 6 log ufc/ml. Luego, se mezclaron los tres tubos que contenían 10 ml de la suspensión celular de cada cepa y se mezcló 1 % de esta suspensión con carne de pollo para obtener una concentración final de 4 log ufc/g y 0,1 % con caldo de pollo para obtener una concentración de 3 log ufc/ml.

Las cepas de *Shew. putrefaciens* (CECT 5346) y *Shewanella* sp. (CECT 4640) se incubaron a 37 °C durante toda la noche en caldo TSB de Oxoid LTD (Hampshire, Reino Unido) y su concentración se ajustó con agua estéril por densidad óptica a 8 log ufc/ml. Ambas suspensiones

se mezclaron y diluyeron para obtener una población de células viables de 6 log ufc/ml. Al igual que en el producto anterior, se añadió un 1% del inóculo al pescado picado y un 0,1 % al caldo.

2.4.2 Productos de pollo y pescado

Los filetes se descongelaron de forma segura en refrigeración y se picaron con una picadora de alimentos (A320, Moulinex) durante 2 minutos para obtener una masa que se separó en cuatro fracciones (200 g cada una), una para cada tratamiento. Se prepararon hamburguesas pequeñas de pollo y pescado (20 g cada una) y se colocaron de tres en tres en bandejas de polietileno/etilenvinil alcohol/poliestireno, posteriormente se envasaron en atmósfera modificada (EAM; 30 % CO₂, 70 % N₂ y 60 % CO₂, 40 % N₂ para pollo y pescado, respectivamente) usando un mezclador WITT-Gasetechnik y una envasadora (Efabind, Murcia, España). Se usó caldo estéril comercial “Aneto” (pollo y pescado) y se dosificó 1 ml en tubos Eppendorf estériles. Todas las muestras se almacenaron a 4 °C.

Se prepararon y codificaron cuatro lotes de hamburguesas y muestras de caldo de pollo de la siguiente forma: C, tratamiento control (sin extracto), E con extracto ATOM (8%), J con el inóculo, y EJ con inóculo y extracto. La carne para las muestras J y EJ se mezcló con 1 % del inóculo de *C. jejuni* descrito anteriormente. En hamburguesas la concentración final de *C. jejuni* fue 4 log ufc/g y las muestras fueron analizadas a 0, 1, 4, 7 y 10 días, mientras que en las muestras de caldo la concentración de esta bacteria fue de 3 log ufc/ml y fueron analizadas después de 0, 1, 4, 7, 10, 14, 29, 52, 67 y 85 días.

En el caso de pescado, la preparación de las muestras fue similar a lo descrito anteriormente: C, control (sin extracto), E con extracto ETOH-H₂O (8 %), S con inóculo y SE con inóculo y extracto. Las muestras S y SE se prepararon con inóculo de *Shewanella* de la misma manera que se prepararon las muestras de pollo. La concentración final de *Shewanella* fue de 4 log ufc/g en hamburguesas y las muestras fueron analizadas a 0, 1, 3, 7, 8 y 14 días. La concentración final en el caldo fue de 3 log ufc/ml y las muestras analizadas a 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 38, 44, 65, 72, 84, 104 y 131 días.

2.4.3 Análisis microbiológicos

Se transfirieron asépticamente 20 g de hamburguesas a una bolsa estéril de muestreo con filtro de superficie total (BagPage, Bruselas-Bélgica) y se homogenizó con 180 ml de solución Ringer (Oxoid, Barcelona-España) usando un homogeneizador (Stomacher 400, Seward, Londres-UK) por 2 minutos. Se tomaron 100 µl de muestras de caldo directamente de los tubos eppendorf y para ambos tipos de producto, se prepararon diluciones decimales según la necesidad y se esparcieron en los medios correspondientes para realizar las siguientes determinaciones:

En el caso de hamburguesas y caldo de pollo, se cuantificaron bacterias aerobias mesófilas (*aerobic mesophilic bacteria* o AMB) en placas de vertido de agar Plate Count (PCA) de Conda (Madrid, España) incubadas durante 24 h a 30 °C y *C. jejuni*, en placas extendidas de agar selectivo sin sangre (CCD) para *Campylobacter* de Oxoid LTD (Hampshire, Inglaterra) e incubadas a 42 °C durante 48 h, en condiciones microaerófilas.

Por su parte, para hamburguesas y caldo de pescado, se realizó el recuento de AMB en placas de agar triptona-soja (TSA, por sus siglas en inglés) de Oxoid LTD (Hampshire, Inglaterra); y para *Shewanella putrefaciens*, en placas de iron agar de Conda (Madrid-España), ambas incubadas durante 24 h a 30 °C.

2.4.4 Determinación de pH

El pH se midió con un pH-metro (microPH2001, CRISON, Barcelona-España) colocando un electrodo en la muestra y utilizando soluciones de buffer fosfato (pH 4 y 7) para la calibración. Se realizaron tres mediciones cambiando el lugar de inserción del electrodo.

2.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media aritmética $\pm$ desviación estándar. La diferencia entre medias se determinó mediante un ANOVA simple usando el paquete estadístico Statgraphics XVII-X64. La prueba de Tukey se usó para determinar si había diferencias significativas entre los tratamientos a $p < 0,05$.

3. Resultados y Discusión

3.1 Actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana de cuatro extractos de *Simira ecuadorensis* frente a 20 bacterias y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2. Como se puede observar, siete bacterias se vieron afectadas y se produjeron zonas de inhibición de entre 12 a 18 mm, encontrándose valores de CMI de 20 a 80 mg/ml (Tabla 3).

En esta investigación se demostró que el extracto ETOH tuvo el mayor efecto antimicrobiano al inhibir el crecimiento de *L. mesenteroides*, *Shewanella* sp., *Y. enterocolitica*, *C. perfringens* y *B. cereus*, lo que puede deberse a la presencia de compuestos fenólicos, como las antraquinonas que se extraen con etanol, ya que los solventes alcohólicos son los mejores para lograr un mayor nivel de extracción de estos compuestos [20,21].

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de extractos de *Simira ecuadorensis* expresados como el diámetro del área de inhibición (mm).

Microorganismos	Extractos				
	ETOH	H2O	ETOH-H2O	ATOM	Control positivo
<i>Bacillus cereus</i>	11	ni	ni	ni	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	ni	ni	ni	ni	15
<i>Escherichia coli</i>	ni	ni	ni	ni	15
<i>Listeria monocytogenes</i>	ni	ni	ni	ni	17
<i>Listeria innocua</i>	ni	ni	ni	ni	14
<i>Salmonella enterica</i>	ni	ni	ni	ni	14
<i>Shigella sonnei</i>	ni	ni	ni	ni	13
<i>Yersinia enterocolitica</i>	12	ni	ni	ni	16
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	ni	ni	ni	ni	17
<i>Pseudomonas putida</i>	ni	ni	ni	ni	19
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ni	ni	ni	ni	17
<i>Aeromona caviae</i>	ni	ni	ni	ni	19
<i>Shewanella putrefaciens</i>	8	12	12	8	36
<i>Shewanella</i> sp.	16	ni	ni	ni	29
<i>Clostridium perfringens</i>	12	ni	ni	ni	10
<i>Campylobacter jejuni</i>	10	18	10	10	17
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ni	ni	ni	ni	14
<i>Enterococcus faecalis</i>	ni	ni	ni	ni	9
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	9	8	8	ni	19
<i>Weissella viridescens</i>	ni	ni	ni	ni	16

ni: no inhibido; Control positivo: Solución de hipoclorito de sodio (0,94 %); Valores promedio de tres repeticiones (n = 3); Extractos: ETOH (extraído con etanol), ETOH-H2O (extraído con etanol-agua), ATOM (extraído con agua y atomizado) y H2O (extraído con agua y liofilizado).

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos de *Simira ecuadorensis* (mg/ml).

Microorganismos	Extractos			
	ETOH	H2O	ETOH-H2O	ATOM
<i>Shewanella putrefaciens</i>	80	80	80	80
<i>Shewanella</i> sp.	40	–	–	–
<i>Campylobacter jejuni</i>	80	80	80	80
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	80	80	40	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	20	–	–	–
<i>Bacillus cereus</i>	20	–	–	–
<i>Clostridium perfringens</i>	20	–	–	–

Rango de concentración 5 – 80 mg/ml; Tres réplicas (n = 3); Extractos: ETOH (extraído con etanol), ETOH-H2O (extraído con etanol-agua), ATOM (extraído con agua y atomizado) y H2O (extraído con agua y liofilizado)

La CMI fue 80 mg/ml para todos los extractos; este valor es alto comparado con lo reportado por Rondón *et al.* [19] quienes comprobaron la actividad de un extracto etanólico de *S. ecuadorensis* frente a *V. parahaemolyticus* y determinaron una CMI de 40 ppm. Elez Garofulić *et al.* [22] y Sterniša *et al.* [23] reportaron una actividad antimicrobiana alta contra cepas de *C. jejuni* (CMI menos de 0,512 mg/ml) y *Shew. putrefaciens* (2 y 3,13 mg/ml) utilizando extractos de *Urtica dioica* L. En este trabajo, las cepas más sensibles a los extractos de *S. ecuadorensis*, fueron *C. jejuni*, bacteria termófila, microaerófila obligada, que responde negativamente a la tinción de Gram, que persiste a lo largo de la cadena alimentaria de las aves de corral [24], generalmente por contaminación de la canal con el contenido intestinal durante el proceso de sacrificio [25,26]. En muchos países, *C. jejuni* es el agente responsable de más del 90 % de los casos de campilobacteriosis. Los síntomas van desde gastroenteritis leve hasta disentería, aunque pueden aparecer secuelas no gastrointestinales como como artritis reactiva, los síndromes de Guillain-Barré y Miller-Fisher [27,28]. Por su parte *Shewanella putrefaciens* es una bacteria Gram-negativa no patógena, anaerobia facultativa psicrófila [29,30], que contribuye al deterioro de pescados y mariscos. Se encuentra en climas cálidos ya que forma parte natural de la microbiota marina. Tiene forma de bastón, es capaz de reducir el óxido de trimetilamina (TMAO) a trimetilamina y de producir sulfuro de hidrógeno (H₂S), con la consiguiente decoloración, malos olores y sabores, formación de limo y cambios en la textura [23,29,31,32].

Moreira *et al.* [33] y Rondón *et al.* [19] reportaron que *S. ecuadorensis* tiene actividad antimicrobiana y que está relacionada con sus metabolitos secundarios; los más abundantes son los alcaloides cuyos mecanismos de acción pueden afectar la división celular, provocar inhibición

respiratoria e inhibición enzimática en bacterias, alteración de la membrana bacteriana y afectación a los genes de virulencia [34]. Por otro lado, existen compuestos fenólicos cuyo modo de acción se basa en la privación de hierro o enlaces de hidrógeno con proteínas vitales y/o la pérdida de función de adhesinas, polipéptidos de la pared celular y enzimas unidas a la membrana [35].

S. ecuadorensis ha sido poco estudiada. No ha habido informes de su uso como aditivo antimicrobiano en alimentos o la aplicación directa de sus extractos en matrices alimentarias, lo que resalta la importancia de este estudio.

Para desarrollar la segunda parte del estudio sobre alimentos modelo, se aplicó un extracto etanólico y otro acuoso, ya que, como se ha descrito anteriormente, el tipo de disolvente influye en la composición del extracto. Como se pudo verificar en apartados anteriores, la actividad antimicrobiana fue mayor en ETOH, pero su bajo rendimiento de extracción hizo inviable realizar más estudios con él. Por tanto, no fue considerado para su aplicación en matrices alimentarias, eligiéndose ETOH-H₂O como extracto etanólico. Entre los dos extractos acuosos de actividad similar, también se seleccionó el de mayor rendimiento ATOM.

3.2 Efecto del extracto atomizado sobre el crecimiento microbiano en hamburguesas de pollo durante el almacenamiento.

Se continuó con la evaluación del potencial antimicrobiano de extractos de *S. ecuadorensis*, midiendo su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de AMB y *C. jejuni* en dos productos de pollo (hamburguesas y caldo), elegidos teniendo en cuenta los resultados mencionados en el anterior apartado. En la Tabla 4, se puede observar que los valores iniciales altos (> 4 log ufc/g) de AMB (día 0) podrían deberse a la contaminación natural de la carne de pollo.

Tamkuté *et al.* [36] indicaron que la comunidad científica estableció que los productos cárnicos no son aptos para el consumo cuando la AMB alcanza 7–8 log ufc/g. Las muestras C y J alcanzaron 8 log ufc/ml después de 4 días de almacenamiento, mientras que las muestras con extracto (E y EJ) no superaron estos recuentos hasta el día 7. Al final del período de almacenamiento, los recuentos alcanzaron aproximadamente 8,80 log ufc/g para todos los tratamientos (Tabla 4). En las hamburguesas de pollo inoculadas (EJ), el crecimiento de *C. jejuni* no fue inhibido significativamente por la adición del extracto de *S. ecuadorensis* (Tabla 5), esto posiblemente sea consecuencia de la disminución de la actividad del extracto de la planta debido a la reacción con componentes de los alimentos tales como lípidos, proteínas y carbohidratos [37,38]. Tras 10 días de almacenamiento, el número de estas bacterias en ambas muestras (J y EJ) fue de 3,30 log ufc/ml, siendo significativamente menor que lo reportado para el día 1, lo

que podría deberse a que, a pesar de su resistencia a los procedimientos de limpieza y desinfección, *C. jejuni* presenta exigentes requisitos de crecimiento [24]. Estas bacterias no se detectaron en las muestras C y E.

Tabla 4. Crecimiento de AMB (log ufc/g) en hamburguesas de pollo durante 10 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con 8 % de extracto atomizado (E); con inóculo (J); con 8 % de extracto e inóculo (EJ).

		Muestra							
		C		E		J		EJ	
Día	0	4,90 ± 0,07	D	---		---		---	
	1	5,70 ± 0,10	b C	5,20 ± 0,08	c C	6,30 ± 0,04	a C	4,60 ± 0,21	d C
	4	8,20 ± 0,14	a B	7,10 ± 0,45	b B	8,50 ± 0,13	a B	6,30 ± 0,35	b B
	7	8,70 ± 0,11	a A	8,60 ± 0,26	ab A	8,70 ± 0,12	ab A	8,30 ± 0,19	b A
	10	8,90 ± 0,15	a A	8,80 ± 0,05	a A	8,80 ± 0,05	a A	8,60 ± 0,18	a A

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-b Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas; A-D Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, $p < 0,05$. --- para esos tratamientos no se llevó a cabo este análisis.

Tabla 5. Crecimiento de *C. jejuni* (log ufc/g) en hamburguesas de pollo durante 10 días de almacenamiento: con inóculo (J); con 8 % de extracto atomizado e inóculo (EJ).

		Muestra			
		J		EJ	
Día	1	4,50 ± 0,22	a A	4,30 ± 0,30	a A
	4	4,60 ± 0,19	a A	4,50 ± 0,15	a A
	7	4,00 ± 0,09	a B	3,80 ± 0,51	a AB
	10	3,30 ± 0,18	a C	3,30 ± 0,20	a B

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a La misma letra dentro de la misma fila indica que no hay diferencias estadísticas; A-C Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, $p < 0,05$.

Las reacciones químicas y microbianas que causan el deterioro de los alimentos están asociadas con cambios en el pH, lo que lo convierte en un indicador fiable de la estabilidad de los alimentos. Después de 10 días, los valores de pH de las hamburguesas de pollo E, J y EJ disminuyeron (Tabla 6), probablemente debido a la producción de ácidos orgánicos principalmente por las bacterias ácido-lácticas (BAL) [39,40]. Sin embargo, el valor de pH de las muestras control durante el almacenamiento aumentó significativamente después de 4 días, lo cual puede explicarse por la degradación de proteínas y aminoácidos, y la formación de amoníaco por el crecimiento de algunas bacterias Gram-negativas, lo que aumenta el pH [31,40].

Tabla 6. pH en hamburguesas de pollo durante 10 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con 8 % de extracto atomizado (E); con inóculo (J) y con 8 % de extracto atomizado e inóculo (EJ).

		Muestra							
		C		E		J		EJ	
	0	5,92 ± 0,01	B	---		---		---	
	1	5,95 ± 0,02	ab B	5,91 ± 0,02	b C	5,99 ± 0,01	a B	5,79 ± 0,01	c A
Día	4	6,33 ± 0,01	a A	6,32 ± 0,03	a A	5,78 ± 0,01	b C	5,75 ± 0,01	b A
	7	6,31 ± 0,01	a A	6,02 ± 0,13	b B	6,08 ± 0,01	bc A	4,97 ± 0,03	c B
	10	6,35 ± 0,02	a A	5,73 ± 0,01	c C	5,97 ± 0,01	b B	4,83 ± 0,03	d C

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-d Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas; A-C Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, $p < 0,05$. --- indica que para esos tratamientos no se llevó a cabo este análisis.

3.3 Efecto del extracto atomizado sobre el crecimiento microbiano en caldo de pollo, durante el almacenamiento.

Se evaluó el potencial antimicrobiano del extracto atomizado de *S. ecuadorensis* en caldo de pollo inoculado. El caldo de pollo UHT es un producto que puede almacenarse durante varios meses sin refrigeración, lo que es posible gracias a la combinación del tratamiento térmico con el envasado aséptico. Se observó, que, durante todo el almacenamiento, no se obtuvieron recuentos de AMB en las muestras C y J, pero en E y EJ, el crecimiento fue significativamente alto (Tabla 7). En el caldo de pollo, AMB aumentó de 3,70 a 9,00 log ufc/g hasta los 14 días de almacenamiento; luego, el número disminuyó significativamente a 4,90 log ufc/g (29 días de almacenamiento), y finalmente, el aumento fue más lento hasta el final del almacenamiento. Este resultado podría deberse a una contaminación inicial del extracto.

El extracto atomizado demostró efecto bactericida contra *C. jejuni*. En el primer día de almacenamiento los recuentos de esta bacteria en el caldo de pollo inoculado fueron significativamente menores en la muestra a la que se le agregó el extracto (EJ) (Tabla 8). Desde este día hasta el final del almacenamiento, el recuento de *C. jejuni* estuvo por debajo del límite de detección en la muestra con extracto; sin embargo, en la muestra J no ocurrió hasta el día 52. Se observa que el extracto es mucho más efectivo sobre *C. jejuni* en el caldo que en las hamburguesas, posiblemente por la sencillez de la matriz alimenticia, lo que implica que los compuestos del extracto con potencial actividad antimicrobiana pueden actuar más fácilmente ya que no se unen a componentes de los alimentos como lípidos y proteínas. *C. jejuni* no creció en las muestras C y E (sin inóculo), lo que indica que no hubo presencia de este microorganismo.

Tabla 7. Crecimiento de AMB (log ufc/g) en caldo de pollo durante 85 días de almacenamiento: con 8 % de extracto atomizado (E); con 8 % de extracto atomizado e inóculo (EJ).

		Muestra	
		E	EJ
Día	0	---	---
	1	3,76 ± 0,25 a E	3,65 ± 0,14 a G
	4	4,68 ± 0,57 a E	5,43 ± 0,16 a EF
	7	8,02 ± 0,13 a AB	8,02 ± 0,13 a BC
	10	9,04 ± 0,04 a A	9,20 ± 0,09 a A
	14	9,12 ± 0,05 a A	8,89 ± 0,02 b AB
	29	4,86 ± 0,99 a DE	4,90 ± 0,32 a F
	52	6,30 ± 0,93 a CD	6,59 ± 0,19 a DE
	67	6,98 ± 0,15 a BC	6,42 ± 1,12 a DE
	85	6,71 ± 0,33 b BC	7,31 ± 0,23 a CD

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-b Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas; A-F Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, $p < 0,05$. --- indica que para esos tratamientos no se llevó a cabo este análisis.

Tabla 8. Crecimiento de *C. jejuni* (log ufc/g) en caldo de pollo durante el almacenamiento por 85 días: con inóculo (J); con 8 % de extracto atomizado e inóculo (EJ).

		Muestra	
		J	EJ
Día	1	3,65 ± 0,05 A	2,57 ± 0,05
	4	3,43 ± 0,47 AB	ND
	7	3,43 ± 0,47 AB	ND
	10	2,99 ± 0,02 B	ND
	14	2,79 ± 0,28 B	ND
	29	2,00 ± 0,31 C	ND
	52	ND	ND
	67	ND	ND
	85	ND	ND

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). A-C Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, $p < 0,05$. ND significa por debajo del límite de detección (< 1 ufc/ml).

3.4 Efecto del extracto etanol-agua sobre el crecimiento microbiano en hamburguesas de pescado durante el almacenamiento.

El estudio continuó evaluando el potencial antimicrobiano del extracto de *S. ecuadorensis* en hamburguesas de pescado inoculadas con *Shew. putrefaciens*, que se eligió como microorganismo específico del proceso de deterioro del pescado.

Para este estudio se eligió como pescado la merluza (*Merluccius merluccius*) al ser una de las especies de pescado más consumidas en el mundo, siendo España su mayor mercado [41]. El pescado, debido a sus propiedades y composición, es propenso al desarrollo de diversas bacterias, incluidas las bacterias Gram-negativas como *Shewanella* [32,42]. Esta susceptibilidad se intensifica en productos como las hamburguesas, debido a su procesado, lo que aumenta el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos y reduce su vida útil [10]. Esto puede explicar los altos niveles iniciales de recuento de bacterias aerobias mesófilas (AMB) en todas las muestras (Tabla 9). Se observaron diferencias significativas entre las muestras sin (C) y con extracto ETOH-H₂O (E). La adición de extracto al 8 % redujo el crecimiento de AMB entre los días 7 y 9 de almacenamiento, alcanzando los mismos recuentos el día 14 que las muestras sin extracto, alrededor de 8 log ufc/g. Además, el crecimiento de AMB en las muestras inoculadas (ES) se redujo principalmente entre los días 3 y 9 de almacenamiento; en las muestras con extracto, el recuento de AMB fue aproximadamente 3,50 ciclos logarítmicos menor, posteriormente comenzó a crecer y alcanzó 7,90 log ufc/g al final del almacenamiento refrigerado (Tabla 9).

Tabla 9. Crecimiento de AMB (log ufc/g) en hamburguesas de pescado durante 14 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con inóculo (S); con extracto de etanol-agua al 8% (E); con 8% de extracto e inóculo (ES).

	Muestra			
	C	E	S	ES
Día				
0	4,10 ± 0,20 D	---	---	---
1	3,90 ± 0,50 a D	4,10 ± 0,30 a C	4,40 ± 0,20 a D	3,80 ± 0,20 a D
3	4,50 ± 0,10 b D	4,60 ± 0,12 b C	5,60 ± 0,12 a C	3,90 ± 0,15 c D
7	5,90 ± 0,06 b C	4,40 ± 0,13 d C	8,30 ± 0,15 a B	4,90 ± 0,10 c C
9	7,10 ± 0,10 b B	5,80 ± 0,16 c B	9,30 ± 0,13 a A	5,80 ± 0,21 c B
14	8,20 ± 0,13 a A	7,80 ± 0,22 a A	8,30 ± 0,27 a B	7,90 ± 0,45 a A

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-d Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas; A-D Letras diferentes, en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, $p < 0,05$. --- indica que para esos tratamientos no se llevó a cabo este análisis.

En relación con el crecimiento de *Shew. putrefaciens* en hamburguesas de pescado, se observó que las muestras no inoculadas (C y E) no presentaban contaminación natural con estas bacterias. Por su parte, como se puede ver en la Tabla 10, en las muestras inoculadas S y ES, la adición de extracto tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de este microorganismo, mostrando un efecto inhibitorio a lo largo del tiempo de almacenamiento. Se observó un nivel de reducción en los recuentos bacterianos de hasta 1 log en el día 1, y la carga de *Shew. putrefaciens* se redujo más, aproximadamente 2 log en el día 3, 4 log en los días 7 a 9 y 1 log al final del experimento (día 14).

Tabla 10. Crecimiento de *Shew. putrefaciens* (log ufc/g) en hamburguesas de pescado durante 14 días de almacenamiento: con inóculo (S); con 8 % de extracto etanol-agua e inóculo (ES).

		Muestra					
		S			ES		
Día	1	3,90	±	0,08	a D	3,00	± 0,30 b C
	3	5,20	±	0,27	a C	3,10	± 0,43 b C
	7	8,30	±	0,06	a B	4,40	± 0,23 b B
	9	9,20	±	0,08	a A	5,30	± 0,39 b B
	14	8,40	±	0,10	a B	7,20	± 0,45 b A

Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar (n=3). a-b Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas; A-D Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, $p < 0,05$.

Moreira *et al.* [36] indicaron en su trabajo sobre el género *Simira* que aún existe poca información publicada sobre el estudio fitoquímico de algunas especies, pero encontraron extractos de *Simira glaziovii* y *Simira sampaioana* con efecto antimicrobiano y CMI mayor a 100 μ g/ml contra *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium kansasii*. Wright *et al.* [29,43] mencionaron que los extractos metanólicos de *Terminalia ferdinandiana*, *Kunzea pomifera*, *Acrornychia acidula*, *Citrus glauca* y *Solanum aviculare* y los extractos acuosos de *K. pomifera*, *C. glauca* y *Davidsonia pruriens* mostraron inhibición contra *Shew. putrefaciens*.

Además, mencionaron que 0,50 mg/ml del extracto metanólico de *T. ferdinandiana* fueron efectivos para inhibir el crecimiento bacteriano total en un sistema modelo de pescado almacenado en refrigeración. Otros autores también han informado buenos efectos inhibidores contra *Shew. putrefaciens* a partir de extractos etanólicos de hojas de *Urtica dioica* en carne de pescado [23] o películas comestibles de quitosano y gelatina-quitosano que han incorporado aceite esencial de clavo en filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) o dorada (*Coryphaena hippurus*), respectivamente [31,44].

Como se muestra en la Tabla 11, el valor de pH inicial de las hamburguesas de pescado correspondientes al control (C) fue de 6,69, similar al reportado en otros estudios [21,45] y que corresponde con la variabilidad normal de este tipo de carne, pero superior al valor reportado por Schelegueda *et al.* [42] para hamburguesas de *Merluccius hubbsi*.

Tabla 11. pH en hamburguesas de pescado para 14 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con extracto de etanol-agua al 8% (E); con inóculo (S) y con 8% de extracto e inóculo (ES).

	Muestra							
	C		E		S		ES	
Día	0	6,69 ± 0,01 A	---	---	---	---	---	---
	1	6,55 ± 0,01 a BC	6,40 ± 0,00 b A	6,56 ± 0,03 a B	6,36 ± 0,06 b A			
	3	6,57 ± 0,01 a B	6,35 ± 0,01 c AB	6,51 ± 0,01 b B	6,29 ± 0,00 d A			
	7	6,57 ± 0,05 a B	6,36 ± 0,03 b AB	6,58 ± 0,04 a B	6,31 ± 0,01 b A			
	9	6,45 ± 0,03 b CD	6,29 ± 0,03 c BC	6,92 ± 0,04 a A	6,28 ± 0,01 c A			
	14	6,39 ± 0,01 b D	6,26 ± 0,00 b C	6,89 ± 0,08 a A	6,25 ± 0,01 b A			

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). a-d Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas; A-D Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, $p < 0,05$. --- indica que para esos tratamientos no se llevó a cabo este análisis.

Las hamburguesas de pescado con inóculo (S) tuvieron un pH similar a la muestra control (C), desde el día 1 hasta el día 7 y aumentó significativamente hasta el final del almacenamiento. Esta tendencia podría deberse a la acumulación de compuestos alcalinos, como amoníaco, trimetilamina y otros compuestos que contienen nitrógeno que se forman a partir de la descomposición de proteínas y nucleótidos en el músculo durante el período post-mortem [21,46]. Sin embargo, durante 9 días de almacenamiento, el pH en las muestras de extracto (E) y extracto inoculado (ES) fue significativamente más bajo que en las muestras control (C) e inoculada (S), lo que puede atribuirse al efecto antimicrobiano del extracto contra la acción microbiana y el deterioro enzimático [21,47,48].

3.5 Efecto del extracto etanol-agua sobre el crecimiento microbiano en caldo de pescado durante el almacenamiento.

En la Tabla 12, se puede observar que el extracto inhibió efectivamente el crecimiento de AMB, con altas reducciones en los recuentos (4-6 ciclos logarítmicos) de ES frente a S hasta el día 131 de almacenamiento; además, las muestras E y ES no mostraron diferencias significativas entre ellas. En la muestra C se pudo verificar que se evitó la contaminación cruzada.

El efecto inhibitorio del extracto etanol-agua sobre el crecimiento de *Shew. putrefaciens* es evidente (Tabla 13); los valores de log ufc/g fueron 7 – 8 veces más bajos que en el control (S).

Wright *et al.* [29] reportaron que compuestos como taninos, alcaloides, antraquinonas, flavonoides, polifenoles, fitoesteroides y saponinas presentes en los extractos de *Kunzea pomifera* podrían ser responsables de inhibir el crecimiento de *Shew. putrefaciens*. Por otro lado, Moreira *et al.* [33] indicaron que algunas sustancias aisladas del género *Simira* son alcaloides, cumarinas, esteroides, iridoides, lignanos, diterpenos y triterpenos, algunos de los cuales, como reportan Rondón *et al.* [19], podrían estar asociados con la actividad antibacteriana de un extracto etanólico de *S. ecuadorensis*. *Shew. putrefaciens* no se detectó en las muestras de caldo de pescado C y E durante todo el período de almacenamiento.

Tabla 12. Crecimiento de AMB (log ufc/g) en caldo de pescado durante 131 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con extracto de etanol-agua al 8% (E); con inóculo (S) y con 8% de extracto e inóculo (ES).

		Muestras											
		C				E				S			
Día	0	ND				---				---			
	1	ND	2,92 ±	0,10	b	C				3,50 ±	0,21	a	F
	3	ND	2,94 ±	0,11	b	C				2,96 ±	0,05	b	AB
	7	ND	2,94 ±	0,12	b	C				6,92 ±	0,14	a	E
	14	ND	2,79 ±	0,19	b	C				8,98 ±	0,03	a	BC
	21	ND	2,70 ±	0,34	b	C				8,79 ±	0,08	a	BCD
	28	ND	2,68 ±	0,26	b	C				8,83 ±	0,24	a	BCD
	38	ND	2,85 ±	0,09	b	C				8,50 ±	0,25	a	CD
	44	ND	2,90 ±	0,11	b	C				9,06 ±	0,02	a	B
	65	ND	3,55 ±	0,10	b	B				8,97 ±	0,08	a	BC
	72	ND	3,12 ±	0,13	b	BC				2,91 ±	0,24	b	AB
	84	ND	2,77 ±	0,25	b	C				2,91 ±	0,40	b	AB
	104	ND	4,31 ±	0,38	b	A				3,37 ±	0,26	b	AB
	131	ND	2,85 ±	0,07	b	C				9,30 ±	0,16	a	AB

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). a-b Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas; A-F Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre días de almacenamiento, $p < 0,05$. ND significa por debajo del límite de detección (< 1 ufc/ml). --- indica que para esos tratamientos no se llevó a cabo este análisis.

Tabla 13. Crecimiento de *Shew. putrefaciens* (log ufc/g) en caldo de pescado durante el almacenamiento por 131 días: con inóculo (S); con 8% de extracto etanol-agua e inóculo (ES).

		Muestra			
		S		ES	
Día	0	---		---	
	1	3,42 ± 0,42	a F	2,21 ± 0,09	b A
	3	6,97 ± 0,06	a E	ND	
	7	9,15 ± 0,15	a BC	2,08 ± 0,04	b A
	14	8,75 ± 0,08	a BCD	1,63 ± 0,15	b CD
	21	8,76 ± 0,05	a BCD	1,15 ± 0,15	b E
	28	8,40 ± 0,37	a CD	1,66 ± 0,18	b BCD
	38	8,81 ± 0,13	a BC	ND	b F
	44	8,86 ± 0,04	a BC	2,24 ± 0,06	b A
	65	9,23 ± 0,09	a AB	1,90 ± 0,30	b ABC
	72	9,72 ± 0,17	a A	2,06 ± 0,10	b AB
	84	8,92 ± 0,12	a BCD	2,06 ± 0,15	b A
	104	8,56 ± 0,02	a BC	1,42 ± 0,10	b DE
	131	8,29 ± 0,10	a D	1,63 ± 0,20	b CD

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). a-b Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas; A-F Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre días de almacenamiento, $p < 0,05$. ND significa por debajo del límite de detección (< 1 ufc/ml). --- indica que para esos tratamientos no se llevó a cabo este análisis.

4. Conclusiones

Los resultados de este estudio sugieren que los extractos de *S. ecuadorensis* mostraron actividad antimicrobiana contra *Shew. putrefaciens*, *C. jejuni*, *L. mesenteroides*, *B. cereus*, *Y. enterocolitica* y *C. perfringens*.

El extracto atomizado no demostró efectividad contra *C. jejuni* en las hamburguesas de pollo, aunque desde el primer día mostró una alta eficacia contra el mismo microorganismo en caldo de pollo. Sin embargo, no tuvo ningún efecto sobre AMB en el mismo producto.

Por su parte el extracto etanol-agua fue efectivo en productos de pescado; en el caso de las hamburguesas se pudo evidenciar la reducción del crecimiento de AMB entre los días 3 y 9, y un efecto notorio frente a *Shew. putrefaciens* hasta el día 9 de almacenamiento. También tuvo una gran actividad antimicrobiana frente a AMB y *Shew. putrefaciens* en caldo de pescado durante 131 días de almacenamiento.

5. Referencias bibliográficas

1. Jørgensen, P.M.; León-Yáñez, S. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. St. Louis 1999, 75, 1-1182.
2. WHO. *Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines*; Manila : WHO Regional Office for the Western Pacific: 1992.
3. Armijos, C.; Matailo, A.; Bec, N.; Salinas, M.; Aguilar, G.; Solano, N.; Calva, J.; Ludeña, C.; Larroque, C.; Vidari, G. Chemical composition and selective BuChE inhibitory activity of the essential oils from aromatic plants used to prepare the traditional Ecuadorian beverage horchata lojana. *Journal of Ethnopharmacology* 2020, 263, 113162, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113162>.
4. Armijos Riofrio, C.; Vita Finzi, P.; Gilardoni, G.; Borja Espín, D.; Goetschel Gómez, M.L.; Radice, M.; Guerrini, A.; Scalvenzi, L.; Terán Soto, R.; Aguirre, J.S.; *et al.* *Productos naturales Investigación y Perspectivas en Ecuador*, Primera ed.; Editorial Abya-Yala: 2022.
5. Bailon-Moscoso, N.; Tinitana, F.; Martínez-Espinosa, R.; Jaramillo-Velez, A.; Palacio-Arpi, A.; Aguilar-Hernandez, J.; Romero-Benavides, J.C. Cytotoxic, antioxidative, genotoxic and antigenotoxic effects of Horchata, beverage of South Ecuador. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2017, 17, 539, doi:<https://doi.org/10.1186/s12906-017-2048-x>.
6. Tene, V.; Malagón, O.; Finzi, P.V.; Vidari, G.; Armijos, C.; Zaragoza, T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology* 2007, 111, 63-81, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032>.
7. Arjabi, A.; Anarjan, N.; Jafarizadeh-Malmiri, H. Effects of extracting solvent composition on antioxidant and antibacterial activities of *Alhagi maurorum* extracts. *Journal of Food Processing and Preservation* 2021, 45, e15300, doi:<https://doi.org/10.1111/jfpp.15300>.
8. Armijos, C.; Guamán Balcázar, M.D.C.; Meneses, M.; Suarez, A.I. Antioxidant properties of medicinal plants used in the Southern Ecuador. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2018, 1.
9. Zhang, X.; Li, D.; Meng, Q.; He, C.; Ren, L. Effect of Mulberry Leaf Extracts on Color, Lipid Oxidation, Antioxidant Enzyme Activities and Oxidative Breakdown Products of Raw Ground Beef During Refrigerated Storage. *Journal of Food Quality* 2016, 39, 159-170, doi:<https://doi.org/10.1111/jfq.12187>.

10. Tamkutė, L.; Gil, B.M.; Carballido, J.R.; Pukalskienė, M.; Venskutonis, P.R. Effect of cranberry pomace extracts isolated by pressurized ethanol and water on the inhibition of food pathogenic/spoilage bacteria and the quality of pork products. *Food Research International* 2019, 120, 38-51, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.025>.
11. Bondi, M.; Lauková, A.; de Niederhausern, S.; Messi, P.; Papadopoulou, C. Natural Preservatives to Improve Food Quality and Safety. *Journal of Food Quality* 2017, 2017, 1090932, doi:<https://doi.org/10.1155/2017/1090932>.
12. Bouarab Chibane, L.; Degraeve, P.; Ferhout, H.; Bouajila, J.; Oulahal, N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2019, 99, 1457-1474, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>.
13. Carcho, M.; Barreiro, M.F.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R. Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2014, 13, 377-399, doi:<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>.
14. Da Cruz Cabral, L.; Fernández Pinto, V.; Patriarca, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology* 2013, 166, 1-14, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026>.
15. Gottardi, D.; Bukvicki, D.; Prasad, S.; Tyagi, A.K. Beneficial Effects of Spices in Food Preservation and Safety. 2016, 7, doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01394>.
16. Vargas-Ramella, M.; Lorenzo, J.; Zamuz, S.; Valdés, M.E.; Moreno, D.; Balcázar, M.C.G.; Fernández-Arias, J.M.; Reyes, J.F.; Franco, D.J.A. The Antioxidant Effect of Colombian Berry (*Vaccinium meridionale* Sw.) Extracts to Prevent Lipid Oxidation during Pork Patties Shelf-Life. *Antioxidants* 2021, 10, 1290.
17. Aguirre Mendoza, Z.; Geada-Lopez, G. Estado de conservación de los bosques secos de la provincia de Loja, Ecuador. *Arnaldoa* 2017, 24, 207-228, doi:<https://doi.org/10.22497/arnaldoa.241.24107>.
18. Aguirre, Z. *Especies Forestales de los Bosques Secos de Ecuador. Guía Dendrológica para su Identificación y Caracterización. Proyecto Manejo Forestal Sostenible ante el Cambio Climático. MAE/FAO-Finlandia*; Quito, Ecuador, 2012; p. 140 p.
19. Rondón, M.; Moncayo, S.; Cornejo, X.; Santos, J.; Villalta, D.; Siguencia, R.; Duche, J. Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University - Science* 2017, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.03.009>.

20. Mayekar, V.M.; Ali, A.; Alim, H.; Patel, N. A review: Antimicrobial activity of the medicinal spice plants to cure human disease. *Plant Science Today* 2021, 8, 629–646, doi:<https://doi.org/10.14719/pst.2021.8.3.1152>.
21. Miranda, J.M.; Zhang, B.; Barros-Velázquez, J.; Aubourg, S.P. Preservative Effect of Aqueous and Ethanolic Extracts of the Macroalga *Bifurcaria bifurcata* on the Quality of Chilled Hake (*Merluccius merluccius*). *Molecules* 2021, 26, 3774.
22. Elez Garofulić, I.; Malin, V.; Repajić, M.; Zorić, Z.; Pedisić, S.; Sterniša, M.; Smole Možina, S.; Dragović-Uzelac, V. Phenolic Profile, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity of Nettle Leaves Extracts Obtained by Advanced Extraction Techniques. *Molecules* 2021, 26, 6153.
23. Sterniša, M.; Bucar, F.; Kunert, O.; Smole Možina, S. Targeting fish spoilers *Pseudomonas* and *Shewanella* with oregano and nettle extracts. *International Journal of Food Microbiology* 2020, 328, 108664, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108664>.
24. García-Sánchez, L.; Melero, B.; Jaime, I.; Rossi, M.; Ortega, I.; Rovira, J. Biofilm formation, virulence and antimicrobial resistance of different *Campylobacter jejuni* isolates from a poultry slaughterhouse. *Food Microbiology* 2019, 83, 193-199, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.016>.
25. Ma, L.; Wang, Y.; Shen, J.; Zhang, Q.; Wu, C. Tracking *Campylobacter* contamination along a broiler chicken production chain from the farm level to retail in China. *International Journal of Food Microbiology* 2014, 181, 77-84, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.023>.
26. Melero, B.; Juntunen, P.; Hänninen, M.-L.; Jaime, I.; Rovira, J. Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. *Food Microbiology* 2012, 32, 124-128, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.020>.
27. Musthafa, K.S.; Sirirak, T.; Paosen, S.; Voravuthikunchai, S.P. Antimicrobial effect of *Eleutherine americana* bulb extract on the growth of *Campylobacter jejuni* in broiler meat. *Journal of Food Measurement and Characterization* 2021, 15, 4112-4118, doi:<https://doi.org/10.1007/s11694-021-00951-5>.
28. WHO/FAO. Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens. 2009, <https://www.fao.org/3/a1469e/a1469e.pdf>.
29. Wright, M.H.; Matthews, B.; Arnold, M.S.J.; Greene, A.C.; Cock, I.E. The prevention of fish spoilage by high antioxidant Australian culinary plants: *Shewanella putrefaciens*

- growth inhibition. *International Journal of Food Science & Technology* 2016, 51, 801-813, doi:<https://doi.org/10.1111/ijfs.13026>.
30. Carrión-Granda, X.; Fernández-Pan, I.; Rovira, J.; Maté, J.I. Effect of Antimicrobial Edible Coatings and Modified Atmosphere Packaging on the Microbiological Quality of Cold Stored Hake (*Merluccius merluccius*) Fillets. *Journal of Food Quality* 2018, 2018, doi:<https://doi.org/10.1155/2018/6194906>.
 31. Albertos, I.; Rico, D.; Diez, A.M.; González-Arnáiz, L.; García-Casas, M.J.; Jaime, I. Effect of edible chitosan/clove oil films and high-pressure processing on the microbiological shelf life of trout fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2015, 95, 2858-2865, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.7026>.
 32. Satomi, M.; Vogel, B.F.; Venkateswaran, K.; Gram, L. Description of *Shewanella glacialipiscicola* sp. nov. and *Shewanella algidipiscicola* sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that *Shewanella affinis* is a later heterotypic synonym of *Shewanella colwelliana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007, 57, 347-352, doi:<https://doi.org/10.1099/ijls.0.64708-0>.
 33. Moreira, V.; Vieira, I.; Braz-Filho, R. Chemical Constituents and Biological Activities of *Simira* Genus: A Contribution to the Chemotaxonomic of Rubiaceae Family. *The Natural Products Journal* 2014, 4, 290-298, doi:<http://dx.doi.org/10.2174/2210315505666141211225600>.
 34. Othman, L.; Sleiman, A.; Abdel-Massih, R.M. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Frontiers in Microbiology* 2019, 10, doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00911>.
 35. Tamokou, J.D.D.; Mbaveng, A.T.; Kuete, V. Chapter 8 - Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, Kuete, V., Ed.; Academic Press: 2017; pp. 207-237.
 36. Tamkutė, L.; Vaicekauskaitė, R.; Gil, B.M.; Rovira Carballido, J.; Venskutonis, P.R. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) pomace extracts inhibit food pathogenic and spoilage bacteria and increase the microbiological safety of pork products. *Journal of Food Processing and Preservation* 2021, 45, e15220, doi:<https://doi.org/10.1111/jfpp.15220>.
 37. Piskernik, S.; Klančnik, A.; Riedel, C.T.; Brøndsted, L.; Možina, S.S. Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions. *Food Control* 2011, 22, 718-724, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.002>.

38. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 2004, 94, 223-253, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
39. Jones, R.J. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Microbiology* 2004, 90, 273-282, doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00310-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00310-6).
40. Kryževičūtė, N.; Jaime, I.; Diez, A.M.; Rovira, J.; Venskutonis, P.R. Effect of raspberry pomace extracts isolated by high pressure extraction on the quality and shelf-life of beef burgers. *International Journal of Food Science & Technology* 2017, 52, 1852-1861, doi:<https://doi.org/10.1111/ijfs.13460>.
41. Arancibia, H.; Pitcher, T.; Livingston, M. An overview of hake and hoki fisheries: analysis of biological, fishery and economic indicators. In *Hakes: Biology and exploitation*; 2015; pp. 324-340.
42. Schelegueda, L.I.; Delcarlo, S.B.; Gliemmo, M.F.; Campos, C.A. Effect of antimicrobial mixtures and modified atmosphere packaging on the quality of Argentine hake (*Merluccius hubbsi*) burgers. *LWT - Food Science and Technology* 2016, 68, 258-264, doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.012>.
43. Wright, M.H.; Shalom, J.; Matthews, B.; Greene, A.C.; Cock, I.E. *Terminalia ferdinandiana* Exell: Extracts inhibit *Shewanella* spp. growth and prevent fish spoilage. *Food Microbiology* 2019, 78, 114-122, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.006>.
44. Gómez-Estaca, J.; López de Lacey, A.; López-Caballero, M.E.; Gómez-Guillén, M.C.; Montero, P. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology* 2010, 27, 889-896, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.012>.
45. Albertos, I.; Jaime, I.; Diez, A.M.; González-Arnáiz, L.; Rico, D. Carob seed peel as natural antioxidant in minced and refrigerated (4 °C) Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *LWT - Food Science and Technology* 2015, 64, 650-656, doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.037>.
46. Lahreche, T.; Ucar, Y.; Kosker, A.; Hamdi, T.; Ozogul, F. Combined impacts of oregano extract and vacuum packaging on the quality changes of frigate tuna muscles stored at 3±1°C. *Veterinary World* 2019, 12, 155-164, doi:<https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.155-164>.
47. Apang, T.; Xavier, K.A.M.; Lekshmi, M.; Kannuchamy, N.; Layana, P.; Balange, A.K. *Garcinia* spp. extract incorporated icing medium as a natural preservative for shelf life

- enhancement of chilled Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*). *LWT - Food Science and Technology* 2020, 133, 110086, doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110086>.
48. Bensid, A.; Ucar, Y.; Bendeddouche, B.; Özogul, F. Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during chilled storage. *Food Chemistry* 2014, 145, 681-686, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.106>.

CAPÍTULO 3

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *PIPER CARPUNYA* Y SU EFECTO SOBRE LA VIDA ÚTIL EN MODELOS ALIMENTARIOS

En este capítulo se presentarán los resultados del estudio de algunas de las propiedades de extractos de *Piper carpunya* (guaviduca) y su efecto al aplicarse en modelos alimentarios. Se consideraron cuatro extractos obtenidos con solventes y procesos diferentes, se los denominó como: etanol (ETOH), etanol-agua 50:50 (ETOH-H₂O), atomizado (ATOM) y liofilizado (H₂O). La primera parte del estudio consistió en evaluar *in vitro* su actividad antimicrobiana frente a 20 cepas microbianas patógenas y de deterioro, que frecuentemente se encuentran en los alimentos, para lo que se usó el método de difusión en agar.

Tres de los cuatro extractos estudiados tuvieron efecto inhibitorio sobre algunas cepas microbianas. El ETOH fue el más efectivo sobre *Listeria innocua* siendo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 80 mg/ml, *Yersinia enterocolitica* (CMI 40 mg/ml), *Shewanella* sp., *Shew. putrefaciens* y *Campylobacter jejuni* (CMI de 20 mg/ml) y *Clostridium perfringens* (CMI de 10 mg/ml). El H₂O fue efectivo sobre *Brochothrix thermosphacta* y *C. perfringens* (CMI de 80 mg/ml), *Bacillus cereus* (CMI 40 mg/ml), y el ETOH-H₂O frente a *B. thermosphacta* y *C. jejuni* (CMI de 80 mg/ml), *Y. enterocolitica* (CMI 40 mg/ml) y *C. perfringens* (CMI 20 mg/ml). El extracto ATOM presentaba contaminación y no permitió realizar estas pruebas. Los extractos etanol-agua y liofilizado presentaron efecto sobre *C. perfringens*.

La segunda parte consistió en la aplicación de los extractos ETOH-H₂O y H₂O que dieron los mejores resultados *in vitro* en modelos alimentarios elegidos en función de la afinidad para el crecimiento de *Clostridium perfringens*. Como modelo alimentario para la “prueba de desafío” se eligió un producto a base de arroz cocido tipo *risotto*. El extracto ETOH-H₂O tuvo una mayor efectividad tanto para *C. perfringens* como para AMB (*Aerobic Mesophilic Bacteria*) y psicrófilos.

Además, se determinó que el pH y Aw de los tratamientos con extracto ETOH-H₂O y H₂O tuvieron valores inferiores al control y se encontró que ambos extractos tenían un efecto prooxidante.

El efecto antibacteriano de los extractos de *P. carpunya* indica que podría ser utilizado en conservación de alimentos.

1. Introducción

En la actualidad, la industria de alimentos se enfrenta un desafío significativo: satisfacer la creciente demanda de productos alimenticios más saludables y naturales por parte de los consumidores, manteniendo sus características, e incluso mejorándolas. En este contexto, el concepto de *clean label* o etiqueta limpia se ha convertido en un objetivo clave para muchas empresas alimenticias. Se reporta en algunos trabajos datos importantes que muestran cómo va evolucionando este mercado, por ejemplo, casi el 27% de los nuevos productos envasados lanzados en Europa en el 2013, tenían algún tipo de etiqueta limpia [1]. Así mismo, Asioli *et al* [2] mencionan estudios en los que a través del número de citas del término *clean label* se puede ver el interés que ha ido tomando este tema, aumentando progresivamente el número de citas del término desde solo 2 veces en el año 2000, 18 veces en el 2011 y 77 veces en 2016. No obstante, todavía no está claro qué significa exactamente, ya que hasta el momento no existe una definición formal, ni se ha desarrollado la legislación para regularlo lo que implica que sigue siendo un tema de interpretación subjetivo de los consumidores, profesionales y/o procesadores de alimentos [2-4]. Algunos trabajos han realizado aportes para intentar establecer los lineamientos que permitan la construcción de una definición, es así que se han considerado tres categorías relevantes como: productos orgánicos, naturales y “libres de” aditivos/ingredientes artificiales [5]. Este último es el que los consumidores relacionan más con los productos *clean label* y se refiere a eliminar o reducir al mínimo los ingredientes artificiales, químicos y aditivos en los alimentos procesados, ofreciendo en su lugar productos más naturales y saludables [2,4]. Es en este punto en el que el uso de extractos naturales se ha convertido en una estrategia esencial para alcanzar los estándares de *clean label* en la industria de alimentos ya que además son percibidos como más saludables y seguros para los consumidores [6].

Los extractos naturales son sustancias obtenidas de plantas, frutas, especias y hierbas que se utilizan en la industria de alimentos para realzar el sabor, el color y la conservación y proporcionar beneficios funcionales [7]. Su uso se ha vuelto cada vez más popular debido a su capacidad para reemplazar ingredientes artificiales que a menudo son percibidos por los consumidores como poco saludables; así podemos encontrar colorantes (remolacha, cúrcuma, betacaroteno), saborizantes (extractos de vainilla, almendra, entre otros) y conservantes (extractos de romero, té verde, etc.) [8]. Pese a todas las ventajas que presentan los extractos naturales aún se deben resolver ciertos desafíos que principalmente están relacionados con su costo, estabilidad y disponibilidad [9].

Se ha demostrado que algunas de las propiedades que tienen los extractos son su capacidad antioxidante y antimicrobiana, la primera permite retardar y/o prevenir la oxidación, y la otra eliminar o impedir el desarrollo de bacterias contaminantes, ambas importantes a la hora de mejorar la vida útil de los alimentos y que están relacionadas con altos contenidos de polifenoles, alcaloides, terpenoides, taninos, entre otros [10].

Los países andinos y especialmente el Ecuador es un país considerado megadiverso por su ubicación, encontrándose especies de plantas que aún no han sido estudiadas, pero que algunas comunidades indígenas, que han heredado el conocimiento de sus ancestros las usan para tratar algunas enfermedades o para uso culinario. En este contexto, *Piper carpunya* Ruiz & Pav. (syn. *Piper lenticellosum* C. DC.) es una especie que se usa en fresco o para preparar la bebida tradicional llamada guaviduca, para combatir resfriados, problemas gastrointestinales y dermatológicos, sobre la cual se han desarrollado investigaciones para conocer y/o comprobar sus efectos gastroprotectores, antiinflamatorios, antiparasitarios, anti-*Helicobacter pylori*, etc. [11,12].

Las pruebas comunes para evaluar el efecto antimicrobiano de extractos naturales abarcan una variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como algunos hongos y levaduras. Las bacterias Gram-negativas tienden a ser más resistentes a estas sustancias debido a la presencia de lipopolisacáridos hidrofílicos en su membrana externa, que actúan como una barrera hacia las macromoléculas y compuestos hidrofóbicos lo que proporciona a estas bacterias mayor tolerancia a compuestos antimicrobianos hidrofóbicos como los que se encuentran en los aceites esenciales [13,14].

La familia *Piperaceae* comprende aproximadamente 14 géneros y 1950 especies en todo el mundo [15,16], siendo *Piper* y *Peperomia* los géneros más abundantes (alrededor de 700 y 600 especies, respectivamente) [16]. Para Ecuador se reportan cuatro géneros de la familia *Piperaceae*, incluyendo 215 especies de *Piper*, 75 de ellas endémicas [17].

P. carpunya, así como varias especies del género *Piper* poseen actividad antimicrobiana, siendo capaces de inhibir el crecimiento de bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, entre otras, y hongos como *Candida albicans* [14,18-21]. Sin embargo, a pesar de los resultados encontrados, la aplicación de sus extractos en modelos reales o *in vivo* es limitada, uno de los pocos ejemplos corresponde a la aplicación de un extracto etanólico de *P. carpunya* para controlar el crecimiento del hongo *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* que causa la enfermedad más extendida y económicamente importante que afecta al sector comercial de la producción de rosas en el Ecuador y los resultados indican la eficacia del mismo para prevenir y

controlar la infección por hongos y su viabilidad como una alternativa nueva para el control biológico en este sector [22]. Estas propiedades antimicrobianas y antimicóticas se deben posiblemente al alto contenido de monoterpenos como piperitona, terpineno, limoneno, compuestos como el 1,8-cineol y otros fitoesteroides, y flavonoides que se han encontrado en el análisis fitoquímico de hojas y aceites esenciales de esta especie [8,10,19,23]. Un aspecto que llama la atención es que uno de sus principales componentes el safrol, un compuesto orgánico que se indica también como responsable del efecto antimicrobiano, potencialmente dañino por sus posibles efectos cancerígenos en humanos [19], pero cuya concentración varía mucho en función, entre otros factores, de las condiciones ecológicas, época del año, factores genéticos, ambientales y forma de extracción.

La literatura científica relacionada con la determinación de la capacidad antimicrobiana de esta especie está limitada a varias cepas de bacterias y hongos específicos de los alimentos, por lo que lo destacable de esta investigación es comprobar esta actividad antibacteriana incorporando un mayor número de cepas de bacterias alterantes y patógenas que se encuentran en los alimentos y medir su efectividad al formar parte de la formulación de un alimento. Por tanto, el objetivo de esta investigación es el estudio del efecto de extractos de *P. carpunya* sobre el crecimiento bacteriano *in vitro* y su aplicación en sistemas alimentarios.

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Plantas

Las hojas de guaviduca (*Piper carpunya*) fueron recolectadas el mes de noviembre de 2019 en el barrio Celén, perteneciente a la parroquia rural Gualiel, provincia de Loja-Ecuador.

Una vez recolectadas las hojas, estas fueron llevadas al Laboratorio de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja, donde se realizó su lavado y posterior secado para lo cual se usó un secador de bandejas (DY-110H, Daeyeong E&B CO., Ltd., Ansan, South Korea) a 40 °C por alrededor de 12 horas. A continuación, las muestras secas se molieron, tamizaron, homogenizaron (tamaño de partícula < 350 µm) antes de la extracción y se almacenaron en condiciones de refrigeración hasta su uso en el proceso de extracción.

2.1.2 Preparación de los extractos.

Para la obtención de los extractos se aplicó el método de maceración estática, el cual consistió en dejar en condiciones de refrigeración la mezcla “solvente-agua” en un recipiente ámbar por tres días, mezclando de una a dos veces por día para posteriormente filtrar al vacío.

Se usó agua, etanol y etanol-agua (50:50 v/v) como solventes, en una relación de cinco litros de solvente por kilogramo de hojas. En el caso de los extractos etanólicos, el etanol se evaporó en un rotaevaporador (G1, Heidolph, Schwabach, Alemania) a 40 °C y 150 rpm, y el agua se eliminó por liofilización en un liofilizador (Labconco, Kansas City, MO, USA) con las siguientes condiciones: presión = 0,180 mbar; temperatura = -50 °C por 72 horas; estos extractos se designan en lo sucesivo como ETOH y ETOH-H₂O. Para preparar los extractos acuosos, una parte se congeló a -40 °C liofilizándose posteriormente (utilizando las mismas condiciones mencionadas anteriormente) y la otra parte se mezcló con maltodextrina (3 %) y se secó por atomización (Büchi Mini Spray Dryer B-290, Suiza) a 120 °C y un flujo de alimentación de 6 ml/min, la denominación que se dio a estos extractos es H₂O y ATOM, respectivamente.

Los rendimientos de los extractos ETOH, ETOH-H₂O, H₂O y ATOM fueron 1,71 %, 4,04%, 10,85 % y 13,41 %, respectivamente.

2.2 Fases de la etapa experimental

La primera fase consistió en la determinación de la actividad antimicrobiana *in vivo*, de los extractos de *P. carpunya*, para generar una base de datos, probando el efecto de los extractos frente a 20 especies de microorganismos patógenos y de deterioro que se encuentran en los alimentos, ya que la información encontrada es muy limitada en cuanto a su aplicación en cepas relacionadas con los alimentos.

En la segunda fase, se estudió el efecto inhibitorio de los extractos sobre modelos alimentarios a los que se inocularon la especie relevante seleccionada en la fase *in vitro* (*Clostridium perfringens*). Los alimentos considerados para realizar las pruebas de desafío se seleccionaron en función de aquellos en los que estos microorganismos podrían aparecer, en este caso fue el arroz cocido.

2.3 Actividad antimicrobiana *in vitro*

2.3.1. Especies microbianas

Se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos de *P. carpunya* frente a 20 especies de microorganismos obtenidos de la colección española de cultivos tipo (CECT), del *International*

Life Science Institute (ILSI) y del Hospital Universitario de Burgos-Universidad de Burgos (HUBU-UBU) (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas bacterianas elegidas para este estudio y condiciones de cultivo.

Microorganismo	Cepa bacteriana	Gram	Temperatura de Incubación (°C)	Caldo	Agar de prueba
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	HUBU-UBU 72732	-	37	TSB	Muller Hinton
<i>Escherichia coli</i>	CECT 501	-	37	BHI	Muller Hinton
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 457	-	37	TSB	Muller Hinton
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CECT 559	-	37	TSB	Muller Hinton
<i>Vibrio alginolyticus</i>	CECT 521	-	30	Nutrient caldo + 2 % NaCl	Nutrient agar + 2 % NaCl
<i>Campylobacter jejuni</i>	CECT7572	-	37	BHI	Nutrient + sangre 5 %
<i>Clostridium perfringens</i>	CECT 376	+	42	BHI	Nutrient + sangre 5 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 30	+	37	BHI	Muller Hinton
<i>Listeria monocytogenes</i>	ILSI-4	+	37	BHI	Muller Hinton
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910	+	37	BHI	Muller Hinton
<i>Bacillus cereus</i>	CECT 148	+	30	BHI	Muller Hinton
<i>Enterococcus faecalis</i>	CECT 481	+	37	BHI	Nutrient + sangre 5 %
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	CECT 847	+	26	TSB + Lev 0,6 %	Muller Hinton
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CECT 394	+	30	MRS	MRS
<i>Weissella viridescens</i>	CECT 283	+	30	MRS	MRS
<i>Pseudomonas putida</i>	CECT 3241	-	30	TSB	Muller Hinton
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CECT 378	-	30	TSB	Muller Hinton
<i>Aeromonas caviae</i>	CECT 838	-	30	TSB	Muller Hinton
<i>Shewanella putrefaciens</i>	CECT 5346	-	30	TSB	Muller Hinton
<i>Shewanella</i> sp.	CECT 4640	-	30	TSB	Muller Hinton

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; ILSI: *International Life Science Institute*; HUBU-UBU: Hospital de Burgos-Universidad de Burgos

2.3.2 Determinación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de todos los extractos se evaluó mediante el método de difusión en agar, con modificaciones [24,25]. La superficie de la placa de agar se inoculó esparciendo 250 µl del inóculo microbiano sobre toda la superficie del agar, las bacterias de prueba se usaron en un número de 10^8 ufc/ml. Luego se hace un agujero de 7 mm de diámetro en las placas utilizando una pipeta esterilizada. Los extractos fueron diluidos a 80 mg/ml, usando agua desionizada y dimetil sulfóxido (DMSO) en una proporción de 1:1, posteriormente se introdujo 40 µl en los pocillos. Las placas se incubaron por 24 a 48 horas en las condiciones adecuadas dependiendo del microorganismo de prueba y la actividad antimicrobiana de las muestras se determinó midiendo el diámetro del halo de inhibición que se forma, usando un calibre. Una solución agua-DMSO se usó como control negativo, mientras que una solución de hipoclorito de sodio (0,94 %) se usó como control positivo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las condiciones de cultivo de los microorganismos seleccionados se presentan en la Tabla 1.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó sólo con los microorganismos que presentaron zonas de inhibición. Los extractos de *P. carpunya* se diluyeron, al igual que se menciona en el apartado anterior, en agua-DMSO, para preparar las concentraciones de prueba: 40, 20, 10, 5 mg de extracto/ml, y se aplicó el método de difusión en agar, descrito en el apartado anterior. La concentración más baja (mg/ml) de extracto que inhibió visiblemente el crecimiento de las bacterias analizadas se consideró como el valor CMI. Los ensayos se hicieron por triplicado.

2.4 Pruebas de desafío

Se llevó a cabo una prueba de desafío o *Challenge test* [26,27] con modificaciones, para evaluar el efecto de los extractos sobre un producto a base de arroz tipo *risotto*, elegido como sistema alimentario de prueba ya que es un excelente medio de crecimiento de *B. cereus* y *C. perfringens*.

2.4.1 Preparación del inóculo

En este estudio se usaron dos cepas de referencia *Clostridium perfringens* (CECT 563 y CECT 376). Para la preparación de los inóculos de *C. perfringens*, el primer paso fue realizar una siembra por estría en placas de agar nutritivo con 5% de sangre de cordero de Oxoid LTD (Hampshire, Reino Unido), después se incubaron a 37 °C durante 24 h en una atmósfera anaeróbica (< 0,15 % O₂, 1 - 15 % CO₂) generada por AeroGen® (Thermo Scientific, Reino Unido).

Se transfirió una colonia aislada de las placas correspondientes a cada cepa y se inoculó en tubos con 5 ml de caldo infusión cerebro corazón (*brain heart infusion* - BHI) (Oxoid, Reino Unido), que se incubaron durante toda la noche en condiciones de anaerobiosis. Al día siguiente, tras su crecimiento, se ajustó la concentración de ambas suspensiones de cepas de *C. perfringens* con caldo BHI por densidad óptica a 8 log ufc/ml. Luego, se mezclaron a partes iguales (1:1) y se diluyeron con agua estéril para obtener una población de células viables de 6 log ufc/ml, con la cual se inoculó a una tasa máxima del 1% de la masa o volumen del producto (para no modificar sus propiedades). En las muestras que no llevaban microorganismo se añadió agua estéril en la misma proporción.

2.4.2 Preparación del producto

Se simuló un producto precocinado de tipo *risotto* con 3,5% de contenido graso, que permitió realizar tanto el estudio del efecto antimicrobiano, como del efecto antioxidante de los extractos de guaviduca.

Para la elaboración del modelo alimentario de prueba, se revisaron fichas técnicas de *risottos* comerciales, que junto a resultados de pruebas previas permitieron establecer las cantidades de los diferentes ingredientes, es así que, para 100 g de producto se mezclaron: 25 g “arroz redondo” (Hacendado), 16,70 g “nata ligera para cocinar” (Hacendado), 27,80 g “leche entera” (Hacendado) y 30,50 ml agua, ingredientes que se colocaron en bolsas plásticas y se sellaron al vacío para posteriormente colocarlas en un baño maría (Selecta, Barcelona) durante 30 minutos controlando que se mantenga una temperatura entre 80 - 85 °C para conseguir una correcta cocción del arroz y una textura similar al producto simulado.

Cada tratamiento se dosificó en bolsas limpias tratadas 15 minutos bajo luz UV las cuales se rellenaron con 5 g del alimento modelo, en el caso de las muestras con extracto previamente se añadió 8 % de este al *risotto* cocido. Con relación al experimento con *C. perfringens*, se prepararon y codificaron seis lotes de *risotto* de la siguiente forma: C, tratamiento control (sin extracto); E, con extracto ETOH-H₂O; L, extracto liofilizado; P, con el inóculo (*C. perfringens*); EP, inóculo y extracto ETOH-H₂O y LP, inóculo y extracto liofilizado.

Considerando que la vida útil de la matriz alimentaria elegida es de alrededor de 30 días, las muestras fueron analizadas después de 0, 1, 4, 7, 15 y 30 días, mantenidas en refrigeración (5 °C). Las muestras C y P son las únicas que se analizaron el día 0, como referencia del estado higiénico de partida. Para cada día de análisis se necesitaron dos muestras (5 g cada una) de cada tratamiento para el análisis microbiológico y dos muestras adicionales de C, E y L para el análisis del estado de oxidación, actividad de agua y pH.

2.4.3 *Análisis microbiológicos*

Se transfirió asépticamente 10 g de *risotto* a una bolsa estéril de muestreo con filtro de superficie total (BagPage, Bruselas-Bélgica) y se homogenizó con 90 ml de solución Ringer (Oxoid, Barcelona-España) usando un homogeneizador (Stomacher 400, Seward, Londres-UK) por 2 minutos. Se prepararon diluciones decimales según la necesidad para poder hacer la siembra sobre los medios sólidos.

Para el estudio del efecto de los extractos sobre la evolución del crecimiento de *C. perfringens*, se utilizaron dos medios de cultivo: uno de ellos agar de recuento en placa (*plate count agar* - PCA) de Conda (Madrid, España) en placas de vertido incubadas durante 24 h a 30 °C para evaluar si tienen influencia en la microbiota general (*aerobic mesophilic bacteria* - AMB), y otras con el mismo medio incubadas durante 10 días a 5 °C para verificar el efecto sobre las bacterias psicrófilas. El otro medio correspondió a placas de agar sulfito de triptona con neomicina (*tryptone sulphite neomycin agar* - TSN) como medio sólido específico de *C. perfringens*, las cuales se incubaron a 37 °C por 24 horas en condiciones anaerobias. En ambos casos se realizó la siembra de profundidad y los resultados se expresaron en log ufc/g.

2.4.4 *Determinación de pH*

El pH se midió con un pH-metro (microPH2001, CRISON, Barcelona-España) con un electrodo de punción, calibrado utilizando soluciones de buffer fosfato (pH 4 y 7). Se realizaron tres mediciones cambiando el lugar de inserción del electrodo.

2.4.5 *Determinación de la actividad de agua (Aw)*

La actividad de agua (*Aw*) se midió por triplicado con el equipo AQUALAB 4TE (Aqualab, Estados Unidos).

2.4.6 *Oxidación lipídica*

Se evaluó a través de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) que se determinaron usando 10 g de muestra previamente triturada, a la que se añadió 50 ml de agua destilada y se homogenizó en un Ultra Turrax (IKA T25 basic, Staufen, Alemania). Posteriormente se agregó 47,50 ml de agua destilada y 2,50 ml de HCl 4N (hasta pH 1,50) llevando la mezcla a ebullición con unas gotas de antiespumante (Scharlau, Barcelona). Toda la mezcla se destiló en un equipo de destilación (Foss Tecator, Suecia) hasta obtener 50 ml de destilado (filtrándolo si fuera necesario). Se tomó 5 ml y junto con 5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,02M) se colocó en tubos de vidrio, se agitó e incubó a 96 °C en un baño de agua durante 40 minutos. Se enfriaron los tubos y se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro (HITACHI, Japón) a 538 nm. Los valores de TBARS fueron determinados utilizando una curva de calibración con 1,1,3,3

tetraetoxipropano (TEP) como estándar. Los resultados se expresaron en miligramos de malondialdehído (MDA) por kilogramo de muestra.

2.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media aritmética $\pm$ desviación estándar. La diferencia entre medias se determinó mediante un ANOVA simple usando el paquete estadístico Statgraphics XVII-X64. La prueba de Tukey se usó para determinar si hay diferencias significativas entre los tratamientos a $p < 0,05$.

3. Resultados y Discusión

3.1 Actividad antimicrobiana *in vitro*

Se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de cuatro extractos de *Piper carpunya* frente a 20 bacterias patógenas o alterantes de los alimentos, los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2. Como se puede observar 8 de las 20 bacterias ensayadas se vieron afectadas y se produjeron zonas de inhibición de entre 8 a 16 mm, obteniéndose valores de CMI de 20 a 80 mg/ml (Tabla 3).

En esta investigación se demostró que el extracto ETOH tuvo el mayor efecto antimicrobiano al inhibir el crecimiento de *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Yersinia enterocolitica*, *Shewanella* sp., *Shewanella putrefaciens*, *Clostridium perfringens* y *Campylobacter jejuni*, lo que puede deberse a su alto contenido de compuestos volátiles ya que los solventes alcohólicos son los mejores para lograr un mayor nivel de extracción de estos [28,29]. Entre los más destacables se encuentran 1,8-cineol [30] y safrol [31-33], ambos caracterizan al género *Piper* y están presentes como componentes mayoritarios. También se pudo encontrar trabajos en otras especies de *Piper* en los que relacionan la actividad antimicrobiana con la presencia de piperitona y monoterpenos como α -pineno y β -pineno [34,35].

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de extractos de *P. carpunya* expresada como el diámetro del área de inhibición (mm). Valores promedio de tres repeticiones ($n = 3$).

Microorganismo	Extractos			
	ETOH	H2O	ETOH-H2O	Control positivo
<i>Bacillus cereus</i>	8	9	ni	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	ni	ni	ni	13
<i>Escherichia coli</i>	ni	ni	ni	17
<i>Listeria monocytogenes</i>	ni	ni	ni	16
<i>Listeria innocua</i>	9	ni	ni	13
<i>Salmonella enterica</i>	ni	ni	ni	15
<i>Shigella sonnei</i>	ni	ni	ni	16
<i>Yersinia enterocolitica</i>	9	ni	9	19
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	ni	7	8	24
<i>Pseudomonas putida</i>	ni	ni	ni	16
<i>Pseudomona fluorescens</i>	ni	ni	ni	19
<i>Aeromona caviae</i>	ni	ni	ni	20
<i>Shewanella</i> sp.	9	ni	ni	29
<i>Shewanella putrefaciens</i>	8	ni	ni	27
<i>Clostridium perfringens</i>	13	10	16	11
<i>Campylobacter jejuni</i>	15	7	8	15
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ni	ni	ni	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	ni	ni	ni	11
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ni	ni	ni	19
<i>Weissella viridescens</i>	ni	ni	ni	21

ni, no inhibido; Control positivo: Solución de hipoclorito de sodio (0,94%); Extractos: ETOH (extraído con etanol), ETOH-H2O (extraído con etanol-agua) y H2O (extraído con agua y liofilizado). Disco 7 mm

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos de *P. carpunya* (mg/ml). Valores promedio de tres repeticiones ($n = 3$).

Microorganismos	Extractos		
	ETOH	H2O	ETOH-H2O
<i>Bacillus cereus</i>	80	40	
<i>Listeria innocua</i>	80		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	40		40
<i>Brochothrix thermosphacta</i>		80	80
<i>Shewanella</i> sp.	20		
<i>Shewanella putrefaciens</i>	20		
<i>Clostridium perfringens</i>	10	80	20
<i>Campylobacter jejuni</i>	20	80	80

Rango de concentración 5 – 80 mg/ml; Extractos: ETOH (extraído con etanol), ETOH-H2O (extraído con etanol-agua) y H2O (extraído con agua y liofilizado)

El extracto ETOH de *P. carpunya* ejerció actividad antimicrobiana frente a *L. innocua* con CMI de 80 mg/ml, *Y. enterocolitica* con 40 mg/ml, *Shew. sp.*, *Shew. putrefaciens*, *C. jejuni* con una CMI de 20 mg/ml y 10 mg/ml frente a *C. perfringens*. La CMI del extracto liofilizado, por su parte, fue de 80 mg/ml frente a *B. thermosphacta*, *C. perfringens* y *C. jejuni*; y 40 mg/ml frente a *B. cereus*. El extracto ETOH-H2O presentó CMI de 80 mg/ml contra *B. thermosphacta* y *C. jejuni*; 40 mg/ml frente a *Y. enterocolitica* y 20 mg/ml frente a *C. perfringens*. En general se consideran valores altos si se comparan con los reportados para el aceite esencial de esta misma especie por Valarezo *et al.* [19] los cuales reportan una CMI de 500 µg/ml para *Klebsella pneumoniae* y Rondón *et al.* [20] con CMI de 100 µg/ml para *S. aureus*, 200 µg/ml para *E. coli*, 300 µg/ml para *K. pneumoniae*, 800 µg/ml para *P. aeruginosa* y 900 µg/ml frente a *Enterococcus faecalis*. También se encontraron investigaciones que probaron extractos de *P. carpunya*, en el caso de extractos etanólicos a 25 mg/ml presentaron inhibición frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *B. cereus* y *C. albicans* [36] y en el caso de un extracto metanólico presentaron efecto antibacteriano alto contra *E. coli* y leve contra *P. aeruginosa* [21].

Para desarrollar la segunda parte del estudio sobre alimentos modelo, se eligió un extracto etanólico y otro acuoso, ya que, como se ha descrito anteriormente, el tipo de disolvente influye en la composición del extracto. Como se pudo observar, la actividad antimicrobiana fue notablemente más elevada en el extracto etanólico (ETOH). Sin embargo, debido a su bajo rendimiento de extracción (1,71%), resultó poco viable para la realización de estudios adicionales. Por consiguiente, su posible aplicación en matrices alimentarias estaría limitada, por ello, se optó en su lugar por el extracto ETOH-H2O (con rendimiento de 4,04%). De

los dos extractos acuosos con actividad antimicrobiana similar, se prefirió el liofilizado debido a su rendimiento (10,85 %) y la ausencia de contaminación microbiológica.

3.2 Efecto antimicrobiano de los extractos liofilizado y etanol-agua de *P. carpunya* en *risotto* durante el almacenamiento.

Para esta parte del estudio se seleccionó *Clostridium perfringens*, por ser la cepa más sensible a los tres extractos probados. Esta es una bacteria patógena Gram-positiva, anaeróbica, con forma de bastón que forma esporas y es capaz de producir toxinas. Se distribuye ampliamente en la naturaleza y en el tracto intestinal de humanos y animales [37]. La intoxicación alimentaria, que incluye diarreas y calambres abdominales, se produce al comer alimentos contaminados, en los que el número bacteriano se acerca a 8 log ufc/g [38].

En esta segunda parte del estudio, se trataba de comprobar si el efecto *in vitro* observado, se mantiene o no en producto. Para ello, se evaluó el potencial antimicrobiano de los extractos de *P. carpunya*, midiendo su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. perfringens* y AMB en *risotto* precocinado.

En cuanto al crecimiento de *C. perfringens*, según los datos presentados en la Tabla 4, se puede observar que en las muestras no inoculadas (C, L y E) no hay crecimiento del microorganismo, o está por debajo del límite de detección (< 1 log ufc/ml).

En cuanto a los tratamientos inoculados, se puede ver que el día 0 inician con recuentos de alrededor de 5 logaritmos que se deben específicamente al inóculo ya que los extractos de partida (E y L) no manifiestan presencia de este microorganismo. En general se puede observar que los extractos tienen efecto antimicrobiano ya que desde el día cero disminuye significativamente el recuento de la bacteria en los tratamientos EP y LP frente al tratamiento P. Dicha diferencia se mantiene hasta el día 21 en el caso del tratamiento EP, pero en LP el día uno ya no tiene diferencia estadística respecto a P, lo que podría interpretarse como un menor efecto antimicrobiano del extracto L. Esta diferencia entre los extractos podría explicarse ya que las mezclas acuosas de etanol son más efectivas a la hora de obtener un mayor nivel de compuestos fenólicos [29,39]. Con los extractos acuosos, en cambio, se consigue obtener altos rendimientos de polisacáridos, proteínas y péptidos activos [29].

El extracto ETOH-H₂O de guaviduca disminuyó significativamente, dos ciclos logarítmicos aproximadamente, el recuento de *C. perfringens* hasta el día 7, comparado con el tratamiento P y mantuvo recuentos inferiores a los del tratamiento a P hasta el día 21 de almacenamiento. Lo anterior ratifica los resultados obtenidos *in vitro*. Su propiedad antimicrobiana se asocia con sus componentes como 1,8-cineol [30], safrol [31,32], piperitona, monoterpenos como α -pineno y β -pineno [34,35] compuestos que caracterizan al género *Piper*.

Además, se puede observar que en los tratamientos con inóculo (P, EP, LP) hay una disminución significativa, durante el periodo de almacenamiento, de la cantidad de *C. perfringens*, lo que se puede deber a las condiciones de refrigeración (4 °C) en las que se almacenaron las muestras para el estudio de vida útil. Varios estudios que buscaban determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento o supervivencia de este microorganismo encontraron que a temperaturas inferiores a 10 °C no sobrevivían, posiblemente, debido a la falta de síntesis de ácidos grasos insaturados como mecanismo de adaptación de la bacteria a esas condiciones ambientales [40,41].

En la Tabla 5 se presentan los recuentos de bacterias aerobias mesófilas (AMB), un indicador del deterioro bacteriano y del final de la vida útil del producto. Se observa un aumento significativo en el recuento de colonias a medida que avanzan los días de almacenamiento, llegando en todos los casos a cifras entre 3 y 6 logaritmos en el último día de análisis.

Se confirmó la actividad antibacteriana del tratamiento con extracto ETOH-H₂O (E), ya que los recuentos de bacterias aerobias mesófilas (AMB) desde el día 15 hasta el final del almacenamiento fueron significativamente menores en comparación con el tratamiento control (C), mostrando una diferencia de entre 2 a 4 logaritmos.

Al examinar los resultados del tratamiento con extracto ETOH-H₂O con inóculo (EP), se constata que hasta el día 4 los recuentos son significativamente inferiores a los del tratamiento que sólo tiene el inóculo (P). Sin embargo, la actividad del extracto parece disminuir posteriormente, posiblemente debido a su interacción con componentes de los alimentos como lípidos, proteínas y carbohidratos [42,43], aunque aún muestra una ligera diferencia, especialmente el día 21. Además, al compararlo con el tratamiento H₂O con inóculo (LP), sigue manteniendo valores significativamente menores.

El tratamiento con extracto H₂O (L), por otro lado, exhibe un recuento elevado desde el inicio del experimento, aproximadamente 4,50 logaritmos, lo cual posiblemente se deba a una contaminación cruzada en alguna etapa de su proceso de extracción.

Tabla 4. Crecimiento de *C. perfringens* (log ufc/g) en risotto durante 30 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con 8 % de extracto etanol-agua (E); con 8 % de extracto liofilizado (L); con inóculo (P); con 8 % de extracto etanol-agua e inóculo (EP); con 8 % de extracto liofilizado e inóculo (LP).

Muestras	C	E	L	P	EP	LP
0	ND	ND	ND	5,28 ± 0,11 a A	4,99 ± 0,14 b A	4,69 ± 0,17 c A
1	ND	ND	ND	4,74 ± 0,23 a AB	2,99 ± 0,40 b B	4,15 ± 0,11 a A
4	ND	ND	ND	4,31 ± 0,32 a BC	2,25 ± 0,37 c BC	3,43 ± 0,19 b AB
Día 7	ND	ND	ND	3,67 ± 0,17 a C	1,72 ± 1,50 bc BCD	2,36 ± 0,25 ab BC
15	ND	ND	ND	1,55 ± 0,28 a D	ND	1,62 ± 0,27 a CD
21	ND	ND	ND	ND	ND	1,19 ± 1,04 CD
30	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-c Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas; A-D letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, $p < 0,05$. ND significa por debajo del límite de detección (< 1 ufc/ml).

88

Tabla 5. Crecimiento de *AMB* (log ufc/g) en risotto durante 30 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con 8 % de extracto etanol-agua (E); con 8 % de extracto liofilizado (L); con inóculo (P); con 8 % de extracto etanol-agua e inóculo (EP); con 8 % de extracto liofilizado e inóculo (LP).

Muestras	C	E	L	P	EP	LP
0	ND	ND	4,57 ± 0,15 b BC	ND	1,30 ± 0,00 c CD	5,31 ± 0,03 a ABC
1	ND	ND	4,44 ± 0,17 a BC	3,55 ± 0,21 a C	1,36 ± 0,32 b CD	4,17 ± 1,10 a C
4	ND	1,73 ± 0,26 b ABC	4,20 ± 0,28 a C	4,14 ± 0,11 d BC	1,00 ± 0,00 bc D	4,08 ± 0,14 a C
Día 7	1,26 ± 1,10 b B	3,03 ± 0,63 ab A	4,87 ± 0,14 a AB	4,72 ± 0,00 ab ABC	2,80 ± 0,70 ab BC	4,58 ± 0,10 a BC
15	6,60 ± 0,17 a A	2,18 ± 1,38 c AB	4,81 ± 0,30 abc AB	5,14 ± 1,55 ab ABC	3,45 ± 0,87 bc B	5,58 ± 0,20 ab AB
21	5,77 ± 0,32 a A	3,57 ± 0,79 c A	4,86 ± 0,11 ab AB	5,95 ± 0,40 a A	4,15 ± 0,13 bc B	5,84 ± 0,40 a AB
30	5,34 ± 0,26 ab A	3,18 ± 0,46 c A	5,19 ± 0,08 ab A	5,38 ± 0,28 ab AB	4,31 ± 1,09 bc B	5,85 ± 0,06 a A

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-d Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas; A-D letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, $p < 0,05$. ND significa por debajo del límite de detección (< 1 ufc/ml).

Así mismo, se pudo notar que los tratamientos L y LP tienen un recuento inicial superior a 3 log ufc/g, que como se mencionó anteriormente puede deberse a una contaminación del extracto. En cuanto a los tratamientos E, L, EP y LP de manera general se puede observar que los recuentos finales alcanzaron valores de entre 4 y 5 log ufc/g, inferiores a los de las muestras C y P, lo que podría indicar el efecto antimicrobiano de los extractos, de los cuales, los tratamientos con extracto ETOH-H₂O (E) son significativamente menores que los presentados para L, P y LP hasta el día 21 de almacenamiento, llegando a tener una diferencia de entre 2 y 3 logaritmos. Complementariamente, al analizar y comparar EP y P, se puede ver una disminución significativa entre el día 7 y 21 de alrededor de 2 logaritmos, lo que confirma su actividad antimicrobiana obtenida *in vitro*.

3.3 Efecto de los extractos liofilizado y etanol-agua de *P. carpunya* sobre el pH de *risotto* durante el almacenamiento.

El pH en los alimentos está asociado con su seguridad, pues cambios en este parámetro puede suponer reacciones químicas y microbianas que indican el estado de deterioro de los alimentos, además, el pH se relaciona con las propiedades sensoriales y de textura de los alimentos [45,46].

En la Tabla 7, se aprecia que el pH de todos los tratamientos se mantiene relativamente estable durante el almacenamiento, aunque se observa una ligera disminución, posiblemente debido a la hidrólisis de lípidos y la consiguiente formación de ácidos grasos libres. Por otro lado, al realizar la comparación entre tratamientos, los correspondiente a los extractos (L y E) tienen valores desde el día 0 significativamente más bajos que C especialmente el tratamiento E ya que al día 30, aún mantiene esta característica, hay que recordar que en su composición los extractos pueden tener presencia de ácidos orgánicos, como el ascórbico o fenólico [47,48], que podrían ser la causa de esta particularidad.

Tabla 6. Crecimiento de bacterias psicrófilas (log ufc/g) en risotto durante 30 días de almacenamiento: sin inóculo (C); con 8 % de extracto etanol-agua (E); con 8 % de extracto liofilizado (L); con inóculo (P); con 8 % de extracto etanol-agua e inóculo (EP); con 8 % de extracto liofilizado e inóculo (LP).

Muestras	C	E	L	P	EP	LP
0	ND	ND	3,21 ± 0,21 a B	ND	ND	3,64 ± 0,10 a BC
1	1,05 ± 0,91 bc C	ND	3,48 ± 0,18 a B	ND	1,00 ± 0,00 bc C	2,14 ± 1,61 ab C
4	2,78 ± 1,41 ab BC	ND	3,53 ± 0,54 a B	1,90 ± 0,17 abc C	1,40 ± 0,37 bc BC	3,41 ± 0,52 a BC
Día 7	3,45 ± 1,98 ab ABC	ND	3,42 ± 0,10 ab B	3,98 ± 0,00 a B	1,26 ± 0,24 bc BC	2,86 ± 0,14 ab BC
15	4,12 ± 2,54 ab ABC	2,21 ± 0,96 b B	4,05 ± 0,39 ab B	6,06 ± 0,00 a A	4,18 ± 0,00 ab A	3,75 ± 0,65 ab ABC
21	5,45 ± 0,46 a AB	2,99 ± 0,41 b AB	5,40 ± 0,70 a A	5,45 ± 1,13 a A	2,59 ± 0,78 b B	5,60 ± 0,22 a A
30	7,23 ± 0,32 a A	4,35 ± 1,16 a A	4,34 ± 0,78 a AB	6,15 ± 0,00 a A	4,35 ± 0,50 a A	4,85 ± 1,60 a AB

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-c Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas; A-C Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, $p < 0,05$. ND significa por debajo del límite de detección (< 1 ufc/ml).

Tabla 7. pH en risotto durante 30 días de almacenamiento: Control sin extractos (C); con 8 % de extracto etanol-agua (E) y con 8 % de extracto liofilizado (L).

Muestras	C	E	L
0	7,00 ± 0,06 a AB	6,43 ± 0,04 c A	6,73 ± 0,04 b A
1	6,95 ± 0,03 a AB	6,48 ± 0,06 a A	6,80 ± 0,19 a A
Día 4	7,07 ± 0,01 a A	6,42 ± 0,16 b A	6,77 ± 0,08 ab A
7	6,95 ± 0,06 a AB	6,32 ± 0,00 c A	6,70 ± 0,02 b A
15	6,97 ± 0,08 a AB	6,36 ± 0,04 c A	6,68 ± 0,05 b A
30	6,83 ± 0,00 a B	6,40 ± 0,13 b A	6,71 ± 0,04 a A

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-c Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas; A-B Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, $p < 0,05$.

3.4 Efecto de los extractos liofilizado y etanol-agua de *P. carpunya* sobre la actividad de agua (Aw) de *risotto* durante el almacenamiento.

La Aw es un factor intrínseco de los alimentos que tiene incidencia sobre la textura, sabor, color, gusto, valor nutricional del producto y tiempo de conservación ya que posibilitan o dificultan el crecimiento microbiano en los alimentos [46,49].

Tabla 8. Aw en *risotto* durante 30 días de almacenamiento: control sin extractos (C); con 8 % de extracto etanol-agua (E) y con 8 % de extracto liofilizado (L).

Muestras	C	E	L
0	0,995 ± 0,005 a A	0,977 ± 0,000 b A	0,976 ± 0,002 b A
1	0,997 ± 0,000 a A	0,975 ± 0,001 b A	0,978 ± 0,001 b A
4	0,997 ± 0,000 a A	0,978 ± 0,001 b A	0,977 ± 0,005 b A
7	0,996 ± 0,001 a A	0,974 ± 0,004 b A	0,973 ± 0,003 b A
15	0,994 ± 0,001 a A	0,976 ± 0,011 a A	0,976 ± 0,006 a A
30	0,996 ± 0,002 a A	0,980 ± 0,004 b A	0,982 ± 0,002 b A

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-b Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas entre los tratamientos, $p < 0,05$.

En términos generales, la Tabla 8 muestra que la Aw del *risotto* es alta. El uso de extractos de guaviduca (E y L) provoca una disminución significativa en la Aw. Esta reducción podría influir sobre los recuentos microbianos más bajos en las muestras con extractos [49]. Además, es notable que los valores de Aw para cada tratamiento permanecen estadísticamente iguales hasta el final del almacenamiento.

3.5 Efecto de los extractos liofilizado y etanol-agua de *P. carpunya* sobre la oxidación de *risotto* durante el almacenamiento.

La oxidación lipídica es un fenómeno que induce modificaciones de los lípidos, ocurre a través de la formación de radicales libres a través de una serie de reacciones en cadena, que afectan a las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos. Al hablar de estabilidad oxidativa se haría referencia a la resistencia a la formación de dichos radicales libres [50]. Uno de los productos secundarios de la peroxidación lipídica es el MDA, que no es deseable en los productos alimenticios y se determina analíticamente al formar productos coloreados en la reacción con el TBA [46].

Al observar los datos de la Tabla 9, en general se puede notar que todos los valores son bajos, lo que implica que al día 30 se tendrían cambios que desde el punto de vista sensorial posiblemente no afecten las características sensoriales del producto, tomando en cuenta los

criterios que algunos autores indican, por ejemplo, que valores a partir de 2 mg de malondialdehído por kg de carne, es el rango en el que los consumidores pueden detectar la rancidez [51].

Tabla 9. Malondialdehído (mg/kg) en risotto durante 30 días de almacenamiento: control sin extractos (C); con 8% de extracto etanol-agua (E) y con 8% de extracto liofilizado (L).

Muestras	C	E	L
0	0,02 ± 0,02 b A	0,20 ± 0,05 a A	0,13 ± 0,01 ab A
1	0,01 ± 0,00 b A	0,23 ± 0,00 a A	0,19 ± 0,02 a A
4	0,03 ± 0,02 b A	0,27 ± 0,02 a A	0,18 ± 0,02 a A
7	0,08 ± 0,10 a A	0,32 ± 0,10 a A	0,22 ± 0,14 a A
15	0,07 ± 0,09 a A	0,32 ± 0,13 a A	0,26 ± 0,12 a A
30	0,03 ± 0,03 b A	0,29 ± 0,02 a A	0,23 ± 0,01 a A

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-b Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticas, $p < 0,05$.

Realizando una comparación entre tratamientos, se puede observar que el tratamiento C, presenta valores significativamente menores a los tratamientos E y L, lo que implicaría que los extractos provocan un efecto prooxidante, lo que contradice la idea inicial que se tenía sobre los compuestos presentes en la planta y sus extractos, este fenómeno se puede explicar ya que los flavonoides pueden cambiar de antioxidantes a prooxidantes en función de la concentración considerada [52,53]. Además, los valores de MDA para cada tratamiento permanecieron estadísticamente iguales durante todo el almacenamiento.

4. Conclusiones

Dada la escasez de información científica, este trabajo representa uno de los primeros esfuerzos por investigar la aplicación de extractos de *Piper carpunya* en la industria alimentaria. Se pudo evidenciar que estos extractos tienen una importante actividad antibacteriana, afectando principalmente a *B. cereus*, *L. innocua*, *B. thermosphacta*, *Y. enterocolitica*, *Shewanella* sp., *S. putrefaciens*, *C. perfringens* y *C. jejuni*. De los extractos estudiados el ETOH fue el más efectivo, pero con muy bajo rendimiento, seguido por el ETOH-H₂O y el H₂O, en ese orden. El extracto ETOH-H₂O, tuvo una alta efectividad contra *C. perfringens* en risotto desde el día 1 hasta el 21 de almacenamiento en refrigeración, frente a AMB hasta el día 4 y también se observó un efecto sobre la microbiota psicrófila. El extracto H₂O, por su parte, tuvo menos efecto ya que los recuentos menores de la bacteria se dieron hasta el día 4 de almacenamiento y prácticamente no hubo diferencia en AMB y psicrófilos, frente al tratamiento con inóculo. El pH y Aw del risotto con extracto etanol-agua y liofilizado tuvieron valores inferiores al control y

se encontró que ambos extractos tenían un efecto prooxidante posiblemente causado por la concentración del extracto, aunque los valores de malondialdehído eran bajos. Todo lo anterior sugiere que los extractos de *P. carpunya* pueden considerarse como un ingrediente natural prometedor en el ámbito de la seguridad microbiológica de los alimentos.

5. Referencias bibliográficas

1. Ingredion. The clean label guide in Europe. Available online: <https://www.ingredion.com/content/dam/ingredion/pdf-downloads/emea/87%20-%20The%20Clean%20Label%20Guide%20to%20Europe%20from%20Ingredion.pdf> (accessed on 24/09/2023).
2. Asioli, D.; Aschemann-Witzel, J.; Caputo, V.; Vecchio, R.; Annunziata, A.; Næs, T.; Varela, P. Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International* 2017, 99, 58-71, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.022>.
3. Lomba-Viana, X.; Raymundo, A.; Prista, C.; Alegria, M.J.; Sousa, I. Clean Label “Rocha” Pear (*Pyrus communis* L.) Snack Containing Juice By-Products and *Euglena gracilis* Microalgae. *Frontiers in Nutrition* 2022, 9, doi:<https://doi.org/10.3389/fnut.2022.825999>.
4. Karwowska, M.; Munekata, P.E.S.; Lorenzo, J.M.; Tomasevic, I. Functional and Clean Label Dry Fermented Meat Products: Phytochemicals, Bioactive Peptides, and Conjugated Linoleic Acid. *Applied Sciences* 2022, 12, 5559.
5. Schroeder, J. Study finds consumers don't understand “clean labels.”. *Food Safety Quality & Safety* 2016.
6. Munekata, P.E.S.; Pateiro, M.; Domínguez, R.; Nieto, G.; Kumar, M.; Dhama, K.; Lorenzo, J.M. Bioactive Compounds from Fruits as Preservatives. *Foods* 2023, 12, 343.
7. Delgado-Pando, G.; Ekonomou, S.I.; Stratakis, A.C.; Pintado, T. Clean Label Alternatives in Meat Products. *Foods* 2021, 10, 1615.
8. Carocho, M.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R. Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology* 2015, 45, 284-295, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>.
9. Nishad, J. Chapter 5 - Stability of plant extracts. In *Plant Extracts: Applications in the Food Industry*, Mir, S.A., Manickavasagan, A., Shah, M.A., Eds.; Academic Press: 2022; pp. 89-126.

10. Li, S.; Jiang, S.; Jia, W.; Guo, T.; Wang, F.; Li, J.; Yao, Z. Natural antimicrobials from plants: Recent advances and future prospects. *Food Chemistry* 2024, 432, 137231, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137231>.
11. Trabadela, C.; Sanchez-Fidalgo, S.; Mino, P.; Berenguer, B. Gastroprotective Effects of *Piper carpunya* Against Diclofenac-Induced Gastric Lesions in Rats. *Pharmaceutical biology* 2008, 46.
12. Quílez, A.; Berenguer, B.; Gilardoni, G.; Souccar, C.; de Mendonça, S.; Oliveira, L.F.S.; Martín-Calero, M.J.; Vidari, G. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. *Journal of Ethnopharmacology* 2010, 128, 583-589, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.060>.
13. Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology* 2012, 3, doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>.
14. Mgbeahuruike, E.E.; Yrjönen, T.; Vuorela, H.; Holm, Y. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. *South African Journal of Botany* 2017, 112, 54-69, doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.007>.
15. Whitmore, T.C. The plant book — A portable dictionary of the higher plants: By D. J. Mabberley. Cambridge University Press, Cambridge. 1987. 706 pp. ISBN 0 521 34060 8. *Biological Conservation* 1988, 45, 311-312, doi:[https://doi.org/10.1016/0006-3207\(88\)90062-6](https://doi.org/10.1016/0006-3207(88)90062-6).
16. Ramirez, J.; Cartuche, L.; Morocho, V.; Aguilar, S.; Malagon, O. Antifungal activity of raw extract and flavanons isolated from *Piper ecuadorensis* from Ecuador. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2013, 23, 370-373, doi:<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000012>.
17. Jørgensen, P.M.; León-Yáñez, S. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. St. Louis* 1999, 75, 1-1182.
18. Armijos, C.; Ramírez, J.; Salinas, M.; Vidari, G.; Suárez, A.I. Pharmacology and Phytochemistry of Ecuadorian Medicinal Plants: An Update and Perspectives. *Pharmaceuticals* 2021, 14, 1145.
19. Valarezo, E.; Rivera, J.X.; Coronel, E.; Barzallo, M.A.; Calva, J.; Cartuche, L.; Meneses, M.A. Study of Volatile Secondary Metabolites Present in *Piper carpunya* Leaves and in the Traditional Ecuadorian Beverage Guaviduca. *Plants* 2021, 10, 338.

20. Rondón, M.E.; Velasco, J.; Cornejo, X.; Fernández, J.; Morocho, V. *Chemical composition and antibacterial activity of Piper lenticellosum C.D.C essential oil collected in Ecuador*; Issue: 8: 2016; Volume Volume: 6, pp. 156-159.
21. Andrea, A.; Carmita Jaramillo, J.; Diana San, M.; Haydelba D'Armas, R. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador / Analysis of antimicrobial effect of twelve medicinal plants of ancient use in Ecuador. *CIENCIA UNEMI* 2016, 9, doi:<https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp11-18p>.
22. Cárdenas, C.; Pozo, W.; Rojas, M.; Roque, A.; Mihai, R. Antifungal Activity of two Botanical Extracts on Rose Crop (*Rosa L. Sp.*), Against *Sphaerotheca Pannosa* Var. *Rosae*. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2016, 10, 465-474, doi:<https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.09.017>.
23. Cañon-Ibarra, A.F.; Sanchez-Castañeda, M.P.; Arbelaez, L.M.; Sanchez, L.T.; Pinzon, M.I.; Villa, C.C. Natural Antimicrobials. In *Natural Additives in Foods*, Valencia, G.A., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2023; pp. 69-85.
24. Arjabi, A.; Anarjan, N.; Jafarizadeh-Malmiri, H. Effects of extracting solvent composition on antioxidant and antibacterial activities of *Alhagi maurorum* extracts. *Journal of Food Processing and Preservation* 2021, 45, e15300, doi:<https://doi.org/10.1111/jfpp.15300>.
25. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibnsouda, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2016, 6, 71-79, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
26. EURL Lm (European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*). EURL Lm Guidance document to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests and durability studies related to *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. 2023.
27. Osés, S.M.; Diez, A.M.; Gómez, E.M.; Wilches-Pérez, D.; Luning, P.A.; Jaime, I.; Rovira, J. Control of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in suckling-lamb meat evaluated using microbial challenge tests. *Meat Science* 2015, 110, 262-269, doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.08.004>.
28. Mayekar, V.M.; Ali, A.; Alim, H.; Patel, N. A review: Antimicrobial activity of the medicinal spice plants to cure human disease. *Plant Science Today* 2021, 8, 629–646, doi:<https://doi.org/10.14719/pst.2021.8.3.1152>.
29. Miranda, J.M.; Zhang, B.; Barros-Velázquez, J.; Aubourg, S.P. Preservative Effect of Aqueous and Ethanolic Extracts of the Macroalga *Bifurcaria bifurcata* on the Quality of Chilled Hake (*Merluccius merluccius*). *Molecules* 2021, 26, 3774.

30. Hendry, E.R.; Worthington, T.; Conway, B.R.; Lambert, P.A. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009, 64, 1219-1225, doi:<https://doi.org/10.1093/jac/dkp362>.
31. Dognini, J.; Meneghetti, E.K.; Teske, M.N.; Begnini, I.M.; Rebelo, R.A.; Dalmarco, E.M.; Verdi, M.; de Gasper, A.L. Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. *Journal of Essential Oil Research* 2012, 24, 241-244, doi:<https://doi.org/10.1080/10412905.2012.676768>.
32. Sauter, I.P.; Rossa, G.E.; Lucas, A.M.; Cibulski, S.P.; Roehe, P.M.; da Silva, L.A.A.; Rott, M.B.; Vargas, R.M.F.; Cassel, E.; von Poser, G.L. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products* 2012, 40, 292-295, doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.025>.
33. Valarezo, E.; Benítez, L.; Palacio, C.; Aguilar, S.; Armijos, C.; Calva, J.; Ramírez, J. Volatile and non-volatile metabolite study of endemic ecuadorian specie *Piper lanceifolium* Kunth. *Journal of Essential Oil Research* 2021, 33, 182-188, doi:<https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1848650>.
34. Morales, A.; Rojas, J.; Moujir, L.M.; Araujo, L.; Rondón, M. Chemical composition, antimicrobial and cytotoxic activities of piper hispidum SW. Essential oil collected in venezuela. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2013, 3, 16-20, doi:<https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3603>.
35. Marzouk, B.; Fredj, M.B.H.; Chraief, I.; Mastouri, M.; Boukef, K.; Marzouk, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 2008, 6, 78-82.
36. Salamanca, S.; Galiano, M. Actividad antimicrobiana de cuatro especies del género *Piper* y elucidación estructural de sus aceites esenciales. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2016.
37. Duan, Z.; Hansen, T.H.; Hansen, T.B.; Dalgaard, P.; Knøchel, S. Predicting outgrowth and inactivation of *Clostridium perfringens* in meat products during low temperature long time heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 2016, 230, 45-57, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.019>.
38. Luo, K.; Wang, J.; Kim, S.Y.; Kim, S.H.; Oh, D.H. Experimental studies and modeling the behavior of anaerobic growth of *Clostridium perfringens* in cooked rice under non-

- isothermal conditions. *Food Control* 2017, 71, 137-142, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.029>.
39. Alothman, M.; Bhat, R.; Karim, A.A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry* 2009, 115, 785-788, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.005>.
 40. De Jong, A.E.I.; Rombouts, F.M.; Beumer, R.R. Behavior of *Clostridium perfringens* at low temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 2004, 97, 71-80, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.030>.
 41. Li, J.; McClane, B.A. Further Comparison of Temperature Effects on Growth and Survival of *Clostridium perfringens* Type A Isolates Carrying a Chromosomal or Plasmid-Borne Enterotoxin Gene. *Applied and Environmental Microbiology* 2006, 72, 4561-4568, doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.00177-06>.
 42. Piskernik, S.; Klančnik, A.; Riedel, C.T.; Brøndsted, L.; Možina, S.S. Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions. *Food Control* 2011, 22, 718-724, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.002>.
 43. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 2004, 94, 223-253, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
 44. Dhaulaniya, A.S.; Balan, B.; kumar, M.; Agrawal, P.K.; Singh, D.K. Cold survival strategies for bacteria, recent advancement and potential industrial applications. *Archives of Microbiology* 2019, 201, 1-16, doi:<https://doi.org/10.1007/s00203-018-1602-3>.
 45. Šulniute, V.; Jaime, I.; Rovira, J.; Venskutonis, P.R. Rye and Wheat Bran Extracts Isolated with Pressurized Solvents Increase Oxidative Stability and Antioxidant Potential of Beef Meat Hamburgers. *Journal of Food Science* 2016, 81, H519-H527, doi:<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13197>.
 46. Tamkutė, L.; Gil, B.M.; Carballido, J.R.; Pukalskienė, M.; Venskutonis, P.R. Effect of cranberry pomace extracts isolated by pressurized ethanol and water on the inhibition of food pathogenic/spoilage bacteria and the quality of pork products. *Food Research International* 2019, 120, 38-51, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.025>.
 47. Dimić, E.B.; Vujasinović, V.B.; Radočaj, O.F.; Pastor, O.P. Characteristics of blackberry and raspberry seeds and oils. *Acta Periodica Technologica* 2012, 43, 1-9, doi:<https://doi.org/10.2298/APT1243001D>.
 48. Kryževičūtė, N.; Jaime, I.; Diez, A.M.; Rovira, J.; Venskutonis, P.R. Effect of raspberry pomace extracts isolated by high pressure extraction on the quality and shelf-life of beef

- burgers. *International Journal of Food Science & Technology* 2017, 52, 1852-1861, doi:<https://doi.org/10.1111/ijfs.13460>.
49. Albertos, I.; Rico, D.; Diez, A.M.; González-Arnáiz, L.; García-Casas, M.J.; Jaime, I. Effect of edible chitosan/clove oil films and high-pressure processing on the microbiological shelf life of trout fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2015, 95, 2858-2865, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.7026>.
 50. Nieto, G.; Skibsted, L.H.; Andersen, M.L.; Ros, G. Actividad antioxidante y prooxidante del aceite esencial de ajo por resonancia de spin electrónica. *Anales de Veterinaria de Murcia* 2012, 28, 23-33, doi:<https://doi.org/10.6018/j/188691>.
 51. Wood, J.D.; Richardson, R.I.; Nute, G.R.; Fisher, A.V.; Campo, M.M.; Kasapidou, E.; Sheard, P.R.; Enser, M. Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Science* 2004, 66, 21-32, doi:[https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00022-6).
 52. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997, 22, 749-760, doi:[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00351-6).
 53. Nieto, G.; Huvaere, K.; Skibsted, L.H. Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system. *European Food Research and Technology* 2011, 233, 11-18, doi:<https://doi.org/10.1007/s00217-011-1486-9>.

CAPÍTULO 4

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE *SIMIRA ECUADORENSIS*,
PIPER CARPUNYA E *ILEX GUAYUSA* Y SU POTENCIAL USO PARA EVITAR LA
OXIDACIÓN LIPÍDICA EN ALIMENTOS**

Esta investigación buscó explorar la capacidad antioxidante de extractos obtenidos de *Simira ecuadorensis*, *Piper carpunya* e *Ilex guayusa*. Se prepararon cuatro extractos de cada especie utilizando distintos solventes y procesos: etanol (ETOH), etanol-agua 50:50 (ETOH-H₂O), atomizado (ATOM) y liofilizado (H₂O). En una primera etapa, se evaluó *in vitro* la capacidad antioxidante de cada extracto mediante métodos como DPPH, FRAP, ABTS y se cuantificó el contenido de fenoles totales. La segunda fase incluyó la aplicación de estos extractos (8%) en hamburguesas de cerdo, formando seis lotes: sin extracto (B), Eritorbato de Sodio 500 mg/kg (ERY), y los extractos mencionados previamente con la misma codificación. Se evaluó la oxidación de lípidos utilizando el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y se monitoreó el pH durante 14 días de almacenamiento en refrigeración. Los extractos ETOH-H₂O de *P. carpunya* y *S. ecuadorensis* exhiben la mayor capacidad antioxidante, mientras que los extractos de *I. guayusa* muestran la menor capacidad, excepto el extracto H₂O, que revela la mayor concentración de compuestos fenólicos al compararse con los extractos de las otras especies. La incorporación de estos extractos naturales (ETOH-H₂O, ETOH y H₂O de *S. ecuadorensis*; ETOH y H₂O de *P. carpunya*; ETOH-H₂O y ETOH de *I. guayusa*) reduce significativamente la oxidación lipídica en hamburguesas de cerdo hasta el día 14. Estos resultados sugieren que los extractos de hojas de las tres especies evaluadas en este estudio podrían ser una alternativa eficaz a los antioxidantes sintéticos comerciales para mejorar la calidad y prolongar la vida útil de las hamburguesas de cerdo.

1. Introducción

Los alimentos que consumimos provienen de plantas y animales, su calidad se va perdiendo de manera progresiva en función del avance del tiempo, es decir, es un proceso inevitable que afecta a su estabilidad, seguridad y vida útil. Se producen cambios físicos, químicos y microbiológicos que modifican sus características sensoriales y nutricionales. La oxidación, el enranciamiento, el deterioro microbiano y la acción de las enzimas son algunas causas de la pérdida de calidad de los alimentos.

La vida útil de un alimento o el tiempo de duración mínima es la fecha hasta la cual un alimento conserva propiedades específicas como sabor, aroma, apariencia y/o alguna cualidad que se relacionan con el producto [1]. Los productores de alimentos, los científicos y las sociedades han estado muy comprometidos con la protección y mejora de producción de los alimentos frescos y procesados, contra daños químicos, físicos y microbianos [2]. La oxidación de los lípidos sigue siendo un reto para la industria de alimentos, ya que produce una serie de efectos perjudiciales sobre la calidad de los alimentos, algunos de ellos correspondientes a sabores desagradables, cambios de aroma, color, textura, pérdida de nutrientes, generación de sustancias volátiles perjudiciales que causan la rancidez (aldehídos, cetonas y alcoholes), entre otros [2,3]. Estas reacciones parecen seguir vías conocidas que ocurren simultáneamente y en competición, es por esto que se han ideado varios métodos para su evaluación, aunque no existe ninguno que permita el seguimiento simultáneo de todos los eventos oxidativos o que sea igualmente aplicable para todas las etapas del proceso o a todas las grasas, todos los alimentos y todas las condiciones de procesamiento, por lo que una sola prueba puede monitorear solo unos pocos cambios, de modo que se usan combinadas [4]. Algunas de las pruebas que se consideran frecuentemente para estimar la capacidad antioxidante son el 2,2-azinobis (ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), poder antioxidante reductor férrico (FRAP) y capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) [5].

Para enfrentar la oxidación de los lípidos y procesos de enranciamiento o cambios de color, la industria alimentaria ha considerado como una de sus estrategias la combinación de antioxidantes, los cuales cumplen su objetivo mediante tres tipos de interacciones: sinergismo, efecto aditivo y antagonismo, que pueden ser afectados por el tipo de matriz alimentaria, pH, tipo, concentración y/o proporción de antioxidante, interacción con otros componentes del alimento y condiciones del proceso [2]. Un antioxidante es una molécula que inhibe o retrasa significativamente la oxidación de sustratos oxidables, generalmente en bajas concentraciones

[2,6], que está presente naturalmente en los alimentos o se puede agregar o formar durante el procesamiento [2].

Durante varios años, la industria ha recurrido al uso de antioxidantes sintéticos, como el hidroxianisol butilado (BHA), la butilhidroquinona terciaria (THBQ) y el hidroxitolueno butilado (BHT), sin embargo, estos aditivos tienen efectos negativos para la salud por su posible toxicidad y por una sospecha de acción como promotores de carcinogénesis [1,7-9], lo que ha aumentado el interés y la demanda de aditivos alimentarios de origen natural por parte de los consumidores. A este fenómeno se lo conoce como tendencia hacia la etiqueta limpia o *clean label* [10,11]. Los antioxidantes naturales más importantes son los compuestos fenólicos, estos compuestos muestran efectos interesantes sobre la salud humana, especialmente contra el cáncer, la osteoporosis, las cataratas, las disfunciones cardiovasculares, las enfermedades cerebrales y las afecciones inmunológicas [12]. Además, pueden ser agregados a matrices alimentarias por su amplia eficacia en la conservación de alimentos al inhibir y retrasar la oxidación de lípidos [4]. Los extractos de plantas generalmente son ricos en compuestos fenólicos, varios de ellos usados como condimentos en el procesamiento de alimentos muestran gran actividad antioxidante [13]. La industria cárnica es una de las que ha considerado e incrementando las opciones de extractos naturales con actividad antioxidante etiqueta limpia en sus productos y procesos, los cuales son reconocidos como seguros (GRAS) por la FDA, algunos de ellos son: café, semilla de uva, té verde, orégano, eneldo, perejil y extracto de romero [14]. La Unión Europea por su parte solamente ha reconocido al extracto de romero como antioxidante de uso en la industria cárnica, con el número E392 [12,14].

En la industria cárnica, restaurantes de comidas rápidas y en los hogares, las carnes picadas y particularmente las hamburguesas son uno de los productos más comunes por su flexibilidad, adaptabilidad y facilidad de preparación, pero a diferencia de un corte entero, por el proceso de picado y la consecuente desintegración de membranas musculares se liberan compuestos que catalizan reacciones entre moléculas prooxidantes y compuestos insaturados [7,15]. Además, es muy susceptible a sufrir procesos de deterioro por el crecimiento y metabolismo de microorganismos los cuales producen olores desagradables, gases, limosidad, y oxidación de lípidos y pigmentos, que se manifiestan por la decoloración ocasionada [11,16]. Por todo ello, se buscan alternativas para mejorar su conservación y extender su vida útil.

Uno de los marcadores químicos asociado directamente con la oxidación lipídica de productos cárnicos es el TBARS, el cual proporciona información acerca de la frescura o el grado de deterioro de la carne relacionado con la oxidación. Se basa en la determinación del compuesto coloreado que se genera al reaccionar el ácido tiobarbitúrico (TBA) con el

malondialdehído (MDA) compuesto altamente reactivo que se forma como consecuencia de la autólisis de los ácidos grasos poliinsaturados [17,18].

Varios trabajos han reportado la actividad antioxidante de extractos de plantas medicinales del sur del Ecuador, determinándose su capacidad para eliminar los radicales libres y su interesante contenido en compuestos fenólicos, los cuales podrían ser los responsables de las aplicaciones terapéuticas que los pueblos ancestrales dan a estas plantas medicinales.

Una investigación en la que se han incluido 37 especies pertenecientes a 23 familias botánicas de plantas medicinales del sur del Ecuador, reportó que las familias *Piperaceae*, *Onagraceae*, *Clusiaceae*, *Ericaceae* y *Lycopodiaceae* pueden considerarse como una buena fuente de antioxidantes, con contenidos fenólicos totales de entre 5222,90 mg GAE/g hasta 20,90 mg GAE/g de extracto, entre 364,80 to 843,30 μ M TE/mg en el ensayo de ABTS y de 946,30 μ g Trolox/mg a 213,40 μ M TE/mg de extracto en DPPH [19].

En el caso de las especies consideradas en este estudio se ha encontrado para *Piper carpunya* que su propiedad antioxidante evaluada por DPPH era de $71,88 \pm 1,53$ mmol TE/g [20], sin embargo, Valarezo *et al.* [21], indican que el aceite esencial de esta misma especie mostró poca actividad antioxidante (12 % y 22 % de captación de radicales a 1000 ppm de concentración para el ensayo de DDPH y ABTS, respectivamente). Para *Simira ecuadorensis* el contenido de fenoles totales es moderado con valores de 346,28 mg GAE/100 g (base seca) [22] y para *Ilex guayusa* se han reportado valores de fenoles totales de 54,86, 106,62 y 59,47 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g (base seca) para hojas verdes, blanqueadas y fermentadas, respectivamente, y una capacidad antioxidante de 33, 35,40 y 19,70 mmol Trolox/100 g (base seca) determinada por DPPH para esos mismos tratamientos, en el orden dado anteriormente [23].

De todo lo anteriormente mencionado, se puede deducir que la investigación sobre la aplicación de estas especies en modelos alimentarios sigue siendo limitada. Por ello, el propósito de este estudio fue evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de *S. ecuadorensis*, *P. carpunya* e *I. guayusa*, así como su efecto en la oxidación lipídica de hamburguesas de cerdo durante el almacenamiento.

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Plantas

En diciembre de 2019, se llevó a cabo la recolección de hojas frescas de tres plantas distintas en diversas localidades de Ecuador. Las hojas de *Simira ecuadorensis*, conocida como

guápala, fueron recolectadas en el cantón Zapotillo, provincia de Loja. Por otro lado, las hojas de *Piper carpunya*, conocida como guaviduca, fueron obtenidas en la parroquia Gualiel, también en el cantón Loja. Además, las hojas de *Ilex guayusa*, conocida como guayusa, fueron recolectadas en el cantón Yantzaza, situado en la provincia amazónica de Zamora Chinchipe

2.1.2 Preparación de las hojas

Las hojas de las tres especies siguieron un procedimiento uniforme: fueron lavadas con agua y luego sometidas a un proceso de secado utilizando un secadero de bandejas (modelo DY-110H, Daeyeong E&B CO., Ltd., Asan, Corea del Sur) a una temperatura de 40 °C durante un período de 12 horas. Una vez completado el secado, las hojas fueron molidas, tamizadas para obtener un tamaño de partícula inferior a 350 µm y almacenadas en refrigeración hasta el momento de la extracción de los compuestos de interés.

2.1.3 Preparación de los extractos

Se empleó el método de maceración estática para la obtención de los extractos, que consistió en dejar reposar la mezcla de solvente y agua en un recipiente ámbar en condiciones refrigeradas durante tres días. Durante este proceso, se realizó una agitación manual de una a dos veces al día, seguida de una filtración al vacío.

Los solventes utilizados fueron agua, etanol y una mezcla de etanol-agua (50:50 v/v), en una proporción de cinco litros de solvente por kilogramo de hojas. Para los extractos etanólicos, el etanol se evaporó en un rotaevaporador (modelo G1, Heidolph, Schwabach, Alemania) a 40°C y 150 rpm. Por su parte, el agua se eliminó por liofilización en un liofilizador (Labconco, Kansas City, MO, USA) bajo las siguientes condiciones: presión = 0,180 mbar; temperatura = -50 °C durante 72 horas. Estos extractos fueron designados como ETOH y ETOH-H₂O, respectivamente.

Para la preparación de los extractos acuosos, una porción fue congelada a -40 °C y posteriormente liofilizada, siguiendo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Otra porción se mezcló con maltodextrina (3 %) y se secó por atomización en un atomizador (Büchi Mini Spray Dryer B-290, Suiza) a 120 °C y un flujo de alimentación de 6 ml/min. Estos extractos se denominaron H₂O y ATOM, respectivamente.

Los rendimientos de los extractos son una medida que refleja la cantidad de extracto obtenido en relación con el peso inicial de las hojas, lo cual indica la eficiencia del proceso de extracción. En este estudio, se lograron los rendimientos que aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento tras la extracción de hojas frescas de guápala (*S. ecuadorensis*), guaviduca (*P. carpunya*) y guayusa (*I. guayusa*).

Extractos	Rendimiento (%)		
	<i>S. ecuadorensis</i>	<i>P. carpunya</i>	<i>I. guayusa</i>
Atomizado	17,41	18,60	4,65
Liofilizado	15,17	7,29	7,50
Etanol-agua	11,61	11,49	0,78
Etanol	4,90	0,64	1,19

2.2 Determinación de actividad antioxidante y fenoles totales

Se utilizaron tres métodos distintos para evaluar la actividad antioxidante de los extractos: DPPH, FRAP y ABTS, además de la determinación de fenoles totales como indicador del índice global de compuestos antioxidantes.

2.2.1 Contenido de fenoles totales

Para cuantificar el contenido de polifenoles totales en los extractos, se empleó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, adaptado según el protocolo descrito por Thaipong *et al.* [5]. Los resultados obtenidos se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo en base seca (mg EAG/g BS).

Se reconstituyó cada extracto con el solvente utilizado durante la maceración (agua destilada, etanol o una mezcla de etanol-agua en proporción (1:1)) y se ajustó cada uno para alcanzar una concentración inicial de 5000 ppm.

Se procedió a preparar una solución de Folin-Ciocalteu 0,25 N combinando 25 ml de Folin 2 N con 175 ml de agua destilada, además de una solución de carbonato de sodio 1 N (5 g disueltos en 25 ml de agua destilada).

La medición de la absorbancia se realizó a 725 nm utilizando un espectrofotómetro UV (HITACHI, Japón), empleando curvas estándar de ácido gálico con concentraciones entre 0,01 y 0,10 mg/ml. Cada extracto y estándar se trató tomando 150 µl de la solución, a los que se añadieron 2400 µl de agua destilada y 150 µl de Folin-Ciocalteu 0,25 N. Después de agitar durante 2 minutos y permitir una reacción de 3 minutos, se incorporaron 300 µl de carbonato de sodio (1 N), dejando reposar la solución durante 2 horas en oscuridad. Las lecturas se efectuaron por triplicado a 25 °C.

2.2.2 Método DPPH

La actividad antioxidante de las muestras y los estándares se determinó mediante el método de la actividad de captación de radicales utilizando el radical DPPH utilizando el método descrito por Scherer y Godoy [24] con algunas modificaciones.

Se preparó una solución patrón disolviendo 11,83 mg de DPPH en 50 ml de etanol. La solución de trabajo se preparó mezclando 10 ml de solución patrón con 100 ml de etanol hasta obtener una lectura en absorbancia de $1,10 \pm 0,02$ unidades a una longitud de onda de 515 nm en un espectrómetro UV.

Cada extracto se pesó y se reconstituyó con el solvente utilizado durante la maceración (agua destilada, etanol, etanol-agua (1:1)) hasta tener una concentración inicial de 60 g/l para el extracto atomizado, 20 g/l para el liofilizado, 2,50 g/l para etanol-agua y 10 g/l para el extracto con etanol, a partir de éstas se prepararon cinco concentraciones más con el respectivo solvente. La curva de calibración se obtuvo con diferentes concentraciones de DPPH (27,60 – 1,97 $\mu\text{g/ml}$). Se añadieron en una microplaca de 96 pocillos 8 μl de cada extracto a diferentes concentraciones y se agregó 292 μl de una solución de trabajo de DPPH. Las absorbancias de las muestras se midieron a 516 nm. La IC_{50} (Concentración Inhibitoria del 50 %) se obtuvo gráficamente utilizando una curva de calibración en el rango lineal. Esta curva se elaboró trazando la concentración del extracto frente al efecto inhibitorio correspondiente, los valores de este índice mientras más bajos indican una mayor actividad antioxidante y valores más altos reflejan una menor actividad antioxidante [25]. Como se puede ver en la ecuación 1, la actividad antioxidante se expresa como el Índice de Actividad Antioxidante (AAI), el cual se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{AAI} = \frac{\text{Concentración final de DPPH } (\mu\text{g.ml}^{-1})}{\text{IC}_{50}(\mu\text{g.ml}^{-1})} \quad (1)$$

AAI < 0,5, actividad antioxidante pobre; AAI entre 0,5 y 1,0 moderada; AAI entre 1,0 y 2,0 fuerte; y AAI > 2, muy fuerte.

En este estudio, se concluye que los extractos de las plantas analizadas exhiben una actividad antioxidante pobre, según los rangos establecidos previamente por Scherer y Godoy [24].

2.2.3 Método FRAP

La determinación de capacidad antioxidante mediante el mecanismo de reducción de metales (FRAP), se realizó de acuerdo con el método descrito por Thaipong *et al.* [5], con

modificaciones. El patrón de referencia utilizado fue Trolox y los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo en base seca ($\mu\text{mol ET/g BS}$).

Cada extracto se pesó y se reconstituyó con el solvente utilizado durante la maceración (agua destilada, etanol, etanol-agua (1:1)). En el caso de los extractos de guaviduca, hasta tener una concentración de 5000 ppm para el extracto atomizado, 2500 ppm para el liofilizado y 833 ppm para los extractos etanol-agua y etanol. Los cuatro extractos de guápala se analizaron en una concentración de 833 ppm y en el caso de guayusa fueron reconstituidos a 1000 ppm (atomizado, liofilizado y etanólico), el extracto etanol-agua a 600 ppm.

Las soluciones stock incluyeron 300 mM de tampón acetato ($3,10 \text{ g C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ y $16 \text{ ml C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), pH 3,60, solución de TPTZ (2, 4, 6- tripiridil-s-triazina) de 10 mM en HCl de 40 mM y 20 mM de solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La solución de trabajo se preparó mezclando 25 ml de tampón acetato, 2,50 ml de solución de TPTZ y 2,5 ml de solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y luego calentando a 37°C antes de usarla.

Se tomó 50 μl de extracto y se añadió 950 μl de la solución de trabajo y se dejó reaccionar durante 30 minutos en condiciones de oscuridad. A continuación, se midió la absorbancia del producto coloreado (complejo de tripiridiltriiazina ferroso) a 593 nm. La curva estándar se midió entre las concentraciones de Trolox 25 y 800 mM.

2.2.4 Método ABTS

Se procedió de acuerdo a lo descrito por Thaipong *et al.* [5], con modificaciones. El patrón de referencia utilizado fue Trolox y los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo en base seca ($\mu\text{mol ET/g BS}$).

Cada extracto se pesó y se reconstituyó con el solvente utilizado durante la maceración (agua destilada, etanol o etanol-agua [1:1]), en el caso de guaviduca, hasta tener una concentración inicial de 625 ppm para el extracto liofilizado, 312,50 ppm para el extracto atomizado, 833 ppm para el extracto etanol y 208 ppm para etanol-agua. Para guápala los cuatro extractos se analizaron en una concentración de 833 ppm y para guayusa, el extracto atomizado, el extracto liofilizado y el extracto etanólico se reconstituyeron a una concentración de 1000 ppm y el extracto etanol-agua a 300 ppm.

Se prepararon dos soluciones: ABTS (0,0074 M) y persulfato de potasio (0,0026 M), la mezcla de estas se dejó reposar por 12 h de tal forma que se obtuvo la solución patrón de ABTS. La solución de trabajo se preparó mezclando 1 ml de solución patrón con 60 ml de MeOH hasta obtener una lectura en absorbancia de $1,10 \pm 0,02$ unidades a una longitud de onda de 515 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Scientific). Se emplearon curvas estándar de Trolox en concentraciones entre 50 y 800 μM . De cada concentración, así como de cada muestra se tomó

150 µl en un vial, se adicionó 2,85 ml de la solución trabajo de ABTS y se dejó reaccionar por 2 h en oscuridad a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm, en un espectrofotómetro UV (HITACHI, Japón). El análisis se realizó por triplicado.

2.3 Evaluación de la vida útil de las hamburguesas de carne de cerdo

Para este estudio se realizó el monitoreo de la oxidación lipídica y el pH de hamburguesas de cerdo los días 0, 1, 4, 9, y 14 de almacenamiento en refrigeración.

2.3.1. Preparación de hamburguesas de carne de cerdo

Como producto modelo se consideró hamburguesas de cerdo, para lo cual se utilizó carne fresca de cerdo adquirida en Supermaxi (Grupo La Favorita, Ecuador). La formulación de estas hamburguesas incluye una mezcla compuesta por un 55 % carne magra de cerdo, 45 % panceta de cerdo, ambas picadas con un plato de 5 mm. Además, se incorporaron 180 g/kg de hielo, 20 g/kg de NaCl, 2 g/kg de pimienta blanca y el agente antioxidante (eritorbato de sodio como antioxidante comercial o los extractos). Posteriormente, se dio forma a las hamburguesas, en unidades de 10 g cada una. Se prepararon y codificaron seis tratamientos de hamburguesas por cada especie vegetal estudiada, el tratamiento control (C) consistió en la hamburguesa sin extracto o antioxidante comercial, el tratamiento control (ERIT) al que se incorporó 500 mg/kg de eritorbato de sodio, los demás corresponden a los tratamientos en los que se adiciona cada uno de los extractos de las especies estudiadas en una proporción de 8 g/100 g de producto, es decir: Atomizado (ATOM), liofilizado (H2O), etanol (ETOH) y etanol-agua (ETOH-H2O). Todas las hamburguesas se envasaron en bandejas de poliestireno recubiertas con film de polietileno y se almacenaron en refrigeración.

2.3.2. Oxidación lipídica

Se empleó el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), para ello se tomaron 10 g de muestra y se agregaron 50 ml de agua destilada, luego se homogeneizó utilizando un equipo Ultra Turrax (IKA T25 basic, Staufen, Alemania). Se complementó con 47,50 ml adicionales de agua destilada y 2,50 ml de HCl 4 N para ajustar el pH a 1,50, llevando la mezcla a ebullición con el agregado de unas gotas de antiespumante (Scharlau, Barcelona).

La solución fue destilada con un equipo especial (Foss Tecator, Suecia) hasta obtener un volumen final de 50 ml (filtrándola si era necesario). De esta solución, se tomaron 5 ml y se mezclaron con 5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,02 M) en tubos de vidrio. Tras agitar se llevaron a un baño de agua a 96 °C durante 40 minutos, se enfriaron los tubos y se leyeron las absorbancias a 538 nm mediante un espectrofotómetro (HITACHI, Japón).

2.3.3. Determinación de pH

El pH se determinó utilizando un pH-metro (micropH2001, CRISON, Barcelona-España), calibrándolo con soluciones buffer fosfato (pH 4 y 7) e introduciendo el electrodo de punción directamente en la muestra. Se llevaron a cabo tres mediciones, variando la ubicación de inserción del electrodo para asegurar la precisión de las lecturas.

2.4 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media aritmética $\pm$ desviación estándar. La diferencia entre medias se determinó mediante un ANOVA simple usando el paquete estadístico Statgraphics XVII-X64. La prueba de Tukey se usó para determinar si hay diferencias significativas entre los tratamientos a $p < 0,05$.

3. Resultados y Discusión

3.1 Actividad antioxidante *in vitro*

3.1.1 *Piper carpunya*

Fenoles Totales: Los resultados sobre los compuestos fenólicos de *Piper carpunya* (Tabla 2) muestran que el extracto ETOH-H₂O presentó valores significativamente más elevados que los demás extractos estudiados de esta especie. Esto puede atribuirse a la capacidad de las mezclas acuosas de etanol para disolver una amplia variedad de fenoles, siendo además un solvente empleado en modelos de consumo humano [26]. En otro estudio que examinó extractos etanólicos (70%) de *P. carpunya*, se registró un contenido de fenoles totales de 2,80 mg EAG/g BS [27], una cifra cercana a la nuestra. Estos resultados sugieren que los extractos de esta especie presentan niveles relativamente bajos de fenoles totales, si se comparan con los reportado por Lu *et al.* [28] para extractos de pimienta blanca (*Piper nigrum* L.), los cuales fueron de 3,53 mg EAG/g BS.

DPPH: Se comprobó una actividad antioxidante significativamente superior ($p < 0,05$) en el extracto ETOH-H₂O en comparación con los demás extractos analizados, lo que indica una “fuerte” actividad antioxidante [24]. Este hallazgo se vio respaldado también por el IC₅₀ obtenido para este extracto, por el contrario, Valarezo *et al.* [21] encontraron que el aceite esencial de *P. carpunya* mostró poca actividad antioxidante mediante este método.

FRAP: Los resultados de este método, como se evidencia en la Tabla 2, ponen de manifiesto una vez más, que el extracto ETOH-H₂O destaca respecto al resto, el cual exhibió una

actividad antioxidante (41,36 $\mu\text{mol ET/g BS}$) significativamente superior a los demás extractos estudiados y que es muy parecida a lo reportado para *Piper nigrum* L. (37,80 $\mu\text{mol ET/g BS}$) [28], sin embargo, al compararlos con otras fuentes como la canela, reconocida por su alta actividad antioxidante, con valores para FRAP de 637 $\mu\text{mol ET/g BS}$, y otras como hinojo, comino y angélica silvestre (*Angelica dahurica*), que muestran una capacidad antioxidante baja (FRAP de 72,40, 68,70 y 35,20 $\mu\text{mol ET/g BS}$, respectivamente) [28] al igual que las cáscaras de mango (112 a 134 $\mu\text{mol ET/g BS}$) [29], se observa que los extractos de *P. carpunya* analizados en este estudio presentan una capacidad antioxidante baja, es decir, ejercen un efecto limitado en la reducción de sales férricas.

ABTS: Los valores de ABTS obtenidos para los extractos de *P. carpunya* en este estudio oscilan entre 3,24 y 216,16 $\mu\text{mol ET/g BS}$. El extracto de ETOH-H₂O registró el valor más alto entre los extractos estudiados, con una capacidad antioxidante moderada. Esta comparación se evidencia al contrastar estos resultados con los obtenidos para *P. nigrum*, que presentó un valor ABTS menor (12,42 $\mu\text{mol ET/g BS}$). Por otro lado, especias como la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y el laurel (*Laurus nobilis*) exhiben una capacidad antioxidante más alta, con valores de 525,85 y 412,24 $\mu\text{mol ET/g BS}$, respectivamente [28]. En el estudio de Valarezo *et al.* [21], se señala una baja actividad antioxidante en la evaluación *in vitro* del aceite esencial de *P. carpunya*. Esto posiblemente se deba a la presencia de compuestos antagonistas de la acción de otros como el 1,8-cineol, con actividad antioxidante comprobada.

Al analizar todos los resultados, se puede observar una correlación entre contenido fenólico total del extracto ETOH-H₂O y su capacidad antioxidante (valores de DPPH, FRAP y ABTS), Alothman *et al.* [26] mencionan que estas correlaciones podrían confirmar que los compuestos fenólicos son los principales microconstituyentes que contribuyen a las actividades antioxidantes de frutas y extractos de hojas.

3.1.2 *Simira ecuadorensis*

Fenoles Totales: En la Tabla 3 se evidencia una significativa diferencia en los niveles de fenoles totales entre los cuatro extractos de *S. ecuadorensis*. El extracto ETOH-H₂O exhibió la concentración más alta, alcanzando un valor de 7,30 mg EAG/g BS, lo que puede atribuirse, como se ha mencionado anteriormente, al solvente empleado y su capacidad para disolver una amplia gama de compuestos fenólicos [26]. Para extractos etanólicos de esta misma especie se reportan valores menores de fenoles totales, alrededor de $3,46 \pm 0,18$ mg EAG/g BS [22].

Por otro lado, en referencia a los extractos acuosos (H₂O y ATOM), se observó un mayor contenido fenólico en el extracto H₂O. Esta diferencia posiblemente se deba a la utilización de altas temperaturas en la técnica de secado a, como en el caso de ATOM, que pueden afectar a los compuestos fenólicos [29].

DPPH: En función de la AAI [24] el extracto ETOH-H₂O, seguido del ETOH muestran una actividad antioxidante moderada, mientras que los extractos H₂O y ATOM poseen actividad antioxidante pobre.

Respecto a los valores del IC₅₀ (Tabla 3) los resultados más destacables correspondieron a los extractos ETOH-H₂O y ETOH, los cuales no tuvieron diferencia significativa entre sí y se consideran con alto potencial antioxidante según los criterios indicados por Troya-Santos *et al.* [30]. Los extractos acuosos, por su parte, tuvieron baja actividad antioxidante.

FRAP: Con una tendencia similar, el extracto de ETOH-H₂O mostró un valor significativamente superior en el ensayo FRAP, alcanzando los 71,10 µmol ET/g BS. Este extracto fue seguido por los extractos ATOM, H₂O y ETOH en orden decreciente. Al comparar estos resultados con el estudio de Lu *et al.* [28], que categorizó las especias según su capacidad antioxidante (alta, moderada y baja), observamos que los cuatro extractos evaluados en este trabajo podrían ubicarse en la categoría de baja capacidad antioxidante según este método específico. Esta clasificación realizada en dicho estudio considera especias como laurel con alta capacidad antioxidante, jengibre seco con moderada y el hinojo y comino con baja capacidad antioxidante.

ABTS: En la Tabla 3 se aprecia que se destacaron especialmente el extracto H₂O, el cual mostró el valor más alto para ABTS, alcanzando 225,88 µmol ET/g BS, seguido por el extracto de ETOH-H₂O con 109,00 µmol ET/g BS. Estos valores sugieren una capacidad antioxidante moderada, si consideramos el análisis realizado por Lu *et al.* [28] que reporta para dos especias mixtas (mezcla de varias especias) un valor promedio de 77,41 µmol ET/g BS para este ensayo.

Tabla 2. Contenido fenólico total y capacidad antioxidante de extractos de *P. carpunya*.

Extractos	Fenoles totales (mg EAG/g BS)	FRAP ($\mu\text{mol ET/ g BS}$)	ABTS ($\mu\text{mol ET/ g BS}$)	DPPH (AAI)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
ETOH-H2O	4,92 $\pm$ 0,11 a	41,36 $\pm$ 1,85 a	226,16 $\pm$ 2,60 a	1,22 $\pm$ 0,02 a	19,45 $\pm$ 0,35 d
ETOH	0,26 $\pm$ 0,02 d	1,52 $\pm$ 0,02 d	3,24 $\pm$ 0,00 d	0,34 $\pm$ 0,00 b	69,60 $\pm$ 0,85 c
ATOM	3,25 $\pm$ 0,19 b	9,11 $\pm$ 0,07 b	166,22 $\pm$ 6,31 b	0,05 $\pm$ 0,00 c	522,85 $\pm$ 14,07 a
H2O	1,73 $\pm$ 0,04 c	4,32 $\pm$ 0,24 c	57,48 $\pm$ 2,20 c	0,09 $\pm$ 0,00 c	272,80 $\pm$ 12,45 b

ETOH-H2O (extraído con etanol-agua), ETOH (extraído con etanol), ATOM (extraído con agua y atomizado) y H2O (extraído con agua y liofilizado). Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar (n=3). a-d Diferente letra dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los extractos, $p < 0,05$.

Tabla 3. Contenido fenólico total y capacidad antioxidante de extractos de *S. ecuadorensis*.

Extractos	Fenoles totales (mg EAG/g BS)	FRAP ($\mu\text{mol ET/ g BS}$)	ABTS ($\mu\text{mol ET/ g BS}$)	DPPH (AAI)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
ETOH-H2O	7,27 $\pm$ 0,22 a	71,10 $\pm$ 3,01 a	109,00 $\pm$ 3,90 b	0,83 $\pm$ 0,00 a	24,62 $\pm$ 0,11 c
ETOH	2,46 $\pm$ 0,17 d	21,10 $\pm$ 0,88 c	28,00 $\pm$ 0,69 d	0,64 $\pm$ 0,00 b	32,13 $\pm$ 1,26 c
ATOM	4,57 $\pm$ 0,09 c	32,70 $\pm$ 0,71 b	85,87 $\pm$ 5,05 c	0,06 $\pm$ 0,00 d	364,01 $\pm$ 6,39 a
H2O	5,96 $\pm$ 0,10 b	28,70 $\pm$ 5,56 bc	225,88 $\pm$ 12,65 a	0,11 $\pm$ 0,01 c	188,38 $\pm$ 18,01 b

ETOH (extraído con etanol), ETOH-H2O (extraído con etanol-agua), ATOM (extraído con agua y atomizado) y H2O (extraído con agua y liofilizado). Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar (n=3). a-d La misma letra dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los extractos, $p < 0,05$.

Tabla 4. Contenido fenólico total y capacidad antioxidante de extractos de *I. guayusa*.

Extractos	Fenoles totales (mg EAG/g BS)	FRAP ($\mu\text{mol ET/ g BS}$)	ABTS ($\mu\text{mol ET/ g BS}$)	DPPH (AAI)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
ETOH-H2O	4,40 $\pm$ 0,28 c	5,25 $\pm$ 0,04 a	16,21 $\pm$ 0,13 b	1,00 $\pm$ 0,01 a	24,18 $\pm$ 0,12 b
ETOH	1,91 $\pm$ 0,02 d	4,42 $\pm$ 0,06 b	4,97 $\pm$ 0,10 d	0,76 $\pm$ 0,04 b	35,77 $\pm$ 2,07 b
ATOM	5,77 $\pm$ 0,53 b	5,31 $\pm$ 0,14 a	13,14 $\pm$ 0,82 c	0,20 $\pm$ 0,03 d	116,16 $\pm$ 16,65 a
H2O	9,84 $\pm$ 0,28 a	5,48 $\pm$ 0,21 a	28,08 $\pm$ 0,80 a	0,34 $\pm$ 0,02 c	101,70 $\pm$ 6,01 a

ETOH (extraído con etanol), ETOH-H2O (extraído con etanol-agua), ATOM (extraído con agua y atomizado) y H2O (extraído con agua y liofilizado). Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar (n=3). a-d La misma letra dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los extractos, $p < 0,05$.

3.1.3 *Ilex guayusa*

Fenoles totales: El extracto H₂O exhibe una cantidad significativamente mayor de fenoles totales en comparación con los otros extractos evaluados (Tabla 4). Esta tendencia también fue reportada por Chóez-Guaranda *et al.* [31], los cuales encontraron que el extracto acuoso de hojas de *I. guayusa* tenía un contenido fenólico total significativamente mayor al de los extractos que usaron como solventes metanol, hexano, cloroformo, sólo estando por debajo del extracto con acetato de etilo. Esto lo asocian con la polaridad de los disolventes y a la reacción hidrófila de las pruebas de antioxidantes utilizadas y/o a la solubilidad de los compuestos fenólicos en el disolvente utilizado [26]. No obstante, su valor (9,84 mg EAG/g BS) es inferior al reportado en estudios previos. Villacís *et al.* [32] registraron valores entre 21,42 y 33,44 mg EAG/g BS, Arteaga-Crespo *et al.* [33] reportaron 33,80 mg EAG/g BS, mientras que García *et al.* [23] obtuvieron 54,86 mg EAG/g BS. Esta disparidad con los resultados de la presente investigación posiblemente se debe al tipo de material vegetal utilizado (ubicación, época de cosecha, etc.) y al estado de madurez de las hojas [32]. Los compuestos fenólicos a los que posiblemente se deba la actividad antioxidante de la guayusa son los derivados del ácido hidroxicinámico [32].

DPPH: Los resultados de la capacidad antioxidante de las hojas de guayusa, evaluadas mediante el ensayo DPPH, se presentan en la Tabla 4. Se observa una mayor actividad antioxidante en el extracto ETOH-H₂O, indicativa de una capacidad moderada. A este le sigue el extracto ETOH, también con actividad moderada, aunque significativamente menor que el primero, el resto de los extractos tuvieron una actividad baja [24]. Estos hallazgos se correlacionan con los valores del IC₅₀, donde los extractos ETOH-H₂O y ETOH registraron los valores más bajos. Es importante considerar que, en este índice, valores más bajos indican una mayor actividad antioxidante, mientras que valores más altos reflejan una menor actividad antioxidante [25].

García-Ruiz *et al.* [23] y Villacís-Chiriboga *et al.* [32] han señalado una correlación positiva entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante medida por DPPH. Sin embargo, en el presente estudio, esta asociación no fue confirmada. Los valores reportados para *I. guayusa* por García-Ruiz *et al.* fueron 330 mol Trolox/g para hojas verdes, 354 mol Trolox/g para hojas blanqueadas y 197 mol Trolox/g para hojas fermentadas [23], mientras que Villacís-Chiriboga *et al.* reportaron 162 mol Trolox/g para hojas de guayusa de dos meses y 125 mol Trolox/g para hojas de seis meses [32]. Aunque estos valores proporcionan alguna orientación sobre la

capacidad antioxidante de la especie estudiada, no son directamente comparables con los resultados de esta investigación debido a la utilización de metodologías distintas.

FRAP: La actividad antioxidante total, medida con el método FRAP arroja como resultados la poca variación entre los extractos estudiados, encontrándose que no hay diferencia estadística entre los extractos ETOH-H₂O, ATOM y H₂O, con valores promedio aproximados a 5,30 $\mu\text{mol ET/g BS}$, valores considerados como muy bajos ($< 10 \mu\text{mol ET/g}$) según su capacidad reductora o poder antioxidante establecida en la investigación de Fernandes *et al.* [34]. Se ha reportado valores inferiores a 0,8 mol ET/g para extractos etanol-agua de guayusa asistidos con ultrasonido [33].

ABTS: La capacidad de los extractos de *I. guayusa* para eliminar radicales libres, evaluada mediante el método ABTS, mostró resultados que oscilaron entre 4,97 y 28,08 $\mu\text{mol ET/g}$. El extracto H₂O sobresalió significativamente entre los demás, seguido por el extracto ETOH-H₂O. Una ventaja clave de este método es su capacidad para evaluar tanto antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos [35].

Al comparar los resultados del ensayo ABTS con los hallazgos publicados por Arteaga-Crespo *et al.* [33], quienes informaron valores más altos (40,71 $\mu\text{mol ET/g BS}$) para hojas de guayusa, se evidencia una disparidad en los resultados. Por otra parte, Cadena-Carrera *et al.* [25], al estudiar tres métodos de extracción utilizando hojas de guayusa, informaron un valor de 116 $\mu\text{mol ET/g BS}$ al emplear la técnica Soxhlet con etanol como solvente, el cual también supera los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, sus investigaciones también mostraron valores significativamente más bajos utilizando métodos de fluidos supercríticos (entre 0,21 y 1,45 $\mu\text{mol ET/g}$) y fluidos supercríticos con cosolvente (0,67 – 2,98 $\mu\text{mol ET/g}$). Además, Bravo *et al.* [36] publicaron valores bajos (1,56 y 1,81 $\mu\text{mol ET/g}$) para *Ilex paraguariensis*, lo que resalta la variabilidad en los resultados obtenidos, posiblemente debido al tipo de solvente, la técnica de extracción, la ubicación, el año o la fuente material [25].

3.2 Efecto de los extractos sobre la oxidación de hamburguesas de cerdo durante el almacenamiento

La presencia de antioxidantes para controlar la oxidación lipídica de la carne y por ende la formación de compuestos como el malondialdehído (MDA) que pueden afectar su sabor, aroma y valor nutricional representa una estrategia efectiva que la industria alimentaria ha adoptado en sus procesos para salvaguardar la calidad de sus productos [11,37]. Los

antioxidantes naturales derivados de los extractos de plantas son ricos en compuestos fenólicos y flavonoides, su aplicación, aparte de mejorar la vida útil del alimento, también mejora su calidad sensorial, respondiendo a la creciente demanda de alternativas naturales en la industria alimentaria.

3.2.1 *P. carpunya*

Como se puede observar en la Tabla 5, los niveles de TBARS entre los distintos tratamientos en el día cero variaron significativamente, oscilando entre 0,30 y 1,05 mg MDA/kg de producto. El valor más alto correspondió al extracto ETOH-H₂O, lo que podría indicar un efecto prooxidante. Algunos estudios han sugerido que ciertos componentes, como los flavonoides presentes en el aceite esencial de ajo, pueden cambiar su función de antioxidantes a prooxidantes al aumentar su concentración en matrices alimentarias [37,42].

El nivel de MDA en las hamburguesas control (C) experimentó un aumento significativo desde 0,51 mg MDA/kg en el día 0 hasta 1,91 mg MDA/kg al final del almacenamiento (día 14). Por otro lado, el tratamiento con el antioxidante comercial (ERIT) alcanzó valores estadísticamente similares a los tratamientos ATOM, H₂O Y ETOH-H₂O para el día 14, todos significativamente inferiores al control C. Esta tendencia coincide con estudios anteriores realizados por Bellucci *et al.* [43,44], quienes aplicaron extractos de *açaí* y pitajaya en hamburguesas de cerdo y utilizaron eritorbato de sodio como control.

Hasta el día 4, los tratamientos con extractos exhibieron valores significativamente menores que los tratamientos control (C y ERIT). Sin embargo, para los días 9 y 14, el tratamiento ERIT, junto con los extractos, también mantuvo niveles de TBARS estadísticamente inferiores al grupo de control (C). Estos resultados podrían asociarse al efecto de los compuestos extraídos de *P. carpunya*.

El tratamiento ETOH mantuvo valores más bajos de MDA durante todo el almacenamiento, destacando especialmente el día 14 con un valor significativamente inferior (0,55 mg MDA/kg de producto) en comparación con los demás. Este efecto podría atribuirse a una mayor capacidad antioxidante asociada con la extracción de compuestos fenólicos, cuya eficacia como antioxidantes está influenciada por factores como el número y disposición de los grupos hidroxilo en el anillo aromático [38].

Los valores de TBARS obtenidos para los tratamientos con los extractos de *P. carpunya* se sitúan por debajo del umbral de deterioro de 2 mg MDA/Kg, considerado como el límite a partir del cual el sabor rancio comienza a dominar el sabor de la carne [3,41,44].

3.2.2 *S. ecuadorensis*

Los resultados de la oxidación lipídica durante el almacenamiento de las hamburguesas con extractos de *S. ecuadorensis* se muestran en la tabla 6.

Al inicio del experimento (día 0) los valores de TBARS estuvieron entre 0,21 mg MDA/kg (ATOM) y 0,85 mg MDA/kg (ETOH), con valores estadísticamente menores para ATOM, mayores como el caso del ETOH y sin diferencia significativa entre ERIT, H₂O y ETOH-H₂O frente al control C. Al final del almacenamiento los tratamientos H₂O, ETOH-H₂O y ETOH mostraron el valor TBARS más bajo (0,52, 0,43 y 0,93 mg MDA/kg de muestra), sin diferencia estadística entre ellos, lo que podría indicar el efecto antioxidante de los componentes extraídos de *S. ecuadorensis*.

Aunque hay muy poca información de esta especie, su actividad antioxidante podría estar relacionada con su contenido fenólico, ya que estos compuestos pueden reaccionar con radicales de oxígeno, como radicales hidroxilo, aniones superóxido y radicales peroxilo, e inhibir la oxidación de lípidos en una etapa temprana en alimentos que contienen lípidos [38,39].

Es importante también indicar que para el día 4 todos los tratamientos correspondientes a los extractos fueron significativamente menores que C y ERIT y estaban por debajo de 1 mg MDA/g de muestra, esto es importante si se considera que para Tarladgis *et al.* [40] la cantidad máxima aceptable de MDA en carne oscila entre 0,5 y 1 mg/kg para detectar signos de rancidez y/o deterioro, y para Campo *et al.* [41] el límite es de 2 mg MDA/kg de producto.

Tabla 5. Evolución de los valores de TBARS (mg MDA/kg de producto) de hamburguesas de cerdo con eritorbato de sodio y diferentes extractos de *P. carpunya* durante el almacenamiento en refrigeración.

Tratamiento* (mg MDA/kg)	Día				
	0	1	4	9	14
C	0,51 ± 0,04 c C	0,14 ± 0,01 d C	1,45 ± 0,26 a B	2,54 ± 0,57 a A	1,91 ± 0,14 a AB
ERIT	0,45 ± 0,01 c B	0,91 ± 0,35 ab A	1,20 ± 0,05 ab A	1,19 ± 0,07 b A	1,33 ± 0,07 b A
ATOM	0,35 ± 0,01 d B	0,40 ± 0,01 cd B	0,45 ± 0,01 c B	0,72 ± 0,07 bc B	1,26 ± 0,31 b A
H2O	0,59 ± 0,04 b C	0,57 ± 0,01 bc C	0,59 ± 0,05 c C	0,71 ± 0,01 bc B	0,99 ± 0,01 b A
ETOH-H2O	1,05 ± 0,02 a B	1,06 ± 0,01 a B	1,09 ± 0,01 b AB	1,11 ± 0,06 b AB	1,19 ± 0,06 b A
ETOH	0,30 ± 0,02 d C	0,31 ± 0,02 cd C	0,43 ± 0,01 c B	0,45 ± 0,01 c B	0,55 ± 0,01 c A

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-d Letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencias estadísticas (tratamiento diferente mismo día); A-C Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (mismo tratamiento) a lo largo del almacenamiento ($p < 0,05$). Hamburguesas preparadas:

*C: sin antioxidantes; ERIT: con eritorbato de sodio a 500 mg/kg; ATOM: con extracto atomizado; H2O: con extracto liofilizado; ETOH-H2O: con extracto etanol-agua y ETOH: con extracto etanol. Todos los extractos dosificados a 8 g/100 g de hamburguesa.

Tabla 6. Evolución de los valores de TBARS (mg MDA/kg de producto) de hamburguesas de cerdo con eritorbato de sodio y diferentes extractos de *S. ecuadorensis* durante el almacenamiento refrigerado.

Tratamiento* (mg MDA/kg)	Día				
	0	1	4	9	14
C	0,51 ± 0,04 bc C	0,14 ± 0,01 c C	1,45 ± 0,26 a B	2,54 ± 0,57 a A	1,91 ± 0,13 b AB
ERIT	0,45 ± 0,01 c B	0,91 ± 0,35 a A	1,20 ± 0,05 a A	1,13 ± 0,06 b A	1,33 ± 0,07 bc A
ATOM	0,21 ± 0,07 d B	0,22 ± 0,03 bc B	0,41 ± 0,02 b B	0,52 ± 0,03 b B	2,82 ± 0,58 a A
H2O	0,52 ± 0,07 bc B	0,29 ± 0,01 bc C	0,38 ± 0,05 b BC	1,05 ± 0,09 b A	0,52 ± 0,04 d B
ETOH-H2O	0,60 ± 0,06 b B	0,55 ± 0,01 ab BC	0,62 ± 0,02 b B	1,15 ± 0,06 b A	0,43 ± 0,08 d C
ETOH	0,85 ± 0,03 a A	0,42 ± 0,01 bc B	0,54 ± 0,03 b B	0,92 ± 0,12 b A	0,93 ± 0,03 cd A

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-d Letras diferentes en la misma columna indican que no hay diferencias estadísticas (tratamiento diferente mismo día); A-C Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (mismo tratamiento) a lo largo del almacenamiento ($p < 0,05$). Hamburguesas preparadas: *C: sin antioxidantes; ERIT: con eritorbato de sodio a 500 mg/kg; ATOM: con extracto atomizado; H2O: con extracto liofilizado; ETOH-H2O: con extracto etanol-agua y ETOH: con extracto etanol. Todos los extractos dosificados a 8 g/100 g de hamburguesa.

3.2.3 *I. guayusa*

En la Tabla 7 se detallan los valores de TBARS, que reflejan el grado de oxidación de los lípidos en hamburguesas de cerdo a las que se ha aplicado extractos de *I. guayusa*. En el día 0, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, con valores que oscilaron entre 0,18 y 0,51 mg MDA/kg de producto, siendo el más alto el del lote C. Sin embargo, todos se mantuvieron por debajo de los límites que indican señales de rancidez y deterioro (0,5 a 1 mg MDA/kg de producto) [40]. Además, los tratamientos control (C y ERIT) junto con el extracto ETOH-H₂O mostraron valores estadísticamente equivalentes, mientras que el resto de los tratamientos exhibieron valores significativamente más bajos.

Al finalizar el almacenamiento (día 14), los extractos ATOM y H₂O exhibieron el contenido más alto de TBARS, alrededor de 4 mg MDA/kg de producto, lo que sugiere la posibilidad de que tengan un efecto prooxidante. Situación similar se observó por otros autores en hamburguesas de ternera que incorporaron 0,5 % y 1 % de extracto de orujo de frambuesa obtenido mediante dióxido de carbono supercrítico (SCE), así como 0,75 % de SCE más acetato-lactato [16]. Por otro lado, los tratamientos control mostraron valores altos, aunque no superaron los 2 mg MDA/kg, que es el límite para que los consumidores perciban signos de rancidez [3,11]. Finalmente, los tratamientos ETOH-H₂O y ETOH presentaron valores significativamente más bajos que el resto. Estos últimos muestran claramente el efecto antioxidante del extracto sobre la acumulación de MDA, ya que, aunque sus valores aumentaron gradualmente (de 0,40 a 0,87 mg MDA/kg y de 0,24 a 0,95 mg MDA/kg, respectivamente), se mantuvieron en niveles bajos a lo largo del almacenamiento. Estos resultados podrían atribuirse a la actividad antioxidante de compuestos fenólicos presentes en *I. guayusa*, particularmente a los isómeros del ácido mono y dicafeoilquínico (principalmente el ácido clorogénico) [23].

3.3 Efecto de los extractos sobre el pH de hamburguesas de cerdo durante el almacenamiento

3.3.1 *P. carpunya*

Se evidenciaron diferencias significativas entre los valores de pH de los tratamientos (Tabla 8). En el día 0, las hamburguesas con extractos mostraron valores de pH más elevados que los tratamientos control (C y ERIT). A lo largo del período de almacenamiento (día 1 al 14), el tratamiento ERIT mantuvo los valores de pH más altos. Esta misma tendencia se corroboró en un estudio similar realizado por Bellucci *et al.* [44], quienes introdujeron extractos de pitajaya roja en hamburguesas de cerdo y las almacenaron en refrigeración por 18 días.

Tabla 7. Evolución de los valores de TBARS (mg MDA/kg de producto) de hamburguesas de cerdo con eritorbato de sodio y diferentes extractos de *I. guayusa* durante el almacenamiento refrigerado.

Tratamiento* (mg MDA/kg)	Día				
	0	1	4	9	14
C	0,51 ± 0,04 a C	0,14 ± 0,01 b C	1,45 ± 0,26 b B	2,54 ± 0,569 ab A	1,91 ± 0,135 b AB
ERIT	0,45 ± 0,01 a B	0,91 ± 0,35 a AB	1,20 ± 0,05 b A	1,31 ± 0,271 cd A	1,33 ± 0,070 bc A
ATOM	0,20 ± 0,06 b D	0,19 ± 0,03 b D	2,16 ± 0,14 a C	3,04 ± 0,276 a B	3,93 ± 0,388 a A
H2O	0,18 ± 0,05 b C	0,31 ± 0,06 b C	0,40 ± 0,03 c C	1,88 ± 0,267 bc B	4,01 ± 0,461 a A
ETOH-H2O	0,40 ± 0,05 a C	0,54 ± 0,03 ab B	0,52 ± 0,03 c BC	0,59 ± 0,058 d B	0,87 ± 0,047 c A
ETOH	0,24 ± 0,05 b D	0,54 ± 0,06 ab C	0,60 ± 0,03 c BC	0,80 ± 0,128 d AB	0,95 ± 0,084 c A

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-d Letras diferentes en la misma columna indican que no hay diferencias estadísticas (tratamiento diferente mismo día); A-D Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (mismo tratamiento) a lo largo del almacenamiento ($p < 0,05$). Hamburguesas preparadas: *C: sin antioxidantes; ERIT: con eritorbato de sodio a 500 mg/kg; ATOM: con extracto atomizado; H2O: con extracto liofilizado; ETOH-H2O: con extracto etanol-agua y ETOH: con extracto etanol. Todos los extractos dosificados a 8 g/100 g de hamburguesa.

Durante el almacenamiento, se observó una significativa disminución en el pH de todos los tratamientos con extracto, posiblemente atribuible al efecto antimicrobiano selectivo que favorece el desarrollo de las BAL [7,11], como se ha mencionado en otros apartados. Tendencias similares se han identificado en estudios previos que enriquecieron hamburguesas de cerdo con extracto de tomillo [7], extracto de orujo de arándanos [45] y hamburguesas de ternera con extracto de orujo de grosella roja [38]. Solamente el tratamiento con ETOH mostró un incremento estadísticamente significativo el día 14. Además, los días 9 y 14 los valores de pH en los tratamientos con extractos se mantuvieron significativamente más bajos en comparación con el grupo control (C y ERIT), oscilando entre 5,47 y 6,13.

3.3.2 *S. equorum*

En la Tabla 9, se detalla la evolución del pH en las hamburguesas de carne de cerdo tratadas con extractos de *S. equorum* durante el período de almacenamiento. Se observó que, a partir del día cuatro hasta el final del almacenamiento (día 14), el pH en las muestras con extractos fue considerablemente inferior al de los tratamientos control (C y ERIT), en contraposición a las mediciones del día 0. Este descenso podría atribuirse a la función selectiva de los compuestos antioxidantes presentes en los extractos, que actuaron como una barrera ante la proliferación de cierta microbiota contaminante, lo que permitió el crecimiento de bacterias ácido-lácticas (BAL), generando ácido láctico [11,16]. Otra posible explicación se relaciona con la hidrólisis de lípidos y la formación de ácidos grasos libres [11].

El pH de los tratamientos ATOM, H₂O y ETOH-H₂O muestra un descenso significativo hasta el día 9, seguido de un incremento notable ($p < 0,05$) hasta el día 14. Esta tendencia es previsible, ya que con el tiempo podría aumentar la presencia de bacterias Gram-negativas (como enterobacterias, pseudomonas, entre otras), las cuales descomponen proteínas y aminoácidos, generando amonio y como consecuencia, elevando el pH [16]. El único tratamiento que mantuvo la tendencia a disminuir significativamente el valor de pH fue el ETOH, este resultado podría estar indicando el mayor efecto antimicrobiano de este extracto y la actividad de las BAL, indicada anteriormente.

Tabla 8. Evolución de los valores de pH de hamburguesas de cerdo con eritorbato de sodio y diferentes extractos de *P. carpunya* durante el almacenamiento refrigerado.

Tratamiento*	Día				
	0	1	4	9	14
C	6,29 ± 0,01 c A	6,06 ± 0,01 d C	6,07 ± 0,01 b C	6,27 ± 0,01 b A	6,21 ± 0,01 b B
ERIT	6,20 ± 0,02 d E	6,51 ± 0,02 a D	6,70 ± 0,01 a C	6,77 ± 0,01 a B	6,93 ± 0,02 a A
ATOM	6,75 ± 0,01 a A	5,97 ± 0,01 e B	5,84 ± 0,01 c C	5,53 ± 0,02 e D	5,47 ± 0,01 e E
H2O	6,78 ± 0,02 a A	6,28 ± 0,01 b B	5,96 ± 0,02 bc C	5,54 ± 0,01 e D	5,48 ± 0,02 e E
ETOH-H2O	6,75 ± 0,01 a A	6,12 ± 0,01 c B	6,08 ± 0,01 b C	5,61 ± 0,01 d D	5,55 ± 0,01 d E
ETOH	6,56 ± 0,01 b A	6,28 ± 0,01 b B	6,10 ± 0,13 b CD	5,95 ± 0,04 c D	6,13 ± 0,02 c BC

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-e Letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencias estadísticas (tratamiento diferente mismo día); A-E Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (mismo tratamiento) a lo largo del almacenamiento ($p < 0,05$). Hamburguesas preparadas:

*C: sin antioxidantes; ERIT: con eritorbato de sodio a 500 mg/kg; ATOM: con extracto atomizado; H2O: con extracto liofilizado; ETOH-H2O: con extracto etanol-agua y ETOH: con extracto etanol. Todos los extractos dosificados a 8 g/100 g de hamburguesa.

Tabla 9. Evolución de los valores de pH de hamburguesas de cerdo con eritorbato de sodio y diferentes extractos de *S. equadorensis* durante el almacenamiento en refrigeración.

Tratamiento*	Día				
	0	1	4	9	14
C	6,21 ± 0,02 c B	6,06 ± 0,01 c C	5,06 ± 0,01 e D	6,27 ± 0,01 b A	6,22 ± 0,01 b B
ERIT	6,29 ± 0,01 b D	6,53 ± 0,04 a C	6,76 ± 0,02 a B	6,72 ± 0,02 a B	6,93 ± 0,02 a A
ATOM	6,77 ± 0,01 a A	6,15 ± 0,01 b B	5,55 ± 0,02 c C	4,96 ± 0,01 e E	5,15 ± 0,01 d D
H2O	6,75 ± 0,01 a A	6,09 ± 0,01 c B	5,20 ± 0,02 d C	4,94 ± 0,02 e E	5,15 ± 0,01 d D
ETOH-H2O	6,77 ± 0,01 a A	6,05 ± 0,02 c B	5,96 ± 0,01 b C	5,14 ± 0,01 c E	5,36 ± 0,02 c D
ETOH	6,76 ± 0,01 a A	5,82 ± 0,02 d B	5,04 ± 0,01 e C	5,01 ± 0,01 d C	4,97 ± 0,02 e D

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-e Letras diferentes en la misma columna indican que no hay diferencias estadísticas (tratamiento diferente mismo día); A-E Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (mismo tratamiento) a lo largo del almacenamiento ($p < 0,05$). Hamburguesas preparadas: *C: sin antioxidantes; ERIT: con eritorbato de sodio a 500 mg/kg; ATOM: con extracto atomizado; H2O: con extracto liofilizado; ETOH-H2O: con extracto etanol-agua y ETOH: con extracto etanol. Todos los extractos dosificados a 8 g/100 g de hamburguesa.

3.3.3 *I. guayusa*

Los resultados de la evolución del pH durante el periodo de almacenamientos se presentan en la Tabla 10, en esta se puede observar que los valores de pH de los tratamientos que utilizaron extractos mostraron ser estadísticamente más altos que los de los tratamientos control (C y ERIT). Otros estudios en los que se consideran hamburguesas de cerdo enriquecidas con extractos de plantas, como tomillo [7] y hojas de pitanga [46], también exhiben pH elevados al inicio del estudio, lo que posiblemente se atribuya a las propiedades inherentes de la planta empleada para obtener el extracto, a la naturaleza de sus polifenoles y otros compuestos activos [8]. No obstante, a medida que avanzó el periodo de almacenamiento, se observó una notable disminución en los valores de pH de las hamburguesas con extractos para los días 9 y 14, en comparación con los lotes de control (C y ERIT). Estos resultados concuerdan con lo observado en las hamburguesas con extractos de *P. carpunya* y podrían deberse a la acumulación de metabolitos de bacterias ácido-lácticas (BAL) o a la hidrólisis de lípidos, provocando la formación de ácidos grasos libres [11,45].

El tratamiento ETOH mostró los valores de pH más bajos desde el día 1 hasta el día 14, lo que podría atribuirse a su potencial antimicrobiano frente a bacterias Gram-negativas como enterobacterias y pseudomonas. Estas bacterias descomponen proteínas, generando amonio, lo que conlleva a un incremento en el pH de la carne [16].

Tabla 10. Evolución de los valores de pH de hamburguesas de cerdo con eritorbato de sodio y diferentes extractos de *I. guayusa* durante el almacenamiento en refrigeración.

Tratamiento*	Día				
	0	1	4	9	14
C	6,21 ± 0,01 c B	6,06 ± 0,02 e C	6,05 ± 0,01 bc C	6,28 ± 0,01 b A	6,21 ± 0,01 b B
ERIT	6,28 ± 0,01 b D	6,53 ± 0,02 b C	6,72 ± 0,03 a B	6,77 ± 0,02 a B	6,94 ± 0,03 a A
ATOM	6,83 ± 0,04 a A	6,81 ± 0,02 a A	6,73 ± 0,01 a B	5,44 ± 0,03 c C	5,41 ± 0,02 c C
H2O	6,83 ± 0,01 a A	6,42 ± 0,02 c B	6,02 ± 0,02 bc C	5,38 ± 0,02 d D	5,22 ± 0,03 e E
ETOH-H2O	6,83 ± 0,03 a A	6,13 ± 0,02 d B	6,08 ± 0,02 b B	5,42 ± 0,02 cd C	5,34 ± 0,03 d D
ETOH	6,82 ± 0,02 a A	5,81 ± 0,01 f B	5,83 ± 0,02 d B	5,28 ± 0,02 e C	5,26 ± 0,02 e C

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3). a-f Letras diferentes en la misma columna indican que no hay diferencias estadísticas (tratamiento diferente mismo día); A-E Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (mismo tratamiento) a lo largo del almacenamiento ($p < 0,05$). Hamburguesas preparadas: *C: sin antioxidantes; ERIT: con eritorbato de sodio a 500 mg/kg; ATOM: con extracto atomizado; H2O: con extracto liofilizado; ETOH-H2O: con extracto etanol-agua y ETOH: con extracto etanol. Todos los extractos dosificados a 8 g/100 g de hamburguesa.

4. Conclusiones

Las especies *P. carpunya*, *S. ecuadorensis* e *I. guayusa*, plantas medicinales de los países andinos, exhiben variaciones en su contenido fenólico y capacidad antioxidante, que oscilan entre bajos y altos. Los extractos ETOH-H₂O tanto en *P. carpunya* como en *S. ecuadorensis* presentaron la capacidad antioxidante más alta de este estudio (valores mayores en DPPH, FRAP y ABTS), asociada con el mayor contenido fenólico total. En el caso del extracto H₂O de *I. guayusa* es el que mayor contenido de fenoles totales tuvo. Los extractos ETOH-H₂O, ETOH, H₂O de *S. ecuadorensis*; ETOH y H₂O de *P. carpunya* y ETOH-H₂O y ETOH de *I. guayusa* evitaron la oxidación lipídica de las hamburguesas de cerdo durante 14 días en refrigeración, mostrando un efecto protector mejor o similar que el que se observó en las muestras elaboradas con eritorbato de sodio lo que podría sugerir la posibilidad de sustituir este aditivo por un antioxidante natural. No obstante, algunos extractos como el ATOM en el caso de *S. ecuadorensis* y ATOM y H₂O en *I. guayusa* muestran efecto prooxidante, por lo que habría que hacer nuevos estudios para establecer las dosis adecuadas. Por su parte el pH de las hamburguesas se vio afectado por la aplicación de los extractos disminuyendo su valor para la mayoría de los lotes con extractos. Aunque a nivel industrial el extracto ATOM sería la elección más eficiente debido a su rendimiento y el tipo de solvente utilizado, los resultados de la capacidad antioxidante de las tres plantas sugieren que los extractos más efectivos en este sentido son ETOH-H₂O y H₂O. Estos se destacan por su desempeño superior, mientras que el extracto ETOH, a pesar de sus buenos resultados antioxidantes, se ve limitado por su bajo rendimiento.

5. Referencias bibliográficas

1. Galanakis, C.M. *Food Quality and Shelf Life*; Academic Press: 2019; pp. 1-402.
2. Bayram, I.; Decker, E.A. Underlying mechanisms of synergistic antioxidant interactions during lipid oxidation. *Trends in Food Science & Technology* 2023, 133, 219-230, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.02.003>.
3. Wood, J.D.; Richardson, R.I.; Nute, G.R.; Fisher, A.V.; Campo, M.M.; Kasapidou, E.; Sheard, P.R.; Enser, M. Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Science* 2004, 66, 21-32, doi:[https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00022-6).
4. Sánchez-Alonso, I.; Jiménez-Escrig, A.; Saura-Calixto, F.; Borderías, A.J. Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. *LWT - Food Science and Technology* 2008, 41, 42-50, doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.02.002>.

5. Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins Byrne, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006, 19, 669-675, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>.
6. Choe, E.; Min, D.B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2009, 8, 345-358, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x>.
7. Šojić, B.; Tomović, V.; Kocić-Tanackov, S.; Kovačević, D.B.; Putnik, P.; Mrkonjić, Ž.; Đurović, S.; Jokanović, M.; Ivić, M.; Škaljac, S.; *et al.* Supercritical extracts of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) by-product as natural antioxidants in ground pork patties. *LWT - Food Science and Technology* 2020, 130, 109661, doi:<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109661>.
8. Vargas-Ramella, M.; Lorenzo, J.; Zamuz, S.; Valdés, M.E.; Moreno, D.; Balcázar, M.C.G.; Fernández-Arias, J.M.; Reyes, J.F.; Franco, D.J.A. The Antioxidant Effect of Colombian Berry (*Vaccinium meridionale* Sw.) Extracts to Prevent Lipid Oxidation during Pork Patties Shelf-Life. *Antioxidants* 2021, 10, 1290.
9. Pateiro, M.; Vargas, F.C.; Chinchá, A.A.I.A.; Sant'Ana, A.S.; Strozzi, I.; Rocchetti, G.; Barba, F.J.; Domínguez, R.; Lucini, L.; do Amaral Sobral, P.J.; *et al.* Guarana seed extracts as a useful strategy to extend the shelf life of pork patties: UHPLC-ESI/QTOF phenolic profile and impact on microbial inactivation, lipid and protein oxidation and antioxidant capacity. *Food Research International* 2018, 114, 55-63, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.047>.
10. Asioli, D.; Aschemann-Witzel, J.; Caputo, V.; Vecchio, R.; Annunziata, A.; Næs, T.; Varela, P. Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International* 2017, 99, 58-71, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.022>.
11. Tamkutė, L.; Gil, B.M.; Carballido, J.R.; Pukalskienė, M.; Venskutonis, P.R. Effect of cranberry pomace extracts isolated by pressurized ethanol and water on the inhibition of food pathogenic/spoilage bacteria and the quality of pork products. *Food Research International* 2019, 120, 38-51, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.025>.
12. Carocho, M.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R. Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology* 2015, 45, 284-295, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>.

13. Lorenzo, J.M.; Pateiro, M.; Domínguez, R.; Barba, F.J.; Putnik, P.; Kovačević, D.B.; Shpigelman, A.; Granato, D.; Franco, D. Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. *Food Research International* 2018, 106, 1095-1104, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.005>.
14. Delgado-Pando, G.; Ekonomou, S.I.; Stratakos, A.C.; Pintado, T. Clean Label Alternatives in Meat Products. *Foods* 2021, 10, 1615.
15. Cullere, M.; Tasoniero, G.; Secci, G.; Parisi, G.; Smit, P.; Hoffman, L.C.; Dalle Zotte, A. Effect of the incorporation of a fermented rooibos (*Aspalathus linearis*) extract in the manufacturing of rabbit meat patties on their physical, chemical, and sensory quality during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology* 2019, 108, 31-38, doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.051>.
16. Kryževičūtė, N.; Jaime, I.; Diez, A.M.; Rovira, J.; Venskutonis, P.R. Effect of raspberry pomace extracts isolated by high pressure extraction on the quality and shelf-life of beef burgers. *International Journal of Food Science & Technology* 2017, 52, 1852-1861, doi:<https://doi.org/10.1111/ijfs.13460>.
17. Solva, M.V.; Lannes, S.C.S. Lipid oxidation in meat: Mechanisms and protective factors - a review. *Food Science and Technology (Brazil)* 2018, 38, 1-15, doi:<https://doi.org/10.1590/fst.32518>.
18. Velázquez, L.; Quiñones, J.; Díaz, R.; Pateiro, M.; Lorenzo, J.M.; Sepúlveda, N. Natural Antioxidants from Endemic Leaves in the Elaboration of Processed Meat Products: Current Status. *Antioxidants* 2021, 10, 1396.
19. Armijos, C.; Guamán Balcázar, M.D.C.; Meneses, M.; Suarez, A.I. Antioxidant properties of medicinal plants used in the Southern Ecuador. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2018, 1.
20. Ballesteros, J.L.; Tacchini, M.; Spagnoletti, A.; Grandini, A.; Paganetto, G.; Neri, L.M.; Marengo, A.; Angiolella, L.; Guerrini, A.; Sacchetti, G. Rediscovering Medicinal Amazonian Aromatic Plants: *Piper carpunya* (Piperaceae) Essential Oil as Paradigmatic Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019, 2019, 6194640, doi:<https://doi.org/10.1155/2019/6194640>.
21. Valarezo, E.; Rivera, J.X.; Coronel, E.; Barzallo, M.A.; Calva, J.; Cartuche, L.; Meneses, M.A. Study of Volatile Secondary Metabolites Present in *Piper carpunya* Leaves and in the Traditional Ecuadorian Beverage Guaviduca. *Plants* 2021, 10, 338.
22. Rondón, M.; Moncayo, S.; Cornejo, X.; Santos, J.; Villalta, D.; Siguencia, R.; Duche, J. Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity

- of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University - Science* 2017, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.03.009>.
23. García-Ruiz, A.; Baenas, N.; Benítez-González, A.M.; Stinco, C.M.; Meléndez-Martínez, A.J.; Moreno, D.A.; Ruales, J. Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2017, 97, 3929-3936, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.8255>.
 24. Scherer, R.; Godoy, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* 2009, 112, 654-658, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>.
 25. Cadena-Carrera, S.; Tramontin, D.P.; Bella Cruz, A.; Bella Cruz, R.C.; Müller, J.M.; Hense, H. Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) obtained by supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent. *Journal of Supercritical Fluids* 2019, 152, doi:<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104543>.
 26. Alothman, M.; Bhat, R.; Karim, A.A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry* 2009, 115, 785-788, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.005>.
 27. Jaramillo-Jaramillo, C.; Jaramillo-Espinoza, A.; D'Armas, H.; Troccoli, L.; Rojas de Astudillo, L. Concentrations of alkaloids, cyanogenic glycosides, polyphenols and saponins in selected medicinal plants from Ecuador and their relationship with acute toxicity against *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical* 2016, 64, doi:<https://doi.org/10.15517/rbt.v64i3.19537>.
 28. Lu, M.; Yuan, B.; Zeng, M.; Chen, J. Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International* 2011, 44, 530-536, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.055>.
 29. Sogi, D.S.; Siddiq, M.; Greiby, I.; Dolan, K.D. Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of 'Tommy Atkins' mango peel and kernel as affected by drying methods. *Food Chemistry* 2013, 141, 2649-2655, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.053>.
 30. Troya-Santos, J.; Ale-Borja, N.; Suárez-Cunza, S. Capacidad antioxidante *in vitro* y efecto hipoglucemiante de la maca negra (*Lepidium meyenii*) preparada tradicionalmente. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 2017, 83, 40-51.
 31. Chóez-Guaranda, I.; Viteri-Espinoza, R.; Barragán-Lucas, A.; Quijano-Avilés, M.; Manzano, P. Effect of solvent-solvent partition on antioxidant activity and GC-MS profile

- of *Ilex guayusa* Loes. leaves extract and fractions. *Natural Product Research* 2022, 36, 1570-1574, doi:<https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1882455>.
32. Villacís-Chiriboga, J.; García-Ruiz, A.; Baenas, N.; Moreno, D.A.; Meléndez-Martínez, A.J.; Stinco, C.M.; Jerves-Andrade, L.; León-Tamariz, F.; Ortiz-Ulloa, J.; Ruales, J. Changes in phytochemical composition, bioactivity and *in vitro* digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2018, 98, 1927-1934, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.8675>.
 33. Arteaga-Crespo, Y.; Radice, M.; Bravo-Sanchez, L.R.; García-Quintana, Y.; Scalvenzi, L. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon* 2020, 6, doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>.
 34. Fernandes, R.P.P.; Trindade, M.A.; Tonin, F.G.; Lima, C.G.; Pugine, S.M.P.; Munekata, P.E.S.; Lorenzo, J.M.; de Melo, M.P. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of Food Science and Technology* 2016, 53, 451-460, doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-015-1994-x>.
 35. Arnao, M.B.; Cano, A.; Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 2001, 73, 239-244, doi:[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1).
 36. Bravo, L.; Goya, L.; Lecumberri, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International* 2007, 40, 393-405, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.016>.
 37. Nieto, G.; Skibsted, L.H.; Andersen, M.L.; Ros, G. Actividad antioxidante y prooxidante del aceite esencial de ajo por resonancia de spin electrónica. *Anales de Veterinaria de Murcia* 2012, 28, 23-33, doi:<https://doi.org/10.6018/j/188691>.
 38. Babaoğlu, A.S.; Unal, K.; Dilek, N.M.; Poçan, H.B.; Karakaya, M. Antioxidant and antimicrobial effects of blackberry, black chokeberry, blueberry, and red currant pomace extracts on beef patties subject to refrigerated storage. *Meat Science* 2022, 187, 108765, doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108765>.
 39. Chang, L.W.; Yen, W.J.; Huang, S.C.; Duh, P.D. Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chemistry* 2002, 78, 347-354, doi:[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00119-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00119-X).

40. Tarladgis, B.G.; Watts, B.M.; Younathan, M.T.; Dugan Jr., L. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1960, *37*, 44-48, doi:<https://doi.org/10.1007/BF02630824>.
41. Campo, M.M.; Nute, G.R.; Hughes, S.I.; Enser, M.; Wood, J.D.; Richardson, R.I. Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science* 2006, *72*, 303-311, doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.07.015>.
42. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997, *22*, 749-760, doi:[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00351-6).
43. Bellucci, E.R.B.; dos Santos, J.M.; Carvalho, L.T.; Borgonovi, T.F.; Lorenzo, J.M.; Silva-Barretto, A.C.d. Açaí extract powder as natural antioxidant on pork patties during the refrigerated storage. *Meat Science* 2022, *184*, 108667, doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108667>.
44. Bellucci, E.R.B.; Munekata, P.E.S.; Pateiro, M.; Lorenzo, J.M.; da Silva Barretto, A.C. Red pitaya extract as natural antioxidant in pork patties with total replacement of animal fat. *Meat Science* 2021, *171*, 108284, doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108284>.
45. Peiretti, P.G.; Gai, F.; Zorzi, M.; Aigotti, R.; Medana, C. The effect of blueberry pomace on the oxidative stability and cooking properties of pork patties during chilled storage. *Journal of Food Processing and Preservation* 2020, *44*, e14520, doi:<https://doi.org/10.1111/jfpp.14520>.
46. Lorenzo, J.M.; Vargas, F.C.; Strozzi, I.; Pateiro, M.; Furtado, M.M.; Sant'Ana, A.S.; Rocchetti, G.; Barba, F.J.; Dominguez, R.; Lucini, L.; *et al.* Influence of pitanga leaf extracts on lipid and protein oxidation of pork burger during shelf-life. *Food Research International* 2018, *114*, 47-54, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.046>.

DISCUSIÓN GENERAL

Los países de la región andina y particularmente Ecuador por su condiciones geográficas y climáticas albergan una amplia variedad de ecosistemas que brindan un hábitat propicio para una vasta gama de especies vegetales. Esta riqueza biológica otorga a Ecuador un potencial extraordinario en la diversidad de compuestos bioactivos (polifenoles, flavonoides y otros metabolitos secundarios) presentes en sus plantas, los cuales ofrecen propiedades antioxidantes, antimicrobianas y terapéuticas con una gran posibilidad de aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Esta biodiversidad posiciona a Ecuador como un importante foco de interés para la investigación y desarrollo de nuevos productos naturales con propiedades beneficiosas para la salud humana y el bienestar general. Se han llevado a cabo investigaciones significativas para conocer las especies empleadas en la medicina tradicional, conservar su conocimiento ancestral y sus aplicaciones [1-5]. A lo largo de siglos, las comunidades indígenas han empleado estas plantas para tratar diversas afecciones y enfermedades, constituyendo un elemento fundamental de la medicina tradicional y la rica cultura ancestral en Ecuador. Sin embargo, persiste la necesidad de estudios científicos que puedan valorar estas plantas en términos de su sostenibilidad, uso adecuado y aplicaciones [2,4,5].

En estos últimos años se han realizado extensas investigaciones sobre sustancias de origen vegetal que han demostrado tener excelentes efectos antimicrobianos, antioxidantes, para conservación de alimentos, etc. [6,7], lo que las convierte en prometedoras alternativas naturales, por ejemplo, a los aditivos sintéticos para la industria de alimentos, lo cual abre una posibilidad inmensa para los países con gran biodiversidad y además se ajusta a las tendencias actuales de alimentos etiqueta limpia o *clean label* en los cuales una de sus categorías es la de productos que usen en su formulación aditivos naturales [8], los cuales son percibidos por los consumidores como saludables [9].

En esta investigación se han considerado tres especies de plantas que se encuentran en la región sur de Ecuador: *Piper carpunya* (guaviduca), *Simira ecuadorensis* (guapala) e *Ilex guayusa* (guayusa), las cuales se han usado por las poblaciones nativas desde hace mucho tiempo. La composición química de los extractos de estas plantas reveló la presencia de una variedad de compuestos entre las especies estudiadas, identificándose compuestos fenólicos, flavonoides y otros metabolitos secundarios, cuyas concentraciones también variaron, y pueden relacionarse con la actividad biológica observada.

Respecto al estudio de volátiles, para *Simira ecuadorensis*, se observó que el extracto H₂O presentaba la mayor cantidad de compuestos volátiles, seguido por los extractos ETOH-H₂O y ETOH, en ese orden. El extracto H₂O mostró los valores más elevados para alcoholes, monoterpenos y fenoles volátiles, mientras que los extractos etanólicos (ETOH-H₂O y ETOH) destacaron en otros grupos volátiles. En la familia de monoterpenos, la piperitona fue especialmente notable, mientras que, en los fenoles volátiles, predominaron el eugenol y el 3-alil-6-metoxifenol. Además, dentro de la familia de los ésteres, el éster etílico del ácido 3-hexenoico fue significativo. Respecto a los alcoholes, destacaron el 3-octanol, presente solo en dos muestras, y los compuestos 1-hexanol y 3-hexen-1-ol, que abarcaron casi la totalidad de la familia de los alcoholes. Es la primera vez que se estudia la fracción volátil para esta especie, es por ello que la información previa es escasa. Rondón *et al.* [10], aplicando pruebas cualitativas, reportaron para extractos etanólicos de *S. ecuadorensis* abundante presencia de alcaloides y en menor cantidad taninos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, terpenos y saponinas, varios de estos metabolitos secundarios son característicos del género *Simira* [11].

En el caso de *Piper carpunya*, se evidenció que los extractos ETOH y H₂O presentaban los niveles más altos de compuestos volátiles entre todas las familias estudiadas, siendo los monoterpenos, fenoles volátiles, y otros compuestos como safrol, elemicina e isoelemicina los más destacados. Específicamente, en la familia de monoterpenos, los predominantes fueron α -terpineno, cimeno y 1-8-cineol, seguidos por piperitona, L-limoneno y linalol, que, aunque presentes en cantidades significativas, fueron ligeramente menores que los primeros. En cuanto a los fenoles volátiles, destacaron el metil-isoeugenol y, en menor cantidad, eugenol, m-timol y carvacrol, particularmente en el extracto etanólico.

Algunas investigaciones que reportan la composición química del aceite esencial y/o extractos de *P. carpunya*, también observaron compuestos que coinciden con los reportados en esta investigación, como es el caso de piperitona, limoneno, elemicina, eugenol, metil-isoeugenol y 1,8-cineol [12-15], difiriendo únicamente en su cantidad, lo cual puede deberse a la alta adaptabilidad de la guaviduca a diferentes condiciones ambientales [12].

En *Ilex guayusa* se destaca la familia de los monoterpenos, siendo piperitona y cimeno los compuestos con los valores más elevados, seguidos por ésteres y alcoholes, donde el 2-hidroxibenzoato de metilo y 1-hexanol son predominantes. El extracto etanólico se distingue por tener la mayor cantidad y diversidad de compuestos volátiles en la mayoría de las familias. Es relevante destacar que el 2-hidroxibenzoato de metilo, común en las plantas, posee propiedades antioxidantes y antibacterianas [16,17].

Con base a lo expuesto, se puede concluir que *P. carpunya* es la especie que muestra la mayor variedad de compuestos volátiles. Además, las principales diferencias identificadas entre las familias de compuestos en las tres especies analizadas fueron notables: la presencia destacada de sesquiterpenos en *P. carpunya*, la presencia de furanos en *S. ecuadorensis*, y la ausencia de cetonas en *I. guayusa*. Estas divergencias podrían influir en la variación del efecto antimicrobiano y antioxidante de estas plantas.

Diversas investigaciones han documentado los compuestos encontrados en los extractos de las especies estudiadas en este trabajo, sugiriendo que podrían ser los responsables de su actividad antimicrobiana. La evidencia científica reporta propiedades antimicrobianas para la familia de los monoterpenos, en la cual se han identificado la piperitona [18], α -pineno, β -pineno [19,20], α -terpineno [20,21], 1,8-cineol [22], cimeno [21,23], felandreno [24], limoneno [21], linalol [20,25], 4-terpineol [26]. En cuanto a los fenoles volátiles, se ha encontrado el metil-iso Eugenol [27], eugenol [20,28], timol [20], carvacrol [7,20,29]. Entre los alcoholes, destaca el 1-hexanol [30]. Asimismo, se han reportado norisoprenoides como β -ionona [31] y alquilbencenos como safrol [19,28,32], los cuales manifiestan actividad antimicrobiana tanto de manera individual como a través de efectos sinérgicos, como se observa en el caso del cimeno, precursor biológico del carvacrol [33].

En cuanto a la actividad antimicrobiana de los extractos, se pudo observar que, si se comparan los extractos de las tres plantas por el número de cepas bacterianas afectadas y sus valores de concentración mínima inhibitoria (CMI), el mayor efecto corresponde a los extractos de *P. carpunya* que afectaron a un total de siete bacterias de las 20 consideradas en el estudio, varios trabajos también reportan actividad antimicrobiana de esta especie y otras del género *Piper* [14,19,34,35]. El extracto ETOH fue el mejor y afectó a seis cepas bacterianas, seguido del ETOH-H₂O que inhibió a cinco y el H₂O a tres. Las bacterias más inhibidas fueron *Clostridium perfringens* (CMI para el extracto ETOH de 10 mg/ml seguida de la del extracto ETOH-H₂O con 20 mg/ml), *Campylobacter jejuni*, *Shewanella putrefaciens* y *Shewanella* sp. (para el extracto ETOH, CMI 20 mg/ml para las tres).

Los estudios sobre la actividad antimicrobiana también revelaron que *S. ecuadorensis* presenta una notable actividad antimicrobiana. Aunque la información específica sobre esta especie es limitada, se ha reportado que comparte propiedades antimicrobianas con algunas especies del género *Simira* [10,11]. En nuestro estudio destacó el extracto ETOH inhibiendo el crecimiento de 7 cepas microbianas, *Y. enterocolitica* (CMI de 20 mg/ml), *B. cereus* (CMI de 20 mg/ml), *C. perfringens* (CMI de 20 mg/ml), *Shewanella* sp. (CMI de 40 mg/ml), *Shew.*

putrefaciens (CMI de 80 mg/ml), *C. jejuni* (CMI de 80 mg/ml), *L. mesenteroides* (CMI de 80 mg/ml). Las cepas más sensibles a esta planta fueron *C. jejuni* y *Shew. putrefaciens* ya que se vieron afectadas por los cuatro extractos.

Los extractos de *I. guayusa* presentaron efectos antimicrobianos, como se ha documentado en varias investigaciones [36,37], aunque en menor medida en comparación con las otras especies estudiadas. Se pudo comprobar que el extracto más eficaz en este caso fue el ETOH, que afectó a *Shewanella* sp. (CMI de 40 mg/ml), *Shew. putrefaciens* (CMI de 80 mg/ml), *Enterococcus faecalis*, *Weissella viridescens* (CMI de 80 mg/ml, para ambas), seguido por ETOH-H₂O que afectó a *C. jejuni* y *Shewanella* sp. (CMI 40 y 80 mg/ml, respectivamente). *Shewanella* sp. mostró ser la cepa más sensible a los extractos de *I. guayusa*, ya que todos los extractos la inhibieron (ver apéndices).

A partir de los resultados previamente expuestos sobre la actividad antimicrobiana *in vitro*, se deduce que los extractos ETOH de las tres especies presentaron la mejor capacidad antimicrobiana, que se podría asociar con la eficacia comprobada de los solventes alcohólicos que logran una extracción más completa de compuestos volátiles [20,38], muchos de los cuales poseen actividad antimicrobiana como compuestos individuales o en sinergia potenciando su acción [39].

Una vez que se ha determinado el efecto antimicrobiano de extractos *in vitro*, es crucial probarlos en modelos alimentarios reales ya que, los modelos *in vitro* pueden no reflejar completamente las condiciones y complejidad del entorno alimentario real, como la interacción con otros componentes alimentarios, las condiciones y estabilidad durante el almacenamiento y los procesos de producción [40]. Por tanto, para ampliar los estudios sobre la actividad antimicrobiana, se decidió evaluar la efectividad en modelos alimentarios de un extracto etanólico y otro acuoso. A pesar de que se notó una actividad antimicrobiana más sobresaliente en el ETOH, su limitado rendimiento en la etapa de extracción lo excluyó como alternativa para este fin y para su potencial producción en un entorno industrial, por lo tanto, se consideró como mejor opción el extracto ETOH-H₂O. Además, con un criterio similar se eligió el extracto ATOM, el cual también mostró actividad comparable frente a las cepas estudiadas (*Shew. putrefaciens* y *C. jejuni*).

Los resultados de este estudio respaldan la efectividad antimicrobiana de los extractos ETOH-H₂O y ATOM de *S. ecuadorensis* frente a *Shew. putrefaciens* y *C. jejuni*, especialmente cuando se evaluó en modelos alimentarios que simulan las condiciones de crecimiento de estas

bacterias, eligiéndose caldo y hamburguesas de pescado para el caso de las pruebas con *Shew. putrefaciens* y las mismas matrices, pero con pollo para *C. jejuni*.

El extracto ETOH-H₂O tuvo un efecto destacable en hamburguesas de pescado, evidenciándose una reducción de hasta cuatro unidades logarítmicas en el crecimiento, tanto de bacterias aerobias mesófilas (AMB) como de *Shew. putrefaciens* hasta el día 9 de almacenamiento, sin afectar su pH. En cuanto al caldo de pescado, la capacidad antimicrobiana de este extracto fue más notoria ya que tuvo efecto desde el día uno, y desde el día 7 hasta el día 131 presentó una reducción aún mayor, con valores de hasta 5 log frente a AMB y 6,50 log frente a *Shew. putrefaciens*. Indudablemente la composición de los extractos desempeña un papel crucial en su efecto antimicrobiano. Varios de los compuestos volátiles que se mencionaron anteriormente, reconocidos por su acción antimicrobiana, han sido identificados como responsables de la inhibición de *Shew. putrefaciens* en estudios previos, entre estos destaca el carvacrol [41], terpineno y eugenol [42,43]. Este último puede provocar el colapso de la membrana celular de la bacteria y además en combinación con otros componentes como timol, entre otros, mostró un efecto antibacteriano sinérgico, causando daños más graves a la estructura de la membrana celular bacteriana [43].

En relación con el extracto ATOM, se evidenció su eficacia contra *C. jejuni* en caldo de pollo desde el primer día, aunque no manifestó ningún efecto contra AMB en el mismo producto. En el caso de las hamburguesas de pollo, se observó una disminución significativa de la carga AMB hasta el cuarto día de almacenamiento. Este hecho, combinado con la notable reducción del pH desde el primer día, podría sugerir indirectamente su eficacia antimicrobiana frente a una parte de la microbiota que constituye AMB, sin afectar las bacterias ácido-lácticas (BAL). Sin embargo, este extracto no mostró efecto contra *C. jejuni* en las hamburguesas de pollo. La actividad de este extracto frente a esta bacteria podría estar vinculada a la presencia de compuestos, como metil-isoeugenol, eugenol [27,44,45], carvacrol, y timol [45].

Por su parte, en la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *P. carpunya* en modelos alimentarios, se ha constatado que, al aplicarlos en *risotto*, el extracto ETOH-H₂O demostraba una notable eficacia contra *C. perfringens* desde el día 1 hasta el día 21, así como frente a AMB hasta el día 4. Además, se observó un efecto sobre la microbiota psicrófila. Numerosos estudios respaldan la actividad antimicrobiana de compuestos presentes en los extractos de plantas o aceites esenciales, que coinciden con la composición de los extractos ensayados. Por ejemplo, se ha reportado la actividad de componentes como 4-terpineol [26], timol, carvacrol [46,47], α -pineno [48], β -pineno, 1,8-cineol, limoneno [49], frente a especies de *Clostridium*, entre las que destaca *C. perfringens*. Además, se han descrito efectos sinérgicos entre carvacrol, p-cimeno, linalol y timol, componentes presentes en *P.*

carpunya y en el aceite esencial de *Satureja montana* L, que cuando se aplican a mortadela junto con 100 ppm de nitrito, mejoran su actividad antimicrobiana. También se ha destacado que eugenol y carvacrol poseen efectos inhibidores notables contra la germinación de esporas de *C. perfringens* [50].

Por ende, los resultados señalan la presencia de compuestos que podrían ser responsables de la actividad antimicrobiana de *P. carpunya* contra *C. perfringens*. Además, es crucial considerar la posible existencia de efectos sinérgicos con otros componentes presentes en menor proporción en los extractos, contribuyendo así a esta actividad [46]. Estos descubrimientos destacan la complejidad de las interacciones entre los diversos compuestos presentes en los extractos, respaldando la necesidad de un enfoque integral para comprender completamente sus propiedades antimicrobianas.

La identificación de los compuestos volátiles en los extractos de plantas es esencial para establecer asociaciones con propiedades, como las mencionadas anteriormente, y otras como las antioxidantes. Estos compuestos, que abarcan una variedad de terpenoides, fenoles, alcoholes, entre otros, también han sido objeto de investigaciones para entender su capacidad para neutralizar radicales libres y proporcionar protección contra la oxidación. En este contexto, se ha investigado la relación entre los compuestos volátiles de extractos de *S. ecuadorensis*, *P. carpunya* e *I. guayusa* y su potencial antioxidante, tanto *in vitro* como en modelos alimentarios. Comprender esta relación amplía nuestro conocimiento sobre los mecanismos antioxidantes de estas especies y sus aplicaciones prácticas en la mejora de la estabilidad de alimentos enriquecidos con estos extractos.

El análisis de la actividad antioxidante de los extractos arrojó que *S. ecuadorensis* fue la especie con la mejor actividad antioxidante, seguida de *P. carpunya*. Las tres especies tienen un contenido fenólico y una actividad antioxidante media-alta. Rondón *et al.* [10] reportan un valor de fenoles totales (3,46 mg EAG/g BS) para un extracto etanólico de *S. ecuadorensis* menor a lo observado en la presente investigación para los extractos ETOH-H₂O, ATOM y H₂O. Además, Moreira *et al.* [11] mencionan el potencial antioxidante mediante el método DPPH, de tallos de *Simira glaziovii* (concentración efectiva media, EC₅₀ 21,50 ± 0,30 ppm), tallos de *S. eliezeriana* (EC₅₀ 12,03 ± 0,07 ppm) y ramas de *Simira grazielae* (EC₅₀ 1.200 ± 0,003 ppm), comparadas con el control positivo (EC₅₀ 27,00 ± 0,19 ppm). En el caso de *P. carpunya*, Valarezo *et al.* [14] y Ballesteros *et al.* [12], reportan una baja capacidad antioxidante *in vitro* (evaluada mediante ensayos DPPH y ABTS) del aceite esencial de *P. carpunya*, a pesar de la presencia de compuestos como 1,8-cineol, que ha demostrado actividad antioxidante *in vivo* al reducir el estrés oxidativo inducido en ratas [51]. Esta discrepancia sugiere la posible antagonización de los efectos antioxidantes por otros compuestos presentes en el aceite esencial. La actividad antioxidante

observada podría deberse a la posible bioactividad de algún compuesto menos abundante o a la presencia de interacciones sinérgicas entre moléculas [12].

El extracto ETOH-H₂O, tanto en *P. carpunya* como en *S. ecuadorensis*, presentó la capacidad antioxidante más notable en este estudio, evidenciada por valores superiores en DPPH, FRAP y ABTS. Esta destacada capacidad antioxidante está vinculada al elevado contenido fenólico total, posiblemente atribuible a la riqueza de compuestos volátiles, ya que los solventes alcohólicos son eficientes para extraer estos elementos en mayor cantidad [20,38]. Mientras que *I. guayusa* presentó la menor actividad antioxidante en general, con la excepción del extracto H₂O que reveló la concentración más alta de compuestos fenólicos (9,84 mg EAG/g BS). Estos datos son inferiores a los encontrados en otros estudios con hojas de *I. guayusa* (21,42 y 33,44 mg EAG/g BS [52], 33,80 mg EAG/g BS [53], y 54,86 mg EAG/g BS [54]). Esta variación posiblemente se deba a la influencia de factores que afectan el material vegetal, como el lugar de recolección, la época de cosecha y el estado de madurez de las hojas [52].

Se ha observado correlación entre varios compuestos relacionados con la capacidad antimicrobiana de estas especies que también poseen propiedades antioxidantes, tal es el caso de la familia de monoterpenos, donde se destacan el α -pineno, β -pineno [55], α -terpineno [56], 1,8 cineol [14,21,55], cimeno [57], felandreno [58], linalol [21], L-limoneno [55]. También de los fenoles volátiles como eugenol [59-61], timol [60,61], carvacrol [60-62], en cuanto a los norisoprenoides, β -ionona [31], dentro de los ésteres 2-hidroxibenzoato de metilo [16,17] y otros compuestos como elemicina e isoelemicina [63].

La capacidad *in vitro* de los extractos de hojas de *P. carpunya*, *S. ecuadorensis* e *I. guayusa*, sugieren que son fuentes de antioxidantes naturales, pudiendo ser una alternativa eficaz a los antioxidantes sintéticos comerciales que se usan en la industria para mejorar la calidad y prolongar la vida útil de los alimentos procesados. En consecuencia, era fundamental evaluar su capacidad antioxidante en productos cárnicos, para esto se evaluaron los extractos de las plantas de esta investigación sobre hamburguesas de cerdo, las cuales se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante 14 días y se evaluó la presencia de malondialdehído (MDA) compuesto indeseable en estos productos, ya que es un subproducto de la peroxidación lipídica.

La incorporación de estos extractos naturales (ETOH-H₂O, ETOH y H₂O de *S. ecuadorensis*; ETOH y H₂O de *P. carpunya*; ETOH-H₂O y ETOH de *I. guayusa*) reduce significativamente la oxidación lipídica en hamburguesas de cerdo hasta el día 14. Estos resultados sugieren que los extractos de hojas de las tres especies evaluadas en este estudio podrían ser una alternativa eficaz a los antioxidantes sintéticos comerciales para mejorar la calidad y prolongar la vida útil de las hamburguesas de cerdo.

Se observaron posibles efectos prooxidantes, especialmente en algunos extractos de *P. carpunya* (ETOH-H₂O y H₂O). Esto podría estar vinculado a la concentración empleada en este extracto, ya que ciertos componentes, como los flavonoides, tienen la capacidad de cambiar su función de antioxidantes a prooxidantes al incrementarse su concentración en matrices alimentarias [64,65].

En cuanto a la evolución del pH, se observó una disminución en las hamburguesas tratadas con los extractos. En el caso de *S. ecuadorensis*, los cuatro extractos llevaron a una reducción del pH, siendo más pronunciado en el caso del ETOH. Esta tendencia también se manifestó en *P. carpunya* e *I. guayusa*, aunque con una intensidad menor. Esto podría atribuirse a la selectividad de los compuestos antioxidantes presentes en los extractos, actuando como una barrera contra la proliferación de cierta microbiota contaminante, lo que favoreció el crecimiento de bacterias ácido-lácticas (BAL) y la generación de ácido láctico [66,67]. Otra posible explicación, según Tamkuté *et al.* [66], se relaciona con la generación de ácidos grasos libres mediante la hidrólisis de lípidos.

Estas conexiones entre propiedades antimicrobianas y antioxidantes subrayan la complejidad y el potencial sinérgico de los compuestos presentes en los extractos estudiados, por lo que estos hallazgos sugieren que los extractos de hojas de *P. carpunya*, *S. ecuadorensis* e *I. guayusa* pueden ser alternativas prometedoras a los aditivos alimentarios sintéticos.

DESAFÍOS FUTUROS

A pesar de los resultados prometedores encontrados en este estudio es importante reconocer ciertas condiciones que podrían influir en la estandarización y aplicabilidad de los hallazgos de esta investigación. A continuación, se detallan algunas de estas.

La variabilidad inherente a los componentes activos de las plantas podría introducir cierta incertidumbre en la consistencia de los resultados. Factores como la temperatura, la humedad, el suelo, el período de cosecha, la posición geográfica, las variaciones estacionales y el ciclo vegetativo pueden influir en la composición química de los extractos [14,68,69], lo que afecta la reproducibilidad de los resultados. Para mejorar este aspecto, se requieren estrategias que se centren en el desarrollo de procedimientos de aislamiento y purificación rentables que produzcan extractos estandarizados y consistentes, evitando así la pérdida de las propiedades funcionales de los compuestos activos. Es crucial considerar mezclas de componentes en lugar de compuestos individuales, ya que la actividad biológica de los extractos de plantas suele ser el resultado de los efectos aditivos o sinérgicos de estos componentes [29]. Además, la aplicación de la tecnología de barreras con el uso de antimicrobianos naturales combinados con otras técnicas de conservación puede mejorar su rendimiento y si a esto se suma la encapsulación de estos componentes dentro de partículas coloidales se obtendrán extractos más estables [70].

Una propuesta de avance estaría relacionada con la exploración de otros grupos de compuestos bioactivos presentes en estas plantas, y no solo el análisis de compuestos volátiles, que, si bien proporciona valiosa información de los componentes aromáticos de las especies estudiadas, no aporta una información completa respecto a la composición de las plantas. Entre estos compuestos bioactivos, destacan los polifenoles, alcaloides y otros metabolitos secundarios que también pueden desempeñar un papel crucial en las propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Conocer los compuestos presentes, comprender su efectividad individual y la posible sinergia o antagonismo entre ellos tampoco se aborda explícitamente.

Los compuestos activos de los productos naturales suelen ser propensos al deterioro de su calidad y concentración en almacenamiento, algunos factores causantes de tales cambios son: contaminación con microorganismos e insectos, pérdida de los componentes activos por volatilidad y la disminución de su actividad en almacenamientos con tiempos prolongados, temperaturas inadecuadas, oxígeno, luz, humedad [71]. Los compuestos activos de los productos naturales suelen ser propensos al deterioro de su calidad y concentración durante el almacenamiento, siendo afectados por diversos factores como: la contaminación microbiana e insectos, la volatilidad que conduce a la pérdida de componentes activos, la disminución de la

actividad en almacenamientos prolongados, condiciones de temperatura inadecuadas, exposición al oxígeno, luz, humedad entre otros [69,71]. Por lo tanto, se podrían probar varias estrategias para mejorar su estabilidad, algunas de ellas son la encapsulación, inclusión en biopolímeros, etc.

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó en un conjunto específico de cepas. La inclusión de un espectro más amplio de microorganismos entre los que pueden considerarse cepas del grupo de los hongos podría proporcionar una comprensión más completa de la magnitud del efecto de los extractos estudiados.

Otro aspecto a tomar en cuenta es la matriz alimentaria de prueba. Las hamburguesas en las que se aplicaron los extractos proporcionan un modelo representativo de los sistemas alimentarios reales. No obstante, se podrían considerar otras matrices más complejas, las cuales, presentan desafíos adicionales que no se abordan completamente en este estudio, ya que hay que tomar en cuenta que el procesamiento de alimentos, su intensidad, etapas y condiciones, afectan el material vegetal, es decir, hay un efecto sobre la estabilidad de los compuestos bioactivos al aplicarse los extractos vegetales a matrices alimentarias y someterlas a procesos que usan calor, energía mecánica, variaciones de pH, oxígeno, tiempo, humedad, entre otros [71]. Algunos estudios reportan que hay métodos de cocción que facilitan la liberación de compuestos bioactivos y otros su degradación. Un ejemplo de ello lo presentan Lorenzo *et al.* [72] los cuales reportan que en trabajos en los que sometió coliflor a cocción al vapor, el contenido fenólico aumentó ligeramente, mientras que la ebullición y la fritura lo redujeron.

Es crucial investigar el impacto de extractos de plantas en el perfil reológico, de textura, características sensoriales y nutricionales para su uso en la industria alimentaria, esto requiere estudios más detallados para optimizar las concentraciones de los extractos minimizando su uso sin comprometer los beneficios antioxidantes y/o antimicrobianos, y preservando las características organolépticas del alimento, un aporte importante para este fin es la purificación y estandarización de los extractos.

Un campo importante que podría explorarse al estudiar los extractos de plantas medicinales son los estudios de la bioaccesibilidad de sus biocomponentes, lo cual tiene una marcada importancia ya que determina su eficacia terapéutica o funcional al ser consumidos, por lo que comprender y mejorar esta característica es muy importante para maximizar los beneficios para la salud derivados del consumo de estos extractos. Una investigación de este tipo debe considerar estudios de digestión gastrointestinal *in vitro*, estudios preclínicos y de intervención humana [73].

La falta de un análisis exhaustivo de la toxicidad de los extractos es otra limitación significativa, especialmente considerando su potencial aplicación en alimentos destinados al consumo humano. Para estas pruebas hay que tomar en cuenta la naturaleza del compuesto, el conocimiento previo del consumo humano, evaluación del riesgo considerando todos los componentes activos, ya que varios de ellos pueden tener importancia toxicológica [29]. Un estudio más detallado en esta área sería esencial para respaldar la seguridad de estos productos.

Referencias bibliográficas

1. Rios, M.; Tinitana, F.; Jarrín-v, P.; Donoso, N.; Romero-Benavides, J.C. "Horchata" drink in Southern Ecuador: Medicinal plants and people's wellbeing. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2017, *13*, doi:<https://doi.org/10.1186/s13002-017-0145-z>.
2. Tene, V.; Malagón, O.; Finzi, P.V.; Vidari, G.; Armijos, C.; Zaragoza, T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology* 2007, *111*, 63-81, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032>.
3. Armijos, C.; Guamán Balcázar, M.D.C.; Meneses, M.; Suarez, A.I. Antioxidant properties of medicinal plants used in the Southern Ecuador. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2018, *1*.
4. Bussmann, R.W.; Sharon, D. Traditional medicinal plant use in Loja province, Southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2006, *2*, 44, doi:<https://doi.org/10.1186/1746-4269-2-44>.
5. Bussmann, R.W.; Ashley, G.; Sharon, D.; Chait, G.; Diaz, D.; Pourmand, K.; Jonat, B.; Somogy, S.; Guardado, G.; Aguirre, C.; *et al.* Proving that Traditional Knowledge Works: The antibacterial activity of Northern Peruvian medicinal plants. *Ethnobotany Research and Applications* 2011, *9*, 067-096.
6. Bondi, M.; Lauková, A.; de Niederhausern, S.; Messi, P.; Papadopoulou, C. Natural Preservatives to Improve Food Quality and Safety. *Journal of Food Quality* 2017, *2017*, 1090932, doi:<https://doi.org/10.1155/2017/1090932>.
7. Li, S.; Jiang, S.; Jia, W.; Guo, T.; Wang, F.; Li, J.; Yao, Z. Natural antimicrobials from plants: Recent advances and future prospects. *Food Chemistry* 2024, *432*, 137231, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137231>.
8. Asioli, D.; Aschemann-Witzel, J.; Caputo, V.; Vecchio, R.; Annunziata, A.; Næs, T.; Varela, P. Making sense of the "clean label" trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International* 2017, *99*, 58-71, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.022>.

9. Delgado-Pando, G.; Ekonomou, S.I.; Stratakos, A.C.; Pintado, T. Clean Label Alternatives in Meat Products. *Foods* 2021, *10*, 1615.
10. Rondón, M.; Moncayo, S.; Cornejo, X.; Santos, J.; Villalta, D.; Siguencia, R.; Duche, J. Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University - Science* 2017, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.03.009>.
11. Moreira, V.; Vieira, I.; Braz-Filho, R. Chemical Constituents and Biological Activities of *Simira* Genus: A Contribution to the Chemotaxonomic of Rubiaceae Family. *The Natural Products Journal* 2014, *4*, 290-298, doi:<http://dx.doi.org/10.2174/2210315505666141211225600>.
12. Ballesteros, J.L.; Tacchini, M.; Spagnoletti, A.; Grandini, A.; Paganetto, G.; Neri, L.M.; Marengo, A.; Angiolella, L.; Guerrini, A.; Sacchetti, G. Rediscovering Medicinal Amazonian Aromatic Plants: *Piper carpunya* (Piperaceae) Essential Oil as Paradigmatic Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019, *2019*, 6194640, doi:<https://doi.org/10.1155/2019/6194640>.
13. D'Armas Regnault, H.; Montesino, K.; Jaramillo Jaramillo, C.; León, R. Composición química de aceites esenciales de las hojas de ocho plantas medicinales cultivadas en Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2018, *2*.
14. Valarezo, E.; Rivera, J.X.; Coronel, E.; Barzallo, M.A.; Calva, J.; Cartuche, L.; Meneses, M.A. Study of Volatile Secondary Metabolites Present in *Piper carpunya* Leaves and in the Traditional Ecuadorian Beverage Guaviduca. *Plants* 2021, *10*, 338.
15. Orlo, E.; Nerín, C.; Lavorgna, M.; Wrona, M.; Russo, C.; Stanzione, M.; Nugnes, R.; Isidori, M. Antioxidant activity of coatings containing eugenol for flexible aluminium foils to preserve food shelf-life. *Food Packaging and Shelf Life* 2023, *39*, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101145>.
16. Heleno, S.A.; Martins, A.; Queiroz, M.J.R.P.; Ferreira, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry* 2015, *173*, 501-513, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>.
17. Oloyede, G.K. Toxicity, antimicrobial and antioxidant activities of methyl salicylate dominated essential oils of *Laportea aestuans* (Gaud). *Arabian Journal of Chemistry* 2016, *9*, S840-S845, doi:<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.09.019>.
18. Cañon-Ibarra, A.F.; Sanchez-Castañeda, M.P.; Arbelaez, L.M.; Sanchez, L.T.; Pinzon, M.I.; Villa, C.C. Natural Antimicrobials. In *Natural Additives in Foods*, Valencia, G.A., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2023; pp. 69-85.

19. Rondón, M.E.; Velasco, J.; Cornejo, X.; Fernández, J.; Morocho, V. *Chemical composition and antibacterial activity of Piper lenticellosum C.D.C essential oil collected in Ecuador*; Issue: 8: 2016; Volume Volume: 6, pp. 156-159.
20. Mayekar, V.M.; Ali, A.; Alim, H.; Patel, N. A review: Antimicrobial activity of the medicinal spice plants to cure human disease. *Plant Science Today* 2021, 8, 629–646, doi:<https://doi.org/10.14719/pst.2021.8.3.1152>.
21. Carocho, M.; Heleno, S.A.; Barros, L. *Natural Secondary Metabolites: From Nature, Through Science, to Industry*; 2023; pp. 1-965.
22. Hendry, E.R.; Worthington, T.; Conway, B.R.; Lambert, P.A. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009, 64, 1219-1225, doi:<https://doi.org/10.1093/jac/dkp362>.
23. Marchese, A.; Arciola, C.R.; Barbieri, R.; Silva, A.S.; Nabavi, S.F.; Tsetegho Sokeng, A.J.; Izadi, M.; Jafari, N.J.; Suntar, I.; Daglia, M.; *et al.* Update on monoterpenes as antimicrobial agents: a particular focus on p-cymene. *Materials (Basel)* 2017, 10, doi:<https://doi.org/10.3390/ma10080947>.
24. İşcan, G.; Kirimer, N.; Demirci, F.; Demirci, B.; Noma, Y.; Başer, K.H. Biotransformation of (-)-(R)- α -phellandrene: antimicrobial activity of its major metabolite. *Chemistry & Biodiversity* 2012, 9, 1525-1532, doi:<https://doi.org/10.1002/cbdv.201100283>.
25. Liu, X.; Cai, J.; Chen, H.; Zhong, Q.; Hou, Y.; Chen, W.; Chen, W. Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis* 2020, 141, 103980, doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103980>.
26. Tosun, M.N.; Taylan, G.; Demirel Zorba, N.N. Antibacterial and antibiofilm activities of some plant essential oils and synergistic effects of cinnamon essential oil with vancomycin against *Clostridioides difficile*: *in vitro* study. *Letters in Applied Microbiology* 2022, 75, 598-606, doi:<https://doi.org/10.1111/lam.13747>.
27. Rossi, P.G.; Bao, L.; Luciani, A.; Panighi, J.; Desjobert, J.M.; Costa, J.; Casanova, J.; Bolla, J.M.; Berti, L. (E)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oil against *Campylobacter jejuni*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2007, 55, 7332-7336, doi:<https://doi.org/10.1021/jf070674u>.
28. Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology* 2012, 3, doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>.

29. Negi, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology* 2012, 156, 7-17, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>.
30. Kyoui, D.; Saito, Y.; Takahashi, A.; Tanaka, G.; Yoshida, R.; Maegaki, Y.; Kawarai, T.; Ogihara, H.; Suzuki, C. Antibacterial activity of hexanol vapor *in vitro* and on the surface of vegetables. *Foods* 2023, 12, doi:<https://doi.org/10.3390/foods12163097>.
31. Aloum, L.; Alefishat, E.; Adem, A.; Petroianu, G. Ionone Is More than a Violet's Fragrance: A Review. *Molecules* 2020, 25, doi:<https://doi.org/10.3390/molecules25245822>.
32. Guerrini, A.; Sacchetti, G.; Rossi, D.; Paganetto, G.; Muzzoli, M.; Andreotti, E.; Tognolini, M.; Maldonado, M.E.; Bruni, R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2009, 27, 39-48, doi:<https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.08.002>.
33. Rattanachaikunsopon, P.; Phumkhachorn, P. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2010, 110, 614-619, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.06.010>.
34. Andrea, A.; Carmita Jaramillo, J.; Diana San, M.; Haydelba D'Armas, R. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador / Analysis of antimicrobial effect of twelve medicinal plants of ancient use in Ecuador. *CIENCIA UNEMI* 2016, 9, doi:<https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp11-18p>.
35. Dognini, J.; Meneghetti, E.K.; Teske, M.N.; Begnini, I.M.; Rebelo, R.A.; Dalmarco, E.M.; Verdi, M.; de Gasper, A.L. Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. *Journal of Essential Oil Research* 2012, 24, 241-244, doi:<https://doi.org/10.1080/10412905.2012.676768>.
36. Gamboa, F.; Muñoz, C.-C.; Numpaque, G.; Sequeda-Castañeda, L.G.; Gutierrez, S.J.; Tellez, N. Antimicrobial Activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease. *International Journal of Microbiology* 2018, 2018, 4147383, doi:<https://doi.org/10.1155/2018/4147383>.
37. Sequeda-Castañeda, L.; Costa, G.; Celis, C.; Gamboa, F.; Gutierrez, S.; Luengas, P. *Ilex guayusa* (Aquifoliaceae): Amazon and Andean Native Plant. *Pharmacologyonline* 2016, 3, 93-202.
38. Miranda, J.M.; Zhang, B.; Barros-Velázquez, J.; Aubourg, S.P. Preservative Effect of Aqueous and Ethanolic Extracts of the Macroalga *Bifurcaria bifurcata* on the Quality of Chilled Hake (*Merluccius merluccius*). *Molecules* 2021, 26, 3774.

39. Yamaguchi, T. Antibacterial effect of the combination of terpenoids. *Archives of Microbiology* 2022, 204, doi:<https://doi.org/10.1007/s00203-022-03142-y>.
40. Gutierrez, J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology* 2009, 26, 142-150, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.10.008>.
41. Mączka, W.; Twardawska, M.; Grabarczyk, M.; Wińska, K. Carvacrol-A Natural Phenolic Compound with Antimicrobial Properties. *Antibiotics* 2023, 12, doi:<https://doi.org/10.3390/antibiotics12050824>.
42. Xie, Y.; Zhang, C.; Mei, J.; Xie, J. Antimicrobial Effect of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil on *Shewanella putrefaciens*: Insights Based on the Cell Membrane and External Structure. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24, 11066.
43. Wang, M.; Zhang, J.; Zhou, B.; Ding, J.; Xu, Z.; Sun, T. Antibacterial Mechanism of Eugenol-Containing Composite Preservatives against *Shewanella putrefaciens*. *Shipin Kexue/Food Science* 2021, 42, 10-16, doi:<https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-20200831-409>.
44. Dedieu, L.; Brunel, J.M.; Lorenzi, V.; Muselli, A.; Berti, L.; Bolla, J.M. Antibacterial Mode of Action of the *Daucus carota* Essential Oil Active Compounds against *Campylobacter jejuni* and Efflux-Mediated Drug Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Molecules* 2020, 25, 5448.
45. Balta, I.; Linton, M.; Pinkerton, L.; Kelly, C.; Stef, L.; Pet, I.; Stef, D.; Criste, A.; Gundogdu, O.; Corcionivoschi, N. The effect of natural antimicrobials against *Campylobacter* spp. and its similarities to *Salmonella* spp, *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio* spp., *Clostridium* spp. and *Staphylococcus* spp. *Food Control* 2021, 121, 107745, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107745>.
46. Radaelli, M.; da Silva, B.P.; Weidlich, L.; Hoehne, L.; Flach, A.; da Costa, L.A.M.A.; Ethur, E.M. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2016, 47, 424-430, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.10.001>.
47. de Oliveira, T.L.C.; de Araújo Soares, R.; Ramos, E.M.; das Graças Cardoso, M.; Alves, E.; Piccoli, R.H. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology* 2011, 144, 546-555, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.022>.
48. Unlu, M.; Vardar-Unlu, G.; Vural, N.; Donmez, E.; Cakmak, O. Composition and antimicrobial activity of *Juniperus excelsa* essential oil. *Chemistry of Natural Compounds* 2008, 44, 129-131, doi:<https://doi.org/10.1007/s10600-008-0040-x>.

49. Ávila, M.; Calzada, J.; Muñoz-Tébar, N.; Sánchez, C.; Ortiz de Elguea-Culebras, G.; Carmona, M.; Molina, A.; Berruga, M.I.; Garde, S. Inhibitory activity of aromatic plant extracts against dairy-related *Clostridium* species and their use to prevent the late blowing defect of cheese. *Food Microbiology* 2023, 110, 104185, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104185>.
50. Alanazi, S.; Alnoman, M.; Banawas, S.; Saito, R.; Sarker, M.R. The inhibitory effects of essential oil constituents against germination, outgrowth and vegetative growth of spores of *Clostridium perfringens* type A in laboratory medium and chicken meat. *Food Microbiology* 2018, 73, 311-318, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.003>.
51. Ciftci, O.; Ozdemir, I.; Tanyildizi, S.; Yildiz, S.; Oguzturk, H. Antioxidative effects of curcumin, β -myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. *Toxicology and Industrial Health* 2011, 27, 447-453, doi:<https://doi.org/10.1177/0748233710388452>.
52. Villacís-Chiriboga, J.; García-Ruiz, A.; Baenas, N.; Moreno, D.A.; Meléndez-Martínez, A.J.; Stinco, C.M.; Jerves-Andrade, L.; León-Tamariz, F.; Ortiz-Ulloa, J.; Ruales, J. Changes in phytochemical composition, bioactivity and *in vitro* digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2018, 98, 1927-1934, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.8675>.
53. Arteaga-Crespo, Y.; Radice, M.; Bravo-Sanchez, L.R.; García-Quintana, Y.; Scalvenzi, L. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon* 2020, 6, doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>.
54. García-Ruiz, A.; Baenas, N.; Benítez-González, A.M.; Stinco, C.M.; Meléndez-Martínez, A.J.; Moreno, D.A.; Ruales, J. Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2017, 97, 3929-3936, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.8255>.
55. Ben Hsouna, A.; Ben Halima, N.; Smaoui, S.; Hamdi, N. Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids in Health and Disease* 2017, 16, 146, doi:<https://doi.org/10.1186/s12944-017-0487-5>.
56. Kim, H.-J.; Chen, F.; Wu, C.; Wang, X.; Chung, H.Y.; Jin, Z. Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, 2849-2854, doi:<https://doi.org/10.1021/jf035377d>.

57. de Oliveira, T.M.; de Carvalho, R.B.F.; da Costa, I.H.F.; de Oliveira, G.A.L.; de Souza, A.A.; de Lima, S.G.; de Freitas, R.M. Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. *Pharmaceutical Biology* 2015, 53, 423-428, doi:<https://doi.org/10.3109/13880209.2014.923003>.
58. Visakh, N.U.; Pathrose, B.; Chellappan, M.; Ranjith, M.T.; Sindhu, P.V.; Mathew, D. Extraction and chemical characterisation of agro-waste from turmeric leaves as a source of bioactive essential oils with insecticidal and antioxidant activities. *Waste Management* 2023, 169, 1-10, doi:<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2023.06.030>.
59. Chen, H.; Diao, J.; Li, Y.; Chen, Q.; Kong, B. The effectiveness of clove extracts in the inhibition of hydroxyl radical oxidation-induced structural and rheological changes in porcine myofibrillar protein. *Meat Science* 2016, 111, 60-66, doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.08.017>.
60. Yanishlieva, N.V.; Marinova, E.; Pokorný, J. Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2006, 108, 776-793, doi:<https://doi.org/10.1002/ejlt.200600127>.
61. Brewer, M.S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2011, 10, 221-247, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>.
62. Bhavaniramya, S.; Vishnupriya, S.; Al-Aboody, M.S.; Vijayakumar, R.; Baskaran, D. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology* 2019, 2, 49-55, doi:<https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>.
63. Al-Qahtani, W.H.; Dinakarkumar, Y.; Arokiyaraj, S.; Saravanakumar, V.; Rajabathar, J.R.; Arjun, K.; Gayathri, P.K.; Nelson Appaturi, J. Phyto-chemical and biological activity of *Myristica fragrans*, an ayurvedic medicinal plant in Southern India and its ingredient analysis. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2022, 29, 3815-3821, doi:<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.02.043>.
64. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997, 22, 749-760, doi:[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00351-6).
65. Nieto, G.; Skibsted, L.H.; Andersen, M.L.; Ros, G. Actividad antioxidante y prooxidante del aceite esencial de ajo por resonancia de spin electrónica. *Anales de Veterinaria de Murcia* 2012, 28, 23-33, doi:<https://doi.org/10.6018/j/188691>.
66. Tamkutė, L.; Gil, B.M.; Carballido, J.R.; Pukalskienė, M.; Venskutonis, P.R. Effect of cranberry pomace extracts isolated by pressurized ethanol and water on the inhibition

- of food pathogenic/spoilage bacteria and the quality of pork products. *Food Research International* 2019, 120, 38-51, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.025>.
67. Kryževičūtė, N.; Jaime, I.; Diez, A.M.; Rovira, J.; Venskutonis, P.R. Effect of raspberry pomace extracts isolated by high pressure extraction on the quality and shelf-life of beef burgers. *International Journal of Food Science & Technology* 2017, 52, 1852-1861, doi:<https://doi.org/10.1111/ijfs.13460>.
 68. Burbott, A.J.; Loomis, W.D. Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. *Plant Physiol* 1967, 42, 20-28, doi:<https://doi.org/10.1104/pp.42.1.20>.
 69. Thakur, L.; Ghodasra, U.; Patel, N.; Dabhi, M. Novel approaches for stability improvement in natural medicines. *Pharmacogn Rev* 2011, 5, 48-54, doi:<https://doi.org/10.4103/0973-7847.79099>.
 70. Hadidi, M.; Orellana-Palacios, J.C.; Aghababaei, F.; Gonzalez-Serrano, D.J.; Moreno, A.; Lorenzo, J.M. Plant by-product antioxidants: Control of protein-lipid oxidation in meat and meat products. *LWT - Food Science and Technology* 2022, 169, 114003, doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114003>.
 71. Nishad, J. Chapter 5 - Stability of plant extracts. In *Plant Extracts: Applications in the Food Industry*, Mir, S.A., Manickavasagan, A., Shah, M.A., Eds.; Academic Press: 2022; pp. 89-126.
 72. Lorenzo, J.M.; Estévez, M.; Barba, F.J.; Thirumdas, R.; Franco, D.; Munekata, P.E.S. 11 - Polyphenols: Bioaccessibility and bioavailability of bioactive components. In *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds*, Barba, F.J., Saraiva, J.M.A., Cravotto, G., Lorenzo, J.M., Eds.; Woodhead Publishing: 2019; pp. 309-332.
 73. de la Fuente, B.; López-García, G.; Mániz, V.; Alegría, A.; Barberá, R.; Cilla, A. Evaluation of the Bioaccessibility of Antioxidant Bioactive Compounds and Minerals of Four Genotypes of *Brassicaceae* Microgreens. *Foods* 2019, 8, 250.

CONCLUSIONES DEL TRABAJO

A continuación, se exponen las conclusiones obtenidas respecto a los objetivos establecidos:

Objetivo general de la investigación

Contribuir al estudio de la biodiversidad ecuatoriana, a través de pruebas *in vitro* y en modelos alimentarios de extractos de tres plantas medicinales de la región sur del Ecuador, determinando su potencial antioxidante y antimicrobiano.

Esta investigación ha evaluado exhaustivamente el potencial antioxidante y antimicrobiano de tres plantas medicinales del Ecuador y región Andina representado un importante avance en su comprensión y aprovechamiento. Los resultados obtenidos muestran de manera consistente que los extractos de estas plantas exhiben efectos antioxidantes y antimicrobianos tanto en pruebas *in vitro* como en modelos alimentarios. Esta dualidad de efectos refuerza aún más su valor potencial en la industria alimentaria, ofreciendo mayor seguridad, calidad y la posibilidad de desarrollar alimentos más saludables y beneficiosos para los consumidores.

Este objetivo general puede dividirse en tres objetivos específicos que se materializan a través de los capítulos descritos en este trabajo, de la siguiente forma:

Objetivo 1: Determinar la composición de compuestos volátiles de cuatro extractos de hojas de *I. guayusa*, *P. carpunya* y *S. ecuadorensis*, plantas provenientes de la región Andina y Amazónica.

- Este estudio ha permitido determinar la composición química de extractos de *Ilex guayusa*, *Piper carpunya* y *Simira ecuadorensis*. Los extractos de *P. carpunya* exhibieron el contenido más alto de compuestos volátiles, destacando varios monoterpenos, fenoles volátiles y otros compuestos como safrol. Por otro lado, en cuanto a *S. ecuadorensis*, el extracto H₂O mostró valores más altos de monoterpenos, alcoholes y fenoles volátiles y los etanólicos (ETOH-H₂O y ETOH) el resto de los grupos volátiles. En cuanto a los extractos de *I. guayusa* destacaron piperitona y cimeno en la familia de los monoterpenos, el 2-hidroxibenzoato de metilo en los ésteres y 1-hexanol en los alcoholes. Estos resultados son fundamentales para

comprender mejor las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y potenciales aplicaciones de estas plantas en la industria alimentaria.

Objetivo 2: Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de cuatro extractos de hojas de *I. guayusa*, *P. carpunya* y *S. ecuadorensis* y su eficacia para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y/o alterantes en modelos alimentarios.

- Se ha encontrado una notable actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas medicinales analizadas, especialmente del extracto ETOH. *P. carpunya* demostró una gran actividad antimicrobiana afectando especialmente a *Clostridium perfringens*, *Campilobacter jejuni*, *Shewanella putrefaciens* y *Shewanella* sp. Por su parte, *S. ecuadorensis* también exhibió actividad antimicrobiana significativa frente a *Shew. putrefaciens* y *C. jejuni*, e *I. guayusa* principalmente frente a *Shewanella* sp. y *Shew. putrefaciens*.
- Los estudios de aplicación de extractos en modelos alimentarios revelaron la eficacia del extracto ETOH-H₂O de *S. ecuadorensis* en productos de pescado, con una reducción significativa en el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas (AMB) y *Shew. putrefaciens*. Asimismo, este extracto mostró una actividad antimicrobiana notable en caldo de pescado durante 131 días de almacenamiento. Por otro lado, el extracto atomizado exhibió una alta efectividad contra *C. jejuni* en caldo de pollo, pero no tuvo efecto en hamburguesas de pollo. En el caso de los extractos de *P. carpunya*, el ETOH-H₂O demostró una alta efectividad contra *C. perfringens* en risotto y una notable reducción en los recuentos de bacterias psicrófilas. Sin embargo, el extracto liofilizado mostró menos efecto contra *C. perfringens* y un mínimo efecto en los recuentos de AMB y psicrófilos. Estos resultados sugieren el potencial de estos extractos como agentes antimicrobianos en aplicaciones alimentarias.

Objetivo 3: Medir el efecto antioxidante de extractos de *I. guayusa*, *P. carpunya* y *S. ecuadorensis* *in vitro* y durante el almacenamiento en matrices alimentarias a las que se incorporaron como ingredientes.

- La especie con la mejor capacidad antioxidante es *S. ecuadorensis*, seguida de *P. carpunya*. Las tres especies tienen un contenido fenólico y una actividad antioxidante media-alta. Los extractos ETOH-H₂O tanto en *P. carpunya* como en *S. ecuadorensis* presentaron la capacidad

antioxidante más alta de este estudio (valores mayores en DPPH, FRAP y ABTS). En el caso de *I. guayusa* su extracto H₂O es el que mayor contenido de fenoles totales tuvo.

- Los extractos de *S. ecuadorensis*, *P. carpunya* e *I. guayusa* tienen un efecto protector contra la oxidación lipídica en hamburguesas de cerdo durante un período de 14 días de almacenamiento en refrigeración, específicamente los extractos ETOH-H₂O, ETOH, H₂O de *S. ecuadorensis*; ETOH y H₂O de *P. carpunya*, y ETOH-H₂O y ETOH en *I. guayusa*, mostrando un efecto mejor o similar que el observado en los tratamientos con eritorbato de sodio, antioxidante de uso comercial.

APÉNDICE

Apéndice 1

Tabla A1. Actividad antimicrobiana de extractos de *I. guayusa* expresada como el diámetro del área de inhibición (mm). Valores promedio de tres repeticiones ($n = 3$).

Microorganismo	Extractos				Control positivo
	ETOH	H2O	ETOH-H2O	ATOM	
<i>Bacillus cereus</i>	ni	ni	ni	ni	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	ni	ni	ni	ni	11
<i>Escherichia coli</i>	ni	ni	ni	ni	13
<i>Listeria monocytogenes</i>	ni	ni	ni	ni	13
<i>Listeria innocua</i>	ni	ni	ni	ni	12
<i>Salmonella enterica</i>	ni	ni	ni	ni	15
<i>Shigella sonnei</i>	ni	ni	ni	ni	14
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ni	ni	ni	ni	17
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	ni	ni	ni	ni	15
<i>Pseudomonas putida</i>	ni	ni	ni	ni	14
<i>Pseudomona fluorescens</i>	ni	ni	ni	ni	14
<i>Aeromona caviae</i>	ni	ni	ni	ni	17
<i>Shewanella sp.</i>	13	11	10	13	21
<i>Shewanella putrefaciens</i>	09	ni	ni	ni	18
<i>Clostridium perfringens</i>	ni	ni	ni	ni	12
<i>Campylobacter jejuni CECT</i>	ni	ni	09	ni	11
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ni	ni	ni	ni	13
<i>Enterococcus faecalis</i>	07	ni	ni	ni	10
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ni	ni	ni	ni	16
<i>Weissella viridescens</i>	07	ni	ni	ni	15

ni, no inhibido; Control positivo: Solución de hipoclorito de sodio (0,94%); Extractos: ETOH (extraído con etanol), ETOH-H2O (extraído con etanol-agua) y H2O (extraído con agua y liofilizado). Disco 7 mm

Apéndice 2

Tabla A2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos de *I. guayusa* (mg/ml).
Valores promedio de tres repeticiones (n = 3).

Microorganismo	Extractos			
	ETOH	H2O	ETOH-H2O	ATOM
<i>Shewanella sp.</i>	80	80	80	80
<i>Shewanella putrefaciens</i>	80			
<i>Campylobacter jejuni CECT</i>			40	
<i>Enterococcus faecalis</i>	80			
<i>Weissella viridescens</i>	80			

Rango de concentración 5 – 80 mg/ml; Extractos: ETOH (extraído con etanol), ETOH-H2O (extraído con etanol-agua) y H2O (extraído con agua y liofilizado)