



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

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y  
ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE HOJAS DE  
MEZQUITE (*Prosopis velutina*) PARA SU POTENCIAL USO  
COMO CONSERVADOR DE CARNE DE CERDO**

---

Por:

**Margarita Irene Ramírez Rojo**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Margarita Irene Ramírez Rojo, le han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



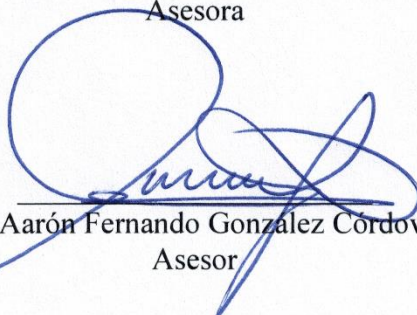
\_\_\_\_\_  
Dra. Armida Sánchez Escalante  
Directora de Tesis



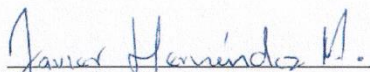
\_\_\_\_\_  
Dr. Gastón Ramón Torrescano Urrutia  
Asesor



\_\_\_\_\_  
Dra. Belinda Vallejo Galland  
Asesora



\_\_\_\_\_  
Dr. Aarón Fernando González Córdova  
Asesor

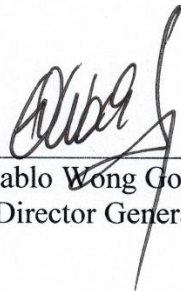


\_\_\_\_\_  
Dr. Javier Hernández Martínez  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el apoyo económico, a través de mi beca para la realización del presente trabajo de investigación.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), por haber otorgado todos los medios y permitir el uso de las instalaciones necesarias para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

Agradezco a mi comité de tesis, integrado por los doctores Armida Sánchez Escalante, Gastón Ramón Torrescano Urrutia, Belinda Vallejo Galland, Aarón Fernando González Córdova y Javier Hernández Martínez, por su apoyo, recomendaciones y correcciones, así como sus aportaciones realizadas durante los experimentos y reuniones de comité de tesis a través de mis estudios de doctorado.

Gracias a mi directora de tesis, Dra. Armida Sánchez Escalante, en un principio, por aceptarme como su hija académica, y posteriormente por apoyarme en todos los sentidos, ya que ha tenido paciencia y cariño para guiarme y poder desarrollar los trabajos experimentales de la tesis; en cada una de las presentaciones ante el grupo y comité, así como también el desarrollo de los escritos y artículos que forman parte del trabajo doctoral. Doy gracias además, por estar a la vanguardia en los temas de la investigación y apoyarnos con sugerencias de nuevas y mejores técnicas, así como la obtención de todos los materiales necesarios para desarrollar el trabajo experimental. Finalmente, gracias por ser un ejemplo de vida para toda mujer.

Agradezco a mi asesor, Dr. Gastón Torrescano Urrutia, quién a la par de la Dra. Sánchez Escalante, siempre apoyó en el diseño y desarrollo del trabajo experimental, la revisión de las presentaciones de seminario, y los manuscritos de los artículos.

Agradezco a mi asesora, Dra. Belinda Vallejo Galland, que estuvo siempre presente en las decisiones importantes a tomar para el desarrollo del trabajo doctoral, en las reuniones de comité, apoyando con sus aportaciones académicas y sugerencias para mejorar la investigación, así como el desarrollo de los experimentales de la tesis.

Así mismo, agradezco a mi asesor, Dr. Aarón Fernando González Córdova, por haber estado al pendiente del trabajo experimental, sobre todo en el análisis de los compuestos presentes en los extractos, objeto de la tesis. Así como sus aportaciones académicas durante las reuniones de comité de tesis, que marcaron pautas para el buen desarrollo de la investigación.

Doy las gracias al Dr. Javier Hernández Martínez, como asesor del trabajo doctoral, así como por haberme aceptado para realizar una estancia en el laboratorio SARA de la Universidad Veracruzana, y llevar a cabo el entrenamiento de la metodología para el análisis de capacidad antioxidante de los extractos. También agradezco el apoyo durante la dirección de los análisis de HPLC para los compuestos de tipo indol presentes en los extractos de hoja de mezquite.

A Dr. Rey David Vargas Sánchez, quién ha sabido ser un buen compañero de trabajo, y por fomentar la organización de nuestro trabajo de investigación en el laboratorio. También por su apoyo en la revisión de los artículos que integran la presente tesis. Gracias por su valioso ingenio.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio, Brisa Del Mar Torres Martínez y María de los Ángeles de la Rosa Alcaraz, por su apoyo incondicional durante el desarrollo de los experimentales de aplicación en carne y microbiología. A Livier Zavala Cárdenas, por su apoyo en el desarrollo de los experimentales, y a Kattya Guadalupe Valenzuela Gómez, durante la determinación de metamioglobina. A Nancy Velasco Pérez y Stephani Rizo Gálvez, por su apoyo durante los preliminares de actividad antioxidante; así como a Edwin Alfredo Ávila Espinosa y Eduardo Montaña Sánchez, por el apoyo durante la determinación de actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos.

A NORSON Alimentos ESR, por proveer la carne en condiciones de menos de 24 horas de realizado el sacrificio, así como por apoyar de manera no lucrativa en los experimentales de aplicación en carne.

A mis demás compañeras de laboratorio, Elena Carrasquer Álvarez, Carolina Hernández Álvarez, Priscilia Ivonne Saavedra Peiro, Karla Joanna Aispuro Sainz y Daniela Alejandra Espinoza García, por estar siempre presentes apoyando en las actividades relacionadas con mi tesis.

Gracias a la Dra. María de Jesús Torres Llanez, por su apoyo en la accesibilidad al laboratorio durante los análisis de HPLC de las muestras de extractos de hoja de mezquite. Al personal de los laboratorios de proximal y microbiología del grupo de Pesqueros; de microbiología del grupo de Lácteos; de microbiología de la Dra. Silvia Gómez, por apoyar con las instalaciones para lograr finalizar los experimentales.

Al IQ. José Jesús Sánchez Escalante, responsable del herbario de la UNISON, por su apoyo en la identificación de las especies de plantas durante los muestreos, especialmente mezquite (*Prosopis velutina*).

A Evelin Martínez Benavidez y María Guadalupe Ruiz Gómez, por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio SARA de la Universidad Veracruzana, en la implementación de las técnicas de determinación de actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides.

Agradezco a Marcia Gracia y José Rito Cañedo por su apoyo durante los muestreos de hojas de plantas, especialmente mezquite; en la población de Rancho Viejo, municipio de Ures, Sonora.

A Alejandro Felician Vega y Guadalupe Rafael Díaz Orduño, por su apoyo en la recolección de muestras, para el análisis de identificación de compuestos de tipo indol.

A Alberto Pérez García, por apoyar durante su estancia de verano científico en la logística de los análisis de microbiología.

A la Dra. Herlinda Soto Valdez, por estar siempre apoyando en los asuntos académicos que han surgido a lo largo de mis estudios de doctorado; así como a todo el personal de la Coordinación de Programas Académicos, por su apoyo en los trámites necesarios y procesos administrativos.

A María Guadalupe Conesa y Paula Navarro Castro, estudiantes de intercambio de la Universidad de Zaragoza de España, quienes realizaron una estancia profesional en CIAD, y apoyaron en el desarrollo de la ciencia en nuestro laboratorio.

Agradezco a mis compañeros estudiantes de generación, de grupo y de laboratorio, presentes siempre durante nuestras propuestas, trabajos, presentación de resultados, quienes siempre lograban contagiar y darle sentido de unidad al grupo. Muchas gracias.

Y finalmente, y no por ello el menos importante, agradezco a Dios, porque día a día nos permite respirar y realizar nuestras actividades diarias, que solamente así estamos con bien y podemos cumplir sus obras.

## **DEDICATORIA**

*Esta tesis doctoral está dedicada a toda la familia de la que formo parte:*

*Familia Ramírez Martínez y familia Haro Rodríguez,*

*A mis padres, Norma Irene Rojo Haro y Margarito Ramírez Martínez,*

*A mis hermanos, Ivette del Carmen Ramírez Rojo, José Alfredo Ramírez Hernández y Raúl Alonso Ramírez Rojo,*

*A mi esposo, Luis Enrique Sandoval Duarte, así como a mis dos hijos, Luis Enrique y Miguel Ángel Sandoval Ramírez, ya que hemos permanecido unidos, gracias a Dios.*



## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	8
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. SINOPSIS</b> .....	14
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
3.1 Objetivo General .....	21
3.2 Objetivos Específicos .....	21
<b>4. ARTÍCULO 1: EXTRACTOS DE HOJAS DE PLANTAS PARA CONSERVAR LA CALIDAD DE LA CARNE Y LOS PRODUCTOS CÁRNICOS FRESCOS. REVISIÓN.</b> .....	23
<b>5. ARTÍCULO 2: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE HOJA DE MEZQUITE (<i>Prosopis velutina</i>)</b> .....	34
<b>6. ARTÍCULO 3: ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MESQUITE LEAVES EXTRACTS OBTAINED UNDER DIFFERENT SOLVENT AND TEMPERATURE CONDITIONS</b> .....	56
<b>7. ARTÍCULO 4: MESQUITE LEAVES EXTRACT ENHANCES THE OXIDATIVE STABILITY OF PORK PATTIES DURING STORAGE TIME AT 4 °C</b> .....	80
<b>8. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	111
<b>9. ANEXOS</b> .....	113
9.1 Anexo 1 .....	113
9.2 Anexo 2 .....	115

## RESUMEN

Tradicionalmente se utilizan aditivos sintéticos para proteger los alimentos contra deterioro oxidativo y microbiológico; aunque, actualmente se limitan debido a posibles efectos adversos para la salud del consumidor. Por ello, se buscan agentes naturales que preserven la calidad de la carne y los productos cárnicos, principalmente extractos de plantas con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. En este estudio se obtuvieron extractos de hojas de mezquite (*Prosopis velutina*), a temperatura ambiente, mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU) y diferentes solventes (etanol, etanol-agua 1:1, agua), determinando presencia/ausencia de alcaloides, cianógenos y saponinas. También se obtuvieron a diferentes temperaturas (35, 50 y 65°C), analizándose fenoles (FT) y flavonoides totales (FvT), y perfil fitoquímico por HPLC, identificándose con estándares de ácidos fenólicos y flavonoides. Además, se determinó capacidad antioxidante (DPPH• y ABTS<sup>+</sup>) y antimicrobiana *in vitro* (CMI; concentración mínima inhibitoria), contra bacterias Gram positivas (*Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus*) y negativas (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). El extracto con mayor capacidad antioxidante y antimicrobiana se incluyó en la formulación de hamburguesas de cerdo frescas, para determinar el efecto sobre la calidad durante su almacenamiento en refrigeración (4°C, 10 días). La efectividad fue comparada con BHT y Vitamina C; para ello se evaluó pH, CRA, metamioglobina, color, TBARS, dienos conjugados, y calidad sensorial de la carne de cerdo. Los resultados del análisis de los extractos muestran contenido de FT como sigue: EEM (extracto etanólico de mezquite) > EAEM (extracto etanólico-acuoso de mezquite) > EAM (extracto acuoso de mezquite); similar para FvT, siendo el mayor en EEM. En los extractos obtenidos a diferentes temperaturas, se observó que los EEM a 35 °C mostraron contenido mayor de FT y FvT ( $p < 0.05$ ), lo que concuerda con los resultados de HPLC para ácido rosmarínico, rutina, naringenina y hesperetina. Respecto a DPPH•, la mayor capacidad fue para EEM 35°C ( $p < 0.05$ ), mientras que para actividad antimicrobiana, el EEM redujo el crecimiento microbiano (>Gram+), disminuyendo conforme aumentó la temperatura de extracción. Con la inclusión del extracto en hamburguesas, se observaron valores más bajos en

TBARS y dienos conjugados, así como CRA y formación de metamioglobina ( $p<0.05$ ) al final del almacenamiento. Los productos con EEM mejoraron ( $p<0.05$ ) sabor, jugosidad y textura, observándose que el EEM 35°C resultó con mejores propiedades antioxidantes y antimicrobianas, y mantuvo la calidad del producto cárnico durante el almacenamiento en refrigeración, considerándose seguro (sin factores tóxicos) para utilizarse como aditivo natural en carne y productos cárnicos.

**Palabras clave:** extracto de hoja de mezquite, *Prosopis velutina*, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana, carne de cerdo.

## ABSTRACT

Traditionally, synthetic additives have been used to protect foods from oxidative and microbiological deterioration; however, currently, its use is limited due to possible adverse effects on health. To preserve the quality of meat and meat products, natural protective agents are required, mainly plant extracts with antioxidant and antimicrobial properties. In this study extracts of mesquite leaves (*Prosopis velutina*) were obtained by means of ultrasound-assisted extraction (UAE) and different solvents (ethanol, ethanol-water 1: 1, water), in which the presence/absence of alkaloids, cyanogens and saponins were thus determined. Extracts were also obtained at different temperatures (35, 50 and 65 °C), assessing the content of total phenols (FT), flavonoids (FvT) and phytochemical profile by HPLC, the identification was made with standards of phenolic acids and flavonoids. Thus, the antioxidant capacity (DPPH• and ABTS•+), and *in vitro* antimicrobial assessment (MIC; minimum inhibitory concentration) were determined against Gram-positive bacteria (*Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*), and negative (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*). The extract with better antioxidant and antimicrobial properties was included in the formulation of fresh pork patties, in which the effect on quality during its cooling storage was determined. The effectiveness was compared to BHT and Vitamin C treatments; evaluating pH, WHC, metmyoglobin, color, TBARS, conjugated dienes, and sensory analysis too. Results of the analysis of the extracts showed FT content as follows: EEM (mesquite ethanolic extract); > EAEM (mesquite water-ethanolic extract); > EAM (mesquite water extract); similar to FvT, being the greater EEM. In the extracts obtained at different temperatures, it was observed that EEM at 35 °C showed a higher FT and FVT content ( $p<0.05$ ), which corresponds with the results of HPLC for rosmarinic acid, routine, naringenin and hesperetin. Regarding DPPH•, the highest capacity was for EEM 35 °C ( $p<0.05$ ), while for antimicrobial activity, EEM decreased the microbial growth (>Gram+), diminishing as the extraction temperature increased. With the inclusion of the extract in patties, lower values were observed for TBARS, conjugated dienes, WHC and metamioglobin formation ( $p<0.05$ ) at the end of the storage. The products with EEM

presented better ( $p<0.05$ ) flavor, juiciness and tenderness, showing that EEM 35 °C resulted in the best antioxidant and antimicrobial properties, and kept the quality of the meat product during its refrigerated storage, being considered as safe (without toxic factors), which could be used as a natural additive in meat and meat products.

**Keywords:** mesquite leaf extract, *Prosopis velutina*, antioxidant activity, antimicrobial activity, pork meat.

## 1. SINOPSIS

La carne y los productos cárnicos han sido básicos para la alimentación humana, debido al contenido de nutrientes esenciales (proteínas, grasas, minerales y vitaminas) de alta calidad. Históricamente los productos cárnicos se han conservado mediante el cambio de pH y deshidratación a través del proceso de salado y secado. Una práctica común en la actualidad es la aplicación de aditivos alimentarios de origen sintético, como por ejemplo butil hidroxitolueno (BHT) y butil hidroxianisol (BHA), los cuales han demostrado retardar dos de los procesos más importantes en el deterioro de la carne y los productos cárnicos: la oxidación y el deterioro microbiológico. Sin embargo, estos productos sintéticos están cayendo en desuso debido a los posibles efectos adversos en la salud del consumidor, principalmente por ser probablemente asociados al desarrollo de cáncer.

Como una alternativa a lo anteriormente descrito, en los últimos años se han estudiado gran cantidad compuestos presentes en las plantas que poseen características similares a éstos aditivos, tanto en su estructura, como por sus efectos al retrasar las reacciones de oxidación, previniendo la formación de radicales libres, así como retardando el crecimiento de bacterias deteriorativas y/o patógenas en los alimentos.

En el estado de Sonora existen algunas plantas que son de interés para la búsqueda de aditivos naturales, siendo una de ellas el mezquite (*Prosopis velutina*), la cual está distribuida en gran parte de la región. Al respecto estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han evidenciado la posible actividad biológica, ya que en dichos estudios se ha encontrado al polen de mezquite (*P. velutina*) como componente mayoritario al realizar estudios melisopalinológicos en miel de mezquite utilizada en la formulación de salchichas de cerdo. Además también se tienen resultados en investigaciones con propóleos ricos en polen de mezquite con demostrada capacidad antioxidante y antimicrobiana, el cual fue utilizado como aditivo en la formulación de hamburguesas de carne fresca, tanto de cerdo como de bovino.

Por lo anterior, esta planta se eligió para determinar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de sus extractos, y establecer si tiene potencial como aditivo en la conservación de carne fresca de cerdo, en sustitución de los aditivos sintéticos (BHA,

BHT). Para determinar cuál de las partes de la planta sería estudiada, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva acerca de las diversas partes de mezquite (*Prosopis* spp), como su madera, hojarasca, hojas y flores; de los cuales se ha demostrado que tienen capacidad antioxidante, antiinflamatoria, cardioprotectora, antimicrobiana y antifúngica. No obstante, dichos estudios fueron enfocados a investigar los compuestos presentes en esta planta, entre los que se encuentran los compuestos fenólicos, presentes en las distintas especies de mezquite.

Debido a las consideraciones previas, se estableció la siguiente hipótesis: Los extractos obtenidos a partir de hojas de mezquite (*Prosopis velutina*), presentan actividad antioxidante y antimicrobiana con potencial para su uso como agente conservador en carne de cerdo.

En la primera parte de este trabajo de investigación (**Artículo 1**), se indagó sobre la capacidad antioxidante, antimicrobiana y protectora de la calidad de los productos cárnicos frescos, utilizando para ello diferentes compuestos presentes en las hojas de plantas de diversas especies. De este modo, se encontró que los compuestos presentes en hojas de romero, tomillo, olivo, uva, orégano, entre otras, tienen capacidad de ejercer actividad protectora contra la oxidación, así como el deterioro microbiológico en productos de origen animal. Estos resultados se atribuyen a la presencia de gran variedad de compuestos fenólicos. Por lo anterior, los extractos de hojas de plantas pueden ser utilizados como ingredientes que ejercen una protección en los productos cárnicos frescos, frente a la oxidación lipídica y el deterioro microbiológico.

La segunda parte de este trabajo de investigación (**Artículo 2**), tuvo como objetivo evaluar la composición de polifenoles totales y actividad antioxidante de extractos de hoja de mezquite obtenidos con diferentes solventes. Esto se basó en que a partir de diversas especies de mezquite se han logrado extraer compuestos polifenólicos por distintos métodos, como maceración, hidrodestilación, entre otros. Además, se ha comprobado que dependiendo del tipo de solvente y método de extracción se extraen compuestos distintos, sin dejar de lado que también se obtienen los compuestos dependiendo de la composición original de la especie y parte de la planta utilizada. Sin embargo, a partir de hojas de mezquite (*P. velutina*) que es la parte de las plantas donde se encuentran la mayoría de los compuestos fenólicos de las especies, hasta el momento no existen reportes o estudios de

esta especie vegetal. También se ha reportado, que de entre los distintos métodos existentes, uno de los que disminuyen el tiempo y temperatura de extracción, ayudando también a obtener los compuestos en su estado más cercano al natural, es el uso de la extracción asistida por ultrasonido, por lo cual se estableció utilizar este método en este estudio. Así, se obtuvieron extractos de hojas de mezquite utilizando etanol, etanol-agua (1:1) y agua, como solventes, con la finalidad de utilizar solventes amigables con el medio ambiente y no añadir posibles tóxicos provenientes de éstos; ya que posteriormente se utilizaría en la formulación de productos cárnicos para consumo humano. En esta parte del trabajo de investigación se obtuvieron extractos a partir de hojas secas de mezquite (*Prosopis velutina*) utilizando los solventes mencionados, y como temperatura de extracción 35 °C, llevando a cabo extracción repetida de 30 min con ultrasonido (42 kHz), para la posterior separación del líquido por filtración con papel Whatman 40. Una vez reunidos los dos filtrados, se concentraron en rotavapor hasta sequedad, para posteriormente liofilizarlos. Los extractos liofilizados se almacenaron en oscuridad a temperatura de -20 °C para su posterior análisis. Por otro lado, también fue importante considerar que los extractos deben estar libres de sustancias potencialmente dañinas, tales como saponinas, cianógenos y alcaloides, por lo que se realizaron análisis cualitativos para determinar su presencia/ausencia.

Los resultados del análisis de compuestos potencialmente tóxicos, mostraron valores negativos, por lo que pudiera considerarse a los extractos como GRAS (generalmente reconocidos como seguros, por sus siglas en inglés). El rendimiento de extracción fue mayor para el extracto etanólico-acuoso (21.4%  $\pm$  0.7), que para el etanólico (6.5%  $\pm$  2.1) y el acuoso (18.7%  $\pm$  1.9) ( $p < 0.05$ ). No obstante, los resultados del análisis de fenoles totales mostraron el siguiente orden de contenido EEM > EAEM > EAM (> 50 mg EAG/g, para todos), siendo > 75 mg EAG/g para EEM. Mientras que el análisis de flavonoides totales, presentó valores < 50 mg ER/g para EAM y EAEM, y > 100 mg ER/g para EEM. Estos resultados coinciden con la determinación de la capacidad inhibidora del radical DPPH• (> 25% de inhibición), encontrándose que la inhibición se presentó de acuerdo al siguiente orden: EEM > EAEM > EAM; así como también con el poder reductor del Fe<sup>2+</sup>, con valores de 62.7, 39.0 y 58.8% para EEM > EAEM > EAM. De acuerdo a lo anterior,



los resultados mostraron que la mayor capacidad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides, la presentó el extracto obtenido con etanol 100% ( $p < 0.05$ ).

En la tercera parte de este estudio (**Artículo 3**), se obtuvieron extractos de hoja de mezquite (*Prosopis velutina*), utilizando diferentes solventes (agua 100%, agua-etanol 1:1 y etanol 100%), así como distintas temperaturas (35, 50 y 65°C), para determinar su actividad antioxidante y antimicrobiana. Para determinar la capacidad antioxidante se analizó la actividad antirradicalaria para DPPH• y ABTS<sup>•+</sup>. Además, se analizó la composición de los fitoquímicos presentes en los extractos, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), considerando los compuestos eluidos de estándares como ácido cafeico, ácido cinámico, ácido clorogénico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido protocatecuico, ácido rosmarínico, éster fenélico del ácido cafeico (CAPE), t-hidroxicinámico, acacetina, apigenina, catequina, crisina, epicatequina, galangina, genisteina, luteolina, miricetina, naringenina, pinocembrina, quercetina, rutina y rutina hidrato. Estos extractos se probaron para conocer su actividad antimicrobiana *versus* bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*) mediante dilución en microplaca.

Los resultados mostraron que los extractos etanólicos presentaron mayor contenido ( $p < 0.05$ ) de fenoles ( $> 90$  mg EAG/g) y flavonoides totales ( $> 1000$  mg ER/g) que los extractos obtenidos con agua-etanol y agua, en todas las temperaturas probadas. Lo anterior coincide con las diferencias de concentración de algunos de los compuestos encontrados (rutina, ácido rosmarínico, naringenina y hesperetina), siendo mayor ( $p < 0.05$ ) en EEM que en EAEM y EAM, destacando que la concentración disminuye con el aumento de temperatura. De igual manera, la actividad antirradicalaria, tanto para DPPH• (20 a 74.1 %) como ABTS<sup>•+</sup> (29.8 a 90.2 %), mostró valores mayores ( $p < 0.05$ ) para los extractos etanólicos, además de presentar relación con la temperatura utilizada durante la extracción, ya que al igual que con el contenido de fitoquímicos, el aumento de temperatura redujo la actividad antirradicalaria. Respecto a la actividad antimicrobiana, los resultados muestran que los EEM obtenidos a las temperaturas más bajas de extracción (35 y 50°C) son más efectivos ( $> 90\%$ ) ( $p < 0.05$ ) en la reducción del crecimiento microbiano (Gram positivas  $>$  Gram negativas); observándose principalmente para

*Staphylococcus aureus* > *Listeria innocua*, e indicando dependencia de la concentración utilizada. Por lo anterior, el EEM a 35°C, fue seleccionado para realizar la siguiente etapa, la cual consistió en la evaluación del efecto de la inclusión de dicho extracto como aditivo en un producto cárnico fresco (hamburguesas de carne de cerdo) almacenado en refrigeración.

En el **Artículo 4** se llevó a cabo el estudio de la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cerdo adicionadas con extracto etanólico de hojas de mezquite (*Prosopis velutina*) durante el almacenamiento en refrigeración (4°C por 10 días). En el estudio se probó la utilización de diferentes concentraciones del extracto (0.01 y 0.05%), comparando contra BHT (0.02% base grasa), ácido ascórbico (0.02%) y un tratamiento control (sin aditivo). En esta parte del estudio se realizaron análisis de composición química proximal de las hamburguesas (humedad, grasa, ceniza y proteína). Además durante el almacenamiento a 4 °C se evaluó la estabilidad de los productos, monitoreando pH, color (L\*, a\*, b\*), formación de metamioglobina y capacidad de retención de agua, oxidación lipídica medida por la formación de productos primarios (CnD, dienos conjugados) y secundarios de la oxidación (TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), capacidad antirradicalaria DPPH•, poder reductor, así como la evaluación sensorial utilizando una escala descriptiva de 1 a 7.

Los resultados del análisis químico proximal mostraron en la hamburguesa fresca un contenido de humedad de 67.2%, grasa de 11.1%, ceniza de 1.7% y proteína de 22.5%, sin mostrar diferencias entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ). Durante el almacenamiento se observaron cambios de pH en las hamburguesas; sin embargo, las adicionadas con EEM muestran menor descenso en los valores de pH, lo cual indica mayor calidad al final de los días de almacenamiento (pH > 5.8). Respecto a la evaluación de color, los resultados mostraron que la inclusión de los EEM no afectó los valores de L\*, pero si redujo significativamente ( $p < 0.05$ ) los valores de a\* (menos roja que el control, BHT y Vitamina C), y aumentó ( $p < 0.05$ ) los de b\* (tonalidad más amarilla). Sin embargo, los cambios en los valores de a\* y b\* fueron menores ( $p < 0.05$ ) en las hamburguesas adicionadas con EEM a lo largo del almacenamiento. Lo anterior indica que la adición de EEM aumentó la estabilidad del color durante el almacenamiento en refrigeración, coincidiendo con la reducción de la formación de metamioglobina (< 40%) en las hamburguesas, considerado

uno de los principales indicadores de frescura que se encuentran a la vista del consumidor. En relación a la capacidad de retención de agua, los resultados mostraron que los tratamientos con EEM mantuvieron la mayor capacidad de retención de agua de la carne, al compararlos tanto con el control como con el adicionado con ácido ascórbico ( $p < 0.05$ ), lo que concuerda con los resultados obtenidos en la evaluación sensorial, ya que estos productos presentaron una tendencia hacia mayor jugosidad e integridad del producto. Los resultados del análisis sensorial realizado por un panel semientrenado de 25 participantes, mostraron que los mayores efectos se presentaron en el color ( $p < 0.05$ ) de los productos frescos; mientras que en los demás atributos evaluados en las hamburguesas cocinadas, no observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). También se observaron ventajas del uso de EEM en la conservación de las hamburguesas de carne de cerdo, en el análisis de *cnD* y TBARS, ya que desde el inicio del almacenamiento se observaron marcadas diferencias ( $p < 0.05$ ), dando como resultado la protección contra la oxidación lipídica de las hamburguesas al final del almacenamiento, con diferencias de 46% para *cnD* y 93% para TBARS, respecto al control. Por otro lado, los resultados de la evaluación de la actividad antirradicalaria DPPH• y poder reductor, también muestran una mayor reducción de la oxidación ( $> 40\%$  y 0.2 abs, respectivamente) ( $p < 0.05$ ), durante todo el almacenamiento, incluso mejor que con la adición de BHT y vitamina C, cuando se aplicó EEM en las hamburguesas. Por lo anterior, es posible atribuir los beneficios en la conservación de la calidad de los productos adicionados con EEM, a la presencia de compuestos fenólicos, tales como los identificados en el análisis de composición de fitoquímicos (rutina, ácido rosmarínico, naringenina y hesperetina).

De acuerdo a todo lo anteriormente expuesto, se concluye que el EEM puede ser utilizado como agente protector de la calidad de la carne y productos cárnicos, durante su almacenamiento en refrigeración.

## **2. HIPÓTESIS**

Los extractos obtenidos a partir de hoja de mezquite (*Prosopis velutina*), presentan actividad antioxidante y antimicrobiana con potencial para su uso como agente conservador en carne de cerdo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Obtener extractos de hoja de mezquite (*Prosopis velutina*), para determinar su actividad antioxidante y antimicrobiana, y definir aquellos que presenten mejores propiedades para su uso como agente conservador en carne de cerdo.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- 1.- Establecer las condiciones de extracción y determinar el rendimiento durante la obtención de los extractos de hoja de mezquite (*Prosopis velutina*) con diferentes solventes (agua, agua-etanol 1:1 y etanol) y diferentes temperaturas (35, 50 y 65 °C).
- 2.- Determinar el contenido de polifenoles (fenoles totales y flavonoides) y actividad antioxidante (DPPH•, Poder reductor Fe<sup>2+</sup> y ABTS•+) de los diferentes extractos.
- 3.- Evaluar la posible presencia de compuestos tóxicos (alcaloides, saponinas y cianógenos) en los extractos.
- 4.- Determinar los compuestos asociados a la capacidad antioxidante y antimicrobiana presentes en los extractos mediante espectrofotometría y HPLC.
- 5.- Determinar la capacidad antimicrobiana de los extractos contra microorganismos indicadores de calidad y patógenos, Gram positivos (*Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua*) y Gram negativos (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*).

6.- Aplicar el extracto que presente las mejores propiedades como aditivo en un producto cárnico molido de cerdo fresco, evaluando su potencial para prevenir alteraciones físicas, químicas y microbiológicas durante su vida de anaquel.

7.- Evaluar sensorialmente la adición de diferentes concentraciones (0.05 y 0.1%) de extracto de hoja de mezquite seleccionado, en un producto cárnico de cerdo fresco y cocinado.

## **ARTÍCULO 1**

### **EXTRACTOS DE HOJAS DE PLANTAS PARA CONSERVAR LA CALIDAD DE LA CARNE Y LOS PRODUCTOS CÁRNICOS FRESCOS. REVISIÓN.**

**Margarita Irene Ramírez-Rojo, Rey David Vargas-Sánchez, Brisa del Mar Torres-Martínez, Gastón Ramón Torrescano-Urrutia, Armida Sánchez-Escalante**

**Artículo de revisión publicado en Biotecnia, XX(3): 155-164.**



## EXTRACTOS DE HOJAS DE PLANTAS PARA CONSERVAR LA CALIDAD DE LA CARNE Y LOS PRODUCTOS CÁRNICOS FRESCOS. REVISIÓN

PLANT LEAF EXTRACTS FOR PRESERVING THE QUALITY OF FRESH MEAT AND MEAT PRODUCTS.  
A REVIEW

**Margarita Irene Ramírez-Rojo, Rey David Vargas-Sánchez, Brisa del Mar Torres-Martínez, Gastón Ramón Torrescano-Urrutia, Armida Sánchez-Escalante\***

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Carretera a La Victoria Km 0.6, Apartado Postal 1735, Hermosillo, Sonora, 83304, México.

### RESUMEN

Actualmente, uno de los objetivos de la industria cárnica es incrementar la vida de anaquel de sus productos, lo anterior debido al aumento en la demanda de los consumidores. La vida útil de estos productos es comúnmente afectada por factores tales como la oxidación de lípidos (LOX) y la actividad microbiana (AM). Para evitarlo, el sector cárnico utiliza aditivos sintéticos (BHT, BHA, TBHQ, entre otros) con actividad antioxidante (AOX) y antimicrobiana (AMA). A pesar de ello, se conoce que estos aditivos ejercen efectos adversos en la salud humana, lo que provoca desconfianza en los consumidores. Por lo anterior, diversos trabajos de investigación se enfocan hacia la búsqueda de nuevos aditivos alimentarios, como son los extractos de hojas de plantas. Sin embargo, su composición y bioactividad están influenciados por el solvente y el método de extracción utilizado durante su obtención, ya que los extractos de hojas de plantas obtenidos con solventes polares y métodos de extracción no convencionales, muestran mayor contenido de fitoquímicos, AOX y AMA. En conclusión, los resultados de diversas investigaciones demuestran la efectividad de estos extractos para extender la vida de anaquel, al reducir la LOX y AM, cuando son incorporados en productos cárnicos.

**Palabras clave:** Extractos de hojas, Actividad antioxidante, Actividad antimicrobiana, Calidad de la carne.

### ABSTRACT

Currently, one of the meat industry objectives is to increase the shelf life of meat products in response to increasing consumer demand. The meat products shelf life is commonly affected by factors such as lipid oxidation (LOX) and microbial activity (MA). To avoid this, the meat industry uses synthetic additives (BHT, BHA, and TBHQ, among others) with antioxidant (AOX) and antimicrobial (AMA) activities. However, these additives are known to have adverse effects on human health, which causes a lack of confidence among consumers. For this reason, diverse studies have focused on searching for new food additives such as plant leaf extracts. However, the composition and bioactivity of such extracts are influenced by the solvent and extraction method used during elaboration. For example, plant leaf extracts obtained using polar solvents and non-conventional extraction

methods exhibit a highest content of phytochemicals, AOX, and AMA. In conclusion, the results of diverse studies show the effectiveness of plant leaf extracts for extending the shelf life of meat products and reducing LOX and MA upon being incorporated into meat products.

**Keywords:** Leaf extracts, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Meat quality.

### INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la industria de la carne es una de las más importantes, por lo que la investigación en el desarrollo de nuevos productos se da como resultado a la demanda del consumidor, sin descuidar la calidad (Fernández-Ginés *et al.*, 2005; Klopčič *et al.*, 2013). La definición de calidad es muy compleja, ya que puede referirse al conjunto de características sensoriales y tecnológicas, así como toxicológicas y nutritivas (Asenjo, 1999; Becker, 2000).

La carne y los productos cárnicos son una fuente importante de nutrientes, tales como vitaminas (tiamina, niacina, riboflavina, B12 y B6), minerales (hierro, magnesio, fósforo, potasio y zinc), y aminoácidos (lisina, leucina, isoleucina, treonina, triptófano, valina, arginina, entre otros); aunque también contienen grasa y ácidos grasos, tanto saturados como insaturados (mono y poliinsaturados). Los ácidos grasos poliinsaturados poseen dobles enlaces, los cuales a altas concentraciones son fácilmente susceptibles a oxidación, produciendo compuestos oxidativos secundarios que desencadenan el proceso de oxidación de lípidos (LOX), factor responsable del deterioro de la calidad en carne y productos cárnicos durante su almacenamiento (Warnants *et al.*, 1996; Faustman *et al.*, 2010). Además, estos componentes determinan a la carne y sus productos como un medio ideal para el crecimiento de microorganismos deteriorativos y patógenos, tales como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, por mencionar algunos (Heredia *et al.*, 2014). En consecuencia, el crecimiento de estos microorganismos, es considerado otro de los factores responsables del deterioro de la carne y sus productos, representando más del 20% de las pérdidas a nivel mundial (Saucier, 2016).

\*Autor para correspondencia: Armida Sánchez-Escalante  
Correo electrónico: armida-sanchez@ciad.mx

**Recibido: 23 de febrero de 2018**

**Aceptado: 11 de abril de 2018**



Para contrarrestar las posibles pérdidas, en la industria de la carne y sus productos se utilizan aditivos de origen sintético (BHT, BHA, entre otros) con actividad antioxidante (AOX) y antimicrobiana (AMA). Sin embargo, a pesar de tener la categoría de aditivos alimentarios, existe la tendencia a disminuir su uso, debido a que en concentraciones inadecuadas provocan efectos adversos en la salud humana (Faustman *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2015). Por ello, existe gran interés por la obtención y uso de extractos de origen natural (romero, orégano, salvia, romero, olivo, brócoli, boldo, hierba mate y curri, entre otros), ricos en fitoquímicos con propiedades AOX y AMA, similares a los aditivos sintéticos (Tiware *et al.*, 2009; Falowo *et al.*, 2014; Vieitez *et al.*, 2018).

Para la obtención de este tipo de extractos, diversas investigaciones enfatizan sobre los tipos de solventes y métodos de extracción a utilizar (Azmir *et al.*, 2013). Los resultados demuestran que factores como polaridad del solvente, relación soluto-solvente, intensidad de las vibraciones mecánicas, campo eléctrico y radiación electromagnética, nivel de presión, así como la especificidad de enzimas utilizadas durante la extracción, están relacionados con el tipo de fitoquímicos y su actividad biológica (Puri *et al.*, 2012; Azmir *et al.*, 2013).

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue llevar a cabo un análisis de la literatura relacionada con el estudio de AOX y AMA que presentan los extractos de hojas de plantas, obtenidos con diferentes solventes y métodos de extracción; así como sobre el uso de estos extractos para retardar o inhibir la LOX y el crecimiento microbiano en la carne y productos cárnicos.

#### Obtención de Extractos

Los extractos de hojas de plantas, son obtenidos para concentrar los metabolitos y/o fitoquímicos secundarios presentes en dichos vegetales, entre los que se encuentran alcaloides, polisacáridos, terpenoides, saponinas y compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides); los cuales poseen actividad antialérgica, antifúngica, anti-inflamatoria, anti-hipertensiva, antiviral, antitumoral y anticancerígena, así como la capacidad de inhibir radicales libres y retardar el crecimiento microbiano (Tripoli *et al.*, 2007; Falowo *et al.*, 2014). Algunos de estos fitoquímicos son producidos por aminoácidos aromáticos (vía ácido shikímico) y por aminoácidos alifáticos provenientes del ciclo de Krebs. Específicamente, los terpenos se producen vía ácido mevalónico y la ruta no-mevalonato; mientras que los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) son sintetizados a través de las vías de los ácidos shikímico y malónico (Tiaz y Zeiger, 2006).

Los compuestos fenólicos son de considerable importancia fisiológica y morfológica en plantas, y juegan un papel importante en el crecimiento y la reproducción de las mismas (Balasundram *et al.*, 2006). Estos metabolitos poseen características estructurales particulares implícitas en la AOX y AMA, como es la ubicación del grupo hidroxilo (O-H) en el anillo o anillos que conforman a la molécula, hidroxilación

en posición orto- o para-, sustitución de azúcares, presencia de carbonos bencílicos (C-H), entre otras (Rice-Evans *et al.*, 1996; Xu y Lee, 2001; Vargas-Sánchez *et al.*, 2015). Además, ha sido ampliamente demostrado que el tipo de solvente y método de extracción utilizado influye en la extracción de estos fitoquímicos (Sultana *et al.*, 2009).

#### Efecto del sistema de solventes sobre AOX y AMA de extractos de hojas de plantas

Uno de los factores relacionados con la AOX y AMA durante la obtención de extractos de hojas de plantas es el solvente utilizado, ya que el tipo de solvente tiene efectos considerables en la relación estructura-propiedad de la molécula soluto, afectando en sí propiedades moleculares como la longitud del enlace, polarizabilidad, distribución de electrones, momentos dipolares, estabilidades relativas de diferentes isómeros conformacionales y parámetros espectroscópicos; esto a su vez tiene efecto en las interacciones inter- e intra-moleculares y por ende su actividad (Zheng *et al.*, 2017). Además, dependiendo de la polaridad del solvente, será el tipo de compuesto químico a extraer. En diversos trabajos, se ha observado que independientemente del tipo de vegetal y/o planta, es posible extraer compuestos como alcaloides, terpenos y polifenoles, entre otros (Choe *et al.*, 2010; Belfeki *et al.*, 2016).

Lo anterior se observa en un trabajo de investigación, cuyo objetivo fue obtener extractos de hojas de lotus (*Nelumbo nucifera*) y cebada (*Hordeum vulgare*) utilizando metanol y etanol como solventes de extracción, y medir su AOX (1,1-difenil-2-picrilhidrazil, DPPH) y poder reductor (RPw); encontrándose para ambos tipos de hojas, AOX >50% en extractos obtenidos con metanol > etanol (Choe *et al.*, 2010). En otro estudio, en el que se evaluaron extractos de hojas de frambuesa (*Rubus fruticosus*), se observó el mayor rendimiento y AOX (IC50) para extractos metanólicos > agua > acetona, utilizando como modelo, la evaluación de la estabilidad térmica a 120°C del aceite de girasol; los resultados sugirieron que la mayor eficiencia del extracto fue a una concentración de 1000 ppm (Asnaashari *et al.*, 2015). Además, Kalidindi *et al.* (2015), encontraron mayor AOX (DPPH; óxido nítrico, peróxido de hidrógeno y poder reductor), en extractos de hojas de anona (*Annona squamosa* Linn), cuando para obtenerlos se utilizaron los solventes metanol > cloroformo > agua.

Por otra parte, Belfeki *et al.* (2016) evaluaron el efecto del solvente de extracción en la obtención de extractos de hojas de hierbabuena (*Mentha viridis*, MV) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*, EG), sobre la composición química (contenido de fenoles y flavonoides totales, además de taninos condensados) y la AOX. Los resultados muestran que en extractos de MV el contenido de compuestos fenólicos por efecto de solvente de extracción siguió el siguiente comportamiento: para fenoles totales, metanol = agua > acetato de etilo = acetonitrilo > diclorometano; flavonoides totales, metanol > agua > acetonitrilo > acetato de etilo > diclorometano; taninos condensados, metanol > acetonitrilo

**Tabla 1.** Efecto del método de obtención de extractos de hojas de plantas sobre sus propiedades biológicas.  
**Table 1.** Effect of the obtention method of extracts plant leaves on their biological properties.

Material vegetal	Método de extracción	Actividad	Resultado	Referencias
Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	Combinación de maceración y fluido supercrítico	AMA	<i>Escherichia coli</i> : CMI: 0.149 mg/mL. <i>Staphylococcus aureus</i> : CMI 0.376 mg/mL. <i>Bacillus cereus</i> : CMI: 0.151 mg/mL. <i>Salmonella typhimurium</i> : CMI: 0.753 mg/mL.	Vieitez <i>et al.</i> (2018)
Mangle ( <i>Avicennia marina</i> )	Maceración	AMA AOX	<i>Enterococcus faecium</i> : Zona de inhibición: 14.5 mm, CMI: 2 mg/mL. <i>Streptococcus pneumoniae</i> : Zona de inhibición: 14 mm, CMI: 4 mg/mL. <i>Klebsiella pneumoniae</i> : Zona de inhibición: 12 mm, CMI: 8 mg/mL. % inhibición DPPH: 50% IC50: 10 mg/mL.	Behbahani <i>et al.</i> (2018)
Yacón ( <i>Smallanthus sonchifolicus</i> )	Combinación de hidrodestilación y microondas	AOX	Inhibición de DPPH: 91.15 ± 0.93 %. Captación ABTS: 100.06 ± 0.13 %.	Mendoza-Meza <i>et al.</i> (2014)
Vid ( <i>Vitis vinifera</i> )	Maceración	AOX AMA	Inhibición de DPPH: 75.14% Poder reductor FRAP: 183.5 ± 2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> : CMI: 0.91 ± 0.23 mg EAG/mL. <i>Bacillus cereus</i> : CMI: 0.45 ± 0.23 mg EAG/mL. <i>Campylobacter jejuni</i> : CMI: 0.91 ± 0.23 mg EAG/mL. <i>Salmonella infantis</i> : CMI 1.36 ± 0.23 mg EAG/mL. <i>Escherichia coli</i> : CMI: 1.36 ± 0.23 mg EAG/mL.	Katalinic <i>et al.</i> (2013)
Acerolo ( <i>Crataegus azarolus</i> L.)	Ultrasonido	AOX AMA	Inhibición de DPPH: 89.7%. <i>Staphylococcus aureus</i> : Zona de inhibición: 12.7 ± 0.9 mm. <i>Streptococcus faecalis</i> : Zona de inhibición: 11.7 ± 0.4 mm. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Zona de inhibición: 7.5 ± 0.7 mm.	Belkhir <i>et al.</i> (2013)
Palosa ( <i>Acacia modesta</i> ) Mezquite ( <i>Prosopis cineraria</i> ) Mezquite ( <i>Prosopis juliflora</i> )	Maceración	AOX AMA	<i>Acacia modesta</i> : Inhibición de DPPH: 41.42 %. <i>Prosopis cineraria</i> : Inhibición de DPPH: 60.48 %. <i>Prosopis juliflora</i> : Inhibición de DPPH: 47.82%. <i>Escherichia coli</i> : Zona de inhibición: 13 mm (15 mg/mL). <i>Enterobacter aerogenes</i> : Zona de inhibición: 18 mm (15 mg/mL). <i>Vibrio cholerae</i> : Zona de inhibición: 19 mm (15 mg/mL). <i>Bacillus subtilis</i> : Zona de inhibición: 20 mm (15 mg/mL).	Aziz <i>et al.</i> (2012)
Ingábaú ( <i>Eugenia beaurepaireana</i> )	Maceración	AMA	<i>Mollicutes arginini</i> : 1.25 mg/mL. <i>Mollicutes hominis</i> : 1.25 mg/mL. <i>Ureaplasma urealyticum</i> : 1.25 mg/mL.	Simões <i>et al.</i> (2010)
Macaranga ( <i>Macaranga triloba</i> )	Maceración	AOX AMA	DPPH IC50: 0.151 ± 0.0008 mg/mL. Poder reductor FRAP: 20.2 ± 2.1 mg EAG/g. <i>Bacillus cereus</i> : Zona de inhibición: 11.3 mm (62 % de inhibición) a 1 mg/mL. <i>Micrococcus luteus</i> : Zona de inhibición 16.3 mm (79 %) a 1 mg/mL. <i>Staphylococcus aureus</i> : Zona de inhibición: 12.3 mm (64 %) a 1 mg/mL.	Lim <i>et al.</i> (2009)
Curcuma ( <i>Curcuma longa</i> Linn)	Combinación de maceración y ultrasonido	AMA	<i>Salmonella typhimurium</i> : Zona de inhibición: 5 mm.	Thongson <i>et al.</i> (2004)

> diclorometano > agua > acetato de etilo. En EG el orden de obtención fue: para fenoles, metanol > agua > acetonitrilo > diclorometano > acetato de etilo; flavonoides, agua > metanol > diclorometano > acetonitrilo > acetato de etilo; taninos, agua > metanol > acetonitrilo > diclorometano > acetato de etilo. Además, se observó un comportamiento similar en la actividad antioxidante medida por la inhibición de lipasas: metanol > agua > acetonitrilo > acetato de etilo > diclorometano.

Lo anterior muestra que el metanol es mejor solvente de extracción de compuestos fenólicos que el etanol, debido a que este es más polar y consecuentemente aumenta la solubilidad de estos compuestos. Sin embargo, la solubilidad de estos compuestos puede ser afectada si se utiliza una combinación de solventes durante la obtención de extractos (Alotman *et al.*, 2009). Los compuestos fenólicos se caracterizan por ser moléculas anfipáticas debido a que los anillos de fenilo representan la parte hidrofóbica de la molécula y los grupos hidroxilo (OH) la hidrofílica. Los grupos OH polares pueden actuar como donadores de átomos de hidrógeno, mientras que los átomos de oxígeno del segmento benzo- $\gamma$ -pireno puede actuar como aceptores de enlace de hidrógeno (Kozubek *et al.*, 2001; Marković *et al.*, 2012). Estos compuestos eliminan radicales mediante ciertos mecanismos antioxidantes, uno de ellos consiste en la transferencia directa del átomo de hidrógeno del grupo OH del antioxidante (mecanismo HAT), mientras que otro involucra la transferencia secuencial del electrón-protón (mecanismo SETPT); y un tercer mecanismo está relacionado con la transferencia secuencial del protón-electrón (mecanismo SPLET) (Marković *et al.*, 2012).

En otros casos, los extractos más potentes en AOX resultan ser los obtenidos con otros solventes. Por ejemplo, en extractos de hojas de magnolia (*Magnolia officinalis*), la más alta AOX, aunque dependiente de la concentración, se reporta en extractos elaborados con acetona > metanol > agua; correlacionándose con la presencia de los compuestos magnolol y honokiol (Tan *et al.*, 2015). Además, en extracto de hojas de trigo (*Triticum* spp), se estableció una mayor AOX a partir de extractos obtenidos con etanol > agua; lo cual también se correlacionó con la mayor presencia de ácido ascórbico (> 1 mg/g), ácido ferúlico (> 0.25 mg/g) y flavonoides totales (> 6 mg/g) (Zhang *et al.*, 2015).

Referente a la AMA, Trabelsi *et al.* (2010) evaluaron el efecto del solvente de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos y actividad biológica de hojas de salado o verdolaga seca (*Limonium monopteralum*), encontrando que el contenido de compuestos fenólicos por efecto de solvente de extracción siguió el siguiente comportamiento: metanol > etanol/agua (8:2) = acetona/agua (8:2) > metanol/agua (8:2) > acetona = metanol/HCL (1:1) > hexano > etanol > agua > metanol/etanol/agua (4:3:3). Mientras que el orden de obtención de flavonoides fue: etanol/agua (8:2) = metanol = acetona/agua (8:2) > metanol/agua (8:2) > acetona > agua = metanol/HCL (1:1) metanol/etanol/agua (4:3:3) > etanol > hexano. Para taninos

fue: acetona = acetona/agua (8:2) > metanol/agua (8:2) = metanol = metanol/HCL (1:1) = etanol/agua (8:2). El extracto con mayor AMA fue acetona/agua (8:2), contra *S. aureus*>*S. epidermidis*>*E. coli*; actividad que fue correlacionada con algunos polifenoles presentes en el extracto, tales como ácido gálico, ácido 2,2-p-hidroxibenzoico, ácido clorogénico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido trans-cinámico, galato de epicatequina, catequina, rutina, quercetina, apigenina, entre otros.

Por otra parte, Behbahani *et al.* (2018), evaluaron la AMA de extractos de hoja de manglar (*Avicennia marina*) y encontraron el mayor efecto contra *Enterococcus faecium* y *Klebsiella pneumoniae* con extractos obtenidos con etanol > metanol > agua > glicerina. Estos resultados fueron asociados a la presencia de ciertos fitoquímicos tales como alcaloides, taninos, saponinas, flavonas y glucósidos.

### Métodos de extracción y su influencia en AOX y AMA de extractos de plantas

Existen diversos métodos de extracción, desarrollados en el pasado, cuyo principal objetivo ha sido obtener los compuestos presentes en las plantas para curar enfermedades comunes como diarrea, conjuntivitis, gripes, entre otras; siendo utilizados ciertos métodos para la obtención de remedios caseros, como cocción, infusión, molienda mecánica, entre otras (Negi, 2012; Ortega-Ramírez *et al.*, 2014).

En la última década, se han obtenido extractos mediante la utilización de diferentes métodos para obtener compuestos con AOX y AMA, entre los cuales se mencionan aquellos obtenidos por los métodos convencionales (extracción por maceración e hidrodestilación) y métodos no convencionales (ultrasonido, enzimas, microondas, y fluido supercrítico) (Azmir *et al.*, 2013).

La maceración consiste en colocar el material vegetal con el solvente en un contenedor cubierto, a temperatura ambiente por al menos tres días, agitando frecuentemente hasta que la materia soluble se haya disuelto parcial o completamente (Sukhdev *et al.*, 2008). La hidrodestilación, es la obtención de los compuestos volátiles que se encuentran en los vegetales a través del arrastre con vapor de agua; entre dichos compuestos se incluyen terpenos, hidrocarburos no terpénicos, aldehídos, ésteres, alcoholes, fenoles y, con poca frecuencia, ácidos carboxílicos, lactonas, compuestos nitrogenados y sulfurados (Haagen-Smith, 1972; González, 2004).

La extracción con ultrasonido involucra el uso de frecuencias de 20-200 kHz; que incrementa la permeabilidad de las paredes celulares y la cavitación favoreciendo la extracción de los compuestos (Sukhdev *et al.*, 2008). La extracción con microondas se basa en la rápida entrega de energía al disolvente y matriz vegetal, con un posterior calentamiento de ambos por la rotación del dipolo del solvente y consecuente ruptura celular para recuperación eficiente de los componentes (Zhang *et al.*, 2011). El uso de enzimas se basa en la degradación de la pared celular

para una liberación mejorada de los compuestos fenólicos (Maier *et al.*, 2008). Algunas enzimas utilizadas para extraer compuestos de fuentes naturales son proteasas (neutrasa, pepsina), carbohidrasas ( $\beta$ -glucosidasa, glucoamilasa, inulinasa, pectinasas, pectinesterasa y xilasas) pancreatina (mezcla de enzimas digestivas tales como lipasas y proteasas), entre otras (Puri *et al.*, 2012). La extracción por fluido supercrítico es un método alternativo para disminuir el uso de solventes orgánicos, e involucra cambios de temperatura, presión de volumen, recolección de analitos, adición de co-solventes, control de flujo y presión, con el empleo de vesículas cilíndricas de extracción, lo cual permite que las moléculas del extracto se mantengan sin alteraciones en su estado natural (Sukhdev *et al.*, 2008).

### Composición química de los extractos de plantas

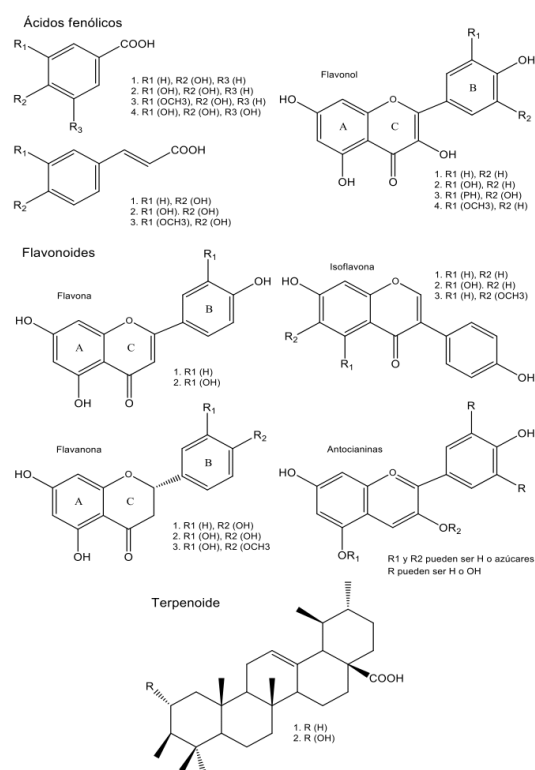
Como se ha mencionado anteriormente, la polaridad del solvente es factor clave en el tipo de compuesto a extraer a partir de hojas de plantas. Por ejemplo, en extractos acuosos pueden obtenerse compuestos tales como antocianinas, taninos, saponinas y terpenoides; mientras que en extractos obtenidos con etanol pueden ser extraídos taninos, polifenoles (flavonoles), terpenoides y alcaloides. En extractos metanólicos se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos (antocianinas y flavonoles), terpenoides, saponinas y taninos; mientras que con cloroformo se han obtenido terpenoides y flavonoides. Con diclorometano y acetona se han extraído terpenoides y flavonoides, respectivamente; mientras que en extractos obtenidos utilizando éter como solvente, se reportan alcaloides y terpenoides (Azmir *et al.*, 2013; Belfeki *et al.*, 2016).

La Figura 1, muestra la estructura química de compuestos identificados comúnmente en extractos de hojas de plantas. En los extractos obtenidos de plantas pertenecientes a la especie *Aframomum* (plantas utilizadas con propósitos etnodietarios, medicinales y espirituales, localizadas en Asia y África), se han encontrado diversos compuestos, entre los que se encuentran flavonoides (algunos derivados del kaempferol y quercetina), hidroxifenil alcanoides, diterpenoides (aframodial, aulacocarpinolina, aulacocarpina A y B), sesquiterpenos y arilalcanoides (Tane *et al.*, 2005). Por otra parte, en hojas de *Blumea balsemifera* se ha reportado la presencia de 50 compuestos diferentes, entre los cuales se encuentran monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, diterpenos, compuestos fenólicos, aldehidos, cetonas, entre otros (Pang *et al.*, 2014).

Sin embargo, el uso de compuestos bioactivos en diferentes sectores comerciales, como la industria farmacéutica y de los alimentos, requiere establecer y estandarizar los procesos de extracción (solvente y método) de los compuestos bioactivos para su posterior uso (Azmir *et al.*, 2013).

### Aplicación de extractos de hojas de plantas en carne y productos cárnicos

La industria de la carne y productos cárnicos por muchos años ha operado de acuerdo a las demandas del



**Figure 1.** Estructura química de compuestos identificados comúnmente en extractos de hojas de plantas.

**Figure 1.** Chemical structure of commonly identified compounds in plant leaves.

consumidor, por lo que actualmente dirige sus esfuerzos a la generación de productos convenientes y atractivos. Así, la demanda de los consumidores por la adquisición de productos con menor contenido de aditivos sintéticos ha alcanzado importancia (Faustman *et al.*, 2010; Falowo *et al.*, 2014). Los nuevos aditivos alimentarios deberán ser utilizados conforme a la regulación existente en cada país. De acuerdo al *Codex Alimentarius*, el concepto de aditivo se refiere a "cualquier sustancia que independientemente de su valor nutricional, se añade intencionalmente a un alimento en cantidades controladas con fines tecnológicos" (Comisión del Codex Alimentarius, 2017). Así, los aditivos alimentarios se utilizan para cumplir diferentes funciones, principalmente las relacionadas con la protección de la calidad de los alimentos, sobre todo los percederos, como es el caso de la carne y los productos cárnicos, pudiendo actuar como antioxidantes y/o antimicrobianos. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos están bajo investigación y algunos de ellos no han sido explotados comercialmente como productos farmacéuticos y/o como agentes protectores de la carne y productos cárnicos (Tiwari *et al.*, 2009).

Una fuente potencial de compuestos con propiedades AOX y AMA, son los extractos de plantas (orégano, romero, tomillo, canela, pimienta y anís, entre otros), los cuales pueden obtenerse a partir de sus diferentes partes, como raíces, yemas, frutos, semillas, corteza y hojas, pudiendo presentar diferente composición. Como ya se mencionó, su composición también dependerá del tipo de solvente y método utilizado en la obtención del extracto; sin embargo, de manera general en estos extractos se pueden encontrar polifenoles, tales como diterpenos fenólicos (carnosol y ácido carnósico), aceites volátiles (eugenol, carvacrol, timol y mentol), ácidos fenólicos (ácido gálico, protocatecuico, cafeico y rosmarínico, entre otros) y flavonoides (quercetina, catequina, apigenina, kaempferol, naringenina y hesperetina); los cuales son responsables de la AOX y/o AMA que ejercen los extractos (Rice-Evans et al., 1996; Gorinstein et al., 2009; Brewer, 2011; Azmir et al., 2013).

Un ejemplo de los compuestos que se han encontrado en los vegetales, son los presentes en extractos de hoja de uva (catequina, epicatequina, kaempferol, quercetina, myricetina, quercetina-4'-glucósido, astringina y trans-resveratrol), en concentraciones dependientes de la madurez de las hojas (Katalinic et al., 2013). Otro es el aceite esencial de tomillo, el cual fue analizado para conocer su composición, encontrándose entre otros compuestos, carvacrol (71.58 %),

p-cimeno (8 %),  $\gamma$ -terpineno (4.41 %), linail acetato (1.65 %), 1,8-cineol (1.51 %),  $\beta$ -mirceno (1.35 %), terpinen-4-ol (1.31 %) y  $\alpha$ -terpineno (1.13 %), los cuales pueden ser los responsables del efecto antimicrobiano observado en hamburguesas funcionales de bovino (Achour et al., 2012).

Estos compuestos fenólicos se han identificado, así como cuantificado y probado su eficacia para conocer su AOX (Bhat et al., 2013; Peksel et al., 2013) y AMA (Zeng et al., 2012), mostrando también efectos asociados al retraso en la aparición de productos de LOX en diferentes matrices alimentarias (Kong et al., 2010; Skowyra et al., 2014), incluyendo a la carne y los productos cárnicos (Anh y Nam et al., 2004; McCarthy et al., 2001). En la Tabla 2 se muestran algunos estudios realizados en los últimos años sobre la utilización de extractos provenientes de hojas de plantas, los cuales se adicionan para proveer un efecto protector sobre la calidad de la carne y productos cárnicos.

Uno de los aditivos naturales más estudiados, con fines de conservación de la carne y productos cárnicos es el romero (*Rosmarinus officinalis*), al que principalmente se le han atribuido propiedades antioxidantes, debido a la presencia de compuestos fenólicos en su composición, los cuales son capaces de regenerar el tocoferol endógeno en la lipoproteína de la bicapa de fosfolípidos (Rice-Evans et al., 1996; Sánchez-Escalante et al., 2011). Este potente

Tabla 2. Efecto protector de la vida de anaquel de carne y productos cárnicos a partir del uso de extractos de hojas de plantas.  
Table 2. Protective effect in meat and carnic products shelf life upon plant leaves extract usage.

Planta y nombre científico	Solvente y método de extracción	Carne/ producto cárnico y dosis	Condiciones de almacenamiento	Resultados	Referencias
Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	Extracto comercial liofilizado	Hamburguesas de bovino (5% de grasa), 0.1%	Envasado en atmósfera modificada (70/20/10, O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> y N <sub>2</sub> ), 2 °C, 20 días de almacenamiento, oscuridad	El uso de 0.1% de extracto de romero en hamburguesas de bovino retrasó la LOX y la formación de metamioglobina preservando el color rojo de la carne durante 20 días de almacenamiento	Sánchez-Escalante et al. (2001)
Tomillo ( <i>Acantholippia seriphoides</i> )	Sin especificar	Hamburguesas de bovino (5% de grasa), 0.015%	Envasado en atmósfera modificada (70/30, N <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> ) y vacío, 4 °C, 4 semanas de almacenamiento	Presentó AOX, ya que se retrasó la formación de TBARS en hamburguesas de bovino funcionales. Sin embargo no se observó actividad antimicrobiana (bacterias aerobias, <i>Clostridium</i> sp y Enterobacterias)	Medina de Dias et al. (2003)
Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	Etanol (95%)	Carne de borrego (3.3% de grasa), 0-2%	Emplegado, a 4 °C, 6 días de almacenamiento	La aplicación de extracto de romero (0.25%) redujo la LOX carne molida de caprino sin cocinar y almacenada en refrigeración	Han y Rhee (2005)
Té verde ( <i>Camellia sinensis</i> ) y semilla de uva ( <i>Vitis vinifera</i> )	Agua, no específica	Hamburguesas de bovino, 0.03%	Emplegado, a 4 °C, 9 días de almacenamiento, iluminación	La aplicación de extracto de té verde disminuyó el efecto de LOX durante el almacenamiento. Así mismo, se redujo la formación de metamioglobina, y el deterioro microbiológico (mesófilos aerobios y coliformes totales)	Bañón et al. (2007)
Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	Sin especificar	Carne fresca de bovino, 0.05, 0.1, 0.15 y 0.25%	Bolsas Ziploc®, 4-6 °C, 5 días de almacenamiento	La adición de aceite esencial de orégano microencapsulado (0.15%) en carne inoculada con <i>Clostridium perfringens</i> , mostró efecto reductor de 2 log UFC/g a las 48 h.	Hernández (2009)

Continúa en la página 161



Planta y nombre científico	Solvente y método de extracción	Carne/ producto cárnico y dosis	Condiciones de almacenamiento	Resultados	Referencias
Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	Extracto comercial liofilizado	Hamburguesas de bovino (5% de grasa), 0.1% de extracto + 0.05% de ácido ascórbico	Envasado en atmósfera modificada (70/20/10, O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> y N <sub>2</sub> ), 2 °C, 20 días de almacenamiento, oscuridad e iluminación	El uso de romero (0.1%) presenta efecto sinérgico con ácido ascórbico (0.05 %), inhibiendo pérdida de color y LOX; manteniendo el color rojo de hamburguesas de bovino durante su almacenamiento. La adición de 0.1% de extracto de romero redujo el crecimiento de microorganismos psicrótrofos hasta el día 8 de almacenamiento en iluminación y hasta el 16 en oscuridad.	Sánchez-Escalante <i>et al.</i> (2011)
Loto ( <i>Nelumbo nucifera</i> )	Agua, maceración	Carne fresca de bovino y cerdo, 3%	Empleado, a 4 °C, 10 días de almacenamiento, oscuridad	La adición de extracto (3%) en carne molida de cerdo y bovino sin cocinar, mostró reducción en la LOX, retrasando la formación de TBARS durante el almacenamiento	Huang <i>et al.</i> (2011)
Curry ( <i>Murraya koenigii</i> L.) y menta ( <i>Mentha spicata</i> )	Etanol, agua, etanol-agua; maceración	Carne fresca de cerdo, 1%	Empleado, a 4 °C, 12 días de almacenamiento	La aplicación de extractos de hojas de curry y menta en carne molida de cerdo sin cocinar y almacenada en refrigeración, preservó el color rojo y retardó la LOX durante 12 días de almacenamiento	Biswas <i>et al.</i> (2012)
Curry ( <i>Murraya koenigii</i> L.) y fenogreco ( <i>Trigonella foenum-graecum</i> )	Agua, maceración	Hamburguesas de pollo, 2%	Empleado, a 4 °C, 8 días de almacenamiento	El tratamiento con extracto de hojas de curry y fenogreco, redujo LOX en carne de pollo comparando contra el control durante su almacenamiento	Devatkal <i>et al.</i> (2012)
Chamnamul ( <i>Pimpinella brachycarpa</i> ) Fatsia ( <i>Aralia elata</i> Miq Seem)	Etanol (70%), maceración	Hamburguesas de bovino (20% de grasa), 0.1 y 0.5%	Bolsas Whirl-Pak®, 4 °C, durante 12 días de almacenamiento	Retraso en la pérdida de color rojo (a*) y en la oxidación de lípidos (TBARS), así como reducción del crecimiento microbiano cuando se aplicaron los extractos al 0.1%. El extracto de fatsia presentó mayor actividad antioxidante y antimicrobiana que el extracto obtenido de chamnamul.	Kim <i>et al.</i> (2013)
Moringa ( <i>Moringa oleifera</i> )	Agua, maceración con dos extracciones	Carne de bovino, 0.1, 0.2 y 0.3 g/L	Envasado en atmósfera modificada (80/20, O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> ), 4 °C, 12 días de almacenamiento	El uso de extractos de hoja de moringa disminuyó la LOX, especialmente con la concentración a 0.3 g/L, retardando también la pérdida de color rojo (valor a*). También se presentó actividad antimicrobiana (mesófilos aerobios)	Shah <i>et al.</i> (2015)
Moringa ( <i>Moringa oleifera</i> ) Amor seco o cadillo ( <i>Bidens pilosa</i> )	Etanol:agua (7:3), maceración	Carne molida de bovino, 0.05 y 0.1%	Empleado, a 4°C, 6 días de almacenamiento	La aplicación de 0.05 y 0.1% de extractos de <i>B. pilosa</i> y <i>M. oleifera</i> retrasó la oxidación de lípidos (TBARS) en la carne de bovino fresca, respecto al control y BHT durante 12 días de almacenamiento en refrigeración, siendo mejor <i>B. pilosa</i> que <i>M. oleifera</i>	Falowo <i>et al.</i> (2017)
Olivo ( <i>Olea europaea</i> )	Etanol (80%), hidrodestilación	Hamburguesas de bovino, 0.2, 1 y 1.5%	4 °C, 6 días de almacenamiento	La adición de 1.5% del extracto de hojas de olivo retardó la oxidación de lípidos (TBARS) en las hamburguesas en comparación con control, durante el almacenamiento en refrigeración.	Al-Rimawi <i>et al.</i> (2017)

efecto inhibitor de la LOX (medida como formación de TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), en la carne fresca, tanto de cerdo como de bovino, ha mostrado efectos similares o incluso mejores a los exhibidos por los aditivos sintéticos (BHA, BHT) (Sebranek *et al.*, 2005). Otra de las plantas utilizadas y que presenta efecto protector sobre la LOX de la carne es la salvia (*Salvia officinalis*), cuyo aceite esencial obtenido de sus hojas, puede reducir 57 y 75% la formación de TBARS en carne de bovino y cerdo fresca, respectivamente (Fasseas *et al.*, 2007).

Uno de los mecanismos por los cuales los compuestos presentes en los extractos de hojas de plantas ejercen su AOX,

es a través de su capacidad para donar electrones y/o átomos de hidrógeno, así como la capacidad de quelar metales (Rao *et al.*, 2010).

Además de la LOX, también es importante proteger a la carne y los productos cárnicos del deterioro microbiano, ya sea por microorganismos deteriorativos y/o patógenos como *S. aureus*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *Campylobacter* spp. (Ramadan, 2012). Por ejemplo, se ha demostrado la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) utilizando diferentes concentraciones (0.05, 0.5 y 1.0%), observándose una disminución en el crecimiento de microorganismos deteriorativos en carne

molida de bovino, y envasada en atmósfera modificada (100% de CO<sub>2</sub>) (Skandamis y Nychas, 2001).

Adicional a la AOX, el extracto de hojas de romero (*Rosemarinus officinalis*) también presenta AMA, lo cual se ha observado en carne de pollo fresca almacenada en refrigeración (4 °C, 15 días). La AMA se evaluó con la utilización de extracto (1%), determinando el desarrollo de cuenta viable total, bacterias ácido lácticas, *Enterobacterias* y *Pseudomonas*, cuyos resultados manifestaron disminución de la carga bacteriana en las muestras con extracto de romero en comparación con el control (Zhang et al., 2016).

Algunos de los mecanismos mediante los cuales los compuestos antimicrobianos presentes en los extractos de plantas ejercen su acción, incluyen 1) alteración de la permeabilidad de la membrana celular, con la posible pérdida de sus funciones (transporte de electrones, insumo de nutrientes, entre otros); 2) inhibición de la síntesis de proteínas; y 3) inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, entre otros (Tiwari et al., 2009; Lou et al., 2012).

## CONCLUSIONES

Los extractos de plantas pueden obtenerse de las diferentes partes anatómicas de las mismas mediante el uso de diversos solventes y métodos de extracción, los cuales tienen efecto sobre su composición y actividad biológica (actividad antioxidante y antimicrobiana). En la literatura existen gran cantidad de trabajos de investigación, en los que se aborda la obtención y evaluación de las propiedades biológicas de extractos obtenidos a partir de hojas de plantas (romero, salvia, orégano, moringa, macaranga, uva, mezquite, tomillo, mangle, entre otras), así como su posible aplicación en matrices alimentarias, incluyendo la carne y los productos cárnicos. En dichos estudios se demuestra que existe un gran potencial para la incorporación de estos ingredientes de origen natural en sustitución de los aditivos sintéticos para la formulación de productos cárnicos, con la posibilidad de utilizarlos como agentes antioxidantes y/o antimicrobianos.

## AGRADECIMIENTOS

Margarita Irene Ramírez Rojo agradece la beca otorgada por CONACYT para realizar sus estudios de Doctorado en Ciencias.

## REFERENCIAS

- Achour, S., Khelifi, E., Attia, Y., Ferjani, E. y Hellal, A.N. 2012. Concentration of antioxidant polyphenols from *Thymus capitatus* extracts by membrane process technology. *Journal of Food Science*. 6: C703-C709.
- Ahn, D.U. y Nam, K.C. 2004. Effects of ascorbic acid and antioxidants on color, lipid oxidation and volátiles of irradiated ground beef. *Radiation Physics and Chemistry*. 71: 149-154.
- Asenjo, M.B. 1999. Efecto de la raza y de la alimentación en los parámetros productivos y de calidad de canal y de carne en añejos de razas charolés y serrana soriana. Tesis de Doctorado. Universidad de Valladolid, Soria.

- Asnaashari, M., Tajik, R. y Khodaparast, M.H.H. 2015. Antioxidant activity of raspberry (*Rubus fruticosus*) leaves extract and its effect on oxidative stability of sunflower oil. *Journal of Food Science and Technology*. 52: 5180-5187.
- Allothman, M., Bhat, R. y Karim, A.A. 2009. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*. 115: 785-788.
- Al-Rimawi, F., Tarawa, M.S. y Elama, C. 2017. Olive leaf extract as natural antioxidant additive of fresh hamburger stored at 4°C. *American Journal of Food Science and Technology*. 5: 162-166.
- Aziz, N.A., Bux, H., Amir, Z.M., Zulfiqar, A.M., Iqbal, A., Roomi, S., Muhammad, I. y Hussain, S.S. 2012. Antimicrobial and antioxidant activities of *Mimosaceae* plants; *Acacia modesta* Wall (Phulai), *Prosopis cineraria* (Linn.) and *Prosopis juliflora* (Swartz). *Journal of Medicinal Plants Research*. 15: 2962-2970.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. y Omar, A.K.M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*. 117: 426-436.
- Bañón, S., Díaz, P., Rodríguez, M., Garrido, M.D. y Price, A. 2007. Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat Science*. 77: 626-633.
- Bhat, R., Liong, M.T., Abdorreza, M.N. y Karim, A.A. 2013. Evaluation of free radical scavenging activity and antioxidant potential of a few popular Green leafy vegetables of Malaysia. *International Journal of Food Properties*. 16: 1371-1379.
- Balasundram, N., Sundram, K. y Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99: 191-203.
- Becker, T. 2000. Consumer perception of fresh meat quality: a framework for analysis. *British Food Journal*. 102: 158-176.
- Bebbahani, B.A., Yazdi, F.T., Shahidi, F., Noorbakhsh, H., Vasiee, A. y Alghooneh, A. 2018. Phytochemical analysis and antibacterial activities extracts of mangrove leaf against the growth of some pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*. 114: 225-232.
- Belfeki, H., Mejri, M. y Hassouna, M. 2016. Antioxidant and anti-lipases activities in vitro of *Mentha viridis* and *Eucalyptus globulus* extracts. *Industrial Crops and Products*. 89: 514-521.
- Belkhir, M., Rebai, O., Dhaouadi, K., Sioud, B., Amri, M. y Sami, F. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian azarole (*Crataegus azarolus* L.) leaves and fruit pulp/peel polyphenolic extracts. *International Journal of Food Properties*. 16: 1380-1393.
- Biswas, A.K., Chatli, M.K. y Sahoo, J. 2012. Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. *Food Chemistry*. 133: 467-472.
- Brewer, M.S. 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10: 221-247.
- Choe, J.H., Jang, A., Choi, J.H., Choi, Y.S., Han, D.J., Kim, H.Y., Lee, M.A., Kim, H.W. y Kim, C.J. 2010. Antioxidant activities of

- lotus leaves (*Nelumbo nucifera*) and barley leaves (*Hordeum vulgare*) extracts. Food Science and Biotechnology. 19: 831-836.
- Comisión del Codex Alimentarius. 2017. Normas internacionales de los alimentos; Norma general para los aditivos alimentarios. [Consultado 21 Julio 2017]. Disponible en: [http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS\\_192s.pdf](http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf).
- Devatkal, S.K., Thorat, P.R., Manjunatha, M. y Anurag, R.K. 2012. Comparative antioxidant effect of aqueous extracts of curry leaves, fenugreek leaves and butylated hydroxytoluene in raw chicken patties. Journal of Food Science and Technology. 49: 781-785.
- Falowo, A.B., Fayemi, P.O. y Muchenje, V. 2014. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. Food Research International. 64: 171-181.
- Falowo, A.B., Muchenje, V., Hugo, A., Aiyegoro, O.A. y Fayemi, P.O. 2017. Antioxidant activities of *Moringa oleifera* L. and *Bidens pilosa* L. leaf extracts and their effects on oxidative stability of ground raw beef during refrigeration storage. CyTA-Journal of Food. 15: 249-256.
- Fasseas, M.K., Mountzouris, K.C., Tarantilis, P.A., Polissiou, M. y Zervas, G. 2007. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. Meat Science. 106: 1188-1194.
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R. y Suman, S.P. 2010. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. Meat Science. 86: 86-94.
- Fernández-Ginés, J.M., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E. y Pérez-Alvarez, J. 2005. Meat products as functional foods: A review. Journal of Food Science. 70: R37-R43.
- Gorinstein, S., Park, Y.S., Heo, B.G., Namiesnik, J., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Ham, K.S., Cho, J.Y. y Kang, S.G. 2009. A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables. European Food Research Technology. 228: 903-911.
- Gonzalez, V.A.A. 2004. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas de las amazonas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. Manizales.
- Haagen-Smith, A.J. 1972. The chemistry, origin and function of the essential oil in plant life. En Guenther E. The essential oils, Vol 1, pp 17-28. Krieger Publishing Company Malabar, Florida.
- Han, J. y Rhee, K.S. 2005. Antioxidant properties of selected Oriental non-culinary/nutraceutical herb extracts as evaluated in raw and cooked meat. Meat Science. 70: 25-33.
- Heredia, N., Dávila-Aviña, J.E., Solís, S.L. y García, S. 2014. Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control. Nacameh. 8: S20-S42.
- Hernández, C.J.J. 2009. Microencapsulación del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) para su aplicación en la conservación de carne de res. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila, México.
- Huang, B., He, J., Ban, X., Zeng, H., Yao, X. y Wang, Y. 2011. Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf. Meat Science. 87: 46-53.
- Kalidindi, N., Thimmaiah, N.V., Jagadeesh, N.V., Nandee, R., Swetha, S. y Kalidindi, B. 2015. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. Journal of Food and Drug Analysis. 23: 795-802.
- Katalinic, V., Smole, M.S., Generalic, I., Skroza, D., Ljubenkovic, I. y Klancnik, A. 2013. Phenolic profile, antioxidant capacity and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. International Journal of Food Properties. 1: 45-60.
- Kim, S.J., Cho, A.R. y Han, J. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. Food Control. 29: 112-120.
- Klopčič, M., Kuipers, A. y Hocquette, J.F. 2013. Consumer attitudes to food quality products: Emphasis on Southern Europe, EAAP publication. No. 133. Wageningen Academic Publishers (Ed.). Países Bajos.
- Kong, B., Zhang, H. y Xiong, Y.L. 2010. Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. Meat Science. 85: 772-778.
- Kozubek, A., Zarnowski, R., Stasiuk, M. y Gubernator, J. 2001. Natural amphiphilic phenols as bioactive compounds. Cellular and Molecular Biology Letters. 6: 351-355.
- Lim, T.Y., Lim, Y.Y. y Yule, C.M. 2009. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four Macaranga species. Food Chemistry. 114: 594-599.
- Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C. y Li, J. 2012. p-coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. Food Control. 25: 550-554.
- Maier, T., Göppert, A., Kammerer, D.R., Schieber, A. y Carle, R. 2008. Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. European Food Research Technology. 227: 267-275.
- Marković, Z., Milenković, D., Đorović, J., Marković, J.M.D., Stepanić, V., Lučić, B., y Amić, D. 2012. PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of morin. Food chemistry. 134: 1754-1760.
- Martínez, L., Ros, G. y Nieto, G. 2015. Situación actual del empleo de aditivos sintéticos en preparados cárnicos y nuevas tendencias para la sustitución de los mismos. Eurocarne. 241: 49-55.
- McCarthy, T.L., Kerry, J.P., Kerry, J.F., Lynch, P.B. y Buckley, D.J. 2001. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. Meat Science. 57: 45-52.
- Medina de Dias, R., Zimmermann, M., Dupertuis, L., Espejo, C., Amadio, C., Raimondo, E. y Dip, G. 2003. Aceite esencial de tomillo como antioxidante y conservador en hamburguesas funcionales. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo. 35: 13-23.
- Mendoza-Meza, D.L., Parra-Flórez, L. y Loza-Rosas, S. 2014. Free radical scavenging capacity of essential oil and ethanolic extracts of yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) H. Robinson, cultivated in Colombia. Biosalud. 13: 9-23.
- Negi, P.S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology. 156: 7-17.
- Ortega-Ramírez, L.A., Rodríguez-García, I., Leyva, J.M., Cruz-Valenzuela, M.R., Silva-Espinoza, B.A., González-Aguilar, G.A., Siddiqui, Md.W. y Ayala-Zavala, J.F. 2014. Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: A Hypothesis. Journal of Food Science. 79: R129-R137.



- Pang, Y., Wang, D., Fan, Z., Chen, X., Yu, F., Hu, X., Wang, K. y Yuan, L. 2014. *Blumea balsamifera*-A phytochemical and pharmacological review. *Molecules*. 19: 9453-9477.
- Peksel, A., Imamoglu, S., Kiyamaz, N.A. y Orhan, N. 2013. Antioxidant and radical scavenging activities of *Asphodelus aestivus* Brot. extracts. *International Journal of Food Properties*. 16: 1339-1350.
- Puri, M., Sharma, D. y Barrow, C.J. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*. 30: 37-44.
- Rao, A.S.V.C., Reddy, S.G., Babu, P.P. y Reddy, A.R. 2010. The antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from Njavara rice bran. *BMC Complementary & Alternative Medicine*. 4: 1-9.
- Ramadan, M.F. 2012. Antiradical and antimicrobial properties of cold-pressed black cumin and cumin oils. *European Food Research Technology*: 234: 833-844.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. y Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. 7: 933-956.
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrescano, G., Beltrán, J.A. y Roncalés, P. 2001. The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science*. 58: 421-429.
- Sánchez-Escalante, A., Torrescano, G., Djenane, D., Beltrán, J.A., Giménez, B. y Roncalés, P. 2011. Effect of antioxidants and lighting conditions on color and lipid stability of beef patties packaged in high-oxygen modified atmosphere. *CyTA-Journal of Food*. 9: 49-57.
- Saucier, L. 2016. Microbial spoilage, quality and safety within the context of meat sustainability. *Meat Science*. 120: 78-84.
- Sebranek, J.G., Sewalt, V.J.H., Robbins, K.L. y Houser, T.A. 2005. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science*. 2: 289-296.
- Shah, M.A., Bosco, S.J.D. y Mir, S.A. 2015. Effect of Moringa oleifera leaf extract on the physicochemical properties of modified atmosphere packaged raw beef. *Food Packaging and Shelf Life*. 3: 31-38.
- Simões, C.B., Mendes, dC.S. y Guedes, A. 2010. Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos brutos de especies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. *Revista Pan Amaz-Saude*. 2: 33-39.
- Skandamis, P.N. y Nychas, G.J.E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 1011-1022.
- Skowryra, M., Falguera, V., Azman, N.A.M., Segovia, F. y Almajano, M.P. 2014. The effect of *Perilla frutescens* extract on the oxidative stability of model food emulsions. *Antioxidants*. 3: 38-54.
- Sukhdev, S.H., Suman, P.S.K., Gennaro, L. y Dev, D.R. 2008. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. *International Centre for Science and High Technology*. Editorial ICS UNIDO. Trieste, Italy.
- Sultana, B., Anwar, F. y Ashraf, M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*. 14: 2167-2180.
- Tan, L.H., Zhang, D., Yu, B., Zhao, S.P. y Cao, W.G. 2015. Antioxidant activity of the different polar solvent extracts of *Magnolia officinalis* leaves and purification of main active compounds. *European Food Research and Technology*. 240: 815-822.
- Tane, P., Tatsimo, S.D., Ayimele, G.A. y Connolly, J.D. 2005. Bioactive metabolites from *Aframomum* species. In 11th NAPRECA Symposium Book of Proceedings. 214: 214-223.
- Thongson, C., Davidson, P.M., Mahakaranchanakul, W. y Weiss, J. 2004. Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent-extracted spices. *Letters in Applied Microbiology*. 39: 401-406.
- Tiaz, L., Zeiger, E. 2006. Secondary metabolites and plant defense. In: *Plant Physiology*, 4th ed. Sinauer Associates, pp. 283-308 (Chapter 13). Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Tiwari, B., Valdramidis, V., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Cullen, P.J. y Bourke, P. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 14: 5987-6000.
- Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Soumaya, B., Hajlaoui, G. y Abdelly, C. 2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT-Food Science and Technology*. 43: 632-639.
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D. Giammanco, M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food chemistry*. 104: 466-479.
- Vargas-Sánchez, R.D., Mendoza-Wilson, A.M., Torrescano-Urrutia, G.R. y Sánchez-Escalante, A. 2015. Antiradical potential of phenolic compounds fingerprints of propolis extracts: DFT approach. *Computational and Theoretical Chemistry*. 1066: 7-13.
- Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I. y Alborés, S. 2018. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *The Journal of Supercritical Fluids*. 133: 58-64.
- Warnants, N., Van Oeckel, M.J. y Boucqué, C.V. 1996. Incorporation of dietary polyunsaturated fatty acids in pork tissues and its implications for the quality of the end products. *Meat Science*. 44: 125-144.
- Xu, H.X. y Lee, S.F. 2001. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytotherapy Research*. 15: 39-43.
- Zeng, W.C., He, Q., Sun, Q., Zhong, K. y Gao, H. 2012. Antibacterial activity of water-soluble extract from pine needles of *Cedrus deodara*. *International Journal Food Microbiology*. 153: 78-84.
- Zhang, H.F., Yang, X.H. y Wang, Y. 2011. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*. 22: 672-688.
- Zhang, H., Wu, J. y Guo, X. 2016. Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality. *Food Science and Human Wellness*. 5: 39-48.
- Zhang, Z.Q., Xiang, J.J. y Zhou, L.M. 2015. Antioxidant activity of three components of wheat leaves: ferulic acid, flavonoids and ascorbic acid. *Journal of Food Science and Technology*. 52: 7297-7304.
- Zheng, Y.Z., Zhou, Y., Liang, Q., Chen, D.F., Guo, R., Xiong, C.L., Xu, X.J., Zhang, Z.N. y Huang, Z.J. 2017. Solvent effects on the intramolecular hydrogen-bond and anti-oxidative properties of apigenin: A DFT approach. *Dyes and Pigments*. 141: 179-187.

## **ARTÍCULO 2**

### **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE HOJA DE MEZQUITE (*Prosopis velutina*)**

**Margarita Irene Ramírez-Rojo, Rey David Vargas-Sánchez, Javier Hernández-Martínez, Evelin Martínez-Benavidez, José Jesús Sánchez-Escalante, Gastón Ramón Torrescano-Urrutia, Armida Sánchez-Escalante.**

**Artículo aceptado el 28 de mayo de 2018 para su publicación en el número 1, volumen XXI, 2019 de Biotecnia**

# Biotecnia

Revista editada por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
de la Universidad de Sonora

Hermosillo, Sonora, a 28 de mayo de 2018

**Dra. Armida Sánchez-Escalante**

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

**P r e s e n t e**

Me complace informarle que su artículo titulado “**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE HOJA DE MEZQUITE (*Prosopis velutina*)**”, escrito por: **Margarita Irene Ramírez-Rojo, Rey David Vargas-Sánchez, Javier Hernández-Martínez, Evelin Martínez-Benavidez, José Jesús Sánchez-Escalante, Gastón Ramón Torrescano-Urrutia y Armida Sánchez-Escalante**, ha sido aceptado para su publicación en **Biotecnia**. Se tiene contemplado que su manuscrito sea publicado en el número 1, volumen XXI, 2019 de Biotecnia, el cual estará en línea el 01 de enero de 2019, o antes en caso de poder tener una publicación anticipada a finales del 2018.

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

*Francisco Rodríguez Félix*

**Dr. Francisco Rodríguez Félix**

**Editor**

c.c.p. Dra. Miroslava Suárez Jiménez. Secretaria del Comité Editorial

Dirección electrónica: <http://biotecnia.unison.mx>

Correo electrónico: [biotecnia@ciencias.uson.mx](mailto:biotecnia@ciencias.uson.mx)

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE HOJA DE MEZQUITE**  
**(*Prosopis velutina*)**

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MESQUITE LEAF EXTRACTS (*Prosopis velutina*)**

Margarita Irene Ramírez-Rojo<sup>1</sup>, Rey David Vargas-Sánchez<sup>1</sup>, Javier Hernández-Martínez<sup>2</sup>, Evelin Martínez-Benavidez<sup>2</sup>, José Jesús Sánchez-Escalante<sup>3</sup>, Gastón Ramón Torrescano-Urrutia<sup>1</sup>, Armida Sánchez-Escalante<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Carretera a La Victoria Km 0.6, Hermosillo, Sonora, 83304, México.

<sup>2</sup>Universidad Veracruzana (UV). Dr. Luis Castelazo Ayala S/N, Xalapa, Veracruz, 91190, México.

<sup>3</sup>Universidad de Sonora (USON). Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Hermosillo, Sonora, 83000, México.

\*Autor para correspondencia: Tel: +52 662 2892400, ext. 361; Fax: +52 662 2800421.  
Correo electrónico: armida-sanchez@ciad.mx

## RESUMEN

El mezquite (*Prosopis velutina*) es una planta tradicionalmente utilizada por el hombre y animales como alimento en ciertas regiones de México. Además, también es considerada medicinal debido a que posee ciertas propiedades biológicas, las cuales son atribuidas a la presencia de fitoquímicos como los compuestos fenólicos. El objetivo fue evaluar la composición y actividad antioxidante de extractos de hoja de mezquite obtenidos con diferentes solventes. Los extractos se obtuvieron utilizando como solventes de extracción, agua (EAM), etanol y agua (1:1) (EAEM) y etanol (EEM); una vez obtenidos se evaluaron determinando presencia de posibles compuestos tóxicos (alcaloides, cianógenos y saponinas); el contenido de fenoles y flavonoides totales (CFT y CFvT); así como la actividad antioxidante de los extractos mediante la inhibición del radical DPPH• y el poder reductor (FRAP). Los resultados mostraron que en los extractos no se encontró la presencia de compuestos tóxicos; que los valores más altos de rendimiento de extracción fueron para el EAEM (21.4%); y que el mayor CFT y CFvT (> 50 mg/g), así como la actividad antioxidante la presentó el EEM (34%). Por lo que, el EEM pudiera ser utilizado como aditivo en la industria farmacéutica o como ingrediente en la formulación de alimentos.

**Palabras claves:** *Prosopis*, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, hojas de mezquite

## ABSTRACT

Mesquite (*Prosopis velutina*) is a plant traditionally used by humans and animals as food in certain regions of Mexico. In addition, it is considered medicinal because of its specific biological properties, which are attributed to the presence of phytochemicals such as phenolic compounds. The aim was to evaluate the composition and antioxidant activity of mesquite leaf extracts obtained with different solvents. The extracts were obtained using water (WME), ethanol and water (EWME), and ethanol (EME) as extraction

solvents. Once obtained, the extracts were evaluated by determining the presence of possible toxic compounds (alkaloids, cyanogens, and saponins), total phenolic and flavonoid content (TPC and TFC), and antioxidant activity according to DPPH• radical inhibition and reducing power (FRAP). The results showed that toxic compounds were not present in the extracts. The highest extraction yield values were found for EWME (21.4%). The highest (> 50 mg/g) TPC, TFC, and antioxidant activity were presented by EME (34%). Therefore, EME could be used as an additive in the pharmaceutical industry or as an ingredient in food formulation.

**Keywords:** *Prosopis*, phenolic compounds, antioxidant activity, mesquite leaves

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han realizado un gran número de investigaciones en la búsqueda de nuevos ingredientes de origen natural para la creación de aditivos con actividad antioxidante y ser utilizados en el desarrollo de nuevos productos alimenticios (Falowo *et al.*, 2014). Esto es debido a que algunos antioxidantes disponibles comercialmente, y que son utilizados para la conservación de los alimentos, son de origen sintético (butilhidroxianisol, BHA; butilhidroxitolueno, BHT; terbutilhidroquinona, TBHQ; entre otros), los cuales al ser añadidos en concentraciones inadecuadas son considerados potencialmente tóxicos y asociados a problemas relacionados con la salud (Poljsak *et al.*, 2013). Por lo tanto, en base a la necesidad existente por la obtención de nuevos agentes conservadores naturales y seguros, uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica y de los alimentos es el desarrollo de aditivos a partir de ciertas especies de plantas medicinales y comestibles, capaces de reducir o inhibir la formación de radicales libres, los cuales están estrechamente asociados con enfermedades, incluyendo cáncer, aterosclerosis y diabetes (Fernández-Ginés *et al.*, 2005); y con reacciones de oxidación de lípidos, que junto con el deterioro microbiano son la causa principal de pérdida de calidad en los alimentos (Faustman *et al.*, 2010).

El conocimiento de la medicina tradicional basada en el uso de plantas es una alternativa natural en la obtención de fármacos, y podría ser una estrategia para la obtención de compuestos bioactivos que puedan utilizarse como agentes conservadores de alimentos (Bajpai *et al.*, 2005). En diversas investigaciones se ha reportado el uso de plantas del desierto, entre ellas las familias Krameriaceae, Viscaceae, Loranthaceae, Phytolaccaceae y Fabaceae, contra padecimientos como diarrea, colitis, enteritis, dolor de cabeza, rabia, varicela, enfermedades del riñón y el hígado, sarampión, cáncer, entre otras (Harlev *et al.*, 2012; Jiménez-Estrada *et al.*, 2013). Respecto a plantas de la familia Fabaceae, estas han mostrado potencial para su consumo, tanto animal como humano, en zonas desérticas, tal es el caso del mezquite (Almanza y Moya, 1986).

El matorral del desierto de Sonora y espinoso cubren gran parte del noroeste de México, con numerosos árboles pertenecientes a las plantas fabáceas, entre las que se consideran herbáceas, arbustos y árboles (Robinson, 1898). Estas plantas con flores son conocidas por ser las fuentes más visitadas por las abejas para la producción de miel, cera y propóleos (Prabha *et al.*, 2014). En un trabajo previo Vargas-Sánchez *et al.* (2016), en el que se estableció la importancia de estas plantas en la elaboración de productos apícolas, se reporta que en la región central del municipio de Ures Sonora, México, la vegetación es dominada por especies subtropicales pertenecientes a las familias Fabaceae (18.5%), Cactaceae (10.2%), Malvaceae (8.3%), Asteraceae (6.5%), entre otras. Específicamente, de la familia Fabaceae se encontraron los géneros *Acacia* spp., *Caesalpinia* spp., *Mimosa* spp., *Olneya* spp. y *Prosopis* spp., entre otros.

Por otra parte, en algunas investigaciones se ha encontrado que los extractos obtenidos de cáscara, vainas, polen y hojas de plantas del género *Prosopis* spp. (*P. alba*, *P. chilensis*, *P. juliflora* y *P. tamarugo*) poseen propiedades biológicas, entre las que se mencionan actividad antifúngica, antimicrobiana, analgésica, citotóxica, antiinflamatoria, antitumoral, antiviral, antialérgica, antidiarreica, antidiabética y antioxidante, las cuales están relacionadas con la presencia de alcaloides y compuestos fenólicos; de estos últimos se reportan apigenina, catequina, juliflorina, quercetina, kaempferol y mezquitol (SivaKuamara *et al.*, 2009; Prabha *et al.*, 2014).

En base a lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo obtener extractos de hoja de mezquite (*Prosopis velutina*) utilizando diferentes solventes, y evaluar su

composición de fitoquímicos y compuestos tóxicos, así como sus propiedades antioxidantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal y Reactivos

Las hojas de mezquite (*Prosopis velutina*) fueron colectadas en la región de Rancho Viejo (29°7'19.72"N, 110°16'58.35" W; 476 m a.s.l.) dentro del municipio de Ures Sonora, México. Esta localidad presenta características de clima desértico, aunque en términos de precipitación anual, el clima local puede definirse como semiárido (INEGI, 2012). La identificación botánica de las plantas fue llevada a cabo por especialistas del Herbario de la Universidad de Sonora (Departamento de Investigación Científica y Tecnológica), la cual tiene asignado el número de catálogo 26120.

Todos los reactivos químicos utilizados fueron grado analítico. El reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), etanol, ácido acético glacial, acetato de sodio, éster fenético del ácido cafeico (CAPE), sulfato de hierro (II) heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), rutina, butilhidroxitolueno (BHT), cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), ácido ascórbico (vitamina C), reactivo Drangerdoff y ácido gálico fueron marca Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); el ácido clorhídrico y el metanol se adquirieron de Merck (Bush, Suiza); mientras que el reactivo 4,4,6-tripiridil-S-triazina-TPTZ se adquirió de la marca Fluka Chemie AG (Bush, Suiza).



## **Obtención de Extractos**

Las hojas de mezquite fueron secadas a temperatura ambiente (35 °C) durante una semana, y pulverizadas (20 Mesh) en un molino eléctrico para granos, para posteriormente obtener los extractos por el método descrito por Tolosa y Cañizares (2002), con ligeras modificaciones. La obtención de extractos se realizó por extracción asistida con ultrasonido (25 °C/42 Hz/30 min) utilizando 20 g del polvo con 180 mL de solvente de extracción (agua, etanol y agua-etanol, 1:1). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (5000 x g durante 10 min), y el sobrenadante obtenido se filtró (Whatman No 4), concentró (35 °C) utilizando un evaporador rotatorio (BÜCHI R-200, Flawil, Suiza) y nitrógeno líquido. Los extractos obtenidos (extracto acuoso de hoja de mezquite, EAM; extracto etanólico de hoja de mezquite, EEM; extracto acuoso-etanólico de hoja de mezquite, EAEM) se almacenaron a -20 °C, hasta su análisis.

## **Análisis de Compuestos Tóxicos**

El perfil cualitativo de fitoquímicos potencialmente tóxicos, en todos los extractos, se determinó de acuerdo a los métodos descritos por Samejo *et al.* (2011; 2013), para el análisis de compuestos alcaloides y saponinas, con ligeras modificaciones. Para la determinación de alcaloides, los extractos de hojas de mezquite (5 mL, 5 mg/mL) se homogenizaron con 2 mL de HCl 2 N y se hirvieron durante 10 min. La solución se enfrió y filtró, posteriormente se agregaron 100 µL del reactivo de Drangendorff. La formación de un precipitado color marrón indica la presencia de alcaloides. Mientras que la determinación de saponinas consistió en agitar los extractos de hojas de mezquite (5 mL, 5 mg/mL) durante 3 min a temperatura ambiente, y para establecer la presencia de este grupo de compuestos se observa la persistencia de espuma en la solución.

Por otro lado, para la determinación de cianógenos, se coloca una alícuota de 100 µL de extracto (5 mg/mL) en una hoja de papel previamente impregnada con el reactivo de

Grignard. El cambio de color rojo-rosa indica la presencia de cianógenos (Nuñez *et al.*, 2015).

### **Contenido de Fenoles Totales**

El CFT de los extractos se determinó de acuerdo al método descrito por Ainsworth y Gillespie (2007). Alícuotas de cada extracto (10  $\mu\text{L}$ , 5 mg/mL) se homogenizaron con 40  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu (0.25 N), 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7%, p/v) y 80  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, en ausencia de luz. La absorbancia se midió a 750 nm en un espectrofotómetro (Multiskan<sup>TM</sup> go Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandia). Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco (mg EAG/g).

### **Contenido de Flavonoides Totales**

El contenido de flavonoides fue reportado en términos de flavonas y flavonoles (CFF) y se midió en función de la formación de complejos de cloruro de aluminio (Popova *et al.*, 2004). Alícuotas de cada extracto (10  $\mu\text{L}$ , 5 mg/mL) se homogenizaron con 130  $\mu\text{L}$  de metanol y 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  (5%, p/v). La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad. La absorbancia se midió a 412 nm en un espectrofotómetro. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de rutina/g de extracto seco (mg ER/g).

## Actividad Antirradical

La actividad antirradical de los extractos se evaluó mediante el método descrito por Molyneux (2004). Los extractos (100  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ ) se homogenizaron con 100  $\mu\text{L}$  de solución de DPPH• (300  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, en ausencia de luz. Los compuestos vitamina C, CAPE y Trolox fueron utilizados como estándares de referencia (70  $\mu\text{M}$ ). Los resultados fueron expresados en porcentaje y la capacidad de los extractos para inhibir radicales DPPH• se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{DPPH}\bullet = [1 - (\text{Abs E} - \text{Abs B} / \text{Abs B}) \times 100] \quad (1)$$

Donde Abs E es la absorbancia del extracto a los 30 min de incubación y Abs B es la absorbancia del blanco a  $t = 0$  min.

## Poder Reductor

El poder reductor férrico-antioxidante (FRAP) se determinó de acuerdo a lo establecido por Benzie y Strain (1999). Los extractos (5  $\mu\text{L}$ , 5  $\text{mg/mL}$ ) se mezclaron con 100  $\mu\text{L}$  de solución FRAP (10:1:1, bufer de acetato de sodio 300 mM en ácido acético glacial pH 3.6; 4,4,6-tripiridil-S-triazina-TPTZ 10 mM en 40 nM de HCl;  $\text{FeCl}_3$  20 mM). La mezcla resultante se incubó durante 8 min en la oscuridad y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Los compuestos vitamina C y BHT fueron utilizados como estándares de referencia (70  $\mu\text{M}$ ). Los resultados obtenidos fueron expresados como  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Fe}^{2+}/\text{g}$  de extracto.

## **Análisis Estadístico**

En este trabajo todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado y los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía. Las diferencias fueron analizadas a través de una prueba de comparación de medias (Tukey-Kramer), cuando se encontró un efecto de tratamiento significativo ( $P < 0.05$ ). Además, se realizó un análisis de correlación entre los parámetros evaluados utilizando como prueba el coeficiente de correlación de Pearson (NCSS, 2007).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Algunas investigaciones demuestran que ciertos fitoquímicos tóxicos entre los que se encuentran compuestos de naturaleza alcaloidea, cianógena y saponínica, pueden estar presentes en flores, raíces, tallos, frutos, semillas y hojas de plantas comestibles y no comestibles (Jadhav *et al.*, 1981; Samejo *et al.*, 2011; 2013; Nuñez *et al.*, 2015), lo cual puede ser un factor negativo al utilizarlos, tanto para consumo animal como humano, y en la obtención de extractos de origen natural con potencial como aditivo farmacéutico o ingrediente natural en los alimentos (Nuñez *et al.* 2015). Los resultados del análisis de posibles fitoquímicos tóxicos en los extractos obtenidos de hoja de mezquite *P. velutina* (EAM, EAEM y EEM) indican la ausencia de estos fitoquímicos tóxicos (Tabla 1). En un trabajo realizado por Sathiya y Muthuchelian (2008) se obtuvieron extractos etanólicos de hoja de mezquite (*P. juliflora*), en los cuales se reporta la presencia de alcaloides, mientras que la presencia de saponinas fue negativa. En acuerdo con nuestros resultados, Becker y Grosjean (1980), sometieron a autólisis e hidrólisis (ácido pícrico y  $\alpha$ -glucosidasa) muestras de semilla y pericarpio de *P. glandulosa* y *P. velutina* durante 6 y 16 h, con la finalidad de evaluar la presencia de glucósidos cianogénicos, encontrando en sus resultados la ausencia de este grupo de compuestos. Por lo anterior, los resultados indican

que los extractos obtenidos a partir de *Prosopis* spp. pueden ser reconocidos con la denominación GRAS o "Generalmente reconocidos como seguros" (FDA, 2011).

La recuperación de compuestos antioxidantes de plantas se lleva a cabo comúnmente con diferentes técnicas de extracción, y tomando en consideración la distribución en la planta, ya que los compuestos fenólicos solubles están presentes en concentraciones más altas hacia el exterior que hacia el interior de los tejidos de las plantas. La extracción con solvente es la técnica más frecuentemente usada para aislar compuestos antioxidantes de las plantas; sin embargo, los rendimientos de extracción y la actividad antioxidante son altamente dependientes de la naturaleza del solvente utilizado, debido a la presencia de diferentes compuestos antioxidantes en el material de origen, lo cual depende de las características químicas y de la polaridad. Por ello, los solventes polares son los que con mayor frecuencia se emplean en la recuperación de polifenoles de las plantas (Sultana *et al.*, 2009).

En este estudio los rendimientos de obtención en los extractos de hoja de mezquite, en los que se utilizaron como solventes agua, etanol-agua y etanol fueron  $18.7 \pm 1.9\%$ ,  $21.4 \pm 0.7\%$  y  $6.5 \pm 2.1\%$ , respectivamente. Estos valores son superiores a los reportados para hoja de *P. laevigata* cuyos valores oscilaron entre 3.6 y 18.2% (García-Andrade *et al.*, 2013). Adicionalmente, en un trabajo realizado por Singh (2012), se determinaron los rendimientos de obtención de los extractos de las diferentes partes de la planta de *P. juliflora*, tales como hojas, yemas, vainas, flores y raíces, y utilizando diferentes solventes. Los resultados obtenidos para hojas fueron: etanol (11.26%) > agua (9.94%) > cloroformo (5.7%) > hexano (2.62%) > acetona (1.92%); resultados que no coinciden con los de nuestro estudio, ya que el mayor rendimiento fue para la mezcla etanol: agua (1:1), y el menor para etanol. Tampoco coinciden con los encontrados por Badri *et al.* (2017), quienes utilizaron etanol para la obtención de extractos de hojas de *P. juliflora*, obteniendo un rendimiento de 22.1%. Cabe señalar que es posible que las diferencias en los rendimientos estén dadas porque los extractos estudiados no fueron liofilizados como es el caso del presente estudio.

Por otra parte, las plantas producen una extraordinaria diversidad de metabolitos de origen fenólico, que en concentraciones adecuadas pueden ser considerados seguros; estos compuestos contienen uno o más residuos hidroxilos ácidos unidos a un anillo aromático

fenólico (Löliker, 1991). Para la cuantificación de estos compuestos contenidos en alimentos o muestras biológicas, existen métodos basados en la reacción de los mismos con un reactivo colorimétrico, que permite la medición en la porción visible del espectro (Popova *et al.*, 2004; Ainsworth y Gillespie, 2007). Los resultados de CFT y CFvT de los extractos de hojas de mezquite se presentan en la Figura 1 A y B, respectivamente. Estos resultados muestran que para ambos casos el CFT y CFvT se presentó en el siguiente orden: EEM > EAEM > EAM. El CFT fue > 50 mg EAG/g para todos los extractos, siendo el EEM el que presentó un CFT > 75 mg EAG/g ( $P < 0.05$ ). Respecto al CFvT, los EAM y EAEM mostraron valores < 50 mg ER/g, siendo el EEM el que presentó un CFvT significativamente ( $P < 0.05$ ) > 100 mg ER/g.

En acuerdo con nuestros resultados, García-Andrade *et al.* (2013) reportan que la polaridad juega un papel importante en la extracción de CFT de hojas de mezquite, > 100 mg EAG/g para extractos metanólicos, > 70 mg EAG/g para extractos acetónicos, y > 45 mg EAG/g para extractos metanólicos-acuosos y acuosos. Además, la norma Argentina (IRAM, 2004) establece que la concentración mínima de compuestos fenólicos y flavonoides en extractos de origen natural, para ser considerados biológicamente activos, deberán contener 50 mg EAG/g y 5 mg ER/g, respectivamente; lo cual indica que los extractos obtenidos de hojas de mezquite de este estudio cumplen con los requisitos de calidad establecidos por esta normatividad.

La actividad biológica de los extractos obtenidos de las plantas, entre las que destaca la actividad antioxidante, es ampliamente conocida y está asociada a la presencia de compuestos fenólicos, los cuales poseen la capacidad de actuar como secuestradores de radicales libres y quelantes de iones metálicos (Ainsworth y Gillespie, 2007). Los resultados de la actividad antioxidante (actividad antiradical DPPH• y poder reductor) de los extractos de hojas de mezquite obtenidos con diferentes solventes en comparación con estándares de referencia se incluyen en la Figura 2 A y B, respectivamente. Los resultados muestran que la actividad antiradical DPPH• de los extractos se presentó en el siguiente orden EEM > EAEM > EAM; siendo el EEM el que presentó la mayor ( $P < 0.05$ ) actividad antiradical DPPH• (> 25% de inhibición). Los estándares de referencia vitamina C, CAPE y Trolox presentaron valores de inhibición del radical DPPH• superiores al 80%. En acuerdo con nuestro estudio, se ha demostrado la actividad antioxidante de extractos de

hojas de mezquite (*P. laevigata*) obtenidos con acetona y sus fracciones purificadas por elución con diferentes solventes (agua, agua-metanol 50% y metanol), contra los radicales DPPH• y •OH, así como en la reducción de la inhibición de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los resultados encontrados mostraron que el orden de actividad antioxidante fue metanol > agua: metanol > agua > acetona. Esta actividad antioxidante fue correlacionada con la presencia de algunos compuestos fenólicos encontrados en los extractos, tales como ácido gálico, catequina, galato de epicatequina, rutina y luteolina, entre otros (García-Andrade *et al.*, 2013). Por otro lado, los resultados del estudio realizado por Astudillo *et al.* (2000), en el cual se evaluó la actividad antiradical de extractos metanólicos de hojas de diversas especies de mezquite, muestran que a una concentración de 100 µg/mL, estos presentan actividad antiradical DPPH• en el siguiente orden de inhibición: *P. chilensis* (65%) > *P. tamarugo* (54%) > *P. alba* (8%), cuya actividad fue asociada a la presencia de compuestos fenólicos como catequina. Mientras que en extractos metanólicos de hojas de mezquite (*P. cineraria* y *P. juliflora*) se reporta la inhibición del radical DPPH• en 60.5 y 47.8%, respectivamente (Napar *et al.*, 2012).

Por otra parte, la determinación del poder reductor del Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>, es otra prueba utilizada para medir el potencial antioxidante (Benzie y Strain, 1999). Respecto a esta evaluación, los resultados de poder reductor de los extractos se presentó en el siguiente orden: EEM > EAEM > EAM, donde se observa que el EEM fue significativamente ( $P < 0.05$ ) más efectivo 62.7%, 39.0% y 58.8% en comparación con los extractos obtenidos con agua, etanol: agua (1:1) y BHT, respectivamente, aunque ligeramente menor (27%) que la vitamina C. En comparación con nuestro estudio, LeBlanc *et al.* (2009) estudiaron el potencial reductor de extractos del polen clasificado como de mezquite (> 54.8%) obtenido con diferentes solventes. Los resultados de esta investigación mostraron que el orden del poder reductor se presentó de acuerdo a lo siguiente: metanol > etanol > agua = propanol > 2-propanol > acetona > acetonitrilo; resultados que fueron asociados a la presencia de ciertos compuestos fenólicos (naringenina, 4',5-dihidroxi-7-metoxiflavanona, 7,8,2',4'-tetrahidroxi isoflavona, entre otros). En otro trabajo, Albrecht *et al.* (2010) evaluaron el poder reductor de extractos obtenidos de la vaina de *P. alba*, utilizando como solvente de extracción agua y etanol. Los resultados muestran que el extracto etanólico presentó valores mayores (> 2 µg Fe<sup>2+</sup>/g) de poder reductor en

comparación con el extracto acuoso, lo cual puede estar correlacionado con el mayor contenido de fenoles ( $> 10 \mu\text{g EAG/g}$ ) y flavonoides totales ( $> 0.6 \mu\text{g EQ/g}$ ) de este extracto. En otra planta de la familia Fabaceae (*Mimosa pudica*), se obtuvieron extractos etanólicos (95%) del tallo, semillas, hojas y planta completa, con la finalidad de evaluar su poder antioxidante. Los resultados mostraron que el poder reductor fue dependiente de la concentración, y los valores obtenidos se presentaron en el siguiente orden: hojas  $>$  planta completa  $>$  tallos  $>$  semillas (Zhang *et al.*, 2011).

Otros estudios muestran el potencial antioxidante de los extractos y harinas obtenidos de la corteza, polen y semillas de diversas especies de mezquite (Frankel *et al.*, 1998; Almaraz-Abarca *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2010; Saini *et al.*, 2013; Cattaneo *et al.*, 2014). Por lo que, estos extractos se han propuesto para ser utilizados como posibles ingredientes antioxidantes en la formulación de alimentos (Lorenzo-Justo *et al.*, 2017).

Respecto al análisis de correlación de Pearson, los resultados obtenidos muestran una alta asociación entre los parámetros antioxidantes evaluados ( $r > 0.90$ ) y la presencia de compuestos fenólicos (Tabla 2), lo cual coincide con lo encontrado por Zhang *et al.* (2011) quienes reportaron alta correlación entre el CFT y CFvT respecto a la actividad antioxidante (FRAP y DPPH•) de extractos etanólicos (95%) obtenidos de hojas de *Mimosa pudica* Linn.

## CONCLUSIONES

Los extractos obtenidos de hojas de mezquite (EAM, EAEM y EEM) mostraron la ausencia de fitoquímicos tóxicos como son alcaloides, cianógenos y saponinas, así como la presencia de fitoquímicos tales como fenoles y flavonoides: EEM  $>$  EAEM  $>$  EAM. Además, en este estudio los extractos presentaron alta actividad antioxidante, es decir actividad antiradical DPPH• y poder reductor en el siguiente orden: EEM  $>$  EAEM  $>$  EAM. Este estudio concluye, que las hojas de mezquite son una fuente importante de polifenoles que proveen actividad antioxidante, lo que demuestra el potencial de estos extractos para ser utilizados como antioxidantes en la industria farmacéutica y alimentaria.



## Agradecimientos

Margarita Irene Ramírez Rojo agradece a CONACYT por la beca otorgada para realizar sus estudios de posgrado.

## REFERENCIAS

- Ainsworth, E.A. y Gillespie, K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2: 875-877.
- Albrecht, C., Pellarin, M.G., Baronetti, J., Rojas, M.J., Albesa, I. y Eraso, A.J. 2011. Chemiluminescence determination of antioxidant property of *Zizyphus mistol* and *Prosopis alba* during oxidative stress generated in blood by Hemolytic Uremic Syndrome-producing *Escherichia coli*. *Luminescence*. 26: 424-428.
- Almanza, S.G. y Moya, E.G. 1986. The uses of mesquite (*Prosopis* spp.) in the highlands of San Luis Potosi, Mexico. *Forest Ecology and Management*. 16: 49-56.
- Almaraz-Abarca, N., da Graça Campos, M., Avila-Reyes, J.A., Naranjo-Jiménez, N., Corral, J. H. y González-Valdez, L.S. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*. 20: 119-124.
- Astudillo, L., Schmeda-Hirschmann, G., Herrera, J.P. y Cortés, M. 2000. Proximate composition and biological activity of Chilean *Prosopis* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 567-573.
- Badri, A.M., Garbi, M.I., Kabbashi, A.S., Saleh, M.S., Yousof, Y.S., Mohammed, S.F., Kabbaashi, A.S. y Magzoub, A.A. 2017. In vitro anti-bacterial activity of *Prosopis juliflora* leaves extract against pathogenic bacteria. *Advancement in Medicinal Plant Research*. 5: 37-40.
- Bajpai, M., Pande, A., Tewari, S.K. y Prakash, D. 2005. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 56: 287-291.
- Becker, R. y Grosjean, O.K.K. 1980. A compositional study of pods of two varieties of mesquite (*Prosopis glandulosa*, *P. velutina*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 28: 22-25.
- Benzie, I.F. y Strain, J.J. 1999. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measurement of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzymology*. 299: 15-27.

- Cattaneo, F., Sayago, J.E., Alberto, M.R., Zampini, I.C., Ordoñez, R.M., Chamorro, V., Pazos, A. y Isla, M.I. 2014. Anti-inflammatory and antioxidant activities, functional properties and mutagenicity studies of protein and protein hydrolysate obtained from *Prosopis alba* seed flour. *Food Chemistry*. 161: 391-399.
- Falowo, A.B., Fayemi, P.O. y Muchenje, V. 2014. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*. 64: 171-181.
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R. y Suman, S.P. 2010. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*. 86: 86-94.
- FDA. 2011. U.S. Food & Drug Administration. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000012. Disponible en: <https://wayback.archive-it.org/7993/20171031034742/https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm154905.htm>. Acceso: Febrero, 2018.
- Fernández-Ginés, J.M., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E. y Pérez-Álvarez, J. 2005. Meat products as functional foods: A review. *Journal of Food Science*. 70: R37-R43.
- Frankel, S., Robinson, G.E. y Berenbaum, M.R. 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*. 37: 27-31.
- García-Andrade, M., González-Laredo, R.F., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., Rosales-Castro, M., & Medina-Torres, L. (2013). Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and cardioprotection potential. *Industrial Crops and Products*. 44: 336-342.
- Harlev, E., Nevo, E., Lansky, E.P., Lansky, S. y Bishayee, A. 2012. Anticancer attributes of desert plants: a review. *Anti-Cancer Drugs*. 23: 255-271.
- INEGI. 2012. Clima. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Disponible en: <http://www.oeidrus-sonora.gob.mx/documentos/Geografia/HISTORIA%20Y%20GEO/URES.pdf>. Acceso: Febrero, 2018.
- IRAM. (2004). Norma IRAM 15935-1 Scheme 1. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización - Subcomité de productos agroalimentarios del NOA; 2004.
- Jadhav, S.J., Sharma, R.P. y Salunkhe, D.K. 1981. Naturally occurring toxic alkaloids in foods. *CRC Critical Reviews in Toxicology*. 9: 21-104.
- Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Sierras-Canchola, D., Lapizco-Vázquez, R., Ortiz-Sandoval, C., Burgos-Hernández, A. y Robles-Zepeda, R.E. 2013. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13: 1-8.
- LeBlanc, B.W., Davis, O.K., Boue, S., DeLucca, A. y Deeby, T. 2009. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*. 115: 1299-1305.
- Lörliger, J. 1991. The use of antioxidants in food. In *free radicals and food additives*; Aruoma, O. I., Halliwell, B., Eds.; Taylor and Francis: London. pp 129-150.
- Lorenzo-Justo, M.Y., Rivera-Castro, V.M., Vargas-Sánchez, R.D., Torrecano-Urrutia, G.R. y Sánchez-Escalante, A. 2017. Use of mesquite pod extracts as an additive to extend the shelf life of meat. 63rd International Congress of Meat Science and Technology. pp. 542-543.

- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26: 211-219.
- Napar, A.A., Bux, H., Zia, M.A., Ahmad, M.Z., Iqbal, A., Roomi, S., Muhammad, I. y Shah, S. H. (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of Mimosaceae plants; *Acacia modesta* Wall (Phulai), *Prosopis cineraria* (Linn.) and *Prosopis juliflora* (Swartz). *Journal of Medicinal Plants Research*. 6: 2962-2970.
- Núñez, P., Mejía, L., Yacamán, L., Padilla, L., Coello, A., Ferrari, J., Posadas, R. y Arévalo, A. C. 2015. Identificación de metabolitos secundarios presentes en los frutos frescos de *Cordia dentata* Boraginaceae. *Portal de la Ciencia*. 6: 54-61.
- Prabha, D.S., Dahms, H.U. y Malliga, P. 2014. Pharmacological potentials of phenolic compounds from *Prosopis* spp.-a review. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2: 918-924.
- Poljsak, B., Šuput, D. y Milisav, I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1: 1-11.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L. y Bogdanov, S. 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*. 15: 235-240.
- Robinson, B.L. 1898. Revision of the North American and Mexican species of *Mimosa*. *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University*. 13: 305-331.
- Saini, P., Khan, S., Baunthiyal, M. y Sharma, V. 2013. Effects of fluoride on germination, early growth and antioxidant enzyme activities of legume plant species *Prosopis juliflora*. *Journal of Environmental Biology*. 34: 205-209.
- Samejo, M.Q., Memon, S., Bhangar, M.I. y Khan, K.M. 2011. Preliminary phytochemicals screening of *Calligonum polygonoides* Linn. *Journal of Pharmacy Research*. 4: 4402-4403.
- Samejo, M.Q., Sumbul, A., Shah, S., Memon, S.B. y Chundrigar, S. 2013. Phytochemical screening of *Tamarix dioica roxb.* Ex roch. *Journal of Pharmacy Research*. 7: 181-183.
- Sathiya, M. y Muthuchelian, K. 2008. Investigation of phytochemical profile and antibacterial potential of ethanolic leaf extract of *Prosopis juliflora* DC. *Ethnobotanical leaflets*. 12: 1240-1245.
- Sharma, N., Garg, V. y Paul, A. 2010. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidative potential of *Prosopis cineraria* bark. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 25: 193-200.
- Singh, S. 2012. Phytochemical analysis of different parts of *Prosopis juliflora*. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 4: 59-61.
- SivaKumara, T., Srinivasan, K., Rajavela, R., Vasudevana, M., Ganesha, M., Kamalakannana, K. y Mallikab, P. 2009. Isolation of chemical constituents from *Prosopis juliflora* bark and anti-inflammatory activity of its methanolic extracts. *Journal of Pharmacy Research*. 2: 551-556.
- Sultana, B., Anwar, F. y Ashraf, M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*. 14: 2167-2180.

- Tolosa, L. y Cañizares, E. 2017. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *ARS Pharmaceutica*. 43: 187-204.
- Vargas-Sánchez, R.D., Peñalba-Garmendia, M.C., Sánchez-Escalante, J.J., Torrescano-Urrutia, G.R. y Sánchez-Escalante, A. 2016. Pollen profile of propolis produced on the eastern edge of the Sonoran Desert in central Sonora, Mexico. *Acta Botánica Mexicana*. 114: 69-86.
- Zhang, J., Yuan, K., Zhou, W. L., Zhou, J. y Yang, P. 2011. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from southern China. *Pharmacognosy Magazine*. 7: 35-39.

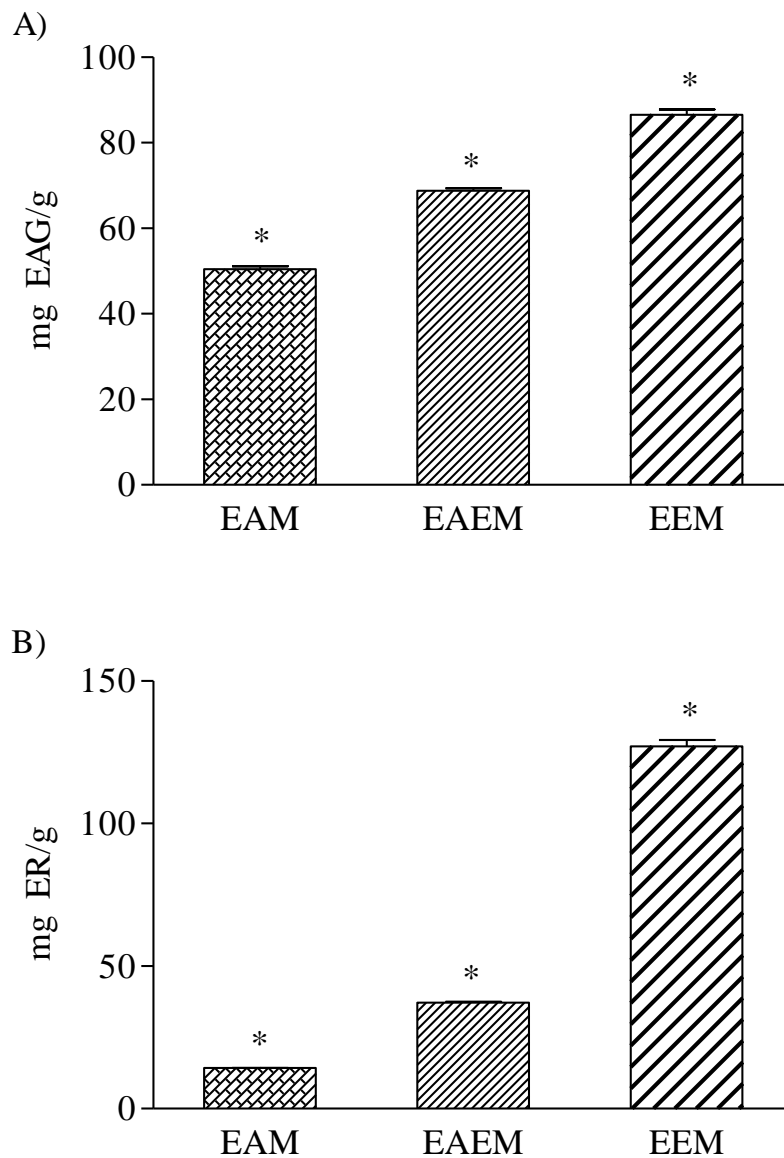


Figura 1. Contenido de fenoles (A) y flavonoides totales (B) de los extractos de hoja de mezquite. Las diferencias entre los tratamientos son marcadas con asterisco ( $P < 0.05$ ).  
 Figure 1. Total phenolic (A) and flavonoids (B) content of the mesquite leaf extracts. The differences between the treatments are marked with asterisk ( $P < 0.05$ ).

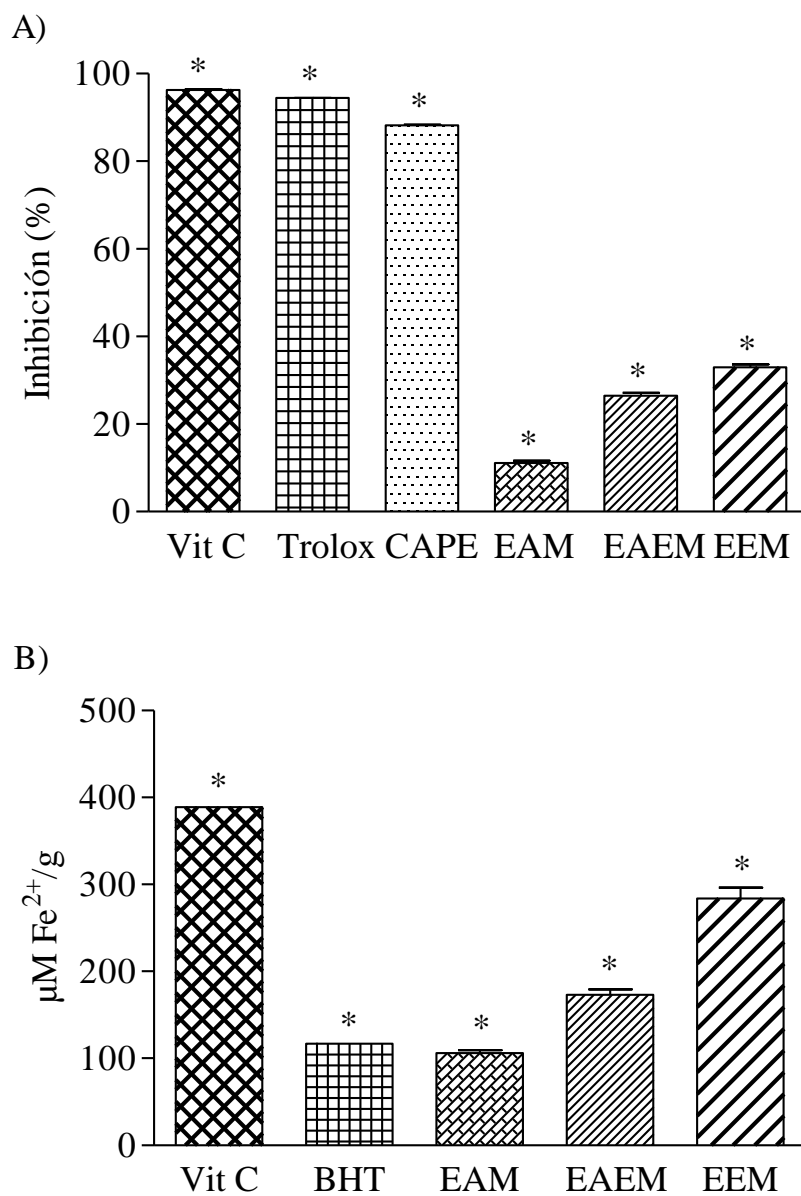


Figura 2. Actividad antirradical DPPH• (A) y poder reductor (B) de los extractos de hoja de mezquite. Las diferencias entre los tratamientos son marcadas con asterisco ( $P < 0.05$ ).  
 Figure 2. Antiradical DPPH• activity (A) and reducing power (B) of the mesquite leaf extracts. The differences between the treatments are marked with asterisk ( $P < 0.05$ ).

Tabla 1. Perfil de fitoquímicos tóxicos presentes en los extractos de hojas de mezquite.  
 Table 1. Profile of toxic phytochemicals present in the mesquite leaves extracts.

Fitoquímicos	Extractos		
	EAM	EAEM	EEM
Alcaloides	(-)	(-)	(-)
Cianógenos	(-)	(-)	(-)
Saponinas	(-)	(-)	(-)

(+) presencia, (-) ausencia.

Tabla 2. Matriz de correlación de Pearson de los parámetros antioxidantes.  
 Table 2. Pearson's correlation matrix of the antioxidant parameters.

Parámetros	Fenoles	Flavonoides	DPPH•	FRAP
Fenoles	1.000	0.943	0.976	0.989
Flavonoides		1.000	0.847	0.982
DPPH•			1.000	0.932
FRAP				1.000

## **ARTÍCULO 3**

### **ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MESQUITE LEAVES EXTRACTS OBTAINED UNDER DIFFERENT SOLVENT AND TEMPERATURE CONDITIONS**

**M.I. Ramírez-Rojo, R.D. Vargas-Sánchez, B. Vallejo-Galland, A.F.  
González-Córdova, J. Hernández-Martínez, G.R. Torrescano-Urrutia,  
A. Sánchez-Escalante.**

**En preparación para LWT- Food Science and Technology**



**ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MESQUITE LEAVES  
EXTRACTS OBTAINED UNDER DIFFERENT SOLVENT AND  
TEMPERATURE CONDITIONS**

M.I. Ramírez-Rojo<sup>a</sup>, R.D. Vargas-Sánchez<sup>a</sup>, B. Vallejo-Galland<sup>a</sup>, A.F. González-Córdova<sup>a</sup>, J. Hernández-Martínez<sup>b</sup>, G.R. Torrescano-Urrutia<sup>a</sup>, A. Sánchez-Escalante<sup>a,\*</sup>.

<sup>a</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Laboratorio de Investigación en Carne y Productos Cárnicos. Carretera a la Victoria Km 0.6, Hermosillo Sonora, 83304. México.

<sup>b</sup>Universidad Veracruzana (UV). Dr. Luis Castelazo Ayala S/N, Xalapa, Veracruz, 91190, México.

\*Corresponding author: Armida Sánchez-Escalante, E-mail address armida-sanchez@ciad.mx

**Highlights**

- Mesquite leaves extract were obtained with different solvents and temperatures.
- MLE exert significant antioxidant and antibacterial activity.
- Polyphenols content and biological activity were affected by extraction conditions.
- MLE could be a new additive for the pharmaceutical and food industry.

## ABSTRACT

This study was aimed to determine the effect of the solvent (water, water: ethanol, ethanol) and temperature extraction (35, 50 and 65 °C) of mesquite leaves (*Prosopis velutina*) on total phenolic (TPC) and flavonoids contents (TFC), chemical composition, as well as antioxidant (DPPH• and ABTS<sup>•+</sup>) and antimicrobial activity against Foodborne pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*). The results demonstrated that the highest TPC and TFC (> 90 mg GAE/g and > 300 mg RE/g, respectively), DPPH• and ABTS<sup>•+</sup> antiradical activity (> 65% of radical inhibition by both, respectively), as well as antimicrobial effects (*S. aureus* > *Listeria innocua* > *E. coli* > *S. typhimurium* > *P. aeruginosa*) were shown in MLE obtained with the solvents ethanol > water-ethanol > water and the temperatures 35 °C > 50 °C > 65 °C ( $p < 0.05$ ). Similarly, higher amounts of phenolic constituents such as rutin (> 100 mg/g), rosmarinic acid (> 15 mg/g), naringenin (> 100 mg/g), and hesperetin (> 90 mg/g) were obtained at the same conditions. These results indicated that MLE has great potential as natural antioxidant and antimicrobial additive to be used in the pharmaceutical and food industry.

*Keywords:* Mesquite leaves, antioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic composition, extraction conditions.

## 1. Introduction

Lipid oxidation and bacterial contamination are considered the major causes of shelf life loss in meat products and the primary source of food-borne diseases in humans, for this reason different chemical and synthetic compounds have been used as antioxidant (butylated hydroxyanisole, BHA); butylated hydroxytoluene, BHT; propyl gallate, PG; and tertiary butylhydroquinone, TBHQ) to reduce the oxidative process, however, they are under increasing scrutiny due to the potential genotoxic and carcinogenic effect (Jiang and Xiong, 2016). Many pathogenic microorganisms such as *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* (e.g. O111:NM and O104:H21), *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* have been reported as the causal agents of food-borne diseases (Altekruse, Cohen, & Swerdlow, 1997). So that there are also some antimicrobial agents that allow reduce the bacterial growth and prevent infections, however, the emergence of multi-drug resistant pathogens presents an increasing global challenge to both human and veterinary medicine. Therefore, there is a continuous need to develop natural antioxidant and antimicrobial agents to minimize the toxic effect of synthetic antioxidants and the occurrence of bacterial resistance against available antibiotics (Altekruse, Cohen, & Swerdlow, 1997; Hussain et al., 2011).

Mesquite (genus *Prosopis* spp., Fabaceae family, Mimosoideae subfamily) is a plant native from Asian, African and American continents. The genus includes 44 species distributed in arid and semiarid regions (Palacios, 2006). In Mexico, mesquite shrub has a wide distribution in the Northwest along the coast (Gallegos-Infante, Rocha-Guzmán, González-Laredo, & García-Casas, 2013) and it is considered an important plant species due it has high potential for nitrogen fixation in very dry areas and during drought seasons, and provides shelter and food to humans and many species of animals that feed on its leaves, fruits nectar and pollen (Almaraz-Abarca et al., 2007; Vargas-Sánchez et al., 2016). Also it has been used in traditional medicine for curing catarrh, colds, diarrhea, dysentery, excrescences, flu, hoarseness, inflammation, sore throat, and measles among others (Prabha, Dahms, & Malliga, 2014).

It has been reported that mesquite leaves (*Prosopis velutina*) composition includes N (3.2%), crude protein (20.2%), crude fiber (27.0%), fat (10.35%), ash (5.6%), neutral detergent fiber (41.8%), acid detergent fiber (33.1%), lignin (7.8%), cellulose (24.5%) and hemicellulose (8.7%) (Lyon, Gumbmann, & Becker, 1988). In addition, Reyes-Reyes et al. (2013) described that chemical composition of mesquite leaves includes the presence of polyphenols (20.0 g/kg). Polyphenols are secondary metabolites that are derivatives of the pentose phosphate, shikimate, and phenylpropanoid pathways in plants; and these are characterized by possessing an aromatic ring bearing one or more hydroxyl groups (OH), and their structure may be a simple phenolic molecule or a complex high-molecular polymer (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006).

Previous studies have reported that mesquite extracts may have several properties such as antifungal, antitumor, anti-inflammatory, antioxidant and antibacterial (García-Andrade et al., 2013; Prabha, Dahms, & Malliga, 2014; Miri, Sarani, Bazaz, & Darroudi, 2015), which are mainly attributed to the phenolic constituents among which are phenolic acids and flavonoids (García-Andrade et al., 2013). Also, it has been reported that *Prosopis cineraria* ethanolic extracts (70%) exert antioxidant and antimicrobial properties and indicate that this plant could be used as a nutraceutical source (Mohammad, Haji Muhammad Shoaib Khan, & Rasool, 2013). However, some reports suggest that solvent and temperature extraction can have influenced the effectiveness of natural extracts (Taddeo, Epifano, Fiorito, & Genovese, 2016). Based on this information, this investigation aims to evaluate the effect of solvent and temperature extraction on phenolic composition related to their antioxidant and antibacterial activity of mesquite leaves extracts.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Reagents and Chemicals

All chemicals used were of analytical grade. Folin–Ciocalteu's reagent, sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), gallic acid, DPPH<sup>•</sup> radical (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl), formic acid (HPLC purity), methanol (HPLC purity), ethanol, potassium persulphate ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), ABTS<sup>•+</sup> radical (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt), and the antibiotic gentamicin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The following authentic standards of phenolic compounds: acacetin, apigenin, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), (+)-catechin, cinnamic acid, chlorogenic acid, chrysin, p-coumaric acid, ferulic acid, galangin, gallic acid, genistein, luteolin, myricetin, protocatechuic acid, quercetin, rosmarinic acid, rutin were obtained Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Hesperetin, naringenin, kaempferol and pinocembrin, pinobanksin and pinostrobin pinocembrin were purchased from INDOFINE (Chemical company, inc., Hillsborough, NJ).

### 2.2. Plant Materials and Extract Preparation

Mesquite leaves were collected in Sonora State (Norwest of Mexico; 29.1476 N, -110.1239 O; 632 m). The trees were botanically identified by specialist from the Herbarium of the Sonora University (Department of Scientific and Technological Research). After, phenolic compounds were obtained from 20 g of dried leaves, which previously were ground in a mill (0.5 mm) and extracted by ultrasound assisted extraction method (42 Hz), using 200 mL of solvent (water, water:ethanol and ethanol) and different temperatures (35, 50 and 65 °C) during 30 min. The resulting solution was filtered through Whatman No. 4 filter paper and concentrated under reduced pressure in a rotary

evaporator (Yamato RE301-BW). The mesquite leaves extracts (MLE) was lyophilized in a Freeze dryer (Yamato DC401, Tokyo, Japan) and stored at -20 °C, under darkness until analysis (Tolosa y Cañizares, 2002).

## 2.2. Chemical Composition

Analysis of MLE constituents was performed by high-performance liquid chromatography system (HPLC, model 1100 series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) using a RP-C18 column (2.5 x 150 mm, Ø 3.5 µm, Agilent inc., Clara, Calif., U.S.) and diode array detector (DAD). The conditions were as follows: solvent A was water-formic acid (1% v/v) and solvent B was methanol. The gradient program was 30% B (0-15 min), 40% B (15-20 min), 45% B (20-30 min), 60% B (30-50 min), 80% B (50-65 min), 100% B (65-75 min). The elution of each peak was monitored at 280 and 340 nm and the injection volume was set to 10 µL at a flow rate of 1.0 mL/min (Hernández et al., 2007).

## 2.3. Total Phenolic Content

The total phenolic content (TPC) was determined using the Folin-Ciocalteu (F-C) method (Ainsworth & Gillespie, 2007) with slight modifications. An aliquot of MLE (10 µL, 5 mg/mL) was transferred into each well of flat 96-well microplate, and homogenized with 80 10 µL of Folin-Ciocalteu reagent (0.25 N) and 60 µL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%). After, the reaction was mixed with 80 µL of distilled water and incubated in the dark at room temperature during 1 h. The absorbance at 750 nm was measured in a spectrophotometer (Multiskan FC UV-Vis, Thermo Scientific, Vantaa, Finland). The TPC values were expressed as mg of gallic acid equivalent/g of MLE (mg GAE/g).

## 2.4. Total flavonoid content

The total flavonoid content (TFC) was reported in terms of flavones and flavanones compounds and measured by the aluminum chloride method (Popova et al., 2004). Aliquots of each extract (10  $\mu$ L, 5mg/mL) were homogenize with 130  $\mu$ L of methanol and 10  $\mu$ L of AlCl<sub>3</sub> (5%, w/v). The reaction mixture was incubated during 30 min at room temperature, under dark. The absorbance was measured at 412 nm in a spectrophotometer. The results were expressed as mg of rutin equivalents/g of MLE (mg RE/g).

## 2.5. Analysis of Antioxidant Activity

### 2.5.1. DPPH• Assay

The antiradical activity of MLE was evaluated by the radical-scavenging activity of the DPPH• radical (Molyneux, 2004). Samples (100  $\mu$ L, 100  $\mu$ g/mL) were mixed with the DPPH• solution (300  $\mu$ mol, [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl]) and after shaken during 1 min, the mixture was incubated during 30 min, under dark. The absorbance was recorded at 517 nm in a spectrophotometer. The radical-scavenging activity was determined as percent discoloration using the following equation:  $I = (1 - [A_B - A_A] / A_B) \times 100$ ; where  $I$  = DPPH• radical inhibition (%);  $A_B$  = absorbance of a blank DPPH• solution ( $t = 0$  min);  $A_A$  = absorbance of MLE at the end of the reaction ( $t = 30$  min).

### 2.5.2. ABTS<sup>•+</sup> Assay

The antiradical activity also was carried out by the ABTS<sup>•+</sup> cation radical-scavenging method (Re et al., 1999). The ABTS<sup>•+</sup> cation was generated in the dark at room temperature by the reaction of 7 mM ABTS solution with 2.45 mM potassium persulphate during 16 h. The resulting ABTS<sup>•+</sup> was diluted with ethanol to give an absorbance of  $0.7 \pm 0.02$  at 730 nm. An aliquot of MLE (20  $\mu$ L) was homogenized with 180  $\mu$ L of ABTS<sup>•+</sup> solution and the absorbance was measured after 6 min of incubation, under dark. The percentage decrease of the absorbance was calculated by the formula:  $I = [A_B - A_A] / A_B \times 100$ ; where  $I$  = ABTS<sup>•+</sup> radical inhibition (%);  $A_B$  = absorbance of a blank ABTS<sup>•+</sup> solution ( $t = 0$  min);  $A_A$  = absorbance of MLE at the end of the reaction ( $t = 6$  min).

### 2.6. Antimicrobial test

The *in vitro* antimicrobial analysis was performed by the broth microdilution method (Jorgensen, Turnidge, & Washington, 1999). Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213B and *Listeria innocua*) and Gram negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC) bacteria strains were initially reactivated in liquid nutrient broth (Brain Herat Infusion agar, BHI Difco<sup>TM</sup>) during 24 h at 37 °C. Before testing, all bacteria strains were maintained in glycerol (10%), at -20 °C. After, an aliquot of MLE (50  $\mu$ L; at 1, 2 and 4 mg/mL) were mixed with 50  $\mu$ L of the bacterial ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL, 0.5 McFarland standard) and incubated during 0, 6, 12, 18 and 24 h (at 37 °C). After each sampling time the optical density (OD) was read at 630 nm in a spectrophotometer. Gentamicin (12  $\mu$ g/mL) and BHI solutions were used as standards. The minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest MLE concentration that reduced at least 90% of the bacterial growth after incubation. The MIC was calculated by the formula:



$$I = (\text{OD}_{630 \text{ nm}} \text{ untreated bacteria} - \text{OD}_{630 \text{ nm}} \text{ test concentration} / \text{OD}_{630 \text{ nm}} \text{ untreated bacteria}) \times 100. (1)$$

## 2.7. Statistical Analysis

All measurements were done in triplicate and presented as the mean  $\pm$  standard deviation. All data were analyzed using SPSS 19.0 version statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data were submitted to a two-way ANOVA including as the main effects the solvent temperature of extraction as well as the interaction between two factors. A Tukey-Kramer multiple comparison test was carried out to assess any significant differences at  $p < 0.05$ .

## 2. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Changes in Total Phenolic and Flavonoid Content

Mesquite leaves extract from the Sonoran desert were subjected to different extraction conditions such as solvent (water, water: ethanol and ethanol) and temperature (35, 50 and 65 °C) in order to evaluate the effect on phenolic contents, as well as on the antioxidant and antimicrobial activity. As shown in Table 1, the results obtained for the TPC and TFC of MLE showed that solvent  $\times$  temperature effect was significant ( $p < 0.001$ ). The results of F-C assay indicate that the TPC values ranged from 55.5 to 122.2 mg GAE/g. The highest TPC level have been detected in all samples obtained with ethanol  $> 90$  mg GAE/g (E35  $>$  E50  $>$  E65), while the samples extracted with water showed less amounts of phenolic constituents  $< 60$  mg GAE/g ( $p < 0.05$ ). The TFC ranged from 43.2 to 4414.8 mg RE/g and the highest values were obtained in MLE obtained with ethanol  $> 1000$  mg

RE/g (E35 > E50 > E65), while similarly MLE extracted with water showed the lowest values < 100 mg RE/g ( $p < 0.05$ ).

In a previously work, Dent *et al.* (2013) reported that the highest polyphenols content extraction of sage leaves (*Salvia officinalis*), was obtained when employed a binary solvent system (ethanol-water, 1:1) at 60 °C regard mono-solvent system at 90 °C. While Ma, Chen, Liu, & Ye (2009) suggested that temperature extraction should not exceed 40 °C, due it can reduce the TPC and modified the phenolic constituents. According to an international regulation the minimum concentration requirements for the development of a natural extract product are 50 mg GAE/g of dry extract (IRAM, 2004), which indicate that all samples approves the established quality requirements by this regulation. Also, it has been demonstrated that natural extracts rich in phenolic compounds can act as an antioxidant ingredient in meat products to reduce lipid oxidation and extend the shelf life of meat during storage (Falowo, Fayemi, & Muchenje, 2014).

Among the different methods used to evaluate the antioxidant properties of MLE, the F-C assay is a method widely using for the quantification of total phenolic content in food products and biological extracts and relies on the electron transfer in alkaline medium from phenolic compounds to phosphomolybdic/phosphotungstic acid complex (Ainsworth and Gillespie, 2007); while the TFC relies of the formation of a complex between the OH group of the polyphenols and the AlCl<sub>3</sub> (Popova *et al.*, 2004).

### 3.2. Changes in Phenolic Composition

In order to identify the phenolic constituents of MLE and the effect of solvent and temperature extraction, the presence of phenolic compounds was analyzed by the HPLC method (Table 2). The results showed that solvent x temperature effect was significant ( $p < 0.001$ ). The polyphenolic compounds such as rutin, rosmarinic acid, naringenin and hesperetin were indentified in all MLE, and the ethanol > aqueous-ethanol > aqueous extracts, displayed the highest concentration of polyphenols (hesperetin > rutin >

naringenin > rosmarinic acid); whose concentration was reduced 63.5, 76.8, 90.1 and 83.6%, respectively, when temperature increase ( $p < 0.05$ ).

In agreement, Dent et al. (2013) reported that the highest phenolic acid (vanillic, caffeic, syringic, rosmarinic, methyl rosmarinate, salvianolic K and I acids) and flavonoid (6-hydroxyluteolin-7-glucoside, luteolin-7-glucuronide, luteolin-7-glucoside, luteolin-3-glucuronide, apigenin-7-glucuronide and apigenin-7-glucoside) composition was obtained when employed ethanol-water as solvent extraction regard water. Also, it has been reported that temperature ( $> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) during ultrasound extraction decrease by degradation, some individual phenolic acids; which is associated with to their chemical structures, due phenolic acids that contains methoxylic-type substituents are more stable, while unstable phenolic compounds contain only hydroxylic-type substituents in their aromatic rings (Ma, Chen, Liu, & Ye, 2009). In addition, the polyphenols identified in MLE are characterized by exert antiradical activity, attributed to the functional groups (O-H and C-H groups) present in their structure (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996), which could be used to replace synthetic antioxidants of food (Djeridane et al., 2006).

### 3.3. Changes in Antioxidant Activity

The previously shown results indicate the presence of some antioxidant components in MLE, so that antioxidant activity were tested. The results of the antiradical DPPH• and ABTS<sup>++</sup> activity showed that solvent x temperature effect was significant at  $p < 0.001$  and  $p = 0.014$ , respectively; while the values ranged from 20 to 74.1% and 29.8 to 90.2%, respectively ( $p < 0.05$ ). These results also showed that MLE obtained with ethanol > ethanol-water > water and low temperature ( $35\text{ }^{\circ}\text{C} > 50\text{ }^{\circ}\text{C} > 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) exert the highest antiradical DPPH• and ABTS<sup>++</sup> antiradical activity ( $p < 0.05$ ). In disagreement with our results, Yildirim, Mavi, & Kara (2001) reported that highest TPC and antioxidant activity (DPPH• and reducing power) values of *Rumex crispus* L. leaves extracts were obtained when employed as extraction solvent water > ethanol = ether. While Wan et al. (2011) indicated that TPC and TFC, as well as the antioxidant activity (DPPH• and ABTS<sup>++</sup>

antiradical activity) of *Gynura divaricata* leaf extracts were increased with the temperature in the order 100 °C = 90 °C > 80 °C > 60 °C > 40 °C.

Also in another study, Fu et al. (2016) evaluated the effect of different extraction solvents including water, methanol-water, ethanol-water and acetone-water on the phenolic compounds recovery and the antioxidant activity of Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. The results showed that TPC values were < 50 mg GAE/g for all samples, and the highest content was obtained when employed the solvents methanol = acetone > ethanol > water (at 90%); while when the solvents were combined with water (50%) the highest values were obtained in the order acetone > ethanol > methanol > water. Respect to the DPPH• assay the scavenging activity following the next order acetone > ethanol > methanol > water.

Among the different methods used to evaluate the antioxidant properties, the DPPH• assay is widely used in the determination of antioxidant activity as a lipophilic radical model and the scavenging reaction between DPPH• radical and the antioxidant compound can be written as  $\text{DPPH}\cdot + \text{ArOH} \rightarrow \text{DPPH}\cdot - \text{H} + \text{ArO}\cdot$ ; which implied that absorbance decreased (color change from purple to yellow) as the radical is scavenged by the antioxidant through H-atom donation to form the reduced DPPH+H (Molyneux, 2004). Otherwise, the ABTS<sup>•+</sup> method is applicable to both lipophilic and hydrophilic antioxidants; the radical cation is pre-formed with potassium persulfate and reduced with the presence of hydrogen donators (e.g. flavonoids, hydroxycinnamates, carotenoids and plasma antioxidants (Re et al., 1999). It has been demonstrated that there may be a relationship between the amount of TPC and antiradical assays such as DPPH• and ABTS<sup>•+</sup> (Yildirim et al., 2001; Fu et al., 2016). In fact, the results of this work showed a positive correlation was found between the TPC and DPPH• and ABTS<sup>•+</sup> values  $r = 0.949$  and  $0.994$ , respectively; while TFC showed a correlation  $r < 0.8$  by both antioxidant assays ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Changes in Antimicrobial Activity

Microbial growth control during processing and storage is a key factor that determines the quality and shelf life in food products. Consequently, Foodborne diseases continues to be a serious public health problem and the emergence and spread of antibiotic-resistance strains among Gram-positive (*Listeria spp.*, *S. aureus*, and *C. perfringens*) and Gram-negative bacteria (*S. enterica*, *E. coli* and *Campylobacter spp.*) is becoming a worldwide food safety issue (Das et al., 2017). In this context, our investigation focused in obtain plant-derived extracts with antibacterial compounds for the control of pathogenic bacteria. The results of antimicrobial activity of the MLE against Gram-positive and Gram-negative bacteria, showed that solvent x temperature effect was significant ( $p < 0.001$ ).

As shown the Figure 1, the MLE obtained with ethanol as solvent at low temperature (35 °C = 50 °C), exert the high antibacterial activity (> 90% of inhibition; Gram-positive > Gram-negative bacteria) mainly against *S. aureus* > *L. innocua* (MIC, 4 mg/mL) in a concentration-dependent manner. Also, the antimicrobial effect of this extract was similar to the standard (Gentamicin), with a slight reduction when the temperature was increased ( $p < 0.05$ ). The results also showed that Gram-negative bacteria inhibition of the MLE obtained with ethanol at 35 °C, following the next order (> 90% of inhibition; MIC, 4 mg/mL): *E. coli* > *S. typhimurium* ( $p < 0.05$ ). In contrast, all samples did not exhibit a reduction > 90% against *P. aeruginosa* at any tested concentration. These results are in agreement with Kumar et al. (2018) who reported that ethanolic extracts obtained from *Terminalia arjuna* leaves had strong antimicrobial activity *S. aureus* > *E. coli* (MIC, 3.1 and 6.3 mg/mL, respectively); results that were associated with the presence of phytochemicals such as flavonoids. While de Dicastillo et al. (2017), reported that ethanolic > water extracts obtained from *Ugni molinae* Turcz leaves exert antimicrobial activity against *L. monocytogenes* (MIC, 0.2 mg/mL) > *E. coli* (MIC, 5 mg/mL). Also, it has been reported that *Prosopis juliflora* and *Prosopis cineraria* leaves extracts present a MIC > 3 and 15 mg/mL, respectively, against *E. coli* (Napar et al., 2012). Additionally, it has been reported that *Eucalyptus globulus* leaves extracts obtained with ethanol (56%) at 50 °C, the MIC values were higher for *S. aureus* (35 mg/mL), *L. innocua* (30 mg/mL), *E.*

*coli* (40 mg/mL), *Salmonella* spp. (45 mg/mL), and *P. aeruginosa* . (45 mg/mL), when compared with the previous works (Gullón et al., 2017).

These obtained results could be attributed to the antimicrobial activity of bioactive compounds present in the leaves extracts. For instance, previous studies on mesquite extracts have found some compounds such as patulein, patulitrin, rutin and luteolin (Garg and Mittal, 2013), apigenin-derived C-glycosyl flavonoids, including 6,8-C-pentoside-C-hexoside, 6,8-dihexoside and quercetin glycosides (Quispe, Petroll, Theoduloz, & Schmeda-Hirschmann, 2014). In addition, it has been reported that rutin selectively promoted *E. coli* topoisomerase IV-dependent DNA cleavage, inhibited topoisomerase IV-dependent decatenation activity and induced the SOS response of the *E. coli* strain. This information suggests that one antibacterial mechanism could be the inhibition of nucleic acid synthesis. The flavanone naringenin is able to lacks the 8-lavandulyl and 2'-hydroxyl groups in membranes, which allows affect the membrane fluidity (Cushnie and Lamb, 2005). Rosmarinic acid has been also characterized as having antimicrobial properties against *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Bacillus cereus* (Campo, Amiot, & Nguyen-The, 2000); while hesperetin and naringenin have antibacterial activity against methicillin-sensitive and methicillin-resistant *S. aureus* (Denny, West, & Mathew, 2008).

#### 4. CONCLUSION

In this investigation, MLE was studied as natural source of antioxidant and antimicrobial compound. The results indicate that the highest TPC and TFC, as well as antioxidant properties (DPPH• and ABTS<sup>•+</sup> antiradical activity) were showed by the MLE obtained with ethanol as solvent at low temperature (35 °C). While at the same conditions of extraction (ethanol at 35 °C) the MLE exert the highest antimicrobial activity, mainly against Gram-positive bacteria. These properties could be associated to the presence of polyphenols such as rutin, rosmarinic acid, hesperetin and naringenin. In addition, this

study demonstrated a great potential of MLE to be use in the pharmaceutical or food industry.

### Acknowledgments

Margarita Irene Ramírez-Rojo gratefully acknowledges a fellowship from CONACYT for PhD studies.

### REFERENCES

- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.
- Almaraz-Abarca, N., da Graça-Campos, M., Ávila-Reyes, J. A., Naranjo-Jiménez, N., Herrera-Corral, J., & González-Valdez, L. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition Analysis*, 20, 119-124.
- Altekruse, S. F., Cohen, M. L., & Swerdlow, D. L. (1997). Emerging foodborne diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 3(3), 285.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
- Campo, J. D., Amiot, M. J., & Nguyen-The, C. (2000). Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 63(10), 1359-1368.
- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356.
- Das, Q., Islam, M. R., Marcone, M. F., Warriner, K., & Diarra, M. S. (2017). Potential of berry extracts to control foodborne pathogens. *Food Control*, 73, 650-662.
- De Dicastillo, C. L., Bustos, F., Valenzuela, X., López-Carballo, G., Vilariño, J. M., & Galotto, M. J. (2017). Chilean berry *Ugni molinae* Turcz. Fruit and leaves extracts with interesting antioxidant, antimicrobial and tyrosinase inhibitory properties. *Food Research International*, 102, 119-128.

- Denny, S., West, P. W. J., & Mathew, T. C. (2008). Antagonistic interactions between the flavonoids hesperetin and naringenin and  $\beta$ -lactam antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Biomedical Science*, 65(3), 145-147.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., & Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvent, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51, 84-91.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660.
- Falowo, A. B., Fayemi, P. O., & Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 64, 171-181.
- Fu, Z. F., Tu, Z. C., Zhang, L., Wang, H., Wen, Q. H., & Huang, T. (2016). Antioxidant activities and polyphenols of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves extracted with solvents of various polarities. *Food Bioscience*, 15, 11-18.
- Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo R. F., & García-Casas, M. A. (2013). Efecto del procesamiento térmico sobre la capacidad antioxidante de pinole a base de vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*). *CyTA-Journal of Food*, 11, 162-170.
- García-Andrade, M., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Rosales-Castro, M., & Medina-Torres, L. (2013). Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and cardioprotection potential. *Industrial Crops and Products*, 44, 336-342.
- Garg, A., & Mittal, S. K. (2013). Review on *Prosopis cineraria*: A potential herb of Thar Desert. *Drug Invention Today*, 5(1), 60-65.
- Gullón, B., Gullón, P., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., & Eibes, G. (2017). Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 108, 649-659.
- Hernández, J., Goycoolea, F. M., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Dominguez, Z., Robles, R., Vázquez-Moreno, L., Velázquez, L., Astiazaran, H., & Lugo, E. (2007). Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Medica*, 73(14), 1469-147.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Sarker, S. D., Moore, J. E., Rao, J. R., & Mazumdar, A. (2011). Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 1199-1206.
- IRAM. (2004). Norma IRAM 15935-1 Scheme 1. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización - Subcomité de productos agroalimentarios del NOA; 2004.
- Jiang, J., & Xiong, Y. L. (2016). Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: a review. *Meat Science*, 120, 107-117.
- Jorgensen, J. H., Turnidge, J. D., & Washington, J. A. (1999). Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In *Manual of Clinical Microbiology* ed. Murray, P.R., Jo Baron, E., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. (pp. 1526–1543). Washington DC: ASM Press.



- Kumar, V., Sharma, N., Sourirajan, A., Khosla, P. K., & Dev, K. (2018). Comparative evaluation of antimicrobial and antioxidant potential of ethanolic extract and its fractions of bark and leaves of *Terminalia arjuna* from north-western Himalayas, India. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(1), 100-106.
- Lyon, C. K., Gumbmann, M. R., & Becker, R. (1988). Value of mesquite leaves as forage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44(2), 111-117.
- Ma, Y. Q., Chen, J. C., Liu, D. H., & Ye, X. Q. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(1), 57-62.
- Miri, A., Sarani, M., Bazaz, M. R., & Darroudi, M. (2015). Plant-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Prosopis farcta* extract and its antibacterial properties. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 141, 287-291.
- Mohammad, I. S., Haji Muhammad Shoaib Khan, N. A., & Rasool, F. (2013). Biological potential and phytochemical evaluation of *Prosopis cineraria*. *World Applied Sciences Journal*, 27(11), 1489-1494.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Napar, A. A., Bux, H., Zia, M. A., Ahmad, M. Z., Iqbal, A., Roomi, S., Muhammad, I., & Shah, S. H. (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of Mimosaceae plants; *Acacia modesta* Wall (Phulai), *Prosopis cineraria* (Linn.) and *Prosopis juliflora* (Swartz). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(15), 2962-2970.
- Palacios, R. A. (2006). Los mezquites mexicanos: biodiversidad y distribución geográfica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 41(1-2), 99-121.
- Prabha, D. S., Dahms, H. U., & Malliga, P. (2014). Pharmacological potentials of phenolic compounds from *Prosopis* spp.-a. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(11), 918-924.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., & Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, 15, 235-240.
- Quispe, C., Petroll, K., Theoduloz, C., & Schmeda-Hirschmann, G. (2014). Antioxidant effect and characterization of South American *Prosopis* pods syrup. *Food Research International*, 56, 174-181.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Reyes-Reyes, B. G., Zamora-Villafranco, E., Reyes-Reyes, M. L., Frias-Hernandez, J. T., Olalde-Portugal, V., & Dendooven, L. (2003). Decomposition of leaves of huisache (*Acacia tortuoso*) and mesquite (*Prosopis* spp) in soil of the central highlands of Mexico. *Plant and Soil*, 256(2), 359-370.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Taddeo, V. A., Epifano, F., Fiorito, S., & Genovese, S. (2016). Comparison of different extraction methods and HPLC quantification of prenylated and unprenylated

- phenylpropanoids in raw Italian propolis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, 219-223.
- Tolosa, L. & Cañizares, E. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *ARS Pharmaceutica*, 43, 187-204.
- Vargas-Sánchez, R. D., Peñalba-Garmendía, M. C., Sánchez-Escalante, J. J., Torrescano-Urrutia, G. R., & Sánchez-Escalante, A. (2016). Pollen profile of propolis produced on the eastern edge of the Sonoran Desert in central Sonora, Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, (114).
- Wan, C., Yu, Y., Zhou, S., Liu, W., Tian, S., & Cao, S. (2011). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of *Gynura divaricata* leaf extracts at different temperatures. *Pharmacognosy Magazine*, 7(25), 40.
- Yıldırım, A., Mavi, A., & Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4083-4089.

## FIGURES AND TABLES

**Table 1.** Total phenolic and antioxidant activity of mesquite leaves extracts.

<b>Solvent</b>	<b>T (°C)</b>	<b>TPC<sup>A</sup></b>	<b>TFC<sup>B</sup></b>	<b>DPPH•<sup>C</sup></b>	<b>ABTS•<sup>+</sup>D</b>
W	35	60.5 ± 2.2 <sup>c</sup>	106.5 ± 5.0 <sup>b</sup>	26.3 ± 2.8 <sup>a</sup>	35.2 ± 2.6 <sup>a</sup>
	50	54.6 ± 1.3 <sup>b</sup>	104.6 ± 4.6 <sup>b</sup>	21.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	34.9 ± 1.3 <sup>a</sup>
	65	46.9 ± 2.4 <sup>a</sup>	43.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	20.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	29.8 ± 1.9 <sup>a</sup>
WE	35	80.6 ± 2.8 <sup>e</sup>	546.5 ± 13.2 <sup>d</sup>	62.7 ± 0.1 <sup>d</sup>	58.4 ± 0.7 <sup>c</sup>
	50	73.1 ± 0.7 <sup>d</sup>	361.5 ± 5.0 <sup>d</sup>	45.5 ± 4.1 <sup>c</sup>	52.6 ± 1.7 <sup>c</sup>
	65	69.7 ± 1.3 <sup>d</sup>	94.8 ± 2.9 <sup>b</sup>	38.9 ± 1.0 <sup>b</sup>	47.6 ± 1.2 <sup>b</sup>
E	35	123.9 ± 1.2 <sup>g</sup>	4414.8 ± 35.5 <sup>f</sup>	75.7 ± 0.4 <sup>e</sup>	90.2 ± 1.3 <sup>e</sup>
	50	121.6 ± 0.3 <sup>g</sup>	1518.2 ± 7.6 <sup>e</sup>	74.3 ± 0.4 <sup>e</sup>	85.0 ± 2.0 <sup>e</sup>
	65	95.8 ± 2.6 <sup>f</sup>	323.1 ± 5.7 <sup>c</sup>	64.7 ± 0.6 <sup>d</sup>	67.8 ± 1.6 <sup>d</sup>
<i>P</i> -level	Solvent	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	T (°C)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Solv * T (°C)	<0.001	<0.001	<0.001	0.014

W, water extract; WE, water: ethanol extract; E, ethanol extract; <sup>A</sup>, total phenolic content (mg GAE/g); <sup>B</sup>, total flavonoid content (mg RE/g); <sup>C</sup>, free-radical scavenging activity (%); <sup>D</sup>, radical-cation scavenging activity (%). Values are mean ± standard deviation of triplicate analysis. Different letters (a-b) indicate significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

**Table 2.** Polyphenolic composition of mesquite leaves extracts (mg/g).

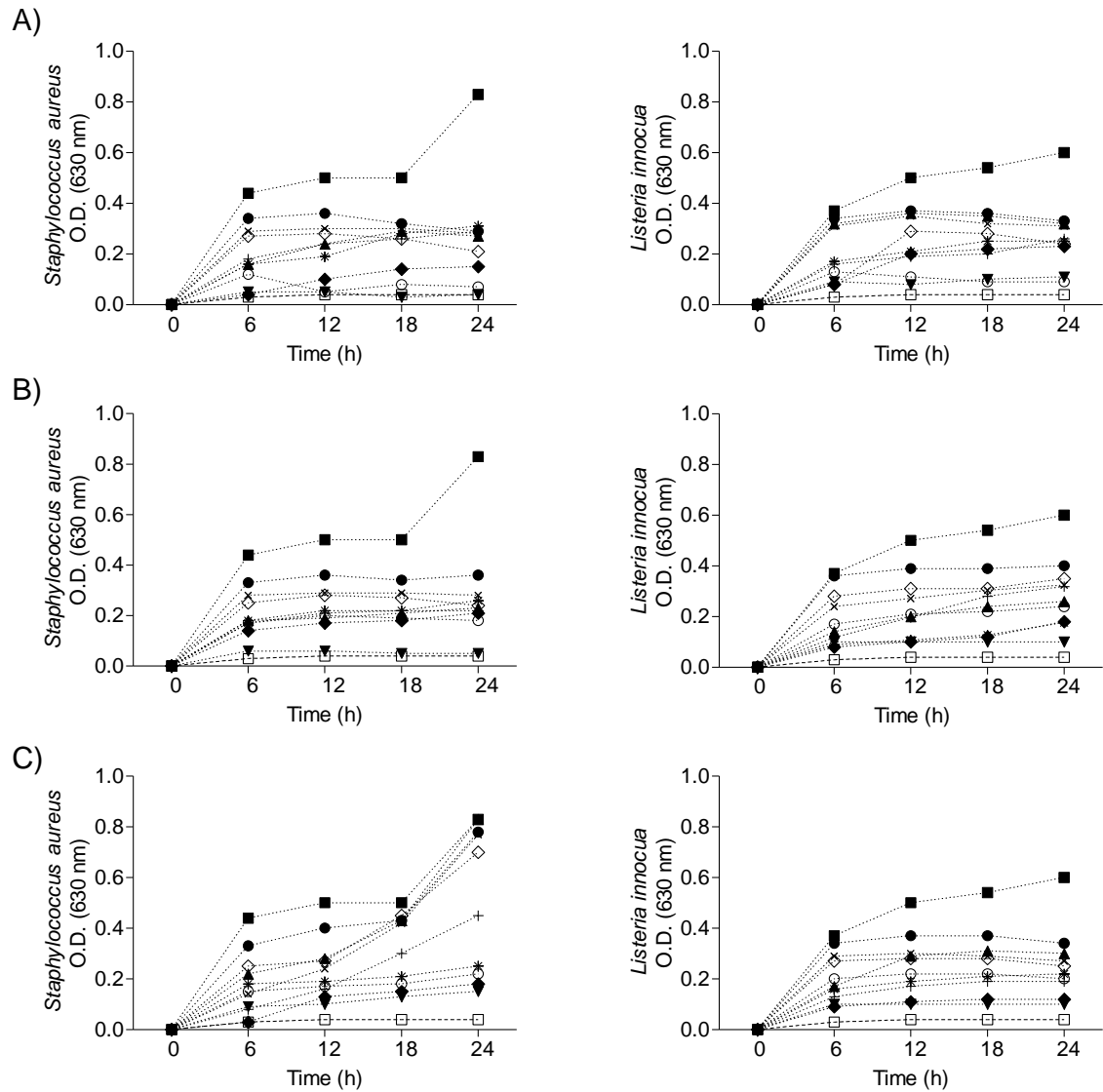
<b>Solvent</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Rosmarinic acid</b>	<b>Rutin</b>	<b>Naringenin</b>	<b>Hesperetin</b>
W	35	3.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	11.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	24.2 ± 0.5 <sup>b</sup>	63.3 ± 1.8 <sup>d</sup>
	50	3.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	37.1 ± 0.2 <sup>b</sup>
	65	2.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	37.2 ± 0.9 <sup>b</sup>
WE	35	8.8 ± 0.3 <sup>e</sup>	62.1 ± 0.2 <sup>d</sup>	103.9 ± 3.1 <sup>c</sup>	53.3 ± 0.3 <sup>c</sup>
	50	7.0 ± 0.3 <sup>d</sup>	35.3 ± 0.3 <sup>c</sup>	n.d.	25.3 ± 0.1 <sup>a</sup>
	65	6.5 ± 0.3 <sup>d</sup>	31.1 ± 0.9 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.
E	35	18.9 ± 0.2 <sup>f</sup>	150.2 ± 1.9 <sup>e</sup>	126.8 ± 1.6 <sup>d</sup>	92.0 ± 0.2 <sup>f</sup>
	50	5.5 ± 0.1 <sup>c</sup>	63.2 ± 1.1 <sup>d</sup>	127.7 ± 1.7 <sup>d</sup>	72.2 ± 0.5 <sup>e</sup>
	65	3.1 ± 0.1 <sup>ab</sup>	34.9 ± 0.5 <sup>c</sup>	12.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	58.6 ± 0.6 <sup>d</sup>
<i>P</i> -level	Solvent	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	T (°C)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Solv *	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	T (°C)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

n.d., not detected. W, water extract; WE, water: ethanol extract; E, ethanol extract. Values are mean ± standard deviation of triplicate analysis. Different letters (a-b) indicate significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

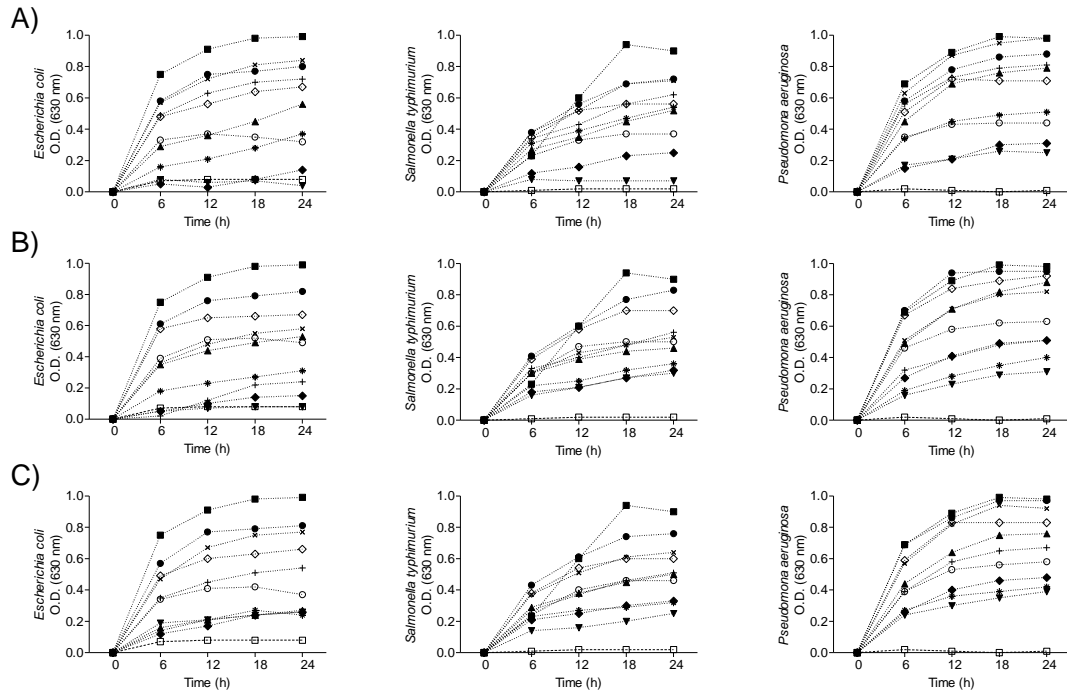
Table 3. Summary of the ANOVA (*P*-level) for two-way interaction (solvent and temperature).

Concentration [mg/mL]	<i>P</i> -level	Gram-positive bacteria		Gram-negative bacteria		
		<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>L.</i> <i>innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>
1	Solv	0.109	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	T (°C)	<0.001	0.202	<0.001	<0.001	0.986
	Solv* T (°C)	0.025	0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2	Solv	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	T (°C)	<0.001	<0.001	<0.001	0.016	0.021
	Solv* T (°C)	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001
4	Solv	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	T (°C)	<0.001	0.362	0.002	0.002	0.003
	Solv* T (°C)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

\*Two-way interaction ( $p < 0.05$ ).



**Figure 1.** Effect of mesquite leaves extracts at different doses (0, 1, 2 and 4 mg/mL) and temperatures (A, 35 °C; B, 50 °C; A, 65 °C) against Gram-positive bacteria's. Control (■), gentamicin (□), W-1 (●), W-2 (◇), W-4 (○), WE-1 (x), WE-2 (+), E-4 (\*), E-1 (▲), E-2 (◆) and E-4 (▼). Values are mean ± standard deviation of triplicate analysis. Significant differences are marked in asterisk ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2.** Effect of mesquite leaves extracts at different doses (1, 2 and 4 mg/mL) and temperatures (A, 35 °C; B, 50 °C; A, 65 °C) against Gram-negative bacteria's. Control (■), gentamicin (□), W-1 (●), W-2 (◇), W-4 (○), WE-1 (x), WE-2 (+), E-4 (\*), E-1 (▲), E-2 (◆) and E-4 (▼). Values are mean  $\pm$  standard deviation of triplicate analysis. Significant differences are marked in asterisk ( $p < 0.05$ ).

## **ARTÍCULO 4**

**MESQUITE LEAVES EXTRACT ENHANCES THE OXIDATIVE  
STABILITY OF PORK PATTIES DURING STORAGE TIME AT 4  
°C**

**M.I. Ramírez-Rojo, R.D. Vargas-Sánchez, G.R. Torrescano-Urrutia, A.  
Sánchez-Escalante**

**En preparación para la revista Meat Science**



## MESQUITE LEAVES EXTRACT ENHANCES THE OXIDATIVE STABILITY OF PORK PATTIES DURING STORAGE TIME AT 4 °C

M.I. Ramírez-Rojo<sup>a</sup>, R.D. Vargas-Sánchez<sup>b</sup>, G.R. Torrescano-Urrutia<sup>a</sup>, A. Sánchez-Escalante<sup>a,\*</sup>.

<sup>a</sup> Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, Laboratorio de Investigación en Carne y Productos Cárnicos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria Km 0.6. Colonia Ejido la Victoria, C.P. 83303. Hermosillo, México.

<sup>b</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa. Blvd. San Ángel s/n Predio Las Coloradas. Fraccionamiento San Benito, C.P. 80236. Culiacán, México.

\*Corresponding author. E-mail address: armida-sanchez@ciad.mx (A. Sánchez-Escalante).

### Highlights

- Effect of mesquite leaves ethanolic extract on pork meat quality was tested.
- Mesquite leaves extract possess high polyphenols contents.
- Mesquite leaves extract exert *in vitro* antioxidant activity.
- Mesquite leaves extract enhances shelf-life of pork patties for 10 days.

## ABSTRACT

The aim of this study was to assess the oxidative stability of pork patties treated with mesquite leaves ethanolic extract (MLE) during storage. Polyphenol contents and antioxidant activity of MLE was evaluated by measuring the total phenolic and flavonoid content, as well as its antiradical and reducing power activity. Pork patties were subjected to five treatments (without antioxidant, control; ascorbic acid, 0.02%; butylhydroxytoluene, 0.02%; MLE, 0.05 and 0.1%) and stored for 10 days/4 °C/under darkness, prior to meat quality analysis. The results showed that MLE contained high phenol and flavonoid content (>200 mg/g in both) and antiradical and reducing power activity (>50%). MLE addition in pork patties delayed the changes in pH and color values, metmyoglobin, conjugated dienes and thiobarbituric acid reactive substances formation, as well as in total antioxidant activity during storage time. MLE not affect the sensory acceptability of the pork patties ( $P < 0.05$ ). In conclusion, MLE had great potential as a natural antioxidant for meat products.

*Keywords:* Mesquite leaves, ethanolic extract, antioxidant activity, meat quality.

## 1. INTRODUCTION

The raising of pigs in Mexico is one of the most important activities in the livestock sector, and recently its meat has become as the second most popular in this country, with a per capita consumption in 2017 of 11.6 kg equating to a total domestic consumption of 2.4 M metric tons (FIRA, 2017). Also, pork meat exert a crucial role in human nutrition due is a valuable source of amino acids (lysine, leucine, isoleucine, threonine, tryptophan, valine and phenilalanine), minerals (iron, sodium, magnesium, phosphorus, potassium and zinc), vitamins (thiamine, niacin, rivo flavine B12 and B6), and fat and fatty acids (Pereira & Vicente, 2013). Additionally, fat and fatty acids (FA) are an important source of energy for human consumption. However, many authorities have recommended that saturated FA (SFA) of dietary intake should be reduced, while in contrast human nutritionist recommend a rise in monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) FA in the human diet (Warnants, Van Oeckel, & Boucqué, 1996), whence several investigations have been carried out to modified the FA to bringing the PUFA/SFA ratio of meat closer to the recommended value ( $>0.07$ ), thought feed additives. Unfortunately, high PUFA contents in pork meat and meat products resulting in low oxidative stability (Warnants, Van Oeckel, & Boucqué, 1996; Lee, Decker, Faustmant, & Mancini, 2005).

The loss of oxidative stability is mainly due to lipid oxidation process which promote the formation of substances that create unpleasant odor, appearance, color, flavor and texture in foods and especially in meat products (Gray, Gomaa, & Buckley, 1996; Lee, Decker, Faustmant, & Mancini, 2005). To prevent this, synthetic phenolic antioxidants such as BHA (butylated hydroxyanisole) and BHT (butylated hydroxytoluene) are commonly used, although these are falling into disuse due to potential adverse effects on consumer health (Kahl & Kappus, 1993). The search for new alternatives leads us to the use of naturally occurring additives in order to preserve meat, such as polyphenolic compounds extracted from different parts of plants: seeds, peels, barks, woods, flowers and leaves (Falowo, Fayemi, & Muchenje, 2014; Shah et al., 2014).

Mesquite (*Prosopis* spp.) has long been a useful biotic resource for the people of the arid and semiarid lands of Mexico. The mesquite wood, pods and leaves are used as human

and animal food, for construction and in the folk medicine, respectively (Almanza & Moya, 1993). Also, several investigations reported that extracts obtained from the bark, pods, pollen and leaves of plants from the genus *Prosopis* possess potential properties, such as antifungal, antimicrobial, antitumoral, anti-inflammatory, antihyperlipidemic and antioxidant, which are attributed to the presence of certain phytochemicals (Prabha et al., 2014). However, the utilization of mesquite as a natural source of antioxidant compounds for meat processing and its potential health benefits are not well understood.

Therefore, the aim of the present study was to elaborate ethanolic extracts from mesquite leaves (*Prosopis velutina*) in order to obtain phenolic compounds with antioxidant activity, thereby assessing their effect on the oxidation of pork patties during storage time (10 days at 4 °C), which leads to a deterioration of quality.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Chemical and Reagents

All the chemical products used were of analytical grade. Folin–Ciocalteu reagent, sodium carbonate, aluminum chloride, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•), ethanol, hexane, 2-propanol, methanol, sodium phosphate, potassium ferricyanide, iron chloride, gallic acid, quercetin, butylated hydroxytoluene and ascorbic acid were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, Mo., U.S.A.). 2-thiobarbituric acid and trichloroacetic acid were obtained from J.T. Baker®.

### 2.2. MLE Preparation

Mesquite leaves (*Prosopis velutina*) were collected in the Norwest of Mexico (Sonora state, Ures municipality; 29°7'19.72"N, 110°16'58.35" W; 476 m a.s.l.) and botanically identified by specialist from the Herbarium of the Sonora University (Department of Scientific and Technological Research). The mesquite leaves were thoroughly washed with water, dried at room temperature (25 °C) and milled (20 Mesh) for subsequently phenolic extraction according to the method described by Kaur, Arora, & Singh (2008). Mesquite leaves powder (50 g) was extracted with ethanol (500 mL) by the extraction assisted by ultrasound method (42 Hz/25 °C/30 min). Subsequently, the mixture was centrifuged (4200 x g for 10 min) to obtain the supernatant, followed by a second extraction period. The resulting solution was filtered through Whatman No. 4 filter paper, concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator (BÜCHI R-200, Flawil, Switerland), lyophilized (Freeze dryer Yamato DC401) and stored at -20 °C under darkness, until analysis.

### 2.3. Polyphenol Contents and Antioxidant Activity

The total phenolic content (TPC) was determined using the Folin-Ciocalteu reagent method described by Kaur, Arora, & Singh (2008). An aliquot of MLE (10  $\mu$ L, 5 mg/mL) was homogenized with 160  $\mu$ L of distilled water, 40  $\mu$ L of Folin-Ciocalteu reagent (0.25 N) and 60  $\mu$ L of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%, w/v) and 80  $\mu$ L of distilled water, and incubated for 1 h (25 °C/under dark). The absorbance was measured at 750 nm in a spectrophotometer (Multiskan FC UV-Vis, Thermo Scientific) and results were expressed as mg gallic acid/g (mg GAE/g). Also, the total flavonoid content (TFC) was measured based on the formation of aluminum chloride complexes following the method described by Popova et al., (2004). In summary, MLE (10  $\mu$ L, 5 mg/ml) was homogenized with 130  $\mu$ L of methanol, 10  $\mu$ L AlCl<sub>3</sub> (5 %, w/v) and incubated for 30 min (25 °C/under dark). The absorbance was read at 412 nm and results were expressed as mg quercetin equivalent/g (mg QE/g).

Moreover, the antiradical activity was evaluated by the DPPH• method described by Molyneux (2004). MLE (100  $\mu$ L, at 25, 50 and 100  $\mu$ g/mL) were mixed with DPPH• solution (300  $\mu$ mol) and incubated for 30 min (25 °C/under dark). The absorbance was measured at 517 nm and results expressed as percentage of radical inhibition (DPPH• %). Additionally, the reducing power assay (RP) was measured using the procedure described by Geckil, Ates, Durmaz, Erdogan, & Yilmaz (2005). MLE (100  $\mu$ L, 5 mg/mL) was mixed with 300  $\mu$ L of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6), 300  $\mu$ L of potassium ferricyanide (1%, w/v) and incubated in a water bath for 20 min (50 °C). After, an aliquot of 300  $\mu$ L of trichloroacetic acid (10%, w/v) was added and centrifuged (4200 x g for 10 min). The supernatant was mixed with 100  $\mu$ L of distilled water and 250  $\mu$ L of ferric chloride (0.1%, w/v) and the absorbance was measured at 700 nm in a spectrophotometer. The absorbance increase indicates an increase in the reducing power.

## 2.4. Pork Patties Preparation and Storage

Minced pork meat (*Semimembranosus* m., 48 h postmortem) was purchased from a local processor and divided into 5 different batches, which were mixed with salt (1.5% w/w), and fat (10% in final formulation, w/w). In each replication (thrice) pork patties were assessed in 5 treatments: 1), Control (without antioxidant, CN); 2), Ascorbic acid (0.02% w/w, Asc); 3), butylated hydroxytoluene (0.02% fat basis, BHT); 4), MLE (0.05% w/w, MLE1); and 5), MLE (0.1% w/w, MLE2). A total of 40 patties (90 g) per each treatment were formed and placed on Styrofoam tray. The polystyrene trays with pork patties were wrapped with polyvinyl chloride film (17400 cm<sup>3</sup> O<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>/24 h at 23 °C). The patties were subjected to refrigerated storage for 0, 3, 7 and 10 days (4 °C, under darkness) and subsequently two packs of each treatment were opened for analysis.

## 2.5. Meat Quality Measurements

### 2.5.1. Proximate Analysis

Moisture, fat, ash, protein and carbohydrates content was determined following the standard procedures of Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

### 2.5.2. Measurement of pH

The pH of raw pork patties was measured after homogenization with distilled water at a ratio 1:10, with a potentiometer (Model pH211, Hanna Instruments Inc., Woonsocket,

R.I., U.S.A.) with automatic temperature compensation (Torrescano, Sánchez-Escalante, Giménez, Roncalés, & Beltrán, 2003).

### **2.5.3. Color Changes**

The color measurement was performed using a spectrophotometer (model CM 2600d, Konica Minolta Inc. The values registered were lightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ ), yellowness ( $b^*$ ), chromaticity ( $C^*$ ), and hue angle ( $h^*$ ). The pork patties were extracted from their packaging and exposed at room temperature for 30 min. In total, 10 measurements were performed on each patties surface (CIE Commission Intl. of l'Eclairage, 1978).

### **2.5.4. Metmyoglobin Formation**

The metmyoglobin formation (MMb) was estimated spectrophotometrically by measuring the reflectance at 572 and 525 nm with a spectrophotometer (model CM 2600d, Konica Minolta Inc., Tokyo, Japan). The maximum value of the quotient  $K/S_{572}$  and  $K/S_{525}$  at the initial day of sampling (day 0) was fixed as 0% MMb, while 100% MMb was obtained after oxidizing the patties with a potassium ferricyanide solution (1%, w/v). Each value was the mean of 10 measurements on the surface of the pork patties (Stewart, Zipser, & Walts, 1965).

### **2.5.5. Water Holding Capacity**

The water holding capacity of patties was determined according to the methodology described by (Sutton et al., 1997). Samples (10 g) were place on a fine mesh nylon,



inserted into 50 mL tubes with a screw cap and then centrifuged at 3600 rpm at 4 °C during 10 min. The WHC (%) was then calculated using the following formula:  $WHC = [(weight\ after\ centrifugation - weight\ after\ drying) / initial\ weight] \times 100$ .

### **2.5.6. Lipid Oxidation**

The lipid oxidation (LOX) was evaluated by the conjugated dienes formation (CnD) according to Esterbauer, Cheeseman, Dianzani, Poli, & Slater (1982), which was measured as increased absorbance at 233 nm of a hexane-isopropanol extract. Pork patties (0.5 g) were homogenized with 5 mL of hexane:isopropanol solution (3:2) for 1 min and centrifuged at 2000 x g for 5 min. Deionized water was used as blank and CnD was quantified using a molar extinction coefficient of 25200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. The results are expressed as μmol/mg of meat.

The LOX was also measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according the method described by Pfalzgraf, Frigg, & Steinhart (1995). Meat samples (10 g) were homogenized with 20 mL of trichloroacetic acid (10%, w/v), centrifuged at 2300xg for 20 min at 5 °C, and the supernatant was filtered through Whatman 4 filter paper. After, 2 mL of 2-tiobarbituric acid (20 mM) was mixed with 2 mL of filtrated and boiling in a water bath for 20 min, and subsequently cooled. Absorbance was measured at 531 nm in a spectrophotometer (Model 336001, Spectronic Genesys 5, Thermo Electron Corp.). The malondialdehyde concentration (MDA) was calculated using a calibration curve and the results expressed as mg MDA/kg sample.

### **2.5.7. Total Antioxidant Activity of Meat Extract**

The meat extract was prepared according to the method described by Huang et al. (2011). Pork patties (0.5 g) were homogenized with 5 mL of distilled water and centrifuged (4200

x g for 10 min). The supernatant was employed to determine the total antioxidant of the meat extract, measured through the DPPH• and RP through activity (Molyneux, 2004; Geckil, Ates, Durmaz, Erdogan, & Yilmaz, 2005).

### **2.5.8. Sensory Evaluation**

Trained panelist (n= 25, laboratory coworkers) were used to evaluate descriptive sensory analysis of the raw and cooked meat samples according to the method described by Djenane, Sánchez-Escalante, Beltrán, & Roncalés (2001). Some pork patties were grilled until reached an internal temperature of 78 °C. The sensory attributes were evaluated for the raw patties (surface color and appearance), and for cooked patties (color, appearance, odor, flavor, juiciness, fat sensation and hardness) using descriptive scale from 1 to 7 (1 = extremely poor to 7 = excellent).

## **2.6. Statistical Analysis**

Three independent experimental trials (replications) were conducted and results presented as the mean  $\pm$  standard deviation. Data of experimental patties were submitted to analysis of variance (ANOVA) according to a two factorial design using NCSS statistical software (2007). The treatments (CN, Asc, BHT, MLE1 and MLE2) and storage time (0, 3, 7 and 10 days) were the fixed terms in the model. For sensory evaluation, panelists were considered as random factor as well. A Tukey-Kramer multiple comparison test was performed to determine significance of mean values for multiple comparisons at  $P < 0.05$ . A principal component analysis was carried out to detail the level of association between the evaluated variables.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Polyphenols Contents and Antioxidant Activity

The antioxidant activity of extracts obtained from plants is widely known and associated to the polyphenol constituents such as hydroxycinnamic acids, anthocyanins, tannins and flavonoids, which possess the ability to act as free radical scavenger and ion metal chelator (Ainsworth & Gillespie, 2007). Table 1 reports the results of the polyphenols contents and antioxidant activity of MLE, expressed as total phenolic and flavonoid content (TPC and TFC, respectively), as well as antiradical DPPH• activity and reducing power (RP). The results showed that MLE possess high values of TPC and TFC values (>200 mg GAE or RE/g, respectively). In agree García-Andrade et al. (2013) reported the presence of polyphenols in extracts obtained from mesquite leaves which ranged from 68 to 108.3 mg GAE/g.

According to an Argentina normative the minimum concentration requirements for the development of a natural extract product are 50 mg of GAE and 5 mg RE/g of dried extract (IRAM, 2004), which indicate that MLE approves the established quality requirements by this regulation. The quantification of TPC relies on the transfer of electrons in alkaline medium from phenolic compounds to phosphomolybdic/phosphotungstic acid complexes (colorimetric reagent Folin-Ciocalteu); while TFC method is based on the formation of a complex between OH groups from the flavonoid with aluminum. These assays have been proposed as a standardized method for use in the routine quality control of natural extracts and measurement the antioxidant capacity of food products and dietary supplements (Ainsworth & Gillespie, 2007; Kaur, Arora, & Singh, 2008).

In relation to the antioxidant activity, the results demonstrated that MLE exert in vitro high inhibition of the radical DPPH• and RP activity (>80% and >1.0 abs, respectively); while the standard ascorbic acid showed the highest antioxidant values, i.e. >90% of radical inhibition and >1.0 abs, respectively ( $P < 0.05$ ). The antiradical DPPH• activity of phenolic compounds (ArOH) from natural extracts is due to their hydrogen donating

ability and the reaction is based on the reduction of the purple-colored DPPH• radical to its reduced form 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine, residual pale yellow-colored: i.e.  $\text{DPPH}\cdot + \text{ArOH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{ArO}\cdot$  (Molyneux et al., 2004; Serpen, Gökmen, & Fogliano, 2012). Moreover, in RP assay the reductants present in the extract promote the reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  to the  $\text{Fe}^{2+}$  through electron-transfer ability (i.e.  $\text{Fe}^{3+} + \text{ArOH} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{ArOH}^+$ ), and high absorbance values indicate high RP (Berker, Güçlü, Tor, & Apak, 2007). A linear correlation between TPC and TFC respect DPPH• and RP assays was observed (TPC vs TFC, 0.973; TPC vs DPPH•, 0.969; TPC vs RP, 0.994; TFC vs DPPH•, 0.830; TFC vs RP, 0.992). This strong positive correlation between phenolic constituents and antioxidant assays has been reported in an extensive range of natural extracts (Rodríguez-Carpena, Morcuende, Andrade, Kylli, & Estévez, 2011a; Al-Rimawi et al., 2017).

### 3.2. Meat Quality Traits

The findings from the present study highlight that MLE are promising source of phenolic compounds with antioxidant activity, which may be employed as an efficient natural additive for extending the shelf life of fresh meat and meat products. To evaluate the effectiveness of MLE in a meat product, the chemical composition and meat quality parameters during storage time (2 °C, 10 days, under darkness) were evaluated. Table 2 reports the results of chemical composition of pork patties, which revealed that MLE incorporation not modified ( $P > 0.05$ ), the moisture (67.2%), fat (11.1%), ash (1.7%) and protein (22.5%) contents. This chemical composition is consistent for pork patties reported by Rodríguez-Carpena, Morcuende, & Estévez (2011b).

Table 3 reports the effect of MLE addition in pork patties and results of meat quality parameters such as pH values, color coordinates ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  and  $h^*$ ), metmyoglobin formation (MMb) and water holding capacity (WHC) showed that treatment x storage time effect was significant ( $P < 0.001$ ). Initial pH values (day 0) for all patties ranged between 5.85 and 5.92, which are characteristic values for fresh pork patties (Huang et al.,

2011). In this work, the pH values decreased gradually for all treatments and at the end of the storage time (day 10), all patties treated with the natural antioxidants (MLE) > synthetic antioxidants (Asc and BHT) resulted in significantly higher ( $P < 0.05$ ) pH >5.8 and >5.7, respectively, when compared with the CN group (pH 5.5). The pH is a major parameter associated with the quality of fresh meat and meat products, due that pH values changes can affect the chemical (accelerate the myoglobin formation), technological (water holding capacity, cooking loss weigh and texture) and sensory properties such as appearance, juiciness, hardness, color, among others (Huff-Lonergan et al., 2002; Bekhit & Faustman, 2005; Huang et al., 2011).

Color is a subjective psycho-physical characteristic as it exists only in the observer's eyes and brain (i.e. it is not a characteristic proper to the object under observation), which is associated with the freshness, flavor, tenderness, safety, storage time, nutritional value and satisfaction level (Faustmant & Cassens, 1990; Page, Wulf, & Schwotzer, 2001; Girolami, Napolitano, Faraone, & Braghieri, 2013). In this study, the results of color showed that initial  $L^*$  values (day 0) were not affected by MLE incorporation, with an average value of 54.2 for all treatments ( $P > 0.05$ ). Also,  $L^*$  values were not decreased during the storage time, at day 10, the patties treated with the natural and synthetic antioxidant showed  $L^*$  values of 54.1 in comparison with the CN patties which showed the highest  $L^*$  value > 56.0 ( $P < 0.05$ ). The  $L^*$  values obtained for pork patties treated with antioxidants were considered as normal (approximately 53-54).  $L^*$  values measured lightness and range from 0 (black) to 100 (white) and is considered the best indicator of PSE (pale, soft and exudative) and/or DFD (dark, firm and dry) pork meat condition; in addition,  $L^*$  values >53-54 are considered as PSE meat (Brewer, Zhu, Bidner, Meisinger, & McKeith, 2001).

The redness ( $a^*$  values) and yellowness were decreased and increased, respectively, for pork patties during storage time ( $P < 0.05$ ). Initial  $a^*$  values (day 0) showed that MLE incorporation reduced 35.4% the light pink color of pork patties when compared with the CN ( $P < 0.05$ ), while  $b^*$  values were increased 33.3% for MLE treatments. However, at day 10 of storage, the pork patties treated with MLE treatments showed the highest  $a^*$  value (> 10) in comparison with the CN < 8 ( $P < 0.05$ ), which indicate that MLE addition to raw meat similar to synthetic antioxidant maintained 25% the light pink color of fresh

pork meat. Also (at day 10), the results showed that  $b^*$  values were significantly higher ( $P < 0.05$ ) for MLE treatments (21%) when compared with CN, however, this values not were increased during storage time for MLE. The  $b^*$  values for CN were increased 13.6% during storage ( $P < 0.05$ ). The rate of red index ( $a^*$ ) is more useful than the yellow ( $b^*$ ) when analyzing the surface color changes in the patties, because the  $a^*$  values measure color changes between red and green (Page, Wulf, & Schwotzer, 2001; Girolami, Napolitano, Faraone, & Braghieri, 2013). In agree with the results of this study, Kang (2016) found that mistletoe extract (*Viscum album* L.) at 0.1, 0.5 and 1.0% increased 16.4% the redness of uncooked pork patties stored at 4 °C during 14 d.

The chromaticity values ( $C$ ) has been described as a good color change indicator, and this index decreases when the red index ( $a^*$ ) and pH values are reduced, while hue angle ( $h^*$ ) and MMb are increased (Fernández-López et al., 2003). At day 10 of storage, the pork patties treated with MLE showed the highest  $C^*$  value ( $> 20$ ) when compared with CN group and synthetic antioxidant ( $< 16$ ), which indicate less color changes. However, significant high values were observed in  $h$  values for patties treated with MLE ( $> 70$ ), which could be associated to the coloration pigment provided by this natural extract, although this value was not modified during storage time ( $P < 0.05$ ). However,  $h$  values for patties from CN were increased 21.8% during storage time ( $P < 0.05$ ).

Myoglobin-Mb is the principal protein responsible of the fresh meat color (Page, Wulf, & Schwotzer, 2001; Bekhit & Faustmant, 2005). Meat discoloration results from oxidation of both ferrous myoglobin derivatives to ferric ion: Oxymyoglobin (OMb) + [oxygen consumption or low  $O_2$  partial pressure] –  $e^-$  → Metmyoglobin (MMb) +  $O_2^-$  (Page, Wulf, & Schwotzer, 2001). In this study, prolonged storage under oxygen during storage time increased significantly the transformation of OMb (bright pink color) into MMb (green-brown color) ( $P < 0.05$ ). Non-significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed at the beginning of the experiment (day 0), between treatments  $< 2\%$  of MMb formation. However, at the end of the experiment (day 10) all patties treated with MLE treatments resulted in significantly lower ( $P < 0.05$ ) MMb values ( $< 40\%$  of formation) when compared with another treatment ( $> 70\%$  of formation). Greene, Hsin, & Zipser (1971) reported that a meat product with 40% of MMb formation, the product is rejected by the consumer. MLE1 and MLE2 reduced 55.2 and 62.1% respectively, the MMb when

compared with CN ( $P < 0.05$ ), which may be due to the richness in phenolic compounds of the MLE. In addition, plant extract addition in pork patties formulation could change the color of the meat samples and increase apparently MMb contents (Huang et al., 2011). Similarly, Haak, Raes, & De Smet (2009) found that a commercially available antioxidant and tocopherol reduced (~40%) OMb oxidation during refrigeration storage per 8 days. Potent activity in the reduction of MMb to OMb (a bright red protein of meat) it has been reported for phenolic compounds (kaempferol, myricetin and quercetin at 300  $\mu\text{mol/L}$ ; sinapic acid, catechin, taxifolin, morin and ferulic acid at 300  $\mu\text{mol/L}$ ), and a possible mechanism suggest the importance of a high propensity toward reduction of flavonol structure and rapid convertibility of the quinone form to the phenol form for OMb reduction and the maintenance of the level of OMb produced (Inai, Miura, Honda, Masuda, & Masuda, 2014).

A pH decline in pork meat causes the denaturation of many myofibrillar proteins and consequently reduce the ability of linkage protein-water and decline the water holding capacity-WHC; consequently, a lower WHC induce the loss of soluble nutrients and flavor, as well as the formation of dry, hard and tasteless muscle and decreased pork meat quality (Mancini et al., 2017). The results showed that initial WHC values (day 0) were similar for all pork patties, > 94% ( $P > 0.05$ ), which was reduced through storage time for the CN and synthetic antioxidant treatments ( $P < 0.05$ ). At day 10 of storage, the MLE addition to pork patties preserved 5% the WHC in comparison with the CN ( $P < 0.05$ ). These results could be due to the great number of hydroxyl groups that exist in the fiber of mesquite leaves, which allow more water interaction through hydrogen binding (Cumby, Zhong, Naczki, & Shahidi, 2008). It has been reported that the increase of water retention in patties treated with natural products (i.e. powders) could be associated to the capability of the powder to bind the water and to the antiradical effect against free radicals or reactive oxygen species such as  $\bullet\text{OH}$  (hydroxyl),  $\text{O}_2\bullet^-$  (superoxide) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (hydrogen peroxide), which could affect proteins and leads to the modification of meat structure (Mancini et al., 2017). Also, the antioxidative ability of plant extracts may retain membrane integrity of muscle fibers and decrease moisture loss through retarding lipid oxidation resulting in improved texture (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005).

Dietary lipids, naturally occurring in raw meat or added during meat processing, play an important role in food nutrition and flavor (Shahidi & Zhong, 2005). Meanwhile, the lipid oxidation (LOX) is characterized by the formation of conjugated dienes, hydroperoxides and aldehydes. During the formation of hydroperoxides from unsaturated fatty acids (UFA) conjugated dienes are typically produced (intense absorption at 234 nm), due to the rearrangement of the double bonds (Esterbauer, Cheeseman, Dianzani, Poli, & Slater, 1982); while aldehydic products of LOX such as malondialdehyde (MDA) offer a facile means of assessing lipid peroxidation in biological materials and can be estimated by the reaction with thiobarbituric acid-TBA ( $TBA + MDA \rightarrow TBA\text{-}MDA$  adduct; intense absorption at 530-535 nm). So that the TBARS values are routinely used as an index of LOX in meat and meat products (Pfalzgraf, Frigg, & Steinhart, 1995; Shahidi & Zhong, 2005).

The effect of the MLE on lipid oxidation (LOX) of pork patties during storage time was evaluated through conjugated dienes (CnD) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assays and results are showed in Fig. 1. The results obtained for CnD and TBARS data indicate that the LOX was significantly affected by both the treatment x storage time ( $P < 0.001$ ). Initial CnD and TBA values (day 0) for all antioxidants samples were significantly lower ( $MLE1 > MLE2 > \text{ascorbic acid} > \text{BHT}$ ) than those for the CN group ( $P < 0.05$ ). These results suggest that MLE retarded LOX during patties formulation or preparation. These results agree with different studies which employed natural extracts with antioxidant properties to raw pork patties. At the end of sampling (day 10), pork patties treated with mesquite extract ( $MLE1 > MLE2$ ) resulted in significantly lower CnD and TBA values ( $0.30 \mu\text{M CnD/mg}$  and  $0.06 \text{ mg MDA/kg}$ ) when compared with another treatments ( $P < 0.05$ ). MLE1 reduced the LOX values of CnD and TBA (40 and 94%, respectively) when compared with CN group. Similarly, Rodríguez-Carpena, Morcuende, & Estévez (2011b) reported a decrease in MDA formation by an average of 85% when avocado extract (Hass and Fuerte trademark: peel and seed extract) was added to raw pork patties stored at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  for 15 days. Also, in agree it was employed in another work an extract of mistletoe (1.0%) rich in phenolic compounds, which shown to improve lipid stability (58.3% of MDA reduction) in un cooked pork meat (Kang, 2016). For the antioxidant (ArOH), the initial step involves a very rapid transfer of the phenolic hydrogen



to the radical:  $\text{ROO}\cdot + \text{ArOH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{ArO}\cdot$  (phenoxyl radical) (Huang, 1995). It has been reported that lipid biomembrane-phenolic interaction can occur which reduced the lipid peroxidation: rutin > hesperetin > quercetin > naringenin (Saija et al., 1995).

### 3.4. Meat Antioxidant Levels

The results of total antioxidant activity of pork patties are shown in Figure 2. The results of initial antiradical DPPH• and RP activity (day 0) showed that treatments Asc and MLE were significantly higher (> 40% of inhibition and > 0.35 abs) when compared with the CN samples ( $P < 0.05$ ). Although these values decreasing during storage time for all treatments ( $P < 0.05$ ). At the end of the experiment (day 10), pork patties treated with mesquite extract (MLE1 > MLE2) showed higher antioxidant properties (> 40% of inhibition of the radical DPPH• and > 0.2 abs) when compared with CN ( $P < 0.05$ ). Similarly, Huang et al. (2011) incorporated extracts from lotus rhizome knot (LRK) and lotus leaf (LL) at 3% (w/w) during storage time (4 °C), and reported an increase of antioxidants levels in raw pork patties (60% of DPPH inhibition and >80% of RP, by both extracts), when compared with the control group. The balance between endogenous and exogenous antioxidant and pro-oxidant substances determined the oxidative stability of meat. In addition, the composition of endogenous antioxidants (i.e. non-enzymatic hydrophilic and lipophilic compounds such as vitamins C and E, carotenoids, polyphenols, and enzymes like superoxide dismutase-SOD, catalase-CAT and glutathione peroxidase-GPx) depends of animal species and diet, pre- and slaughter conditions, meat muscle type, storage conditions, method of cooking, among others (Serpen, Gökmen, & Fogliano, 2012; Martínez, Nieto, & Ros, 2014). While the exogenous antioxidants could be influenced positive or negatively by their chemical composition, origin or source of extraction, season, method used for extraction, solvent and pH of extraction, polarity of the compounds (hydrophilic or lipophilic), storage conditions among others (Valencia et al., 2012; Vargas-Sánchez et al., 2015).

### 3.5. Sensory Evaluation

The results of sensory evaluation are shown in Table 4. The results revealed that raw pork patties treated with MLE had the lowest scores (MLE2 > MLE1) of color when compared with the CN group ( $P < 0.05$ ); which indicate that MLE color could influence these attributes. However, non-significant differences were found in the sensory scores color, appearance, odor, flavor, juiciness, fat sensation and hardness of cooked pork patties between treatments ( $P > 0.05$ ). These results showed that pork patties treated with MLE may be consumed without any problem regarding sensory quality. In agree with these results Mancini et al. (2017) indicate that ginger powder at 1 and 2% could be incorporated into pork patties without having a detrimental effect on their sensory attributes (appearance, juiciness, flavor, acceptability or global evaluation, among others), enhanced the shelf life and producing a healthy meat product (reducing atherogenicity and thombogenicity).

Principal component analysis (Figure 3) showed that the first two principal components explain 94.1% of the total variability. The component 1 and 2 (84.1% and 10%, respectively) differentiate the pork patties from the CN-group, synthetic antioxidants and MLE (Figure 3A). in the bottom-right square of the loading plot (Figure 3B) is well represented as MLE addition increased the pH values, antiradical DPPH• and RP activity, while in the upper-right square of the loading plot indicated that MLE reduced the color changes and increased the WHC. Moreover, the CnD, MDA and MMb formation were plotted in the left square of the load graph, this statement highlighted the antioxidant power of MLE.

## 4. CONCLUSIONS

Mesquite leaves extract (MLE) incorporation in pork patties resulted in significant increase of pH values, color stability, water holding capacity and antioxidant levels, as

well as sensory acceptability. Moreover, MLE improved MMb and LOX stability of treated pork patties during storage time. MLE, can be applied in the meat industry to improve quality and prevent oxidation process during storage.

### Acknowledgments

Margarita Irene Ramírez-Rojo gratefully acknowledges a fellowship from CONACYT for Phd. studies. The authors thank the assistance of Marcia Gracia and Antonio Cañedo for help us to collect the mesquite leaves.

### REFERENCES

- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875-877.
- Almanza, S. G., & Moya, E. G. (1986). The uses of mesquite (*Prosopis* spp.) in the highlands of San Luis Potosi, Mexico. *Forest Ecology and Management*, 16(1-4), 49-56.
- Al-Rimawi, F., Abu-Lafi, S., Abbadi, J., Alamarneh, A. A., Sawahreh, R. A., & Odeh, I. (2017). Analysis of phenolic and flavonoids of wild ephedra alata plant extracts by LC/PDA and LC/MS and their antioxidant activity. *African Journal of Traditional, Complementary & Alternative Medicines*, 14(2).
- AOAC. (1995). Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, pp. 2–99.
- Bekhit, A. E. D., & Faustman, C. (2005). Metmyoglobin reducing activity. *Meat Science*, 71(3), 407-439.
- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72(3), 1157-1165.
- Brewer, M. S., Zhu, L. G., Bidner, B., Meisinger, D. J., & McKeith, F. K. (2001). Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat Science*, 57(2), 169-176.

- CIE. (1978). Recommendations of uniform color spaces-color difference equations psychometric color terms. Supplement No. 2 to CIE Publication No. 15 (E-1.3.1) 1971/ (TC-1.3). Paris: Commission International de l'Éclairage.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, *109*(1), 144-148.
- Djenane, D., Sánchez-Escalante, A., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2001). Extension of the retail display life of fresh beef packaged in modified atmosphere by varying lighting conditions. *Journal of Food Science*, *66*(1), 181-186.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., Dianzani, M. U., Poli, G., & Slater, T. F. (1982). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *Biochemical Journal*, *208*(1), 129-140.
- Falowo, A. B., Fayemi, P. O., & Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, *64*, 171-181.
- Faustman, C., & Cassens, R. G. (1990). The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. *Journal of Muscle Foods*, *1*(3), 217-243.
- Fernández-López, J., Sevilla, L., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., Marin, F., & Pérez-Alvarez, J. A. (2003). Evaluation of the antioxidant potential of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in cooked pork meat. *Journal of Food Science*, *68*(2), 660-664.
- FIRA. (2017). Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. Panorama Agroalimentario, Carne de cerdo 2017. Available at: <http://www.ugrpg.org.mx/pdfs/Panorama%20Agroalimentario%20Carne%20de%20cerdo%202017.pdf>. (Accessed 20 April 2018).
- García-Andrade, M., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Rosales-Castro, M., & Medina-Torres, L. (2013). Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and cardioprotection potential. *Industrial Crops and Products*, *44*, 336-342.
- Geckil, H., Ates, B., Durmaz, G., Erdogan, S., & Yilmaz I. (2005). Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, *1*, 27-31.
- Girolami, A., Napolitano, F., Faraone, D., & Braghieri, A. (2013). Measurement of meat color using a computer vision system. *Meat Science*, *93*(1), 111-118.
- Gray, J. I., Gomaa, E. A., & Buckley, D. J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, *43*, 111-123.
- Greene, B. E., Hsin, I. M., & Zipser, M. Y. W. (1971). Retardation of oxidative color changes in raw ground beef. *Journal of Food Science*, *36*(6), 940-942.
- Haak, L., Raes, K., & De Smet, S. (2009). Effect of plant phenolics, tocopherol and ascorbic acid on oxidative stability of pork patties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *89*(8), 1360-1365.
- Huang N. (1995). "Myoglobin and Lipid Stability of Meat and Liposome Model Systems with Modified Atmosphere Packaging." LSU Historical Dissertations and Theses. 6108. [http://digitalcommons.lsu.edu/gradschool\\_disstheses/610](http://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_disstheses/610)

- Huang, B., He, J., Ban, X., Zeng, H., Yao, X., & Wang, Y. (2011). Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf. *Meat Science*, 87(1), 46-53.
- Huff-Lonergan, E., Baas, T. J., Malek, M., Dekkers, J. C., Prusa, K., & Rothschild, M. F. (2002). Correlations among selected pork quality traits. *Journal of Animal Science*, 80(3), 617-627.
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71(1), 194-204.
- Inai, M., Miura, Y., Honda, S., Masuda, A., & Masuda, T. (2014). Metmyoglobin reduction by polyphenols and mechanism of the conversion of metmyoglobin to oxymyoglobin by quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(4), 893-901.
- IRAM. (2004). Norma IRAM 15935-1 Scheme 1. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización - Subcomité de Productos Agroalimentarios del NOA; 2004.
- Kahl, R., & Kappus, H. (1993). Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung Und-forschung*, 196(4), 329-338.
- Kang, S. N. (2016). Ethanol extracts from Mistletoe (*Viscum album* L.) Act as natural antioxidants and antimicrobial agents in uncooked pork patties during refrigerated storage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(1), 109.
- Kaur, R., Arora, S., & Singh, B. (2008). Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis* A. Juss. *Bioresource Technology*, 99(16), 7692-7698.
- Lee, S., Decker, E. A., Faustman, C., & Mancini, R. A. (2005). The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in n-3 oil fortified ground beef patties. *Meat Science*, 70(4), 683-689.
- Mancini, S., Paci, G., Fratini, F., Torracca, B., Nuvoloni, R., Dal Bosco, A., Roscini, V., & Preziuso, G. (2017). Improving pork burgers quality using *Zingiber officinale* Roscoe powder (ginger). *Meat Science*, 129, 161-168.
- Martínez, J., Nieto, G., & Ros, G. (2014). Total antioxidant capacity of meat and meat products consumed in a reference 'Spanish standard diet'. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(12), 2610-2618.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal Science Technology*, 26(2), 211-219.
- Page, J. K., Wulf, D. M., & Schwotzer, T. R. (2001). A survey of beef muscle color and pH. *Journal of Animal Science*, 79(3), 678-687.
- Pereira, P. M. D. C. C., & Vicente, A. F. D. R. B. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93(3), 586-592.
- Prabha, D.S., Dahms, H.U. y Malliga, P. 2014. Pharmacological potentials of phenolic compounds from *Prosopis* spp.-a. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2: 918-924.
- Pfalzgraf, A., Frigg, M., & Steinhart, H. (1995). Alpha-tocopherol contents and lipid oxidation in pork muscle and adipose tissue during storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 1339-42.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L., Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the

- quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, 15, 235-240.
- Rodríguez Carpena, J., Morcuende, D., Andrade, M. J., Kylli, P., & Estévez, M. (2011a). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5625-5635.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., & Estévez, M. (2011b). Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. *Meat Science*, 89(2), 166-173.
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., & Castelli, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(4), 481-486.
- Serpen, A., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2012). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 90(1), 60-65.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2005). Lipid oxidation: measurement methods. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Pag. 29.
- Stewart, M., Zipser, M., & Walts, B. (1965). The use of reflectance spectrophotometry for assay of raw meat pigments. *Journal of Food Science*, 30, 464-469.
- Sutton, D. S., Ellis, M., Lan, Y., McKeith, F. K., & Wilson, E. R. (1997). Influence of slaughter weight and stress gene genotype on the water-holding capacity and protein gel characteristics of three porcine muscles. *Meat Science*, 46(2), 173-180.
- Torrescano, G., Sánchez-Escalante, A., Giménez, B., Roncalés, P., & Beltrán, J. A. (2003). Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Science*, 64(1), 85-91.
- Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Gálvez-Ruiz, J. C., Salas-Reyes, M., Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, E., Hernández, J., & Velázquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131(2), 645-651.
- Vargas-Sánchez, R. D., Mendoza-Wilson, A. M., Torrescano-Urrutia, G. R., & Sánchez-Escalante, A. (2015). Antiradical potential of phenolic compounds fingerprints of propolis extracts: DFT approach. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1066, 7-13.
- Warnants, N., Van Oeckel, M. J., & Boucqué, C. V. (1996). Incorporation of dietary polyunsaturated fatty acids in pork tissues and its implications for the quality of the end products. *Meat Science*, 44(1), 125-144.

**Table 1**

Antioxidant properties of ethanolic mesquite leaves extracts (MLE).

<b>Item</b>	<b>Mean ± SD</b>	
<i>Polyphenols composition</i>		
TPC (mg gallic acid equivalent/g)	278.5 ± 8.5	
TFC (mg rutin equivalent/g)	226.8 ± 8.3	
<i>Antioxidant activity</i>		
DPPH* (%)	100 µg/mL	85.3 ± 0.3 <sup>b</sup>
	50 µg/mL	74.8 ± 4.0 <sup>a</sup>
	25 µg/mL	68.9 ± 6.6 <sup>a</sup>
	Asc (25 µg/mL)	96.3 ± 2.3 <sup>c</sup>
	BHT (50 µg/mL)	69.3 ± 4.1 <sup>a</sup>
	RP (absorbance at 700 nm)	1.1 ± 0.2 <sup>b</sup>
	Asc (25 µg/mL)	1.4 ± 0.1 <sup>b</sup>
	BHT (50 µg/mL)	0.7 ± 0.2 <sup>a</sup>

TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoids content; RP, reducing power; Asc, ascorbic acid; BHT, butylated hydroxytoluene. All values represent mean ± standard deviation of at least three independent experiments. Different superscripts (a-c) differ significantly ( $P < 0.05$ ).

**Table 2**

Chemical composition of pork patties.

Treatment	Moisture	Fat	Ash	Protein
CN	66.98 ± 0.58	11.04 ± 0.89	1.67 ± 0.11	20.54 ± 0.74
Asc	67.59 ± 0.86	11.02 ± 0.50	1.68 ± 0.02	22.47 ± 0.54
BHT	67.47 ± 0.70	11.10 ± 0.49	1.66 ± 0.04	23.10 ± 0.45
MLE1	67.06 ± 0.14	11.29 ± 1.08	1.67 ± 0.03	22.96 ± 0.13
MLE2	66.89 ± 1.26	11.05 ± 0.83	1.68 ± 0.06	23.52 ± 0.87
P-value	0.765	0.992	0.995	0.246

All values represent mean ± standard deviation of at least three independent experiments. CN, control; Asc, ascorbic acid; BHT, butylated hydroxytoluene; MLE1, mesquite leaves extract at 0.05%; MLE2, mesquite leaves extract at 0.1%.



**Table 3**

Meat quality attributes of pork patties during storage time.

Item	Treat	Storage time (days)				P-level		
		0	3	7	10	Trat	Time	Trat*Time
pH	CN	5.86 ± 0.02 <sup>e</sup>	5.78 ± 0.01 <sup>c</sup>	5.76 ± 0.04 <sup>bc</sup>	5.53 ± 0.01 <sup>a</sup>			
	Asc	5.85 ± 0.05 <sup>e</sup>	5.87 ± 0.02 <sup>e</sup>	5.82 ± 0.01 <sup>d</sup>	5.72 ± 0.03 <sup>b</sup>			
	BHT	5.87 ± 0.01 <sup>e</sup>	5.88 ± 0.01 <sup>e</sup>	5.86 ± 0.04 <sup>e</sup>	5.76 ± 0.01 <sup>bc</sup>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	MLE1	5.92 ± 0.01 <sup>f</sup>	5.88 ± 0.01 <sup>e</sup>	5.88 ± 0.01 <sup>e</sup>	5.84 ± 0.02 <sup>e</sup>			
	MLE2	5.91 ± 0.01 <sup>f</sup>	5.88 ± 0.01 <sup>e</sup>	5.87 ± 0.02 <sup>e</sup>	5.85 ± 0.01 <sup>e</sup>			
L*	CN	53.37 ± 0.50 <sup>a</sup>	53.06 ± 0.35 <sup>a</sup>	53.22 ± 0.41 <sup>a</sup>	56.60 ± 0.77 <sup>a1</sup>	0.427	< 0.001	< 0.001
	Asc	53.82 ± 0.88 <sup>a</sup>	54.68 ± 0.56 <sup>a</sup>	54.19 ± 0.35 <sup>a</sup>	54.25 ± 1.22 <sup>a</sup>			
	BHT	54.63 ± 0.79 <sup>a</sup>	54.39 ± 1.02 <sup>a</sup>	54.35 ± 0.29 <sup>a</sup>	53.75 ± 0.50 <sup>a</sup>			
	MLE1	54.52 ± 0.48 <sup>a</sup>	54.31 ± 0.75 <sup>a</sup>	53.99 ± 0.65 <sup>a</sup>	54.40 ± 0.56 <sup>a</sup>			
	MLE2	54.39 ± 0.58 <sup>a</sup>	53.73 ± 0.41 <sup>a</sup>	53.92 ± 0.22 <sup>a</sup>	54.03 ± 0.80 <sup>a</sup>			
a*	CN	15.78 ± 1.08 <sup>d</sup>	15.74 ± 1.22 <sup>d</sup>	14.03 ± 0.46 <sup>cd</sup>	7.23 ± 0.40 <sup>a</sup>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	Asc	15.66 ± 0.44 <sup>d</sup>	14.14 ± 0.25 <sup>cd</sup>	14.88 ± 0.51 <sup>cd</sup>	9.99 ± 0.71 <sup>b</sup>			
	BHT	14.82 ± 1.06 <sup>cd</sup>	14.73 ± 0.76 <sup>cd</sup>	13.78 ± 0.96 <sup>c</sup>	9.05 ± 0.79 <sup>b</sup>			
	MLE1	12.61 ± 1.25 <sup>c</sup>	12.59 ± 1.14 <sup>c</sup>	12.79 ± 1.13 <sup>c</sup>	10.09 ± 0.76 <sup>b</sup>			
	MLE2	10.19 ± 1.41 <sup>bc</sup>	10.56 ± 0.71 <sup>bc</sup>	10.31 ± 0.37 <sup>b</sup>	9.18 ± 0.41 <sup>b</sup>			
b*	CN	15.01 ± 0.99 <sup>a</sup>	16.02 ± 1.10 <sup>a</sup>	16.77 ± 0.28 <sup>a</sup>	17.37 ± 0.15 <sup>b</sup>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	Asc	15.18 ± 0.58 <sup>a</sup>	15.02 ± 1.08 <sup>a</sup>	15.54 ± 0.32 <sup>a</sup>	14.52 ± 0.68 <sup>a</sup>			
	BHT	15.32 ± 1.05 <sup>a</sup>	15.90 ± 0.90 <sup>a</sup>	15.96 ± 0.78 <sup>a</sup>	14.97 ± 0.92 <sup>a</sup>			
	MLE1	20.75 ± 1.02 <sup>c</sup>	21.45 ± 1.10 <sup>c</sup>	21.56 ± 0.84 <sup>c</sup>	20.14 ± 0.66 <sup>c</sup>			
	MLE2	25.94 ± 0.10 <sup>e</sup>	25.74 ± 0.44 <sup>e</sup>	24.40 ± 0.93 <sup>de</sup>	22.67 ± 1.11 <sup>cd</sup>			
C	CN	21.47 ± 1.13 <sup>bc</sup>	19.83 ± 1.69 <sup>b</sup>	19.73 ± 0.89 <sup>b</sup>	15.37 ± 0.47 <sup>a</sup>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	Asc	21.71 ± 0.61 <sup>b</sup>	20.83 ± 2.03 <sup>b</sup>	21.87 ± 0.39 <sup>b</sup>	16.87 ± 0.89 <sup>a</sup>			
	BHT	20.66 ± 1.57 <sup>b</sup>	21.92 ± 1.02 <sup>bc</sup>	20.43 ± 2.02 <sup>b</sup>	15.73 ± 1.16 <sup>a</sup>			
	MLE1	23.61 ± 1.61 <sup>cd</sup>	23.45 ± 1.07 <sup>cd</sup>	23.96 ± 0.58 <sup>c</sup>	21.77 ± 1.74 <sup>b</sup>			
	MLE2	26.53 ± 1.67 <sup>d</sup>	26.97 ± 0.60 <sup>d</sup>	26.06 ± 0.94 <sup>d</sup>	23.61 ± 1.06 <sup>c</sup>			
h	CN	43.57 ± 0.95 <sup>a</sup>	44.52 ± 1.24 <sup>a</sup>	46.47 ± 1.34 <sup>a</sup>	55.69 ± 1.09 <sup>b</sup>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	Asc	43.82 ± 0.53 <sup>a</sup>	42.53 ± 1.70 <sup>a</sup>	45.50 ± 0.38 <sup>a</sup>	53.25 ± 1.10 <sup>b</sup>			
	BHT	44.50 ± 1.15 <sup>a</sup>	45.83 ± 1.06 <sup>a</sup>	46.40 ± 1.30 <sup>a</sup>	56.15 ± 1.60 <sup>b</sup>			
	MLE1	61.23 ± 2.17 <sup>c</sup>	60.19 ± 1.20 <sup>c</sup>	60.4 ± 2.07 <sup>c</sup>	64.56 ± 1.19 <sup>b</sup>			
	MLE2	70.05 ± 1.49 <sup>d</sup>	70.50 ± 1.46 <sup>d</sup>	69.59 ± 1.90 <sup>d</sup>	72.93 ± 1.64 <sup>d</sup>			
MMb	CN	1.00 ± 0.18 <sup>a</sup>	7.90 ± 0.45 <sup>b</sup>	71.22 ± 3.10 <sup>h</sup>	91.78 ± 2.93 <sup>k</sup>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	Asc	1.70 ± 0.70 <sup>a</sup>	14.67 ± 1.30 <sup>c</sup>	71.70 ± 1.38 <sup>h</sup>	70.12 ± 2.43 <sup>h</sup>			
	BHT	1.40 ± 0.27 <sup>a</sup>	8.51 ± 1.98 <sup>b</sup>	79.83 ± 2.11 <sup>i</sup>	80.97 ± 2.19 <sup>j</sup>			
	MLE1	1.40 ± 0.18 <sup>a</sup>	6.03 ± 0.60 <sup>b</sup>	28.75 ± 2.65 <sup>e</sup>	41.15 ± 2.63 <sup>g</sup>			
	MLE2	1.20 ± 0.27 <sup>a</sup>	7.73 ± 1.46 <sup>b</sup>	17.19 ± 1.26 <sup>d</sup>	34.81 ± 2.68 <sup>f</sup>			

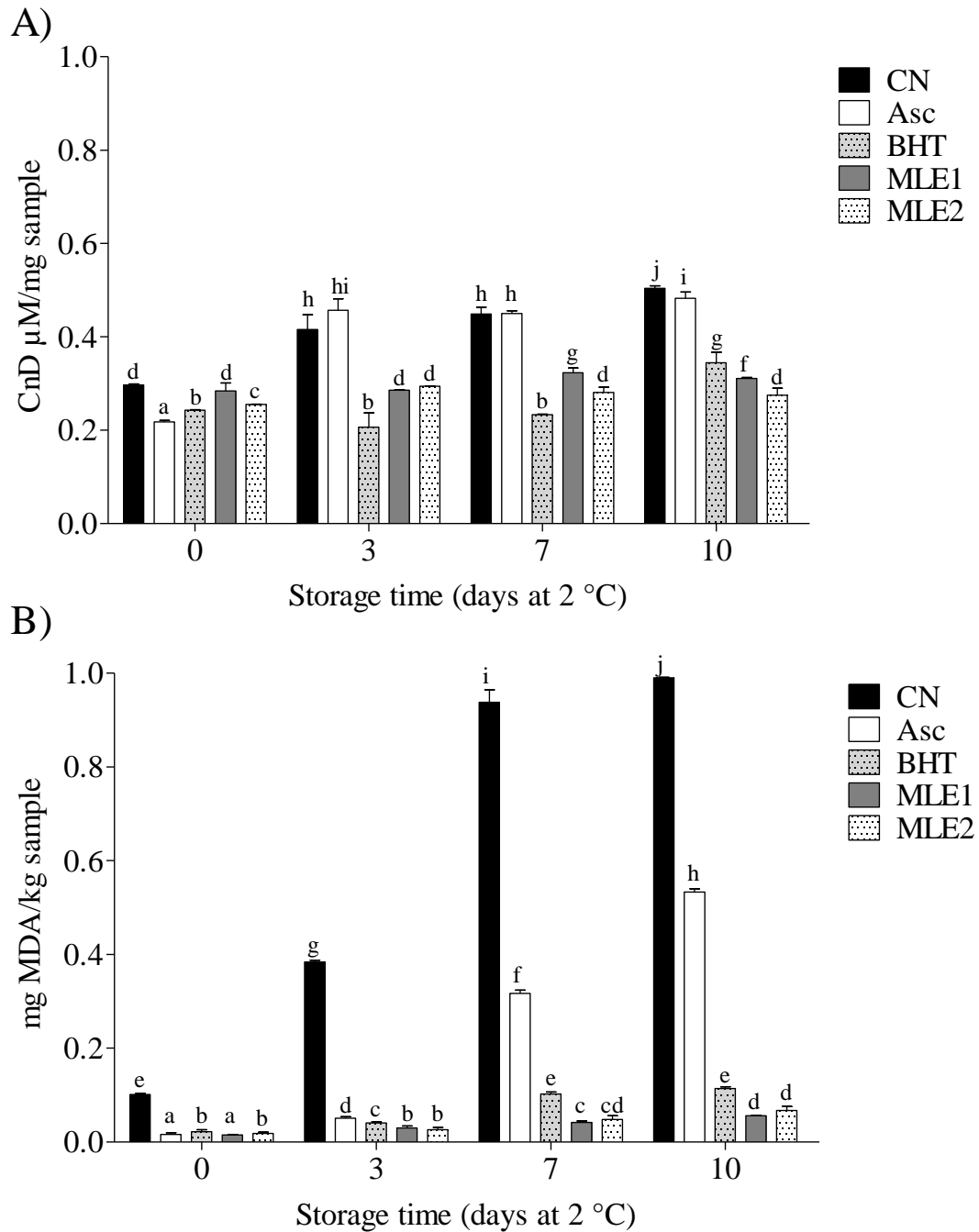
WHC	CN	95.83 ± 0.85 <sup>b</sup>	95.08 ± 0.62 <sup>b</sup>	95.77 ± 1.00 <sup>b</sup>	91.20 ± 0.88 <sup>a</sup>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	Asc	94.26 ± 0.90 <sup>b</sup>	94.80 ± 0.91 <sup>b</sup>	94.61 ± 1.05 <sup>b</sup>	92.20 ± 0.64 <sup>a</sup>			
	BHT	94.92 ± 1.34 <sup>b</sup>	95.57 ± 1.01 <sup>b</sup>	94.98 ± 0.22 <sup>b</sup>	95.42 ± 0.59 <sup>b</sup>			
	MLE1	95.04 ± 0.80 <sup>b</sup>	95.34 ± 1.65 <sup>b</sup>	95.68 ± 1.36 <sup>b</sup>	95.86 ± 0.47 <sup>b</sup>			
	MLE2	94.61 ± 0.98 <sup>b</sup>	95.25 ± 0.32 <sup>b</sup>	95.75 ± 0.27 <sup>b</sup>	95.96 ± 0.26 <sup>b</sup>			

All values represent mean ± standard deviation of at least three independent experiments. CN, control; Asc, ascorbic acid; BHT, butylated hydroxytoluene; MLE1, mesquite leaves extract at 0.05%; MLE2, mesquite leaves extract at 0.1%. Different superscripts (a-k) differ significantly between treatments through storage time ( $P < 0.05$ ).

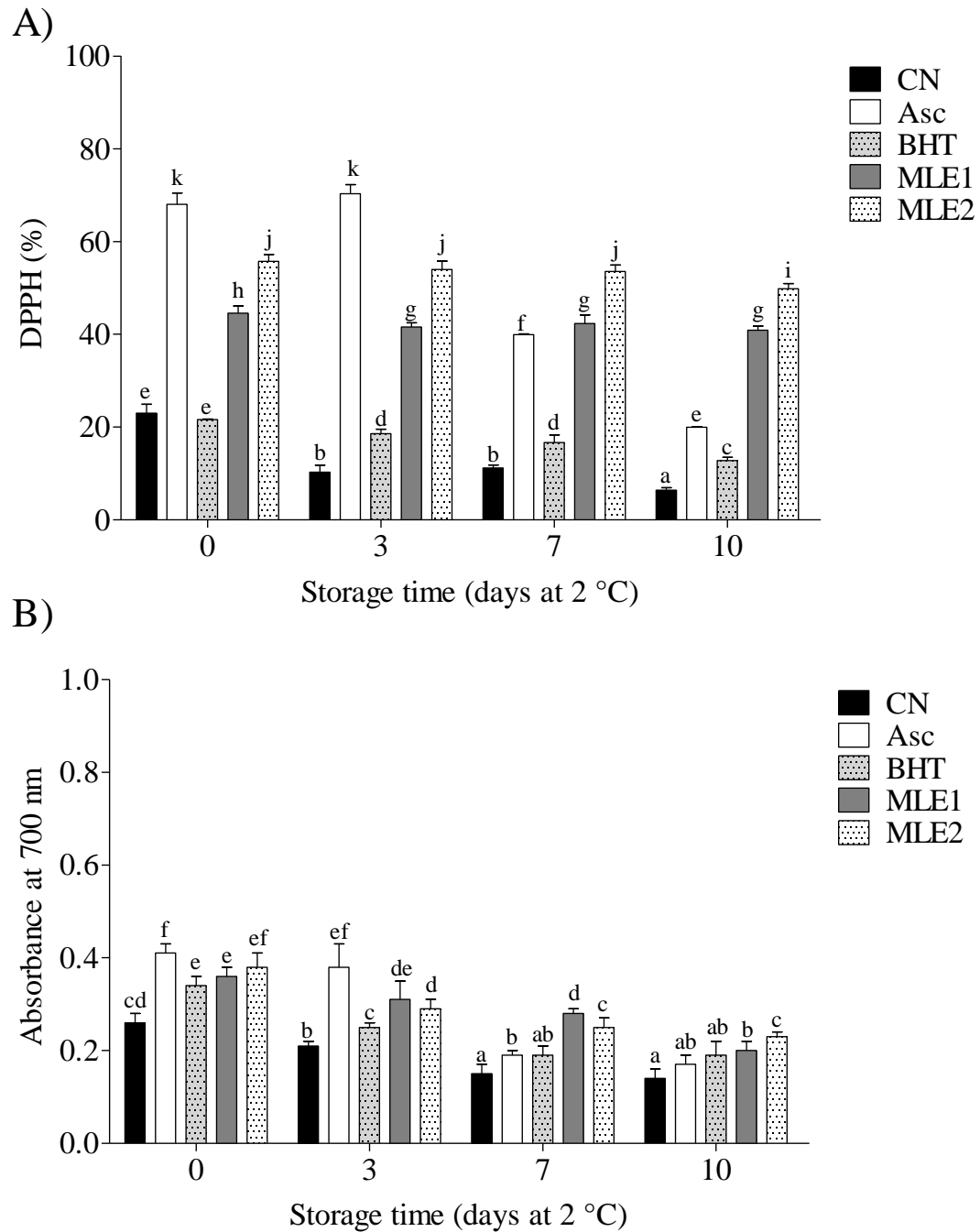
**Table 4**  
Sensory evaluation scores of pork patties.

Item	Treatments			P-value
	CN	MLE1	MLE2	
<i>Raw patties</i>				
Color	6.8 ± 1.4 <sup>c</sup>	5.5 ± 1.2 <sup>b</sup>	4.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	0.013
Appearance	6.1 ± 1.0	5.6 ± 1.0	5.4 ± 0.4	0.114
<i>Cooked patties</i>				
Color	5.4 ± 1.0	5.1 ± 1.1	4.7 ± 1.4	0.775
Appearance	5.7 ± 1.1	5.4 ± 1.0	4.8 ± 1.4	0.656
Odor	5.4 ± 1.3	4.7 ± 1.2	5.6 ± 1.2	0.663
Flavor	5.5 ± 1.2	5.4 ± 1.2	4.7 ± 1.2	0.689
Juiciness	4.8 ± 1.2	5.6 ± 0.7	4.7 ± 1.3	0.576
Fat sensation	5.5 ± 1.5	5.5 ± 1.0	4.7 ± 1.4	0.706
Hardness	5.3 ± 1.4	5.7 ± 1.2	5.1 ± 1.3	0.852

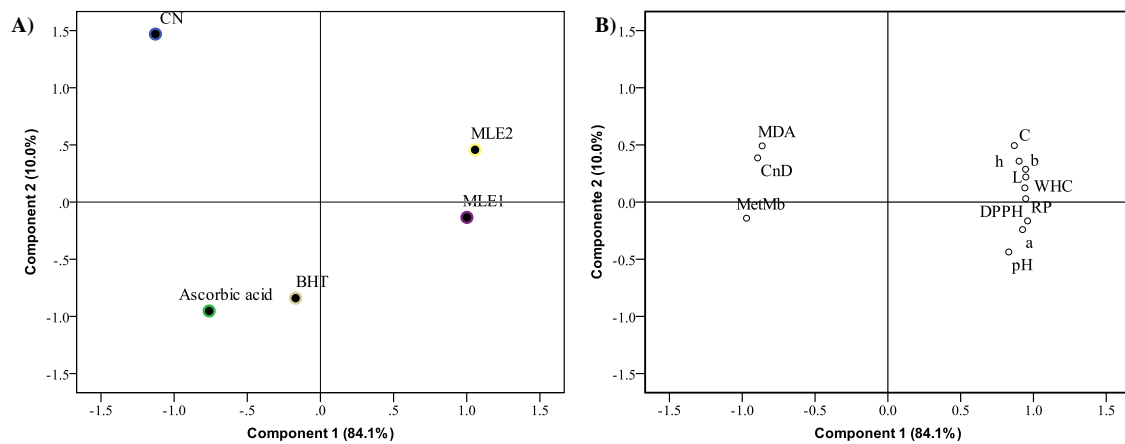
All values represent mean ± standard deviation of at least three independent experiments. CN, control; MLE1, mesquite leaves extract at 0.05%; MLE2, mesquite leaves extract at 0.1%. Different superscripts (a-c) differ significantly between treatments within the same sensory attribute ( $P < 0.05$ ).



**Figure 1.** Lipid oxidation levels of pork patties during storage time determined by the CnD (A) and TBA (B) assays. CN, control; Asc, ascorbic acid; BHT, butylated hydroxytoluene; MLE1, mesquite leaves extract at 0.05%; MLE2, mesquite leaves extract at 0.1%. Bars with different superscripts (a-j) differ significantly between treatments through storage time ( $P < 0.05$ ).



**Figure 2.** Antioxidant levels of pork patties during storage time determined by the free radical scavenging activity (A) and reducing power (B) assays. CN, control; Asc, ascorbic acid; BHT, butylated hydroxytoluene; MLE1, mesquite leaves extract at 0.05%; MLE2, mesquite leaves extract at 0.1%. Bars with different superscripts (a-k) differ significantly between treatments through storage time ( $P < 0.05$ ).



**Figure 3.** A) Principal component analysis of pork patties and B) loadings graph.

## 8. CONCLUSIONES GENERALES

1.- Los extractos de hojas de mezquite (*Prosopis velutina*) obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido, con diferentes solventes (etanol; etanol-agua, 1:1; agua), mostraron la presencia de fenoles y flavonoides totales, propiedades antirradicalarias (DPPH•) y poder reductor. Del total de extractos obtenidos, el etanólico (EEM) mostró mayor efectividad, tanto en relación al rendimiento de extracción, como en actividad antioxidante; siendo el orden EEM>EAEM>EAM. Así mismo, mediante análisis cualitativo se comprobó la ausencia de compuestos fitoquímicos posiblemente tóxicos (alcaloides, cianógenos y saponinas).

2.- De los extractos de hoja de mezquite (*Prosopis velutina*) obtenidos utilizando distintos solventes (etanol; etanol-agua, 1:1; agua) y temperaturas (35, 50 y 65°C), el extracto etanólico obtenido a menor temperatura (EEM a 35°C), presentó mayor contenido de FT y FvT, y mejores propiedades antioxidantes (DPPH• y ABTS<sup>•+</sup>). Así mismo, la actividad antimicrobiana (G+: *Listeria innocua* y *Staphilococcus aureus*, y G-: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), pudiera estar relacionada con la composición del EEM a 35°C, por presentar la mayor concentración de compuestos fenólicos (rutina, ácido rosmarínico, hesperetina y naringenina) los cuales fueron analizados por HPLC.

3.- El extracto EEM a 35°C mostró la mejor capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana *in vitro*, por lo que se seleccionó para su incorporación en hamburguesas de cerdo que fueron almacenadas en refrigeración por 10 días. En esta parte del estudio se encontró que el EEM ejerce efecto protector sobre la calidad de hamburguesas de cerdo frescas almacenadas en refrigeración; incrementando significativamente los valores de pH, mejorando la estabilidad del color (a\* y b\*) y la CRA, así como retrasando la aparición de TBARS, dienos conjugados y la formación de metamioglobina.

4.- El análisis sensorial de las hamburguesas de cerdo frescas, adicionadas con 0.05 y 0.1% de EEM a 35°C, mostró que los mayores cambios en la apariencia, se presentaron en el color en fresco. Mientras que en las cocinadas, se observó que la aplicación de EEM a 35°C, generó mayor jugosidad y aceptabilidad de la textura, principalmente en el producto adicionado con 0.05% de EEM a 35 °C.

5. El EEM puede ser aplicado como agente protector de la calidad de la carne y productos cárnicos, y prevenir los procesos de oxidación durante el almacenamiento en refrigeración, dando la posibilidad de un nuevo aditivo para la industria cárnica.



## 9. ANEXOS

### 9.1 Anexo 1

#### Curva de secado de hojas de mezquite (*Prosopis Velutina*).

El procedimiento de secado de las hojas de mezquite (*Prosopis velutina*), fue posterior a lavado con agua destilada durante una semana, mientras estaban distribuidas sobre una superficie plana a la sombra a temperatura ambiente (35 °C). Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 1 y 2.

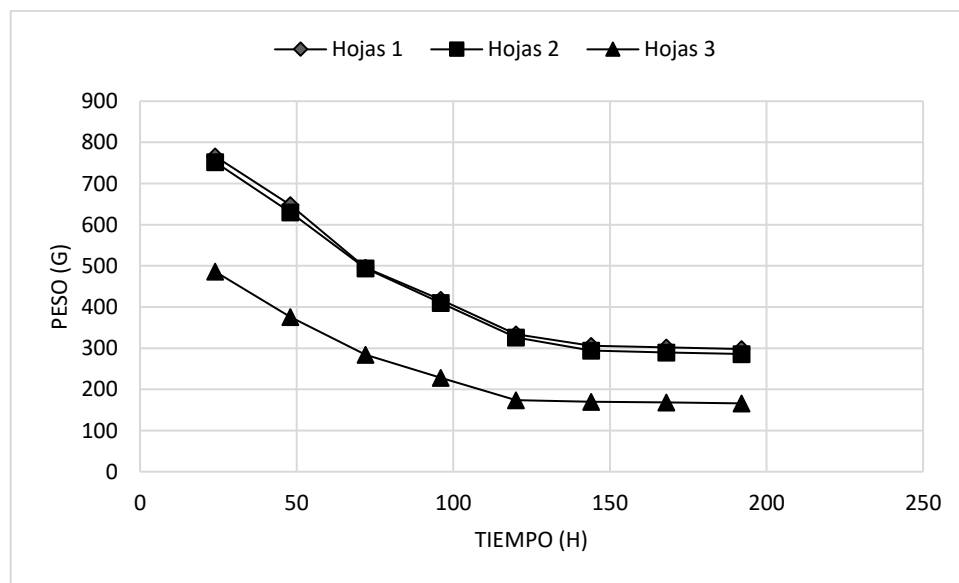


Figura 1. Pérdida de peso de las hojas de mezquite (g) con respecto al tiempo (h) durante el proceso de secado a temperatura ambiente a la sombra.

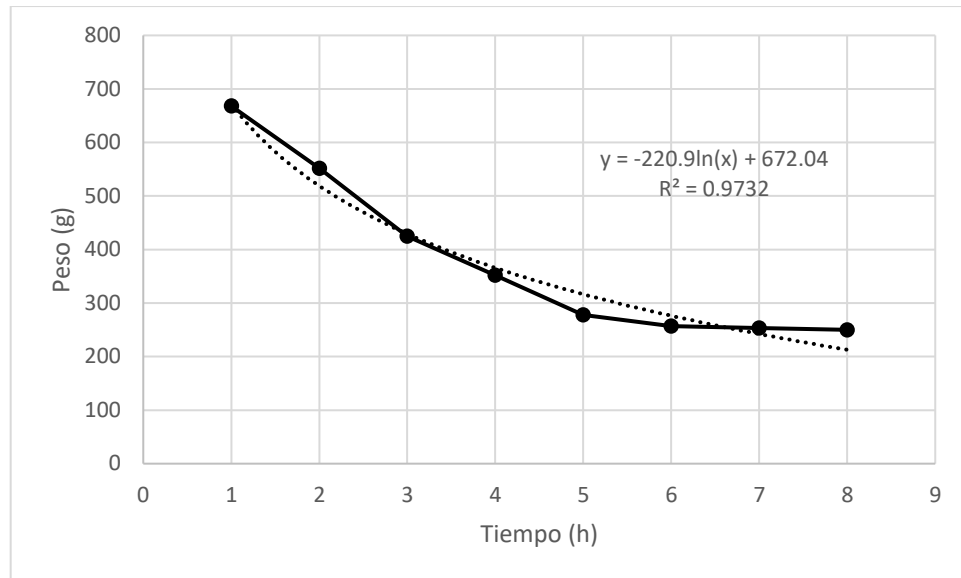


Figura 2. Correlación (R) de los valores de pérdida de peso de las hojas de mezquite (g) con respecto al tiempo (h) y la ecuación obtenida ( $y = -220.9\ln(x) - 672.04$ ).

## 9.2 Anexo 2

### Clarificado de EEM.

Durante la obtención de los extractos se presentó una coloración verde, principalmente en el EEM, el cual al ser adicionado en carne de cerdo afectó su color, manifestándose tonalidades verdosas. Para intentar eliminar este color verde, se realizó un procedimiento de decoloración mediante carbón activado para clarificar el extracto, a través del procedimiento de filtración por gravedad. El resultado fue que se logró decolorar el extracto mostrando un cambio en  $b^*$ ; de + 0.29 a + 5.9, lo que muestra un color más amarillo a la vista. Sin embargo, el contenido de compuestos fenólicos disminuyó considerablemente, de acuerdo a lo siguiente: ácido rosmarínico, rutina, naringenina y hesperetina en 91, 100, 64 y 92 %, respectivamente. Las Figuras 3, 4 y 5, muestran los resultados de los análisis por HPLC de los compuestos eluídos, posterior al procedimiento de decoloración.

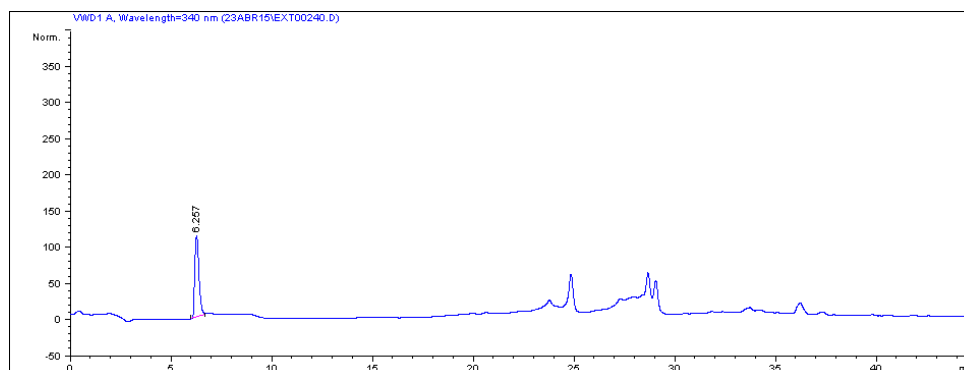


Figura 3. Compuestos eluídos a partir del análisis cromatográfico del extracto EEM, posterior a un procedimiento de filtración por gravedad con carbón activado.

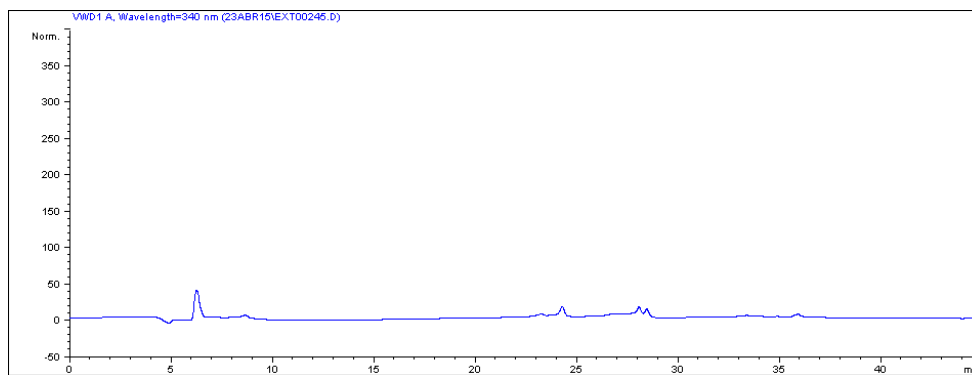


Figura 4. Compuestos eluidos a partir del análisis cromatográfico del extracto EEM, posterior al segundo procedimiento de filtración por gravedad con carbón activado.

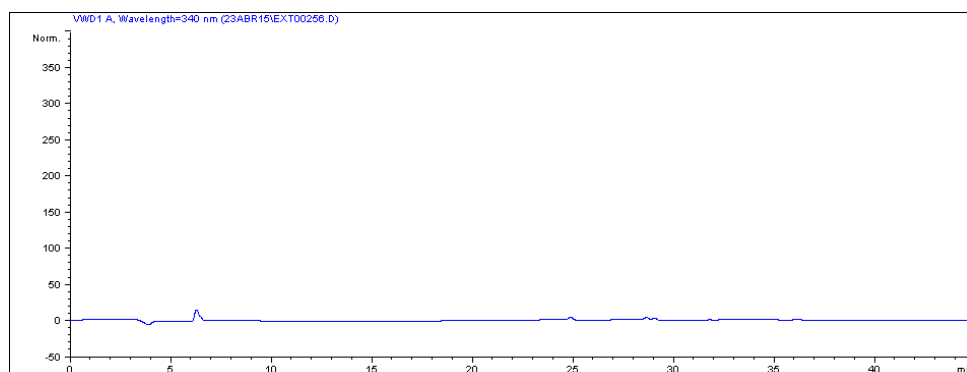


Figura 5. Compuestos eluidos a partir del análisis cromatográfico del extracto EEM, posterior al tercer procedimiento de filtración por gravedad con carbón activado.