

Potencial antioxidante y Actividad antimicrobiana de extractos de hojas de Mistol (*Zizyphuz mistol*), Algarrobo blanco (*Prosopis alba*) y Tusca (*Acacia aroma*) procedentes de Santiago del Estero, Argentina

Antioxidant potential and antimicrobial activity of leaf extracts of Mistol (*Zizyphuz mistol*), Algarrobo blanco (*Prosopis alba*) and Tusca (*Acacia aroma*) from Santiago del Estero, Argentina

Ruiz, S. C.^{1*}, García, E. M.², Nediani, T.³, Zimerman, M.⁴, Nazareno, M. A.⁵, Martínez, S.⁶

¹ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Santiago del Estero (EEASE). Mail: ruiz.silvana@inta.gob.ar

² Instituto de Ciencias Químicas (ICQ), Facultad de Agronomía y Agroindustria, Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA- UNSE). Mail: marian_sgo@yahoo.com.ar

³ Facultad de Agronomía y Agroindustria, Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA- UNSE). Mail: tnediani@gmail.com

⁴ Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS), Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Mail: zimerman.maria@inta.gob.ar

⁵ Instituto de Ciencias Químicas (ICQ), Facultad de Agronomía y Agroindustria, Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA- UNSE), CONICET. Mail: manazar2004@yahoo.com

⁶ Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTA), Facultad de Agronomía y Agroindustria, Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA- UNSE). Mail: sandraluz08@gmail.com

* Autor responsable de correspondencia.

Resumen

Las especies leñosas son fuentes de metabolitos secundarios, especialmente de compuestos fenólicos, muy valiosos por sus propiedades bioactivas, razón por la cual el objetivo de este trabajo fue optimizar la extracción de estos compuestos para obtener extractos naturales que puedan ser utilizados como conservantes en productos alimenticios. Se realizó la extracción de compuestos bioactivos de hojas de *Prosopis alba* (AB), *Acacia aroma* (T) y *Zizyphuz mistol* (M) por ultrasonido y agitación con solventes: agua, metanol y etanol; y mezclas: metanol-agua (50:50v/v); etanol-agua (50:50v/v), acetona-agua (70:30v/v). Se evaluó el contenido total de compuestos fenólicos (CFT) y la capacidad antioxidante (CA). Se obtuvo mayor eficiencia en la extracción de CFT en hojas AB asistida por ultrasonido con acetona-agua (70:30v/v) (9,77±1,63 mg Acido Gálico/ g materia seca (MS)). Por el método de DPPH•, la mayor CA se obtuvo en extractos con acetona-agua (70:30v/v) (M:0,36±0,03; AB:0,4±0,04; T:0,39±0,01 g Acido Gálico/100 g MS). Por el método ABTS•+ la mayor CA fue para los extractos de etanol-agua (50:50v/v) en M y AB (0,12±0,01 y 0,11±0,03 M Trolox/100 g MS). No se encontraron diferencias significativas en extractos acetona-agua (70:30v/v) (M:0,09±0,01; AB:0,07±0,01; T:0,09±0,01, M Trolox/100g MS). Se determinó actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar utilizando: *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus*; *S. spp.*, *L. innocua*, *B. cereus*; *M. luteus*. Se observó inhibición media de los extractos frente *S. aureus*, inhibición alta de extractos AB con etanol-agua (50:50v/v) en *S. spp.* Estas especies nativas podrían ser potenciales recursos para ser utilizados como aditivos conservantes naturales.

Palabras claves: *Prosopis alba*, *Acacia aroma*, *Zizyphuz mistol*, compuestos bioactivos, actividad antimicrobiana.

Abstract

Woody species are sources of secondary metabolites, especially of phenolic compounds, very important for their bioactive properties; hence, the aim of this work was to optimize the extraction of these compounds to obtain natural extracts that can be used as preservatives in food products. The extraction of bioactive compounds from *Prosopis alba* (AB), *Acacia aroma* (T) and *Zizyphuz mistol* (M) leaves were used by ultrasound and agitation with solvents: water, methanol and ethanol; and mixtures: methanol-water (50:50v/v), ethanol-water (50:50v/v), acetone-water (70:30v/v). Total phenolic compounds (TPC) and antioxidant compounds (AC) were evaluated. Greater efficiency in the extraction of TPC was obtained in AB leaves by ultrasound method with acetone-water (70:30 v/v) (9,77±1,63 mg Gallic Acid / g dry material (DM)). By the DPPH• method, the highest AC was obtained in acetone-water extracts (70:30v/v) (M:0,36±0,03, AB:0,4±0,04, T:0,39±0,01 g Gallic Acid / 100 g DM). By ABTS•+ method, the highest AC was obtained in ethanol-water extracts (50:50v/v) in M and AB leaves (M:0,12±0,01 and AB:0,11±0,03 M Trolox/100 g DM). No significant differences were found in acetone-water extracts (70:30v/v) (M:0,09±0,01; AB:0,07±0,01; T:0,09±0,01 M Trolox/100g DM). Antimicrobial activity was determined in vitro by agar diffusion method using: *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus*; *S. spp.*, *L. innocua*, *B. cereus*; *M. luteus*. Medium inhibition of extracts against *S. aureus* and high inhibition of AB extracts with ethanol-water (50:50v/v) in *S. spp.* was obtained. These native species could be potential resources to be used as natural preservative extracts.

Keywords: *Prosopis alba*, *Acacia aroma*, *Zizyphuz mistol*, bioactive compounds, antimicrobial activity.

Introduction

En la actualidad la demanda de productos frescos mínimamente tratados ha ido en aumento (Rodríguez Saucedo, 2011) y los consumidores se han vuelto más exigentes al preferir productos con menor agregado de aditivos y conservantes sintéticos (Pérez Chabela, 2008; Kim et al., 2005, Shan et al., 2008), y que además de propiedades nutricionales aporten otras características a la salud como es el caso de los alimentos funcionales (Rodríguez Saucedo, 2011).

El mercado busca obtener productos alimenticios de calidad a través del control de las distintas etapas del proceso productivo, desde la obtención, conservación y presentación de los mismos para mejorar y preservar las características organolépticas, prolongar su vida útil y garantizar que su consumo no cause daños a la salud humana (Hernández Bautista y Ríos Rincón 2010).

Las formas de deterioro más importantes que presentan los alimentos son la oxidación de las grasas, así como también las alteraciones producidas por microorganismos, lo cual representa el factor limitante de la vida útil de muchos de ellos. Para evitar estos tipos de daños, las industrias alimentarias utilizan diferentes técnicas, que van desde el envasado al vacío hasta el uso de sustancias con propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Ibañez et al., 2003; Rodríguez Saucedo, 2011).

Los antioxidantes pueden ser sintéticos o naturales, sin embargo, el uso de antioxidantes sintéticos tales como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ), entre otros, está siendo muy cuestionado y son cada vez menos utilizados en los alimentos por el riesgo que pueden generar en la salud de los consumidores (Sánchez Escalante et al., 2008), mientras que los antioxidantes naturales son obtenidos de fuentes vegetales como hojas, tallos o frutos; y los antimicrobianos naturales son obtenidos de fuentes animales y microbianas (Tajkarimi et al., 2010; Kunyanga et al., 2012; Kim et al., 2013; Velioglu et al., 1998; Isaza Maya et al. 2013). Entre los compuestos antioxidantes se destacan los compuestos fenólicos, un amplio grupo de moléculas que se caracterizan por poseer un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo (OH) (Morales Gómez, 2011).

Los agentes antimicrobianos también son utilizados para controlar el proceso de deterioro de los alimentos, minimizando o inhibiendo el crecimiento de microorganismos, incluidos los microorganismos patógenos (Tajkarimi et al., 2010). De esta manera el crecimiento microbiano durante el almacenamiento puede reducirse prolongando la vida útil y manteniendo la inocuidad y seguridad del alimento (Gomez y Lorenzo, 2012).

El uso de plantas o partes de ellas es una alternativa económica ya que éstas son una fuente importante para la obtención de extractos vegetales con actividad antioxidantes y antimicrobiana (Rodríguez Pedroso et al., 2012). Se han encontrado numerosas investigaciones en plantas medicinales y comestibles cuyo objetivo es la obtención de compuestos bioactivos (Sánchez et al., 2010; Arias Toledo, 2009; Ardoino et al., 2013).

Santiago del Estero es una de las provincias que integra el Gran Chaco Americano, rica en vegetación que se caracteriza por presentar diversas especies nativas tales como Algarrobo blanco (*Prosopis alba*), Tusca (*Acacia aroma*) y Mistol (*Zizyphuz mistol*) (Araujo et al., 2008), entre otras. Estas son especies que cuentan con una gran cantidad de sustancias bioactivas en sus diferentes tejidos, tales como hojas, tallos, frutos, lo cual permite ser considerada una fuente interesante de obtención de conservantes naturales e ingredientes con capacidades antioxidantes y antimicrobianas (Tamayo et al., 2008; Colares y Arambarri, 2008; Arias et al., 2004; Corzo et al., 2009).

Se han desarrollado numerosas investigaciones respecto a la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas a partir de diversas fuentes naturales (Rodríguez- Carpena et al., 2011; Rodríguez Saucedo 2011; Kim et al., 2013; Fernández López et al., 2005; Armenteros et al., 2013; Cando et al., 2014; Ganhão et al., 2011; Utrera et al., 2015). García et al., (2017) han estudiado la actividad biológica de un tipo de antioxidante, taninos condensados, de las especies leñosas utilizadas en el presente trabajo, para ser utilizadas en la alimentación de ganado caprino, sin embargo, no se conoce información como conservantes en alimentos.

El objetivo del presente trabajo fue optimizar la extracción de compuestos fenólicos, antioxidantes antimicro-

crobianos de hojas de especies leñosas: Algarrobo blanco, Mistol y Tusca, a partir de la utilización de dos métodos de extracción: agitación y ultrasonidos, con diferentes solventes en distintas proporciones y de esta manera optimizar la extracción de hojas de una especie que pueda ser utilizada como conservante en alimentos.

2. Materiales y métodos

2.1. Recolección de la materia prima:

Se colectaron al azar hojas frescas de *Prosopis alba* (Algarrobo blanco, AB), *Acacia aroma* (Tusca, T) y *Zizyphuz mistol* (Mistol, M), tres plantas distintas por cada especie (García et al., 2017), procedentes del Campo Anexo Experimental "Francisco Cantos" perteneciente a la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Santiago del Estero; durante los meses de noviembre y diciembre de 2015, a partir de las cuales se trabajó con una muestra compuesta por cada especie. Las mismas se cosecharon verdes y secaron a temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C, dispuestas en papel absorbente en habitaciones cerradas; luego se molieron, envasaron y congelaron hasta su procesamiento.

2.2. Preparación de los extractos:

Los compuestos bioactivos se extrajeron en el Instituto de Ciencias Químicas (ICQ) de la FAyA, UNSE, a partir del material vegetal mediante el uso de diferentes solventes o mezclas de solventes y diferentes métodos, con el fin de optimizar la extracción y establecer cuál de ellos mejora la eficiencia en la extracción de dichos compuestos. Se prepararon 10 ml de extractos de cada especie al 1%, utilizando los solventes y proporciones que se detallan a continuación: agua destilada (100%), etanol- agua (50:50 v/v), etanol (100%), metanol: agua (50:50 v/v), metanol (100%) y acetona- agua (70:30 v/v). Los métodos de extracción, se describen a continuación:

•Extracción por agitación:

El material vegetal fue sometido a un proceso de agitación a 20 °C durante 1 hora, utilizando un agitador magnético (Decalab S.R.L). Posteriormente, se lo centrifugó a 3000 x g durante 15 minutos, el sobrenadante se transvasó a un matraz de 10 ml y enrasó. Los extractos fueron preparados por duplicado y conservados en refrigeración en frascos de color caramelo hasta su análisis.

•Extracción por ultrasonido:

El material vegetal fue sometido a períodos de 15 min de ultrasonido refrigerado durante 1 hora, utilizando ultrasonido (Branson 2210). Posteriormente, se centrifugó a 3000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se transvasó a un matraz de 10 ml y enrasó. Los extractos fueron preparados por duplicado y conservados en frascos de color caramelo en refrigeración hasta su análisis.

2.3. Determinación del Contenido Total de Compuestos Fenólicos:

La determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) se realizó por el método de Folin- Ciocalteu siguiendo la metodología de Singleton y Rossi (1965). La absorbancia, medida a 725 nm, fue determinada por triplicado utilizando un espectrofotómetro UV- visible (JENWAY 7315). Los resultados fueron expresados como mg de Ácido Gálico/ g de materia seca (MS).

2.4. Determinación de la Capacidad antioxidante in vitro:

•Ensayo de decoloración del radical libre del 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•):

Se realizó por el método descrito por Ozgen et al., (2006). La absorbancia, medida a 515 nm, fue determinada por triplicado utilizando un espectrofotómetro UV- visible (JENWAY 7315). La actividad antioxidante se expresó como mg de Ácido Gálico/ g de materia seca (MS).

•Ensayo de decoloración del catión del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico (ABTS•+):

Se realizó por el método descrito por Ozgen et. al., (2006). La absorbancia, medida a 734 nm, fue determinada por triplicado utilizando un espectrofotómetro UV- visible (JENWAY 7315). Los resultados fueron expresados en mM de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) por gramo de materia seca (MS).

2.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro:

2.5.1. Cepas y condiciones de cultivo bacteriano:

Se utilizó un total de siete cepas bacterianas para evaluar los efectos antimicrobianos de los extractos de hojas de especies nativas: T, M y AB. Estas corresponden a cinco cepas de bacterias Gram positivas: *Staphylococcus* spp (*S. spp*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Listeria innocua* (*L. innocua*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*) y *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) y dos bacterias Gram negativas: *Salmonella* sp y *Escherichia coli* (*E. coli*). Todas las cepas utilizadas son conocidas como patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos en productos cárnicos, y fueron aportadas por la Cátedra de Microbiología correspondiente al departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero.

Se utilizaron cultivos de bacterias jóvenes activadas por inoculación en Infusión Cerebro Corazón (Caldo BHI, Britania, Argentina). Para ello, se transfirieron 10 µl de cultivo en 10 ml de caldo BHI y se incubaron a 37 °C durante 24 horas con el fin de obtener células en fase exponencial.

2.5.2. Método de difusión en agar:

La actividad antibacteriana de los extractos se determinó utilizando el método de difusión en agar descrito por Rodriguez Carpena et al., (2011). Para lo cual, 100 µl del cultivo de bacterias que contienen >10⁶ UFC/ml, medida con la escala de Mc Farland, se extendieron en placas de petri con agar BHI mediante siembra en césped. Se impregnaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro, previamente esterilizados, con 20 µl de cada extracto, los cuales se colocaron posteriormente en las placas inoculadas con las diferentes cepas. Se utilizó como control positivo discos de 5 µg Ciprofloxacina, y como control negativo los solventes y mezclas de solventes utilizados en la preparación de los extractos, con el fin de establecer si los mismos tienen efecto antimicrobiano en las diferentes cepas estudiadas. El análisis se realizó por triplicado y las placas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 24 hs. La actividad antimicrobiana se determinó sobre la zona de inhibición (zona clara) producida alrededor de los discos, medido con un calibre digital. Los resultados se expresaron de acuerdo al grado de inhibición obtenida en: - : sin inhibición, +: inhibición baja, ++: inhibición media, +++: inhibición alta.

2.6. Análisis estadístico:

Se trabajó con un diseño factorial 3x6, donde el factor A corresponde a las especies vegetales, con tres niveles: M, T y AB, el factor B a los solventes de extracción con 6 niveles: 100% agua, 100% etanol, etanol- agua (50: 50 v/v), 100% metanol, metanol- agua (50: 50 v/v) y acetona- agua (70: 30 v/v). Para ello se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ij}^k = \mu + A_i + B_j + ABC_{ij} + \epsilon$$

Donde:

es la observación de las variables respuestas correspondiente al i-ésimo nivel del factor A, al j-ésimo nivel del factor B y al m-ésimo nivel del factor C (para el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante)

μ es la media general

A_i es el efecto fijo debido al i-ésimo nivel de la especie vegetal (i:1, 2 y 3).

B_j es el efecto fijo debido al j-ésimo nivel de solventes y mezclas de solventes (j: 1, 2,3,4,5,6).

B_{ij} es el efecto fijo debido al ij-ésimo nivel de la interacción especie vegetal x solvente (i: 1,2, 3; j: 1,2,3,4,5,6)

ϵ_{ij} es el error o residuo del modelo.

La comparación de medias se realizó a través de un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando la prueba de Tukey como test a posteriori. Las diferencias fueron consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. Para el análisis de datos se utilizó el software estadístico InfoStat versión Professional, 2017 (Di Rienzo et al., 2017).

3.Resultados y discusión

3.1.Compuestos fenólicos totales:

En la Tabla 1 se muestra el CFT de los extractos de las especies M, T y AB obtenidos por diferentes métodos de extracción, solventes y mezclas de solventes.

De los resultados obtenidos se observa que en la extracción por agitación de los compuestos bioactivos fueron más eficientes las mezclas acetona- agua (70: 30 v/v) y metanol- agua (50: 50 v/v), siendo mayor con la mezcla acetona: agua para las tres especies estudiadas. Por otro lado, en la extracción por ultrasonido las mezclas de acetona y etanol con agua resultaron ser más efectivas, obteniendo con acetona mayor cantidad de compuestos fenólicos en hojas M y AB. Si bien con metanol se obtuvieron buenos resultados tanto en extracciones por ultrasonido como por agitación, según diversos autores (Fernández Agulló et al., 2013, Zhou et al., 2004 y Polorný et al., 2001) no es un solvente GRAS (por sus siglas en inglés Generally Recognised as Safe), por lo que no sería un solvente adecuado para realizar este tipo de extracción; además, por la toxicidad que podría obtenerse en estos extractos, consideran conveniente sustituir el metanol por etanol. Los resultados han indicado que el solvente más eficiente para la extracción de compuestos fenólicos en hojas T, AB y M fue acetona-agua en la proporción 70:30, lo cual coincide con lo informado por Michiels et al., (2012), quienes indicaron que las mezclas de solventes con base de acetona extraen una mayor cantidad de compuestos fenólicos que otras mezclas. Diversos autores (Upadhyay et al., 2013; Ojito Ramos et al., 2012; Yung et al., 2014; Fernández Agulló et al., 2013; Zhou et al., 2004; Tomson et al., 2012; Michiels et al., 2012) indicaron que la gran variabilidad obtenida en los contenidos de compuestos fenólicos de los extractos se debe básicamente al tipo de solvente empleado, las proporciones de los mismos, la relación solvente- sólido, la temperatura de extracción y especialmente el material a extraer, esto último se refleja claramente en las hojas estudiadas, al observar que, independientemente del método de extracción las hojas de AB y M presentaron mayor CFT.

Por otro lado, si se comparan los resultados obtenidos en función de los métodos de extracción con acetona-agua (70: 30 v/v) (mejor solvente de extracción), las diferencias fueron significativas ($p = 0,0219$), obteniendo mejores resultados por ultrasonido que por agitación. Esto coincide con lo indicado por Azuola et al., (2007), quienes han comprobado que el método de extracción por ultrasonido es más eficiente en comparación con otros métodos tradicionales.

No se encontraron muchos estudios, en la bibliografía consultada, que informen trabajos realizados en hojas de las especies que aquí se analizan. Colares y Arambarri (2008), han realizado solo pruebas rápidas de determinación de taninos en M, donde comprobaron la presencia de los mismos, así como también García et al., (2017), quienes determinaron taninos condensados en las tres especies M, T y AB. Por su parte Arias et al., (2004), evaluaron el CFT en hojas de T, a partir de extractos de etanol- agua (60: 40 v/v) mediante diversas formas de extracción (maceración, lixiviación, decocción), obteniendo un mayor cantidad de estos compuestos por lixiviación (10 mg cumarina/ ml extracto).

3.2.Capacidad antioxidante in vitro:

En función de los resultados obtenidos en el punto anterior, para la determinación de la capacidad antioxidante, se trabajó con extractos obtenidos por ultrasonido, y si bien se utilizó acetona como solvente de extracción también se seleccionó etanol- agua (50: 50 v/v) por ser el segundo más eficiente en este tipo de extracción. Se descartó los extractos en metanol por no ser GRAS.

Los resultados obtenidos en la determinación de capacidad antioxidante (CA) por los métodos DPPH• y ABTS•+ se presentan en la Tabla 3.

En la tabla 3 se puede observar que la mayor CA de los extractos determinada por el método de ABTS•+ se

obtuvo en extractos de M y AB con etanol- agua (50: 50 v/v), mientras que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) con acetona- agua (70: 30 v/v) para las especies estudiadas. Por otro lado, la CA determinada por el método de DPPH•, fue mayor con extractos de acetona- agua (70: 30), no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las especies T, M y AB. La discrepancia en los resultados obtenidos frente a los distintos solventes de extracción y métodos de medición utilizados puede deberse a los diferentes mecanismos de reacción, al tipo de compuestos bioactivos extraídos y a las especies vegetales estudiadas (Yung et al., 2014; Zhou et al., 2004).

3.3. Actividad antimicrobiana in vitro:

La actividad antibacteriana de los extractos de hojas nativas se presenta en la Tabla 4. Se puede observar que las bacterias Gram positivas: *B. cereus*, *L. innocua*, *M. luteus*, fueron resistentes frente a los extractos estudiados, ya que no se observó inhibición; mientras que la cepa de *S. aureus* fue más sensible, en comparación con las otras cepas Gram positivas evaluadas, en la cual se destaca una inhibición media en los extractos naturales evaluados. Por otro lado, el análisis de los resultados ha manifestado que los extractos de AB con etanol- agua (50: 50 v/v) presentaron inhibición alta frente al crecimiento de *S. spp.* En lo que respecta a las bacterias Gram negativas: *E. coli* y *Salmonella spp.*, las inhibiciones de los extractos fueron de baja a nula.

Según la bibliografía consultada las diferencias observadas en la actividad antibacteriana de los extractos se puede atribuir a que las bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas (Kim et al., 2013), ya que estas últimas cuentan con una membrana externa de peptidoglicano que ejerce un efecto protector adicional (Ramírez et al., 2007; Rodríguez Carpena et al., 2011; Arias et al., 2004). Además, los extractos de estas hojas nativas son ricos en compuestos fenólicos, los cuales presentan en su estructura un núcleo aromático con grupos funcionales polares (OH-, grupos hidroxilos). La posición y el número de estos grupos OH- en los compuestos fenólicos pueden influir en su actividad antimicrobiana, de manera tal que cuanto mayor sea su hidroxilación, mayor será su efecto antimicrobiano (Tamayo et al., 2008; Colares y Arambarri 2008; Arias et al., 2004; Shan et al., 2008; Domingo y Brea 2003). Los compuestos fenólicos también están implicados en la inactivación de proteínas e influyen en la replicación del ADN bacteriano, interrumpiendo, de esta manera, la función protectora de las membranas celulares bacterianas (Pelczar et al., 1988 citado por Kim et al., 2013), lo que podría causar una alteración morfológica considerable y daños en las bacterias, ejerciendo así su efecto bacteriostático o bactericida (Shan et al., 2008). Esto explicaría los efectos inhibitorios que presentaron los extractos estudiados en las cepas de *S. aureus* y *S. spp.* Por todo lo expuesto, es posible advertir que el uso de extractos obtenidos de fuentes naturales podría prevenir la descomposición microbiológica de los alimentos, inhibiendo o retardando el crecimiento de microorganismos patógenos, lo que podría contribuir a prolongar su vida útil (Dermici et al., 2008).

4. Conclusiones:

Los resultados obtenidos mostraron que tanto la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante estuvieron influenciados por la especie vegetal estudiada y las proporciones y tipo de solvente empleado. La extracción con acetona- agua (70:30 v/v) fue más eficiente para la obtención de compuestos fenólicos en hojas AB y M, independientemente del método de extracción utilizado y si bien el potencial antioxidante estuvo influenciado por el método empleado en la determinación; por el método de DPPH• la mezcla de solvente más eficiente también fueron las de acetona- agua (70: 30 v/v) en todas las especies evaluadas. Con respecto a la actividad antimicrobiana, si bien se ha encontrado un cierto grado de inhibición para las cepas de *Staphylococcus* evaluados, se considera necesario realizar un estudio más exhaustivo, utilizando cepas de referencias. Este trabajo forma parte de un ensayo exploratorio de una tesis doctoral, por lo que se considera necesario continuar con investigaciones que permitan ampliar las conclusiones que aquí se mencionan. En una segunda instancia, sería útil determinar la inocuidad de los extractos con el fin de descartar posibles efectos negativos para el organismo humano, de manera tal que los extractos obtenidos puedan ser utilizados como aditivos conservantes capaces de extender la vida útil de productos alimenticios.

Tabla 1: Contenido total de compuestos fenólicos en extractos de Tusca, Mistol y Algarrobo blanco obtenidos por agitación con diferentes solventes.

	Mistol	Algarrobo blanco	Tusca
Acetona 70%	8,62 ± 0,35 ^{ab}	9,29±0,55a	6,56±0,76cd
Etanol 100%	1,20 ± 0,58 ^{ef}	2,32±0,69e	1,62±0,15ef
Etanol 50%	1,27±0,11ef	1,48±0,12ef	1,49±0,42ef
Metanol 100%	0,85±0,23f	1,39±0,08ef	0,90±0,12f
Metanol 50%	7,56±0,80bc	8,43±1,55ab	5,23±0,25d
Agua 100%	0,79±0,10f	1,16±0,35ef	0,51±0,06f

Datos expresados en mg Acido Gálico/ g MS: promedio ± desviación estándar (DE). Medias con letras distintas (a-f) son significativamente diferentes ($p<0,05$) en la interacción doble solvente* material vegetal.

Tabla 2: Contenido total de Compuestos fenólicos en extractos de Tusca, Mistol y Algarrobo blanco obtenidos por ultrasonido con diferentes solventes.

	Mistol	Algarrobo blanco	Tusca
Acetona 70%	9,88±1,29a	9,77±1,63a	7,82±0,61abc
Etanol 100%	4,65±0,89ef	3,63±0,73ef	5,59±2,62cdef
Etanol 50%	7,58±0,54abcd	7,28±0,89abcde	4,89±0,61def
Metanol 100%	6,59±0,72bcde	8,65±0,85ab	7,76±1,94abc
Metanol 50%	6,53±0,84bcde	7,14±0,34abcde	5,26±0,34cdef
Agua 100%	1,54±0,24gh	1,34±0,37gh	0,63±0,12h

Datos expresados en mg Acido Gálico/ g MS: promedio ± desviación estándar (DE). Medias con letras distintas (a-h) son significativamente diferentes ($p<0,05$) en la interacción doble solvente* material vegetal.

Tabla 3: Capacidad antioxidante de los extractos de hojas de Mistol, Algarrobo blanco y Tusca.

		ABTS**A	DPPH*B
Mistol	Acetona 70%	0,09±0,01bc	0,36±0,03abc
	Etanol 50%	0,12±0,01a	0,21±0,01d
Algarrobo blanco	Acetona 70%	0,07±0,01cd	0,4±0,04a
	Etanol 50%	0,11±0,03ab	0,33±0,03bc
Tusca	Acetona 70%	0,09±0,01bc	0,37±0,05ab
	Etanol 50%	0,06±0,01d	0,31±0,05c

Datos expresados como promedio ± desviación estándar (DE). Medias con letras distintas (a-d) son significativamente diferentes ($p<0,05$) para la interacción solvente* especie vegetal en una misma columna. A: M Trolox/ 100 g MS. B: g Ácido Gálico/ 100 g MS.

Tabla 4: Actividad antimicrobiana in vitro de extractos de hojas de Mistol, Tusca y Algarrobo blanco.

Actividad antimicrobiana in vitro							
Cepas Microbianas/ Antimicrobianos	<i>Salmonella</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Listeria innocua</i>
A	+	-	++	-	-	-	-
B	-	-	++	+++	-	-	-
C	+	-	++	-	-	-	-
D	-	-	++	-	+	-	++
E	+	-	++	-	-	-	-
F	-	-	++	-	-	++	+
C1	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-	-	-
CIP	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

-: sin inhibición, +: inhibition baja, ++: inhibition media, +++: inhibition alta. A: Extractos de Algarrobo blanco con acetona- agua (70: 30), B: Extractos de Algarrobo blanco con etanol- agua (50: 50), C: Extractos de Mistol con acetona- agua (70: 30), D: Extractos de Mistol con etanol- agua (50: 50), E: Extractos de Tusca con acetona- agua (70: 30), F: Extractos de Tusca con etanol- agua (50:50), C1: etanol- agua (50: 50), C2: acetona- agua (70:30), CIP: Ciprofloxacina.

5. Agradecimientos:

Este Trabajo fue financiado por Proyectos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA): TUSGO- 1231205- Contribución al desarrollo integral de Oeste de Santiago del Estero y PNAIyVA 1120032: Proyecto Nacional de Agregado de Valor y Agroindustria, Tecnologías de Transformación de Alimentos. Proyectos de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE) N° 23/A186: Producción caprina en sistemas sustentables, costos y calidad de carne. Se agradece la contribución de los laboratorios de Antioxidantes y Procesos Oxidativos y Microbiología de la UNSE.

6. Referencias:

- Araujo, P, Iturre, MC, Acosta, VH, Renolfi, RF. (2008) Estructura del bosque de "La María" EEA INTA Santiago del Estero. *Quebracho* 16: 5-19.
- Ardoino, SM, Boeris, MA, Toso, RE. (2013) Caracterización fisicoquímica de *Prosopis var. Flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa var. Depressa* (alpataco), plantas y acción farmacológica. *Revista Ciencias Veterinarias* 15: 115-125.
- Arias, ME, Gómez, JD, Cudmani, NM, Vattuone, MA, Isla, MI. (2004) Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn. *Life Sciences* 75: 191-202.
- Arias Toledo, B. (2009) Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 5: 389-401.
- Armenteros, M, Morcuende, D, Ventanas, S, Estévez, M. (2013) Application of Natural Antioxidants from Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) and Dog Rose (*Rosa canina* L.) to Frankfurters Subjected to Refrigerated Storage. *Journal of Integrative Agriculture* 12: 1972-1981.
- Azuola, R, Vargas- Aguilar, P. (2007) Extracción de sustancias asistida por ultrasonidos (EUA). *Tecnología en marcha*, 20: 30-40.
- Cando, D, Morcuende, D, Utrera, M, Estévez, M. (2014) Phenolic-rich extracts from Willowherb (*Epilobium hirsutum* L.) inhibit lipid oxidation but accelerate protein carbonylation and discoloration of beef patties. *Eur*

Food Res Technol 238: 741–751.

Colares, MN, Arambarri, AM. (2008) *Ziziphus mistol* (Rhamnaceae): Morfo-anatomía y Arquitectura Foliar. *Latin American Journal of Pharmacy* 27: 568-77.

Corzo, AG, Bravo, E, Serrano, F, Vattuone, A. (2009) Actividad antibacteriana de extractos de hojas de *Prosopis alba*, Griseb, frente a cepas patógenas humanas y fitopatógenas. *Quebracho* 17: 106-114.

Demirci, F, Guven, K, Demirci, B, Dadandi, MY, Baser, KHC. (2008) Antimicrobial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Control* 19: 1159- 1164.

Di Rienzo, JA., Casanoves, F, Balzarini, MG, Gonzalez, L, Tablada, M, Robledo, CW. (2017) Software estadístico InfoStat, versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Domingo, D, Lopez- Brea, M. (2003) Plantas con acción antimicrobiana. *Research Gate Rev. Esp. Quimioterp* 16: 385- 396.

Fernández Agulló, A, Pereira, E, Freire, MS, Valentão, P, Andrade, PB, González Álvarez, et al., (2013) Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) Green husk extracts. *Industrial crops and products* 42: 126-123.

Fernández López, J, Zhi, N, Aleson Carbonell, L, Pérez Alvarez, JA, Kuri, V. (2005) Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science* 69: 371- 380.

Ganhão, R, Estévez, M, Morcuende, D. (2011) Suitability of the TBA method for assessing lipid oxidation in a meat system with added phenolic-rich materials. *Food Chemistry* 126: 772–778.

García, ME, Cherry, N, Lambert, BD, Muir, JP, Nazareno, MA, Arroquy, JL. (2017) Exploring the biological activity of condensed tannins and nutritional value of tree and shrub leaves from native species of the Argentinean Dry Chaco. *J. Sci Food Agric* 97: 5021-5027.

Gómez, M, Lorenzo, JM. (2012) Effect of packaging conditions on shelf-life of fresh foal meat. *Meat Science* 94: 513-520.

Hernández Bautista, J, Río Rincón, GF. (2010) ¿Calidad de carne o carne de calidad? *Nacameh*, 4: 1-10.

Ibáñez, FC, Torre, P, Irigoyen, A (2003) Aditivos alimentarios. Disponible en <https://muybio.com/wp-content/uploads/2012/10/aditivos-alimentarios.pdf>.

Isaza Maya, YL, Restrepo Molina, DA, López Vargas, JH. (2013) Oxidación lipídica y antioxidantes naturales en derivados cárnicos. *Journal of Engineering and Technology* 2: 2256- 3903.

Kim, YS, Hwang, ChS, Shin, DH. (2005) Volatile constituents from the leaves of *Polygonum cuspidatum* S et. Z. and their antibacterial activities. *Food Microbiology* 22: 139- 144.

Kim, SJ, Cho Ah, R, Han, J. (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of leafy Green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food control* 29: 112-120.

Kunyanga, CN, Imungi, JK, Okoth, MW, Biesalski, HK, Vadivel, V. (2012) Total phenolic content, antioxidant and antidiabetic properties of methanolic extract of raw and traditionally processed Kenyan indigenous food ingredients. *LWT. Food Science and Technology* 45: 269- 276.

Michiels, JA, Kevers, C, Pincemal, J, Defraifne, JO, Dommes, J. (2012) Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food chemistry* 130: 986- 993.

Morales Gómez, P. (2011) Vegetales silvestres de uso alimenticio: determinación de compuestos bioactivos y valoración de la capacidad antioxidante. Memoria para optar el grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina, departamento de nutrición y farmacia. ISBN: 978- 84- 695- 1009- 4. Disponible en <http://eprints.ucm.es/14444/>.

Ojito Ramos, K, Herrera Sánchez, Y, Vega Pérez, N, Portal Villafaña, OC. (2012) Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp (*Rutaceae*). *Revista cubana de plantas medicinales* 17: 368- 379.

Ozgen, M, Reese, NR, Tulio, AZJ, Scheerens, JC, Miller, AR. (2006) Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoli-

ne-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2 ϕ -Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 1151- 1157.

Pérez Chabela, ML. (2008) *Probióticos en productos cárnicos. Nacameh 2: 56-62.*

Polorný, J, Korczak, J. (2001) *Preparation of natural antioxidants. Food Science 311-327.*

Ramirez, LSA, Diaz, HEB. (2007) *Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del Ruibarbo (Rumex conglomeratus). Scientia et Technica 33: 397-400.*

Rodríguez Carpena, JG, Morcuende, D, Andrade, MJ, Kylli, P, Estéves, M. (2011) *Avocado (Persea americana Mill) Phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. Journal Agricultural and Food Chemistry 59: 5625- 5635.*

Rodríguez Pedroso, AT, Ramirez Arrebato, MA, Bautista Baños, S, Cruz, TA, Rivero, D. (2012) *Actividad anti-fúngica de extractos de Acacia farneciana sobre el crecimiento in vitro de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. Revista científica UDO Agrícola 12: 91-96.*

Rodríguez Saucedo, EN. (2011) *Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable 7: 153-170.*

Sánchez Escalante, A, Torrescano Uttutia, GR, Camou Arriola, JP, González Méndez, NF, Hernández Watanabe, G. (2008) *Sistema combinados de conservación para prolongar la vida útil de la carne y los productos cárnicos. Nacameh 2: 124- 159.*

Sánchez, E, Garcia, S, Heredia, N. (2010) *Extracts of Edible and Medicinal Plants Damage Membranes of Vibrio cholerae. Applied and Environmental Microbiology 76: 6888-6894.*

Shan, B, Cai, YZ, Brooks, JD, Corke, H. (2008) *Antibacterial properties of Polygonum cuspidatum roots and their major bioactive constituents. Food Chemistry 109: 530-537.*

Singleton, VL, Rossi, JA (1965) *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic 144-156.*

Tomsone, L, Kruma, Z, Galoburda, R. (2012) *Comparison of different solvents and extraction methods for isolation of phenolic compounds from Horseradish Roots (Armoracia rusticana). International Journal of biological, biomolecular, agricultural, food and biotechnological engineering 6: 236-241.*

Tajkarimi, MM, Ibrahim, SA, Cliver, DO. (2010) *Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21: 1199-1218.*

Tamayo, LMA, Arteaga González, DM, Garcés, YJ. (2008) *Propiedades farmacológicas del Algarrobo (Hymenaea courbaril Linneaus) de interés para la industria de alimentos. Revista Lasallista de Investigación 5: 100-111.*

Upadhyay, R, Jha, A, Singh, SP, Kumar, A, Singh, M. (2013) *Apropiate solvents for extracting total phenolic, flavonoids and ascorbic acid from different kind of millets. Association of Food Scientists & Technologists 52: 472- 478.*

Utrera, M, Morcuende, D, Ganhão, R, Estévez, M. (2015) *Role of phenolics extracting from rosa canina L. on meat protein oxidation during frozen storage and beef patties processing. Food Bioprocess Technol 8: 854-864.*

Yung, D, Yang, G, Yue, J, Qian, B, Lia, Z, Wang, D, Zhong, Y, Zhao, Y. (2014) *Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. Food control 38: 184- 191.*

Zhou, K, Yu, L. (2004) *Effects of extraction solvents on wheat bran antioxidant activity estimation. Lebensm-Wiss u. Technol 37: 717- 721.*