

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN**

**Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo**



**REVALORIZACIÓN DE FRUTOS NATIVOS  
ARGENTINOS. CARACTERIZACIÓN  
QUÍMICA Y FUNCIONAL DE FRUTOS DE  
ALGARROBOS**



**Lic. María Jorgelina Pérez**

Tesis Doctoral para optar al grado académico de

Doctora en Ciencias Biológicas

Dra. María Inés Isla

Directora

**-2017-**

**Autoridades Facultad de Ciencias Naturales e  
I.M.L**

**DECANA**

Dra. Margarita del Valle Hidalgo

**VICEDECANO**

Dr. Hugo Rafael Fernández

**SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS**

Dra. Alejandra Kortsarz

**SECRETARIO DE POSGRADO**

Mag. Pablo José Sesma

# **Honorable Consejo Directivo Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L**

## **PROFESORES TITULARES**

Dr. Rubén Báñez

Dr. Carlos Baied

## **PROFESORES ASOCIADOS Y ADJUNTOS**

Dra. Mirna Hilal

Dr. Pablo López

## **DOCENTES AUXILIARES**

Geol. César Moreno

Arql. Matías Gramajo Buhler

## **EGRESADOS**

Dra. Carmen Reguilón

## **NO DOCENTES**

Sra. Betiana Chamorro

## **ESTUDIANTES**

Srta. María Eugenia Naharro

Sra. María de los Ángeles Lagoria

Sr. Luis Veneziano

# **Trabajo de posgrado para la obtención del grado académico superior de Doctora en Ciencias Biológicas**

## **CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Acreditado y Categorizado A ante la comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)

Resoluciones: n° 615/07 y n° 750/13

### **Director:**

Dr. Atilio Castagnaro

### **Vicedirectora:**

Dra. Lucia Claps

### **Comité Académico:**

Dr. Alfredo Grau

Dr. Raul Pedraza

Dra. Silvina Fadda

**Trabajo de postgrado titulado:**

“REVALORIZACIÓN DE FRUTOS NATIVOS ARGENTINOS.  
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y FUNCIONAL DE FRUTOS DE  
ALGARROBOS”

**Tesista:**

Licenciada en Ciencias Biológicas María Jorgelina Pérez

**Directora:**

Dra. María Inés Isla

**Comisión de supervisión:**

Dra. María Inés Isla

Dra. Marisa Selva Garro - Especialista en el tema

Dra. Adriana Neske - Investigador de otra unidad académica

**Trabajo realizado en:**

Cátedra de Química Orgánica y Biológica “Dra. Roxana M. Ordoñez” de la  
Facultad de Ciencias Naturales

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRON)

Instituto de Bioprospección y Fisiología Vegetal

INBIOFIV- CONICET-UNT)

**INBIOFIV**



**CONICET**

Con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Investigaciones  
Científicas y Tecnológicas (CONICET), la Agencia Nacional de  
Promoción Científica y Técnica (ANPCyT) y el Consejo de Investigaciones  
de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT)

## **AGRADECIMIENTOS**

Probablemente perdimos noción de la importancia de las plantas en el momento en que dejamos de sembrarlas y recolectarlas y empezamos a comprarlas en los mercados. Las plantas nos procuran múltiples beneficios: disfrute sensible, bienestar, entorno saludable, alimento, medicina.

La conservación de las plantas nativas favorece el equilibrio ecosistémico y colabora a mantener nuestra identidad regional. Además, muchas de ellas tienen usos medicinales y alimentarios desconocidos aún.

Por poder llevar a cabo la revalorización, al menos parcial, de una especie vegetal autóctona, que silenciosamente nos aporta tantos beneficios, ¡gracias!

Ante todo, mi primer agradecimiento es para Dios: mi Hacedor, mi Salvador y mi Santificador. Para su Santísima Madre, mi ángel custodio e intercesores.

Gracias a mi patria que me procuro los estudios pertinentes.

Gracias también a mi familia y amigos.

Gracias a mi directora de tesis. Paciente, constante y apasionada. Gracias a mis compañeros y demás miembros del equipo LIPRON. Con su apoyo pude finalizar esta etapa.

**GRACIAS**

## PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES

2014- Polyphenolic compounds and anthocyanin content of *Prosopis nigra* and *Prosopis alba* pods flour and their antioxidant and anti-inflammatory capacities. Pérez, M.J., Cuello, A.S., Zampini, I.C., Ordoñez, R.M., Alberto, M.R., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I. Food Research International, 64, 762-771.

2015- Chilean *Prosopis* Mesocarp Flour: Phenolic Profiling and Antioxidant Activity. Schmeda-Hirschmann, G., Quispe, C., Soriano, M.P.C., Theoduloz, C., Jiménez-Aspée, F., Pérez, M.J., Cuello, A.S., Isla, M.I. Molecules 20, 7017-7033.

2017- *Prosopis nigra* mesocarp fine flour, a source of phytochemicals with potential effect on metabolic syndrome. Pérez, M.J., Zampini, I.C., Alberto, M.R., Isla, M.I. Enviado a Plant Foods for Human Nutrition.

2017- Phytochemistry characterization and antioxidant properties of traditional beverages obtained from *Prosopis alba* pods by inhabitants of Argentina Northwestern. Valdecantos Zech, M.X., Cattaneo, F., Rodriguez, F., Pérez, J., Zampini, C., Isla, M.I. (2017) Enviado a Food Research international.



## **Publicaciones relacionadas al tema de tesis**

2016- Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process. Costamagna, M.S., Zampini, I.C., Alberto, M.R., Cuello, A.S., Torres, S., Pérez, M.J., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I. Food Chemistry 190, 392–402.

2017- Microencapsulated Chañar phenolics: a potential ingredient for functional foods development. Costamagna, M.S., Gómez-Mascaraque, L.G., Zampini, I.C., Alberto, M.R., Pérez, J., López-Rubio, A., Isla, M.I. Journal of Functional Foods. 37, 523–530

## PUBLICACIONES EN CONGRESOS Y JORNADAS NACIONALES E INTERNACIONALES

2013- Contenido de polifenoles de harina de mesocarpo de *Prosopis nigra* y su relación con la actividad antioxidante - Pérez, M.J., Zampini, I.C., Ordoñez, R.M., Cuello, S., Isla, M.I. XI Jornadas de Comunicaciones y III Interinstitucionales de la Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. y la Fundación Miguel Lillo. Monográfica y Didáctica Vol. 53. (ISSN 0327-5868).

2014- Anthocyanins and flavonoid glycosides as bioactive of *Prosopis nigra* mesocarp flour. Pérez, J., Cuello, S., Zampini, I.C., Sayago, J., Alberto M.R., Ordoñez, R.M., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I. XIV Congreso Internacional de Etnofarmacología. (Puerto Varas – Chile, 23-26 de septiembre de 2014).

2014- Caracterización química y actividad antioxidante de *Prosopis Alba* Griseb. de Amaicha del Valle (Tucumán- Argentina) Pérez, M.J., Cuello, A.S., Zampini, I.C., Ordoñez, R.M., Alberto, M.R., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I. IV Congreso Iberoamericano de Productos naturales en Patagonia: La diversidad química y biológica. Universidad Nacional de la Patagonia Austral (Río Gallegos – Argentina 28, 29 y 30 de septiembre 2014).

2015- Potencial uso de un concentrado de polifenoles obtenido de frutos de *Geoffroea decorticans* (chañar) en trastornos inflamatorios, estrés oxidativo y síndrome metabólico. Costamagna, M.S., Pérez, M.J., Cuello, A.S., Zampini, I.C., Alberto, M.R., Torres, S., Salas, A.L., Schmeda, G., Isla, M.I. X Simposio Nacional de Biotecnología (Tucumán – Argentina 2-4 de Setiembre de 2015).

2015- Calidad nutricional y funcional de harinas de mesocarpo, semilla y cotiledón de Algarrobo. Pérez, M.J., Cattaneo, F., Zampini, I.C., Alberto, M.R., Rodriguez, F., Isla, M.I., X Simposio Nacional de Biotecnología (Tucumán – Argentina 2-4 de Setiembre de 2015).

2016- Extractos enriquecidos en polifenoles obtenidos de harinas de algarrobos: sus potencialidades en el tratamiento del síndrome metabólico. Pérez, M.J., Isla, M.I. XXXIX Reunión del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN) y V Jornada ALIMENTOS, NUTRICION Y SALUD “Alimentación, nutrición y cultura en 200 años de historia” (San Miguel de Tucumán, 20 al 22 de octubre de 2016).

2016- Proyecto de extensión: Voluntariado Universitario “Plantas Calchaquíes y Salud”. Docentes: Isla, M.I., Alberto, M.R., Zampini, I.C., Sayago, J., Torres, S., Cuello, S., Quarenghi, M., Martinez Arriazu, M., Heredia, J., Arias, M., Nieva Moreno, M.I., Juarez, B., Lagorria Wilfredo, M. Alumnos: Albornoz, B., Kermes, N., Manzur, M., Tomas Grau, R., López Morales, N, Martinez, F., Alumnos de la Escuela Secundaria Nuestra Señora del Rosario de Colalao del Valle, Pérez, J., Torres Carro, R., Salas, A., Moreno, A., Costamagna, M., Carabajal, A., Gallo, C., Verón, H., Orqueda, E., Rodriguez, F., Cattaneo, F., Nuño, G. Cátedra de Química Orgánica y Biológica. Facultad de Ciencias Naturales e IML.UNT. Publicado en la revista Lapsus Calami Publicación especial Edición 1, pp. 120. ISSN/ISBN: 2422-639X. II° Jornadas de Investigación, Docencia y Extensión en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L.- UNT. San Miguel de Tucumán, 10 y 11 de noviembre de 2016. Presentación: Póster.

2016- Estudio comparativo de polifenoles de harina de semillas de once clones de *Prosopis alba* (algarrobo) cultivados en Santiago del Estero.

Correa Uriburu, M.F., Alberto, M.R., Pérez, M.J., Isla, M.I. Publicado en la revista Lapsus Calami Publicación especial Edición 1, pp. 120. ISSN/ISBN: 2422-639X. II° Jornadas de Investigación, Docencia y Extensión en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L.- UNT. San Miguel de Tucumán, 10 y 11 de noviembre de 2016. Presentación: Póster.

2017- Caracterización de concentrados de polifenoles obtenidos de harina de algarrobo para su uso como ingredientes funcionales o nutracéuticos. Rodriguez, I.F., Pérez, J., Cattaneo, F., Zampini, C., Isla, M.I. XVI congreso cytal argentino de ciencia y tecnología de los alimentos. 7° Simposio internacional de nuevas tecnologías. V Simposio latinoamericano de higiene y calidad de alimentos. 3° Simposio de innovación en industrias alimentarias. Mar del Plata 18-20 septiembre. Presentación: póster.

## Tabla de contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	3
Capítulo 1 : INTRODUCCIÓN.....	5
ESTADO DEL ARTE EN LA NUTRICIÓN.....	5
ALIMENTOS FUNCIONALES Y NUTRACÉUTICOS .....	7
NUTRIENTES Y BIOACTIVOS.....	9
Metabolitos primarios y secundarios en los alimentos de origen vegetal .....	9
Carbohidratos .....	10
Fibras .....	11
Lípidos.....	14
Aminoácidos y derivados .....	15
Compuestos fenólicos .....	16
Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos .....	29
ESTADOS PATOLÓGICOS Y FITOQUÍMICOS BIOACTIVOS .....	33
ESTRÉS OXIDATIVO .....	33
INFLAMACIÓN.....	41
SÍNDROME METABÓLICO.....	45
LEGUMINOSAS COMO ALIMENTOS FUNCIONALES.....	54
EL GÉNERO <i>Prosopis</i> .....	56
Usos del género <i>Prosopis</i> sp. ....	59
<i>Prosopis alba</i> Grisebach .....	63
<i>Prosopis nigra</i> Grisebach Hieronymus .....	65
HARINA DE ALGARROBO.....	69
OBJETIVOS .....	73
OBJETIVOS GENERALES .....	73
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	73
Capítulo 2 : MATERIALES Y MÉTODOS.....	74
2.2. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN NUTRICIONAL.....	76
2.2.1. Extracción y cuantificación de azúcares .....	76
2.2.2. Determinación del contenido de proteína total y contenido aminoacídico ...	77
2.2.3. Determinación del contenido de grasa cruda .....	78
2.2.4. Determinación del contenido de fibra cruda .....	78
2.2.5. Determinación de humedad, cenizas y minerales .....	78
2.3.1. Extracción y determinación de diferentes tipos de compuestos fenólicos....	80

2.3.2. Extracción y determinación del contenido de alcaloides .....	86
2.3.3. Extracción y determinación del contenido de Vitaminas.....	87
2.3.3.2. <i>Extracción y determinación del contenido de carotenoides</i> .....	87
2.4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE HARINAS DE ALGARROBO BLANCO Y NEGRO.....	88
2.4.1. Efecto de los extractos polifenólicos sobre la actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	88
2.4.2. Efecto de los extractos polifenólicos sobre la actividad inhibidora de enzimas relacionadas con la inflamación .....	93
2.4.3. Actividad inhibidora de enzimas relacionadas con el síndrome metabólico	95
2.5. TOXICIDAD .....	97
2.5.1. Evaluación de la toxicidad mediante el ensayo de letalidad con <i>Artemia salina</i> .....	97
2.5.2. Ensayo de mutagenicidad.....	97
2.5.3. Ensayos de citotoxicidad .....	99
2.6. Análisis estadístico .....	100
Capítulo 3 : RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	101
PARTE I .....	103
3.I.1. Composición fitoquímica y actividad biológica de extractos ricos en polifenoles .....	107
3.I.3. Pigmentos presentes en vainas de algarrobos: Antocianinas .....	124
3.I.4. Conclusiones parciales.....	130
PARTE II .....	131
3.II.1. Composición fitoquímica .....	132
3.II.2. Actividades biológicas.....	144
3.II.3. Evaluación de la toxicidad de los extractos de semolina.....	155
3.II.4. Conclusiones parciales .....	160
Capítulo 4 : CONCLUSIONES GENERALES .....	161
REFERENCIAS .....	170

## RESUMEN

Las especies de *Prosopis* son recursos alimentarios de uso ancestral en América del Sur capaces de crecer en ambientes áridos y semiáridos. *Prosopis alba* Grisebach y *Prosopis nigra* [Grisebach] Hieronymus son las especies más abundantes en el centro y noroeste de Argentina. La gran capacidad para tolerar la sequía es debido a que se pueden comportar como freatófitas obligadas o facultativas. Además, es una especie xerofítica y fijadora de nitrógeno. Es por ello por lo que existe un gran interés en el cultivo de estas especies para detener el avance de la desertificación y erosión del suelo en zonas áridas y semiáridas, además de su uso como alimento y medicina.

El objetivo de este trabajo fue determinar la composición nutricional y fitoquímica de las harinas de vainas de *P. alba* y *P. nigra*, así como sus propiedades funcionales. Se demostró que los carbohidratos son los constituyentes principales y, fundamentalmente, acumulan sacarosa. La harina mostró un alto nivel de potasio, calcio y magnesio, fibra cruda y compuestos polifenólicos. Se identificaron C-glicósidos de apigenina y ácidos fenilpropanoides. Las harinas obtenidas de vainas maduras de *P. alba* y las de *P. nigra* mostraron una composición fitoquímica diferente entre especies y similares entre las muestras de la misma especie. Se demostró que el color oscuro de las vainas de *P. nigra* está directamente relacionado con el contenido de antocianina, pigmento fenólico hidrosoluble. Los fitoquímicos fenólicos, tanto libres como ligados, extraídos de ambas especies resultaron activos como antioxidantes, antiinflamatorios e inhibidores de enzimas asociadas al síndrome metabólico. Los resultados obtenidos sugieren que las harinas de vainas de

*Prosopis alba* y *Prosopis nigra* al igual que los extractos ricos en polifenoles o en antocianinas podrían utilizarse como ingrediente funcional.

Nuestro estudio agrega valor a esta especie actualmente subutilizada debido, principalmente, al desconocimiento de sus propiedades químicas, físicas y funcionales y, podría impulsar su propagación, conservación y manejo sustentable en regiones semiáridas y áridas de nuestro país, así como fomentar la alimentación saludable e integral.



## ABSTRACT

*Prosopis* species are ancestral food resources in South America capable of growing in arid and semi-arid environments. *Prosopis alba* Grisebach and *Prosopis nigra* [Grisebach] Hieronymus are the most abundant species in central and northwestern Argentina. The great capacity to tolerate drought is since they can behave as obligatory or optional phreatophytes, in addition it is a xerophytic and nitrogen-fixing species. That is why there is a great interest in the cultivation of these species to stop the advance of desertification and soil erosion in arid and semi-arid zones, in addition to their use as food and medicine.

The aim of this work was to determine the nutritional and phytochemical composition of *P. alba* and *P. nigra* pod meal as well as its functional properties. It was shown that carbohydrates are the main constituents fundamentally, sucrose. The flour showed a high level of potassium, calcium and magnesium, raw fiber and polyphenolic compounds. C-glycosides of apigenin and phenylpropanoid acids were identified. Flours obtained from *P. alba* and *P. nigra* mature pods showed a different phytochemical composition between species and the like among samples of the same species. It was shown that the dark color of the *P. nigra* pods is directly related to the anthocyanin content, water soluble phenolic pigment. Both free and bound phenolic phytochemicals extracted from both species were active as antioxidants, anti-inflammatories and enzyme inhibitors associated with the metabolic syndrome. The results suggest that the pod meal of *Prosopis alba* and *Prosopis nigra*, as well as extracts enriched in polyphenols or anthocyanins, could be used as a functional ingredient.

Our study adds value to this currently underutilized species due mainly to the lack of knowledge of its chemical, physical and functional properties

and could promote its propagation, conservation and sustainable management in semi-arid and arid regions of our country, as well as promote healthy and integral.



## Capítulo 1 : INTRODUCCIÓN





## ESTADO DEL ARTE EN LA NUTRICIÓN

Cada vez más consumidores consideran que los alimentos contribuyen directamente a su salud (Mollet & Rowland, 2002). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, los patrones dietarios (comida rápida) junto a los hábitos de vida tales como vida sedentaria y falta de ejercicio constituyen los principales factores de riesgo en relación con el desarrollo de enfermedades crónicas, obesidad y síndrome metabólico (Moebus & Stang, 2007). Este concepto ha llevado a una mayor demanda de los consumidores de alimentos saludables, no sólo con un contenido calórico equilibrado, sino que también buscan alimentos con funciones adicionales de promoción de la salud (Bech-larsen & Scholderer, 2007; Hasler, 2002). Hasta la fecha, la principal preocupación de la industria alimentaria ha sido proporcionar a los consumidores alimentos seguros. Sin embargo, si bien la seguridad sigue siendo de suma importancia, la composición calórica de los alimentos está llegando a ser igualmente preocupante (Day, Seymour, Pitts, Konczak, & Lundin, 2009). Se buscan alimentos destinados a prevenir las enfermedades relacionadas con la nutrición, así como a mejorar el bienestar físico y mental (Betoret, Betoret, Vidal, & Fito, 2011). Gobiernos y consumidores de todo el mundo respaldan esta tendencia al aceptar que se deben lograr productos sanos de alta calidad. Es así como surgieron nuevos conceptos en el campo de la ciencia de los alimentos tales como los **alimentos funcionales** y los **nutracéuticos**.

## ALIMENTOS FUNCIONALES Y NUTRACÉUTICOS

La acción concertada sobre la ciencia de los **alimentos funcionales** en Europa (FUFOSE) en el año 2010 propuso una definición práctica de los **alimentos funcionales**, esto es, un alimento que, además del aporte nutricional, tiene uno o mas efectos fisiológicos positivos, de manera que es relevante para un estado mejorado de salud y bienestar y/o para la reducción del riesgo de enfermedad. Los alimentos funcionales se consumen como parte de un patrón de comida normal.

Otra definición es la que sigue: «Un alimento funcional es aquel alimento natural o procesado que contiene compuestos conocidos o desconocidos biológicamente activos que, en cantidades cuantitativa y cualitativamente definidas, otorgan un beneficio clínicamente demostrado y documentado para la salud, siendo por lo tanto importantes para la prevención y control de enfermedades crónicas en la edad moderna» (Functional Food Center, USA, 2011).

Los desafíos claves de la investigación para los alimentos funcionales se basan en la necesidad de identificar nuevos **ingredientes funcionales** y de ganar la aceptación del consumidor de tales productos, los cuales podrían proporcionar beneficios en términos de salud y bienestar. A este tipo de investigación le concierne analizar las respuestas biológicas individuales a los alimentos funcionales, definir su biodisponibilidad, desarrollar biomarcadores adecuados para una gama más amplia de criterios de valoración funcionales, anticipar la demanda de la nutrición personalizada y el papel potencial de los alimentos funcionales, así como garantizar la estabilidad de los ingredientes alimentarios funcionales durante la fabricación y el paso a través del tracto gastrointestinal para alcanzar intacto el órgano blanco.

El término "**nutracéuticos**" es una contracción de “nutrición” y “medicamento”, y fue acuñado en 1989 por Stephen De Felice, fundador y presidente de la Fundación para la Innovación en la Medicina (FIM). Se lo define como "un alimento (o parte de un alimento) que proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad". Los nutracéuticos pueden ser producidos a partir de los alimentos (macronutrientes, micronutrientes, fitoquímicos) pero se comercializan en forma concentrada de pastillas, cápsulas, polvos, tinturas, etc. Se propone el uso de nutracéuticos, como un intento de lograr resultados terapéuticos deseables con efectos secundarios reducidos, en comparación con otros agentes terapéuticos (Kalra, 2003).

La óptima nutrición involucra en consecuencia el aporte de compuestos bioactivos que contribuyen a prevenir el riesgo de padecer enfermedades, mantener el estado de bienestar y mejorar la salud.

## NUTRIENTES Y BIOACTIVOS

### Metabolitos primarios y secundarios en los alimentos de origen vegetal

El rendimiento metabólico de los vegetales puede ser clasificado en metabolismo primario y secundario. El primero se asocia a los procesos fisiológicos fundamentales y comunes a todas las plantas (fotosíntesis, ciclo de las pentosas fosfato, glicólisis, ciclo del ácido cítrico, transporte de electrones, fosforilación y regulación energética) y que produce moléculas necesarias en vías anabólicas para la construcción, mantenimiento y reproducción celular, proveen energía química y actúan como precursores para la biosíntesis de numerosos metabolitos. El segundo, el metabolismo secundario, fue considerado durante mucho tiempo como generador de productos de desecho resultantes de la degradación metabólica o formados por subproductos del metabolismo primario. Hoy podemos definir al metabolismo secundario como el nivel funcional del metabolismo de las plantas que, sin ser indispensable para el crecimiento y desarrollo de las especies, es indispensable para su supervivencia (Isla, 2017). En contraste con los metabolitos primarios, los secundarios, tienen características que pueden ser expresadas en términos de diferenciación ecológica, taxonómica y bioquímica. Este metabolismo promueve la producción de compuestos de defensa a agentes físicos, químicos y biológicos, y de pigmentos atractivos para dispersores y polinizadores (Cronquist, 1977; Levin, 1976; Swain, 1973).

Los metabolitos primarios, ubicuos, se restringen a un número limitado de compuestos claves que funcionan como precursores biosintéticos (carbohidratos, lípidos, aminoácidos/proteínas y bases nitrogenadas/ácidos nucleicos). Los metabolitos secundarios, en cambio, muestran gran

individualidad y diversidad en su estructura molecular. El genoma de las plantas contiene entre 20000 y 60000 genes y de estos el 15-20% codifican para enzimas del metabolismo secundario (Palacios-Rojas & Leech, 2004).

La biosíntesis de estos compuestos está específicamente integrada en el programa de desarrollo de la planta. Existen factores que lo afectan como la luz (acumulación fotocontrolada), fitohormonas (inducen o reprimen las enzimas), disponibilidad de nutrientes (nitrógeno, carbono y fósforo), temperatura y estrés biótico y abiótico. Dentro de este grupo podemos citar a los compuestos fenólicos, terpenoides, alcaloides, glicósidos cianogénicos, entre otros (Ávalos & García, 2009).

## Carbohidratos

Estos compuestos son producidos por los vegetales a través del proceso de fotosíntesis. Son un constituyente esencial de los seres vivos, formando parte de biomoléculas aisladas o asociadas a otras moléculas como las proteínas y los lípidos, siendo los compuestos más abundantes en la naturaleza y constituyendo gran parte de la biomasa vegetal. Después del agua, los hidratos de carbono son los componentes más abundantes en frutas y verduras, representan el 50-80% del peso seco. Sus funciones en los seres vivos son el de brindar energía inmediata y estructural. Su principal clasificación está basada en su química, número de átomos de carbono, tipo de ligamiento, y grado de polimerización (Gerscheson, Rojas, & Fissore, 2017). Incluyen a los **monosacáridos** de tres a siete átomos de carbono. La glucosa y la fructosa son los azúcares simples más comunes en las frutas. La glucosa, fructosa y sacarosa (disacárido) son los principales responsables del sabor dulce de frutas y verduras (Bernal, Mendiola, Ibáñez, & Cifuentes, 2011). En las frutas y verduras también encontramos



**oligosacáridos** (de 3-10 unidades de monosacáridos) como los fructooligosacáridos, galactooligosacáridos y maltooligosacáridos (Bernal et al., 2011), ingredientes alimenticios funcionales que con frecuencia se encuentran unidos a proteínas. Promueven el crecimiento de *Bifidobacterium* en el intestino humano, modulando la respuesta inmune, inhibiendo el desarrollo de cáncer y tumores, así como estimulando la absorción mineral (Gerscheson, Rojas, & Fissore, 2017). Los compuestos de más de 10 unidades de monosacáridos reciben la denominación de **polisacáridos** (cadenas, ramificadas o no, que resultan de la condensación de muchas moléculas de monosacáridos con la pérdida de varias moléculas de agua). Representan una clase importante de polímeros biológicos relacionados con funciones estructurales o de almacenamiento.

Dentro de este grupo de macromoléculas, el almidón ingerido puede ser clasificado como almidón de digestión rápida, lenta, o resistente (Englyst, Kingman, & Cummings, 1992). El almidón de digestión lenta es generalmente la forma más deseable de almidón de la dieta ya que atenúa la glucosa en plasma postprandial. El resistente escapa a la digestión en el intestino delgado y tiene propiedades funcionales y nutricionales en común con la fibra dietética. Se ha demostrado que las legumbres contienen cantidades significativas de almidón resistente en comparación con los cereales y los tubérculos (Hernández-Medina, Torruco-Uco, Chel-Guerrero, & Betancur-Ancona, 2008).

## Fibras

La fibra dietética es la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y a la absorción en el intestino delgado humano con fermentación completa o parcial en el intestino

grueso. La fibra dietética incluye polisacáridos (poliglucosos tales como celulosa o beta-glucanos, o polifruktosos tales como inulina, o heteropolímeros tales como arabinosilanos y arabinogalactanos, o carbohidratos análogos), oligosacáridos (grado de polimerización entre 3 y 10), lignina y sustancias vegetales asociadas. La lignina es un polímero que resultan de la unión de varios alcoholes fenilpropílicos, que están intrínsecamente ligadas a los polisacáridos de la fibra y aumenta la resistencia a la digestión. La lignina no se digiere ni se absorbe ni tampoco es atacada por la microflora bacteriana del colon. Las ceras, cutina y suberina son sustancias vegetales asociadas derivadas de ácidos grasos no digeribles que, como la lignina, están intrincadamente ligados a los polisacáridos de fibra dietética, sirviendo a menudo como reticulaciones químicas entre varios de los otros componentes y aumentando la resistencia a la digestión (Escudero Álvarez & González Sánchez, 2006).

De acuerdo con la hidrosolubilidad de las fibras, éstas se denominan solubles o insolubles (Escudero Álvarez & González Sánchez, 2006). La fibra soluble formada por oligosacáridos y polisacáridos como la inulina, pectina y goma, en contacto con el agua forman un retículo donde esta queda atrapada, originándose soluciones de gran viscosidad. Los efectos derivados de la viscosidad de la fibra son los responsables de sus acciones sobre el metabolismo lipídico, hidrocarbonado y en parte su potencial anticarcinogénico (Kim, 2000).

Las fibras insolubles o poco solubles son capaces de retener el agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad; esto produce un aumento de la masa fecal que acelera el tránsito intestinal. Es la base para utilizar la fibra insoluble en el tratamiento y prevención de la constipación crónica. Por otra parte, también contribuye a disminuir la concentración y el tiempo de contacto de potenciales carcinogénicos con la mucosa del

colon. El tamaño de la partícula de la fibra puede influir en su capacidad de captar agua. Este se ve afectado por el procesado del alimento, como por ejemplo la molturación de cereales, y la masticación (García Peris & Gimeno, 2007).

De acuerdo con la fermentabilidad, las fibras pueden ser fermentadas total o parcialmente.

Más del 50 por ciento de la fibra consumida es degradada en el colon, el resto es eliminado con las heces. En el colon se dan fundamentalmente dos tipos de fermentación: fermentación sacarolítica y fermentación proteolítica. Los principales productos de la fermentación de la fibra son: ácidos grasos de cadena corta (AGCC), gases (hidrógeno, anhídrido carbónico y metano) y energía. La fermentación proteolítica produce derivados nitrogenados como aminas, amonio y compuestos fenólicos algunos de los cuales son carcinogénicos.

Por otra parte, la propia fibra, los gases y los AGCC generados durante su fermentación, son capaces de estimular el crecimiento de microorganismos del colon. Dentro de estos AGCC, el butirato puede actuar como regulador de la expresión de genes involucrados en la proliferación y diferenciación del colonocito inhibiendo específicamente la proliferación del compartimiento superficial de las criptas colónicas, que es considerado un fenómeno paraneoplásico (Velazquez et al., 1996).

La ingestión de fructooligosacáridos (fibra funcional) puede multiplicar por diez la representación numérica de las bifidobacterias (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006), en lo que se ha denominado efecto prebiótico: “componentes no digeribles de la dieta que resultan beneficiosos para el huésped porque producen el crecimiento selectivo y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias del colon” (Gibson & Roberfroid, 1995).

La fibra tiene un rol muy importante a todo lo largo del sistema digestivo. Requiere más tiempo de masticación lo que implica una mayor salivación lo cual mejora la higiene bucal. En el estómago, como consecuencia de la viscosidad, enlentecen el vaciamiento gástrico y aumentan la sensación de saciedad. A nivel del intestino delgado, nuevamente por la formación de soluciones viscosas, acorta el tiempo de tránsito. También aumenta el espesor de la capa de agua que han de traspasar los solutos para alcanzar la membrana del enterocito, lo que provoca una disminución en la absorción de glucosa, lípidos y aminoácidos. Produce una disminución en la absorción de los ácidos biliares ya que estos se unen a los residuos fenólicos y urónicos en la matriz de los polisacáridos de la fibra. Esto altera la formación de micelas y la absorción de las grasas, disminuyendo los niveles de colesterol, al utilizarse éste en la síntesis *de novo* de nuevos ácidos biliares. La absorción de determinados minerales como el calcio, hierro, cobre y zinc pueden disminuir. Sin embargo, pueden ser liberados por el metabolismo bacteriano. Así que la absorción es más lenta, pero se pueden llegar a absorber en cantidades importantes.

Existe una clara relación entre la actividad biológica de las bacterias, los metabolitos producidos en la fermentación de la fibra y la fisiología humana. Debido a los beneficios que pudieran derivarse de la manipulación de la flora intestinal a través de la ingestión de algunos tipos de fibra, se abren buenas perspectivas en investigación (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006).

## Lípidos

Con el nombre de lípidos (del griego *lypos*, grasa) se conoce a un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos constituidos principalmente por

carbono e hidrógeno y en menor medida por oxígeno. También pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno. Los lípidos cumplen funciones de reserva energética, estructural y reguladora. Se clasifican en: lípidos simples (aceites, mantecas, grasas y ceras); complejos (fosfolípidos, glicolípidos y lipoproteínas); y sustancias asociadas a los lípidos (esteroides, terpenos y vitaminas liposolubles) (Bernal, Mendiola, Ibáñez, & Cifuentes, 2011).

Los ácidos grasos esenciales (ácido linoleico y ácido linolénico) no pueden ser sintetizados por el organismo humano y deben ingerirse en la dieta. Su carencia o desbalance en la ingesta produce serias alteraciones metabólicas. Los ácidos grasos monoinsaturados pueden ayudar a reducir las lipoproteínas de baja densidad (LDL) -colesterol. Los ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (AGPI) especialmente de la serie 3 tienen efectos benéficos que incluyen la prevención de enfermedades coronarias, inflamación, hipertensión, entre otras (Bernal, Mendiola, Ibáñez, & Cifuentes, 2011). Estos están naturalmente presentes en aceites de origen vegetal.

En general, las frutas y verduras tienen aproximadamente 1% de lípidos mientras que las semillas presentan niveles mucho más elevados (Cattaneo et al., 2016).

## Aminoácidos y derivados

Los aminoácidos (aa) son compuestos nitrogenados que tienen un papel primordial ya que constituyen los bloques fundamentales para la síntesis de proteínas y de metabolitos secundarios nitrogenados. Existen 20 aminoácidos de los que derivan todas las proteínas y otros aminoácidos no proteicos. De estos, son esenciales [isoleucina, leucina, lisina, treonina,

valina, histidina, aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano)], y deben incorporarse con la dieta.

En la mayoría de los tejidos de frutas y verduras, las proteínas representan aproximadamente el 1% de la masa fresca de las mismas, mientras que en las legumbres representan del 15 a 30% (FAO, 2011).

Un concepto novedoso desde el punto de vista de la nutrición es la utilización de las proteínas y los péptidos procedentes de alimentos con el fin de mejorar una función biológica o de tratar de prevenir o reducir el riesgo de enfermedad. Se han aislado péptidos antihipertensivos, antimicrobianos, hipoglucemiantes, antitumorales, hipocolesterolémicos, antioxidantes a partir de hidrolizados enzimáticos de proteínas de origen vegetal (Picariello, Mamone, Nitride, Addeo, & Ferranti, 2013). Recientemente se caracterizaron péptidos antioxidantes y antihipertensivos de harina de cotiledones de algarrobo blanco, una especie nativa de Argentina (Cattaneo, 2014).

## Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son el grupo más grande de metabolitos secundarios. El elemento estructural fundamental que los caracteriza es la presencia de al menos un anillo aromático sustituido por uno o más grupos hidroxilos libres u ocupados por otra función: éter, éster o glicósido. Van desde estructuras simples con un anillo aromático a polímeros complejos tales como taninos y ligninas. Solamente las plantas y microorganismos son capaces de sintetizar biológicamente el núcleo aromático. En los animales casi siempre depende de su nutrición o simbiosis. La aromatización de los compuestos fenólicos de plantas sigue la vía del ácido shiquímico dando lugar a ácidos cinámicos y benzoicos, acetofenonas, lignanos, ligninas y

cumarinas y la vía del acetato-malonato que da lugar a policétidos que forman ciclos generando cromonas, isocumarinas, orcinoles, dépsidos, depsidonas, xantonas y quinonas (Isla, 2017). La diversidad estructural de los compuestos fenólicos es debida a su origen biosintético dual y se incrementa por la combinación frecuente de las vías del ácido shiquímico y acetato malonato en la elaboración de compuestos de origen mixto como los flavonoides. La participación de un tercer elemento, el mevalonato, también es posible, aunque menos frecuente y dan derivados mezclados del ácido shiquímico y el mevalonato, tales como quinonas o furano y piranocumarinas o en compuestos mixtos de acetato y mevalonato por ejemplo los cannabinoides (Isla, 2017).

Los compuestos fenólicos pueden clasificarse de acuerdo con su esqueleto básico y al número de átomos de Carbono (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación de los compuestos fenólicos según su complejidad.**

C <sub>6</sub>	Fenoles simples
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos Benzoicos y relacionados
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenonas, ácido fenol acético
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos cinámicos y relacionados
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Cumarinas y relacionados
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides y derivados
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Benzofenonas y estilbenos
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Xantonas
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignanós, ligninas

El total de la ingesta de compuestos fenólicos está en el orden de 1 g/día. Las formas libres de estos compuestos están raramente presentes en las

plantas. Más a menudo se presentan como ésteres, glicósidos y complejos ligados a estructuras celulares, siendo el conocimiento de estos últimos bastante escaso (Nardini & Ghiselli, 2004).

### *Ácidos Fenólicos*

De la clasificación precedente destacamos en primera instancia a los ácidos fenólicos. Encontramos en ellos dos grupos: Ácidos Benzoicos y Ácidos cinámicos y sus derivados (Tabla 1 y 2, Figura 1).

Los ácidos benzoicos o los derivados del ácido hidroxibenzoico tienen una estructura básica  $C_6-C_1$ . Los principales son el ácido gálico, ácido salicílico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido protocatéquico, ácido vainílico y ácido siríngico. El ácido gálico forma parte de estructuras más complejas, tales como los taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jime, 2004), Figura 2.

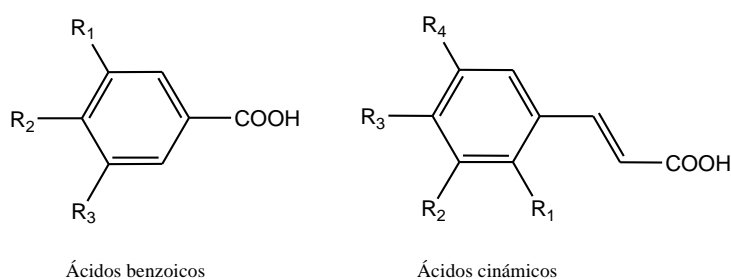
Los ácidos cinámicos o derivados del ácido hidroxicinámico, están ampliamente distribuidos como conjugados en materias vegetales, tiene una estructura básica  $C_6-C_3$ . Los más comunes son los ácidos cafeico, ferúlico, sinápico y p-cumárico. Se encuentran raramente libres, ya que por regla general se hallan presentes en forma de derivados. Así, por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el ácido quínico como ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico (Cseke, 2006).

Los ácidos fenólicos constituyen alrededor de un tercio de los fenoles de una dieta (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Uribe, & Serna-Saldívar, 2014). En general pueden estar en forma libre o ligado a componentes celulares de



la planta a través de uniones éter, éster o acetales (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Uribe, & Serna-Saldívar, 2014; Cseke, 2006).

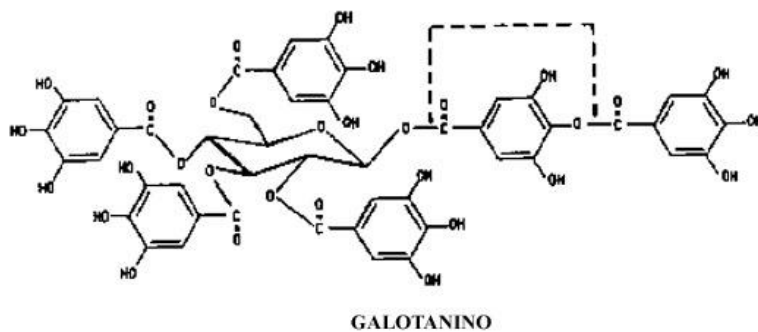
Las **cumarinas e isocumarinas** se biosintetizan a partir de los derivados fenilpropanoides C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, se encuentran generalmente en forma de glicósido (Cseke, 2006) en las Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae y Leguminosae. Estos compuestos pueden presentarse en la cubierta de las semillas, frutos, flores, raíces, hojas y tallos, pero, en general, las mayores concentraciones se encuentran en frutos y flores (Krueger, Winheim, & Morlock, 2018; Lake, 1999).



**Figura 1.** Estructura básica de ácido benzoico y ácido cinámico.

**Tabla 2.** Estructura química de ácidos fenólicos.

	Ácido	R	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Ácidos derivados del ácido benzoico	Gálico	OH	OH	OH	
	Protocatéquico	H	OH	OH	
	Vainílico	H	OH	OCH <sub>3</sub>	
	Siríngico	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	
Ácidos derivados del ácido cinámico	Cafeico	H	H	OH	OH
	Ferúlico	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>
	Sinápico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
	<i>p</i> -cumárico	H	H	OH	H



**Figura 2.** Estructuras químicas de taninos hidrolizables (galotaninos).

### *Flavonoides*

Los flavonoides constituyen el grupo más importante dentro de los compuestos fenólicos, dividiéndose en varias subclases con más de 5000 compuestos (Cseke, 2006; Harborne & Williams, 2000). Son los polifenoles más comunes en las plantas y se distribuyen en varias subfamilias. Su estructura básica (flaván) consta de dos grupos fenilo (anillo A y anillo B) unidos por un puente de tres carbonos que forman un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C). En función de los grados de oxidación e insaturación del anillo heterocíclico se pueden diferenciar varias clases de flavonoides y dentro de cada clase se pueden establecer diferencias en base a la naturaleza y número de sustituyentes unidos a los anillos (Robards, Prenzler, Tucker, Swatsitang, & Glover, 1999). Los flavonoides se encuentran a menudo hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5'. La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina la subdivisión en las dos clases principales de flavonoides: los 3-hidroxi flavonoides (flavanoles, flavonoles, flavanonoles, flavan-3,4-dioles o leucoantocianidinas, antocianidinas, proantocianidinas

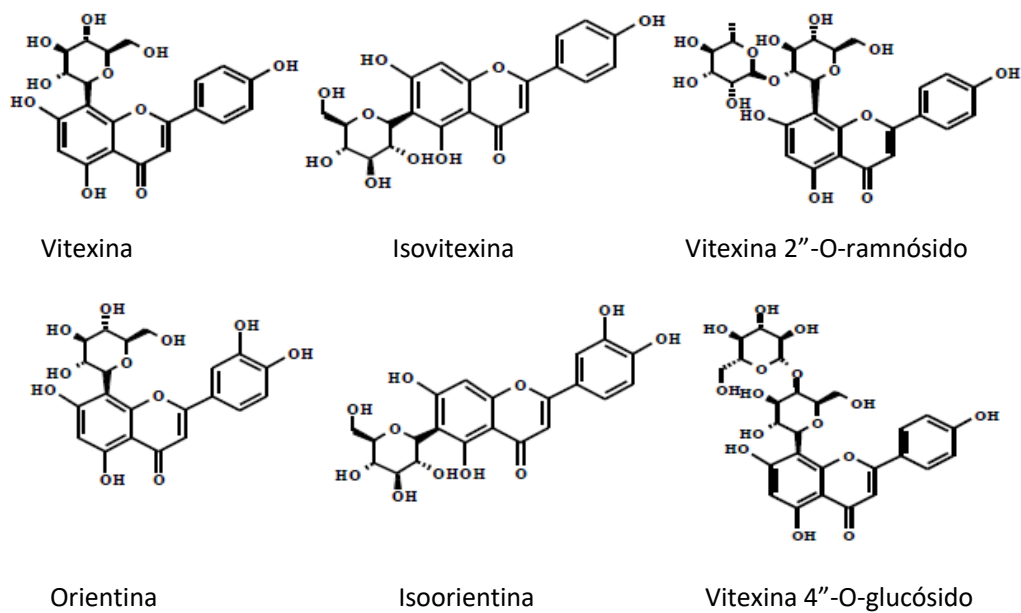
o taninos condensados) y los flavonoides no hidroxilados en posición 3 (flavonas, isoflavonas, flavanonas). Los precursores de todos los flavonoides son las chalconas que tienen los anillos A y B y una cadena carbonada estructuralmente relacionada al propano. La clasificación de los flavonoides agliconas se hace en base a dos criterios (Cseke, 2006):

a) De acuerdo con la posición del anillo B en carbono 2, 3 o 4 del anillo C. En las flavonas, flavanonas, flavonol y antocianinas el anillo B se ubica en la posición 2 del anillo heterocíclico mientras que en los isoflavonoides se ubican en posición 3. En un grupo derivado del cromano el anillo B se encuentra en posición 4 (neoflavonoides).

b) De acuerdo con el grado de oxidación del anillo C se pueden clasificar en flavonas, flavanonas, flavonol, catequinas y antocianinas.

### *Flavonas*

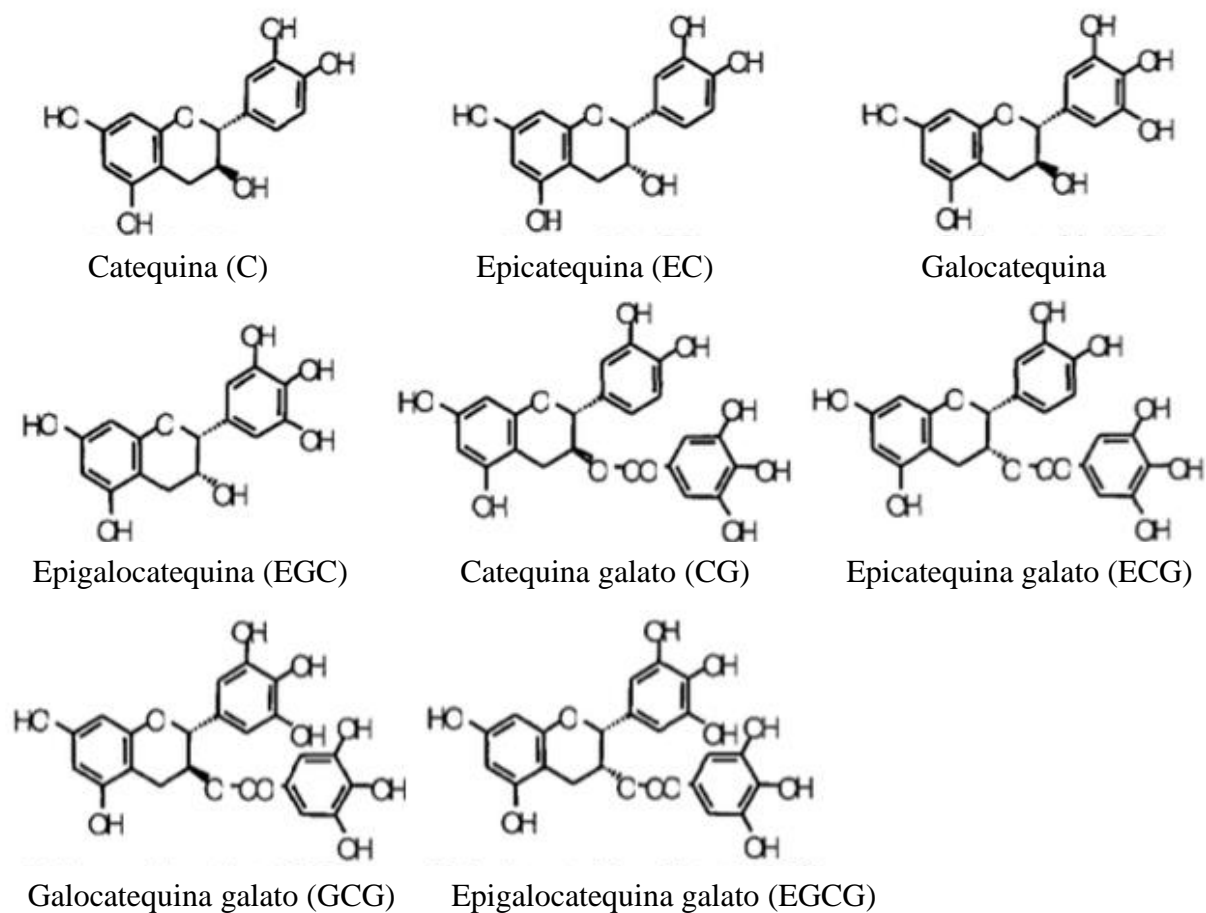
Las flavonas tienen en su anillo heterocíclico tres grupos funcionales incluyendo grupo carbonilo, hidroxilo y doble enlaces conjugados, son lipofílicos e hidrofílicos. Pueden ser O y C-glicosiladas. Son abundantes en frutos y verduras. Las flavonas C glicosiladas han recibido mucha atención debido a sus múltiples propiedades, antioxidante, anticáncer, antidiabetes, antihipertensiva, antiviral, antibacteriana, antiinflamatoria. Su actividad es mayor que las agliconas o las flavonas O-glicosiladas. Son drogas muy prometedoras (Singh, Kaur, & Silakari, 2014; Xiao, Capanoglu, Jassbi, & Miron, 2016), Figura 3. Se ha demostrado que cereales como el maíz, trigo y arroz sintetizan predominantemente flavonas C-glicosiladas (Xiao et al., 2016).



**Figura 3.** Estructura química de flavonas C glicosiladas.

### *Flavanol (catequinas)*

El término catequina se usa comúnmente para referirse al subgrupo flavanol, flavan-3-ol. Las catequinas se diferencian de los flavonoides que contienen grupos carbonilos ya que ellas no poseen estos grupos funcionales en su anillo heterocíclico (Cseke, 2006). Altas concentraciones de catequina se pueden encontrar en las hojas de té, y frutas como uvas negras y fresas. Las catequinas reaccionan con galotáninos formando complejos (epigalocatequina) responsables de sensaciones de astringencia y amargor, Figura 4.



**Figura 4.** Estructuras químicas de catequinas.

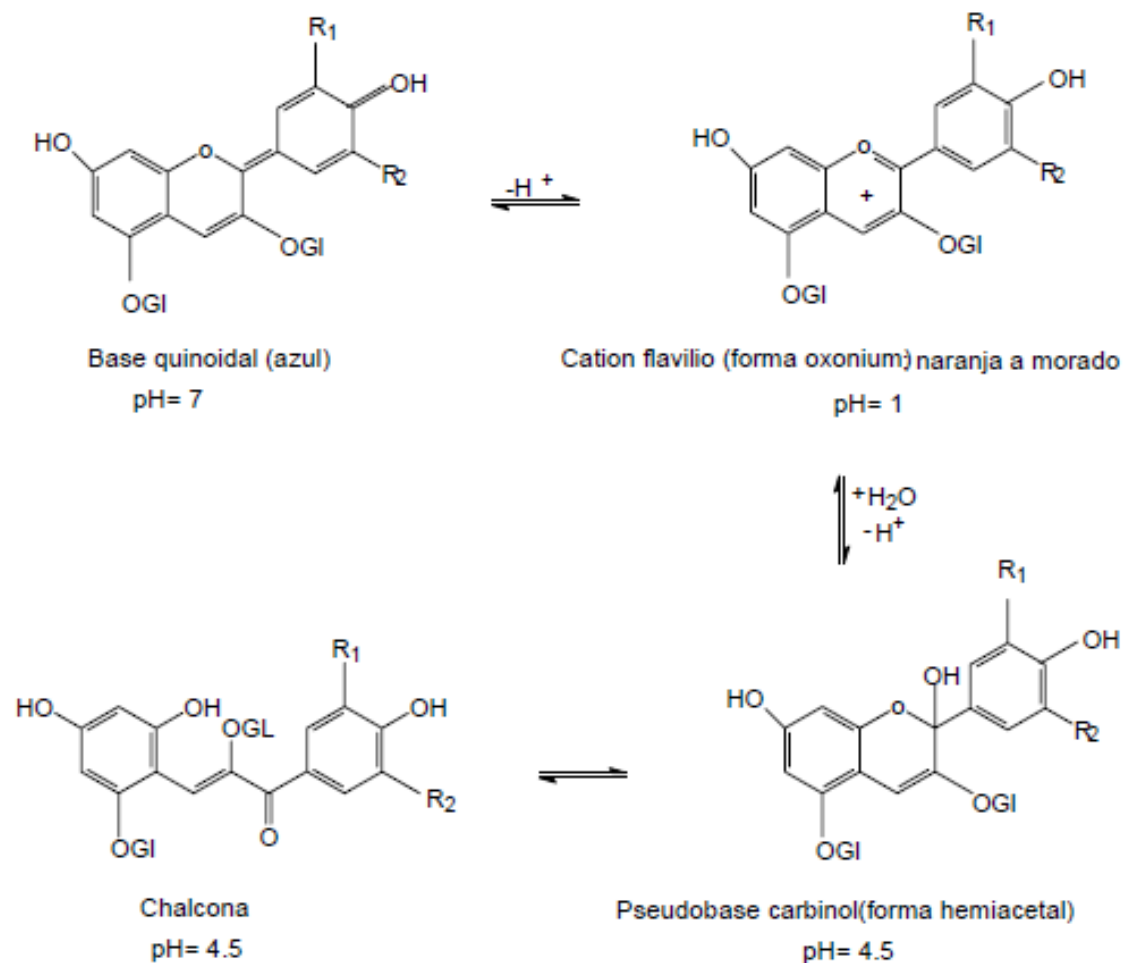
### *Chalconas, auronas*

Las chalconas y auronas y, en menor grado los flavonoles, están involucrados en el color amarillo-anaranjado de las flores y frutos (Andersen & Markham, 2006). Las chalconas tienen acción fungitóxica, antimicrobiana y modulan la captación de la glucosa por ligamiento a un transportador de la membrana plasmática del enterocito por lo que tienen efecto hipoglucemiante (Cazarolli et al., 2010).

## *Antocianinas*

Derivan del catión 2-fenil benzopirilo, más comúnmente denominado catión flavilio. De acuerdo con la literatura, 21 antocianinas han sido completamente descritas, de las cuales solo seis están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son encontradas a menudo en frutas y vegetales (Escribano-Bailón, Santos-Buelga, & Rivas-Gonzalo, 2004). Ellas son: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina. Los glúcidos se unen en la posición 3 de la antocianidina. Si existen grupos adicionales, ocupan la posición 5 y/o 7. Los azúcares más comunes son xilosa, arabinosa y rannosa entre la pentosas y galactosa y glucosa entre las hexosas. Los azúcares pueden ser sustituidos por ácidos alifáticos, hidroxibenzoicos o hidroxicinámicos.

Poseen una máxima absorción en la región visible entre 465-550 nm, y otra menos intensa en la ultravioleta entre 270-280nm. Un incremento en la hidroxilación produce un color azul, mientras que un incremento en la metoxilación, rojo. A diferentes pH presentan diferentes formas químicas: catión flavilo (pH 1) que da el color rojo, la base quinoidal (pH 7) azul y, la pseudobase carbinol y chalcona (pH 4,5) ambas incoloras. Presentan una alta coloración a pH ácido debido a que contienen un cromóforo con 8 dobles enlaces conjugados (Figura 5).



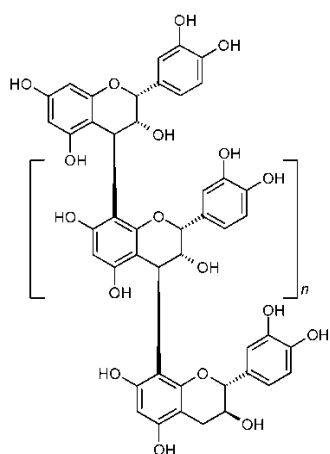
**Figura 5.** Estructuras de antocianinas a diferentes pHs.

Su estabilidad se ve afectada negativamente por la exposición a la luz, altas temperaturas, tiempo de almacenamiento, aumento del pH, oxígeno, estructura química, interacciones con ácido ascórbico, degradación enzimática, y, positivamente, por formación de complejos o quelatos con cationes metálicos, copigmentación (el ión flavilo es casi planar y muestra una deslocalización electrónica que se extiende por todo el grupo cromóforo por lo que es la única especie capaz de copigmentar provocándose un efecto hiperocrómico. Esto ocurre mediante asociaciones moleculares entre las antocianinas y cofactores incoloros tales como flavonoides, ácidos fenólicos, grupos acil aromáticos, etc.), asociación intramolecular (acilación) y polimerización.

Las antocianinas tienen un amplio rango de actividades biológicas. El consumo de alimentos ricos en estos pigmentos ha sido asociado con un incremento en la agudeza visual (Velioglu, Mazza, Gao, & Oomah, 1998), capacidad antioxidante (Degenhardt, Knapp, & Winterhalter, 2000), vasoprotectora y antiinflamatoria (Sweeny & Iacobucci, 1981), antiagregación plaquetaria, etc. Por ello son utilizadas como aditivos alimentarios en bebidas, mermeladas y productos de confitería.

### *Taninos condensados*

Los taninos condensados son los productos polimerizados de flavan-3-ol (catequinas, epicatequinas o epigalocatequinas o epigalocatequingalato) o flavan-3,4-diol o una mezcla de ambos, mediante enlaces interflavan (4-6 y/o 4-8) (Figura 6). Son llamados también proantocianidinas. Generalmente reaccionan con aminoácidos o proteínas de la dieta y su absorción disminuye cuando incrementa su grado de polimerización.



**Figura 6.** Estructura de un tanino condensado.



Desde el punto de vista farmacológico, presentan acciones derivadas de su capacidad de formar complejos y precipitar metales, alcaloides y proteínas, se utilizan como antidiarreicos, antimicrobianos y como antídotos para envenenamiento con alcaloides y metales pesados (Andrade & Fasolo, 2014; Hagerman, 2002; Makkar, Blummel, & Becker, 1995; Robbins et al., 1987; Scalbert, 1991; Silva & Filho, 2002; Vladimir-Knežević et al., 2011). En general actúan como antioxidantes y modulan la actividad enzimática de glucosidasas, tirosinasas, ciclooxigenasa, lipooxigenasas, entre otras (Macáková et al., 2015).

## *TERPENOIDES Y ESTEROIDES*

Los terpenos representan una familia de compuestos que agrupa a una gran variedad de estructuras, de los cuales se han aislado cerca de 30.000 compuestos, todas ellas derivadas del isopreno. Generalmente su acumulación y secreción está asociada a estructuras anatómicamente especializadas: tricomas glandulares, cavidades secretoras de hojas, epidermis glandular de pétalos de flores, frutos, etc (Cseke, 2006).

Los isoprenoides se clasifican de acuerdo al número de unidades isoprenoides que los constituye: a) *Hemiterpenos*: C5, su representante es el propio isopreno, el cual es altamente volátil y es liberado por tejidos fotosintéticamente activos; b) *Monoterpenos*: C10 presenta dos unidades de isopreno; c) *Sesquiterpenos*: C15 presenta tres unidades de isopreno; d) *Diterpenos*: C20 presenta cuatro unidades de isopreno; e) *Triterpenos*: C30 presenta seis unidades de isopreno; f) *Tetraterpenos*: C40 presenta ocho unidades de isopreno; g) *Politerpenos*: > de 8 unidades de isopreno (Cseke, 2006).

Desde el punto de vista farmacéutico, los grupos con principios activos de naturaleza terpénica más interesantes son: monoterpenos y sesquiterpenos constituyentes de los **aceites esenciales**, derivados de monoterpenos correspondientes a los **iridoides**, **lactonas sesquiterpénicas** que forman parte de los principios amargos, algunos diterpenos, triterpenos y esteroides entre los que se encuentran las **saponinas** y los **heterósidos cardiotónicos** y tetraterpenoides como los **carotenoides** (Cseke, 2006).

Dentro de los tetraterpenoides se encuentran los **carotenoides**, pigmentos lipofílicos. Su característica particular es la presencia de una cadena carbonada con dobles enlaces conjugados en la parte central de la molécula, vulnerable a la oxidación y cis-trans isomerización. Los carotenoides son una clase de productos naturales de más de 700 compuestos químicos diferentes que son sintetizados por las plantas, levaduras, hongos y bacterias fotosintéticas (Gil Hernández, 2010).

En los vegetales juegan un papel importante ya que son precursores de la hormona vegetal ácido abscísico, participan en la fotosíntesis, protegen contra daños ocasionados por los procesos fotooxidativos y proporcionan a las frutas y flores diversos colores (amarillo-anaranjado-rojizo) que atraen a los polinizadores y dispersadores de semillas (Ohmiya, 2011).

Los carotenoides son componentes esenciales de la dieta, son precursores de la biosíntesis de la vitamina A y tienen funciones antioxidantes (Ohmiya, 2011).

### *Ácido ascórbico*

La vitamina C o ácido ascórbico es un antioxidante hidrosoluble con un alto poder reductor. Actúa como cofactor de numerosas enzimas implicadas

en la biosíntesis de colágeno, carnitina y algunos neurotransmisores y, puede depurar una gran variedad de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno en medios acuosos. La vitamina C se considera esencial ya que no puede ser sintetizada por los seres humanos, por lo tanto, se la debe ingerir a través de la alimentación. Se encuentra naturalmente presente en los alimentos, especialmente en frutas y verduras (Valente, Albuquerque, Sanches-silva, & Costa, 2011). Varios estudios epidemiológicos mostraron que disminuye el riesgo de adquirir enfermedades crónicas, como enfermedades del corazón, diabetes, cáncer o enfermedades neurodegenerativas (Cattaneo et al., 2014).

## Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos

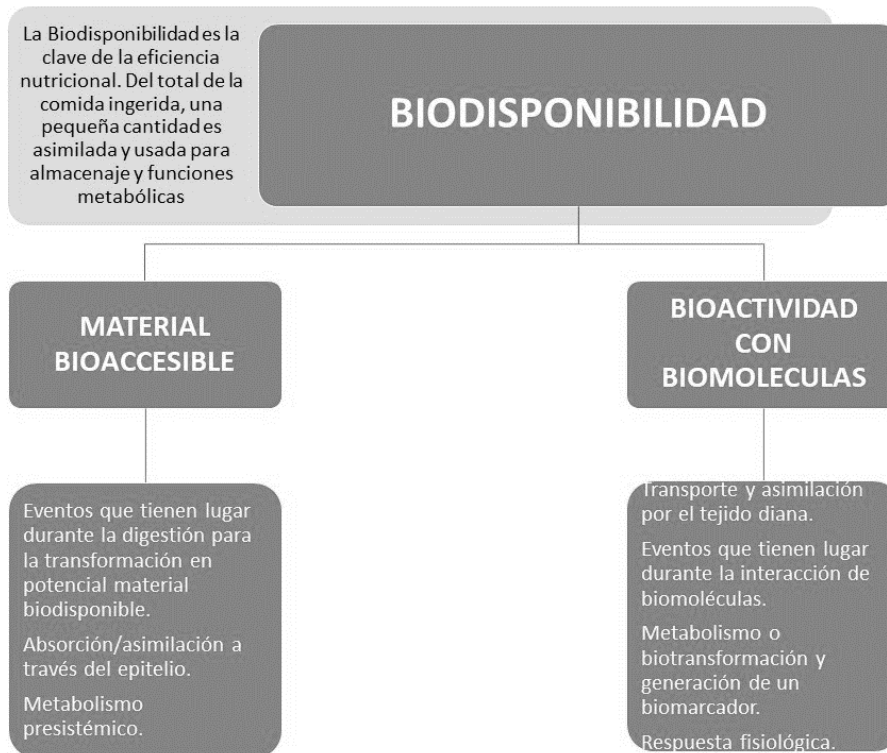
El potencial de estos compuestos de ejercer efectos fisiológicos positivos depende de su consumo, liberación desde la matriz (características de la matriz, forma química del nutriente), cambios durante la digestión, metabolismo y la posterior interacción con los tejidos diana y biodistribución, incluso antes de considerar dosis y factores relacionados con el consumidor particular (edad, estado nutricional, estilo de vida). La biodisponibilidad de macronutrientes (carbohidratos, proteínas, y grasas) es usualmente muy alta, más del 90% de la cantidad ingerida.

La bioaccesibilidad es el primer paso para la biodisponibilidad de fitoquímicos (Figura 7). En esta etapa, el bioactivo es liberado de la matriz alimenticia y se convierte en una forma química que puede unirse a las células intestinales y entrar en ellas o pasar entre ellas. La masticación, digestión enzimática de los alimentos en la boca, mezcla con ácido y con las enzimas en el jugo gástrico, y la liberación en el intestino delgado son

las operaciones unitarias del proceso por el cual los nutrientes se hacen bioaccesibles. El intestino delgado es el sitio principal de absorción de nutrientes mientras las enzimas del jugo pancreático continúan descomponiendo la matriz alimenticia.

La biodisponibilidad gastrointestinal (GI) de los compuestos bioactivos se ve drásticamente afectada por la liberación restringida de los compuestos de la matriz vegetal, la solubilidad en el fluido GI, la permeabilidad a través del epitelio intestinal, así como las reacciones enzimáticas y químicas que se producen dentro del tracto GI (Yao, Xiao, & McClements, 2014). Son necesarios cuatro pasos esenciales para la absorción efectiva de los compuestos:

1. Liberación de la matriz alimentaria.
2. Incorporación en micelas de bilis.
3. Absorción por células epiteliales.
4. Incorporación en los quilomicrones con secreción en el sistema linfático.



**Figura 7.** Esquema de relación entre biodisponibilidad, bioaccesibilidad y bioactividad (Fernández-García, Carvajal-Lérida, & Pérez-Gálvez, 2009).

Los métodos *in vitro* de simulación de digestión gastrointestinal sirven para determinar la bioaccesibilidad (disponibilidad para la absorción intestinal) de los compuestos y pueden usarse para evaluar el diseño de alimentos funcionales.

El primer paso en el metabolismo de los fitoquímicos principalmente los polifenoles es la deglicosilación previa a la absorción en el intestino delgado. La hidrólisis empieza en la cavidad oral por la actividad  $\alpha$ -amilasa de la saliva y la microbiota oral. Continúa a través del tracto digestivo hacia el estómago, donde se reduce el tamaño de las partículas de alimento, se deglicosilan por acción de enzimas hidrolíticas lo que provoca la liberación de agliconas. Se ha estimado, por ejemplo, que el 5-10% de los polifenoles ingeridos son absorbidos en el intestino delgado, mientras que el 90-95% alcanzan el colon donde son degradados intensamente por la

microbiota en una diversidad de metabolitos fenólicos bioactivos (floroglucinol, ácido hidrocafeico, ácido florético) que son absorbidos.

Los polifenoles glicosilados, tales como antocianinas, glicósidos de flavonol y de resveratrol, pueden ser hidrolizados por  $\beta$ -glucosidasas intestinales. Los flavanoles monoméricos y las procianidinas dimericas pueden ser absorbidos directamente en el intestino delgado. Una vez absorbidos, las agliconas resultantes se biotransforman rápidamente dentro del enterocito y el hígado. Otros polifenoles llegan al colon, donde los compuestos se someten a la acción de la microflora colónica y se transforman en varios ácidos fenólicos y otros metabolitos. Finalmente, los metabolitos fenólicos se excretan a través de la orina y las heces (Dueñas et al., 2015).

Las bacterias del tracto gastrointestinal en mamíferos son capaces de liberar ácidos fenólicos libres desde complejos ligados y ser absorbidos y entrar en el metabolismo hepático donde son deglicosilados y metabolizados a glucurónidos, sulfatos y derivados O-metilados (Wiseman, 2013). Otros estudios sugieren que existen formas ligadas biodisponibles (Nardini & Ghiselli, 2004).

# ESTADOS PATOLÓGICOS Y FITOQUÍMICOS BIOACTIVOS

## ESTRÉS OXIDATIVO

### *DEFINICIÓN*

Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Un desbalance en este estado normal redox conlleva la pérdida de la homeostasis celular y a un incremento en la producción de moléculas nocivas para todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. Estos procesos participan en el envejecimiento y en mecanismos etiopatogénicos de enfermedades de importancia clínica y social, como aterosclerosis, Parkinson, Alzheimer.

El estrés oxidativo puede ser visto, entonces, como un estado bioquímico del organismo con origen en el desbalance entre mecanismos prooxidantes y la incapacidad del sistema biológico de decodificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante.

En analogía al término “estrés oxidativo”, Hausladen y Stamler (1999) han denominado “estrés nitrosativo” a la excesiva o desregulada formación del radical óxido nítrico (NO·) y especies reactivas del nitrógeno (ERN) derivadas del mismo.

### *PROOXIDANTES*

Del 1-3% del oxígeno que ingresa en los pulmones en humanos, es convertido en especies reactivas de oxígeno (ERO) (Sohal, 2002). En

condiciones metabólicas normales, la formación continua de ERO y otros radicales libres, es importante para el normal funcionamiento fisiológico, como para la producción de ATP, varios procesos catabólicos y anabólicos y los ciclos celulares que lo acompañan, el ataque de patógenos, etc.

La generación excesiva de estas especies puede deberse a factores biológicos endógenos (metabolismo celular, flujo de iones, patofisiología, ansiedad, isquemia, etc.) o factores ambientales exógenos (patógenos como bacterias, virus, hongos o parásitos; drogas; tóxicos; ingredientes dietarios; factores climáticos; contaminación ambiental debida por ejemplo a pesticidas, metales de transición, residuos de drogas, entre otros) conocidos como prooxidantes.

Así, el término prooxidante se refiere a cualquier endobiótico o xenobiótico que induce el estrés oxidativo ya sea por la generación de moléculas dañinas o por la inhibición de los sistemas antioxidantes.

### *Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno*

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) son generadas como subproducto del metabolismo aeróbico normal de los seres vivos, exposición a diversas condiciones fisicoquímicas o estados patológicos. Su impacto en el organismo depende del tipo de oxidante, del lugar e intensidad de su producción, de la composición y de las actividades de diversos antioxidantes y de la capacidad de los sistemas de reparación.

Estas moléculas pueden clasificarse convenientemente como radicalarias, en las que está presente al menos un electrón desapareado en un orbital atómico, o no radicalarias en la que todos los electrones están apareados (Tabla 3). Los radicales libres son inestables y altamente reactivos. Pueden



donar un electrón o aceptar un electrón de otras moléculas comportándose como oxidantes o reductores. Los daños que devienen de su excesiva generación incluyen modificaciones de las macromoléculas celulares, como proteínas, donde puede perderse la reactividad enzimática; lípidos, donde ocurre peroxidación modificando la estructura de la membrana, el influjo de calcio y provocando la lisis mitocondrial; y ADN, dando lugar a mutagénesis y carcinogénesis.

Tabla 3. **Especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ENO).**

	ERO	ERN
Radicalarias	Alcoxilo (RO) Hidroxilo (OH) Peroxilo (RO <sub>2</sub> ) Hidroperóxilo (O <sub>2</sub> H) Anión superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	Óxido nítrico (NO) Dióxido de nitrógeno (NO <sub>2</sub> )
No radicalarias	Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) Ácido hipocloroso (HOCl) Ozono(O <sub>3</sub> ) Dioxígeno singulete (O <sub>2</sub> )	Trióxido de dinitrógeno (N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) Ión nitronio (NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> ) Cation nitroxilo (NO <sup>+</sup> ) Ácido nitroso (HNO <sub>2</sub> ) Anión nitroxilo (NO <sup>-</sup> ) Cloruro de nitrilo (NO <sub>2</sub> Cl) Peroxinitrilo (OONO <sup>-</sup> )

La mitocondria es el principal orgánulo celular responsable de la producción de ERO. En ella la producción de estas sustancias tiene lugar de forma continua. Esto se da como resultado de la cadena transportadora de electrones localizada en la membrana mitocondrial, esencial para la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Durante este

proceso, pueden producirse reducciones de uno o dos electrones en lugar de cuatro reducciones electrónicas de  $O_2$ , lo que conduce a la formación de  $O_2^{\cdot-}$  o  $H_2O_2$ , y estas especies pueden convertirse a otras ERO (Cárdenas-Rodríguez & Pedraza-Chaverri, 2005).

Durante el envejecimiento celular en las mitocondrias, ocurre una acumulación de mutaciones en su ADN, las cuales son transmitidas aleatoriamente durante la división mitocondrial y la división celular. Estas alteraciones dan lugar al incremento de la producción del radical anión superóxido. El radical anión superóxido puede dismutar espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa para formar peróxido de hidrógeno. Éste, puede reaccionar para formar el radical hidroxilo. Esto ocurre en la matriz mitocondrial. En la cara externa de la membrana mitocondrial, se ubica una enzima (mono-amino oxidasa) que es una fuente importante de  $H_2O_2$ , contribuyendo así a la concentración de especies reactivas en el citosol celular.

En las mitocondrias ocurre también la síntesis del 0,5% de óxido nítrico (NO) a partir de la L-arginina, por acción de la óxido nítrico sintasa. El balance entre la producción de NO y su consumo, resulta en una concentración estable de NO, la cual regula la captación mitocondrial de oxígeno y el suministro de energía. El NO a partir del cual se forman otras especies como el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), anión nitroxilo ( $NO^-$ ) y el dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) inhibe reversiblemente la actividad de la citocromo oxidasa por competencia con el  $O_2$ . Reacciona con el radical  $O_2^{\cdot-}$  en una reacción de terminación que ocurre en la matriz mitocondrial, generando el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Éste, es una especie reactiva altamente oxidante y nitrosante de proteínas, pues induce reacción con los anillos aromáticos, sulfoxidación de metionina, y nitrosilación de cisteína seguida por la formación de un puente disulfuro, inactivando así el

funcionamiento de proteínas regulatorias importantes, como enzimas y receptores (Pavanato et al., 2003; Vargas, Rivas, Nursamaa, & Zoltan, 2007). El óxido nítrico no reacciona con la mayoría de los constituyentes celulares y suele ser bastante selectivo en la elección de proteínas que contienen en su estructura cisteína o un grupo hemo, con las que reacciona en presencia de oxígeno molecular. Sin embargo, en combinación con especies de oxígeno reactivo o con aumentos en el nivel de NO, la nitrosación y la oxidación se observan más fácilmente. El óxido nítrico y sus productos de reacción aeróbica han sido reconocidos por mucho tiempo como citotóxicos, mutagénicos y cancerígenos.

## *ANTIOXIDANTES*

Frente a todos los posibles daños generados por los radicales libres, existen mecanismos detoxificantes. El sistema de defensa antioxidante del organismo está constituido por un grupo de sustancias que, al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de éste.

Pueden ejercer su efecto sobre los sistemas biológicos mediante diferentes mecanismos incluyendo la donación de electrones, quelación de iones metálicos, o regulación de la expresión génica, entre otros.

Los antioxidantes actúan en diferentes niveles: la prevención, la eliminación de radicales, la reparación, y la adaptación (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010). La primera línea de defensa son los antioxidantes preventivos, que suprimen la formación de radicales libres. Reducen previamente los hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno a alcoholes y agua, respectivamente, sin generación de radicales libres y

algunas proteínas secuestran iones metálicos. Algunos ejemplos son la glutatión peroxidasa, la glutatión-s-transferasa, el hidroperóxido fosfolípido glutatión peroxidasa (PHGPX) y la peroxidasa descomponen hidroperóxidos lipídicos en los correspondientes alcoholes. La glutatión peroxidasa y la catalasa reducen el peróxido de hidrógeno a agua.

La segunda línea de defensa son los antioxidantes que capturan los radicales activos para suprimir la iniciación de la cadena y/o romper las reacciones de propagación de la cadena. Entre ellos, vitamina C y E, ácido úrico, bilirrubina, albúmina, ubiquinol y tioles.

La tercera línea de defensa es la reparación. Las enzimas proteolíticas presentes en el citosol y en las mitocondrias reconocen, degradan y eliminan proteínas modificadas oxidativamente y previenen su acumulación.

Luego viene la adaptación donde la señal para la producción de los radicales libres inducen la formación y el transporte del antioxidante apropiado al sitio correcto.

Existen diferentes tipos de antioxidantes. En base a su origen pueden clasificarse como endógenos y exógenos, según se generen dentro del organismo sometido a estrés oxidativo, o sea incorporado en la dieta (Venereo Gutiérrez, 2002). De acuerdo con su mecanismo de acción, en cambio, se dividen en enzimáticos y no enzimáticos (Lobo, Patil, Phatak & Chandra, 2010).

Dentro del mecanismo de protección por enzimas antioxidantes, el superóxido liberado por procesos tales como la fosforilación oxidativa, se convierte primero en peróxido de hidrógeno y luego se reduce más para dar agua. Esta vía de desintoxicación es el resultado de múltiples enzimas, con las superóxido dismutasa catalizando el primer paso y luego las catalasas y

varias peroxidasas eliminando el peróxido de hidrógeno (Panda, 2012). Dentro de los sistemas no enzimáticos endógenos podemos citar al glutatión, la bilirrubina y dentro de los sistemas no enzimáticos exógenos podemos mencionar el ácido ascórbico, carotenoides, polifenoles, entre otros (Lobo et al., 2010).

## *LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y EL ESTRÉS OXIDATIVO*

La ingesta natural de moléculas antioxidantes a través de la dieta, como los polifenoles contenidos en frutas y verduras ejerce efectos beneficiosos sobre el envejecimiento, cáncer y pérdida cognitiva (Chatzianagnostou, Del Turco, Pingitore, Sabatino, & Vassalle, 2015; Dueñas et al., 2015; Mendoza-Wilson et al., 2016; Yashin, Yashin, Wang, & Nemzer, 2013). Los patrones dietéticos, incluyendo el consumo regular de alimentos con compuestos no nutritivos bioactivos, principalmente las sustancias fenólicas, pueden conferir protección molecular y celular específica además de los beneficios epidemiológicamente observados (descenso en las tasas obesidad y en el riesgo de padecer enfermedades crónicas) (Kristo, Klimis-Zacas, & Sikalidis, 2016). Siguiendo la clasificación precedente, los compuestos fenólicos, son antioxidantes exógenos no enzimáticos. Los polifenoles incluyen más de 10.000 compuestos y están entre los compuestos antioxidantes naturales más importantes (Cavaiuolo, Cocetta, & Ferrante, 2013). Dentro de los compuestos fenólicos, el grupo más utilizado como antioxidante es el de los flavonoides. Estos pueden actuar por múltiples mecanismos por ejemplo pueden inhibir la peroxidación lipídica atrapando radicales libres y desactivando ERO tales como oxígeno singlete, radical hidroxilo, anión superóxido, etc. (Zampini et al., 2008, 2012; Moran Vieyra et al., 2009). También se ha propuesto que pueden

reaccionar con los radicales peroxilo cediendo un protón o un electrón interrumpiendo la propagación de la reacción en cadena (Carocho & Ferreira, 2013; López Alarcón & Denicola, 2013; Andrade & Fasolo, 2014). De allí, entonces, otro mecanismo por el cual ejercerían su actividad antioxidante los flavonoides sería la transferencia de electrones con la consecuente aparición de una molécula radical aroxilo. Para que la función antioxidante de los flavonoides sea efectiva, el radical flavonoide formado (radical aroxilo) debe ser estable. El radical aroxilo puede ser recuperado por otros antioxidantes, como el ascorbato. Los flavonoides también pueden actuar como inhibidores de enzimas prooxidativas como lipooxigenasa (LOX) o NADH oxidasa (NOx) o xantino-oxidasa (XO), óxido nítrico sintasa (NOS), entre otras (López-Alarcón & Denicola, 2013). Los flavonoides pueden favorecer la expresión de enzimas antioxidantes a través de la activación o incremento de la expresión del factor de transcripción Nrf-2 asociado al control redox que induce la expresión de enzimas citoprotectoras como glutatión S transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD), hemooxigenasas, entre otras. Otro mecanismo de acción de los flavonoides sería inhibición de la expresión y/o activación de factores de transcripción NF-kB que inducen la expresión de enzimas prooxidantes que participan en la respuesta inflamatoria (López-Alarcón & Denicola, 2013; Slemmer & Weber, 2014). Sin embargo, debemos tener en cuenta que la capacidad de depurar radicales libres es un mecanismo más rápido para proteger blancos biológicos mientras que la regulación de la expresión es mucho más lenta ya que implica la biosíntesis de nuevas proteínas.

Se ha demostrado que la potencia antioxidante de un flavonoide depende de la presencia de una insaturación entre el C2 y C3 del anillo C, la conjugación del anillo B con el grupo carbonilo del anillo C y del número y

posición de sus grupos hidroxilos fenólicos (Rice- Evans, 2001, Carochó & Ferreyra 2013; Andrade & Fasolo, 2014). También es importante la presencia de grupos funcionales capaces de complejar iones de metales de transición como el hierro y el cobre. Uno de los compuestos flavonoides que reúne todas estas propiedades químicas es el flavonol quercetina (Williams et al., 2004). No debemos olvidar que los flavonoides pueden actuar como antioxidantes/prooxidantes dependiendo de la concentración y de la disponibilidad de los mismos en el organismo, así la exposición a altos niveles de flavonoides, pueden originar especies reactivas de oxígeno, tales como oxígeno singlete que puede provocar daño en el material genético (López- Alarcon & Denicola, 2013).

## INFLAMACIÓN

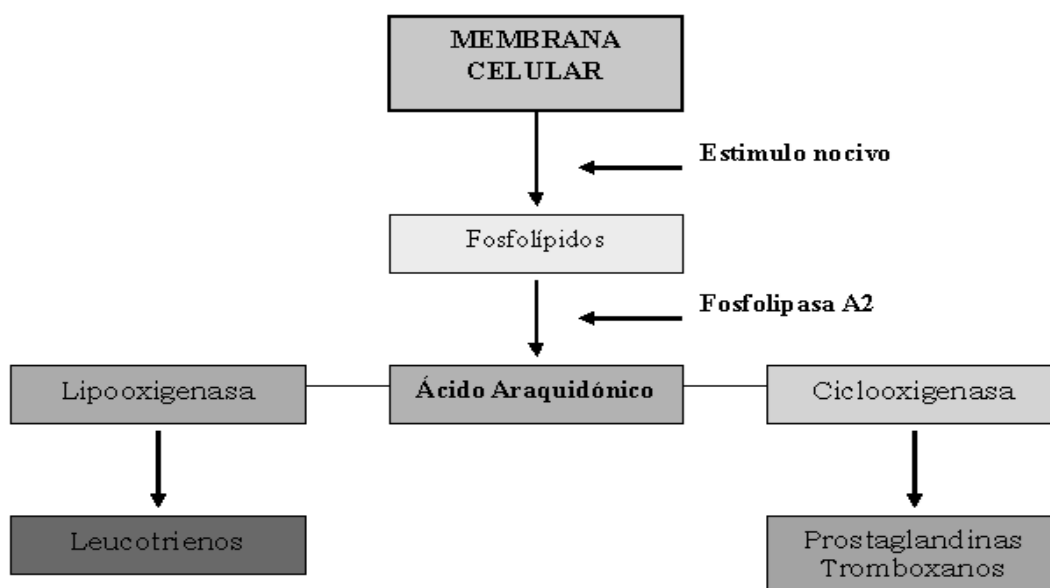
La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas y de naturaleza inespecífica.

El fenómeno inflamatorio es importante y útil. Una vez que se resuelve la injuria, desaparece. Solo se debe actuar cuando el organismo no consigue por sí mismo resolver el problema. Es decir, cuando se perpetúa en el tiempo (inflamación crónica) o cuando se exagera la reacción.

La inflamación es una manifestación del estrés oxidativo, y las vías que generan los mediadores de la inflamación, como las moléculas de adhesión y las interleucinas, son todas inducidas por estrés oxidativo (Ceriello & Motz, 2004; Vargas, Rivas, Nursamaa, & Zoltan, 2007).

Gran parte de los fenómenos observados es debida a mediadores liberados por las células del entorno (Figura 8).

El fenómeno comienza en la pared vascular de las células inflamatorias a través de un cambio en la concentración intracelular de calcio. La calmodulina activa enzimas (fosfolipasa A2) que liberan el ácido araquidónico (AA) con la consecuente liberación de mediadores inflamatorios (sustancias de carácter lipídico, sintetizadas por el mastocito). El ácido araquidónico, precursor de los eicosanoides, es un ácido graso constitutivo de las membranas celulares que se encuentra esterificado en los fosfolípidos.



**Figura 8.** Cascada del proceso inflamatorio.

Las fosfolipasas A2 (PLA2) constituyen un diverso grupo de enzimas del tipo hidrolasa-lipasas que juegan un rol importante en una variedad de procesos celulares induciendo cambios en la composición membranal, digestión y metabolismo de fosfolípidos, así como la producción de precursores para reacciones inflamatorias y generan vías de señalización celular (transducción de señales) (Garcia & Garcia Cardona, 2009).

Una vez liberado el AA puede seguir dos vías metabólicas, llevadas a cabo por dos enzimas claves: la ciclooxigenasa (COX), que determina la



producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX), y la lipoxigenasa (LOX) que conduce a la formación de leucotrienos (LT), Figura 8.

La ciclooxigenasa (COX), también denominada prostaglandina sintetasa, existe en dos isoformas: COX-1 y COX-2. Los genes para COX-1 se expresan constitutivamente, y la enzima se encuentra en casi todos los tejidos y células. La expresión constitutiva de COX-1 indica que los niveles basales de prostanoides son importantes en el servicio de funciones fisiológicas críticas en humanos. Un ejemplo de ello es la producción mediada por COX-1 de PG en el estómago sirve para proteger la mucosa contra los efectos ulcerogénicos del ácido y, la producción de tromboxano en plaquetas promueve la coagulación normal.

En contraste, los genes para COX-2 son inducibles por citoquinas y factores de crecimiento (Gierse, Koboldt, Walker, Seibert, & Isakson, 1999). Estas enzimas juegan un papel importante en la producción de PG proinflamatorias y su liberación tiene lugar en los sitios de inflamación. Los inhibidores selectivos de COX-2 son centrales para la regulación de la producción de PG proinflamatorias.

Los antiinflamatorios no esteroides (AINE) ejercen sus efectos terapéuticos mediante la inhibición de la COX. La inhibición de COX-1 provoca la mayoría de las reacciones adversas gastrointestinales y complicaciones cardiovasculares, mientras que la inhibición de COX-2 produce los efectos antiinflamatorios. De este modo, la aparición de compuestos con acción preferencial sobre COX-2 proporciona importantes ventajas terapéuticas. La nimesulida representa una clase de AINE que se caracterizan por su acción selectiva sobre la COX-2.

Las enzimas LOX también desempeñan un papel proinflamatorio. La actividad de 5-LOX genera al menos cuatro leucotrienos específicos (B4, C4, D4 y E4) y citoquinas (Roschek et al., 2009). Los fármacos dirigidos a

la 5-LOX, todavía no han entrado en el mercado. El único fármaco desarrollado contra esta enzima, Zileuton, se retiró en 2008 debido a su hepatotoxicidad.

Algunos estudios han demostrado que la inhibición de una única vía da lugar a la derivación del sustrato a la otra, lo que complica la intervención terapéutica. Esto ha dado lugar a interés en el desarrollo de inhibidores duales (Devi, Ramanan, Paragi-Vedanthi, & Doble, 2017) que inhiban más de una vía.

Hasta la fecha los fármacos son generalmente activos contra una única vía, dando lugar a efectos secundarios indeseables. Se sabe que los fitoquímicos inhiben múltiples objetivos simultáneamente y son capaces de interactuar con una amplia gama de macromoléculas biológicas y exhiben mejores propiedades farmacológicas en comparación con las moléculas sintéticas. Más del 60% de los medicamentos en el mercado se derivan de compuestos naturales (Molinari, 2009). Mediante ensayos epidemiológicos se demostró que las dietas ricas en frutas y vegetales pueden reducir la incidencia de diferentes enfermedades crónicas que comparten como origen común algún componente inflamatorio. Existe un vínculo muy estrecho entre la capacidad antioxidante de los polifenoles y su actividad antiinflamatoria (Valério et al., 2009; Singh et al., 2010). A los flavonoides se les atribuye la capacidad de inhibir la actividad de enzimas proinflamatorias (COX, LOX, FLA2) o afectar la transcripción de enzimas prooxidantes, (NOS, LOX, XO, NOx) (López-Alarcón & Denicola, 2013). Los flavonoides como quercetina y resveratrol tienen la capacidad de interferir en la vía de activación del factor de transcripción NF-κB que inducen la expresión de enzimas prooxidantes que participan en la respuesta inflamatoria (López-Alarcón & Denicola, 2013). En general se ha demostrado que los flavonoides polihidroxilados inhiben preferentemente a la 5-LOX y los

menos hidroxilados inhiben a la COX. En cambio, *in vivo* pueden comportarse como inhibidores duales, probablemente debido a la biotransformación que sufren en el organismo. Hay estudios que indican que las flavonas inhiben preferentemente a la COX mientras que los flavonoles parecen inhibir preferentemente a la LOX (Verri et al., 2012; Kim et al., 2004, 2014). Se han reportado flavonoides que actúan sobre células que participan en el proceso inflamatorio como por ejemplo sobre la proliferación de Linfocitos B y T o sobre la síntesis de mediadores proinflamatorios inducidos por LPS o citoquinas como TNF o la IL-1B en macrófagos. Los polifenoles inhiben de la liberación de enzimas lisosomales (Chow et al., 2005); atenuar la expresión de genes proinflamatorios (Kwon et al., 2005), e inhiben la síntesis de oxido nítrico (Mamani-Matsuda et al., 2004)

Esto pone de manifiesto que son excelentes fuentes para el diseño de fármacos multivectoriales contra la inflamación (Devi et al., 2017; Sivakumar et al., 2009; Williams et al., 2013).

## SÍNDROME METABÓLICO

El Síndrome Metabólico (SM) es una entidad clínica controvertida que aparece, con amplias variaciones fenotípicas. No se trata de una única enfermedad sino de una asociación de problemas de salud que pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo, causados por la combinación de factores genéticos y ambientales asociados al estilo de vida en los que la resistencia a la insulina se considera el componente patogénico fundamental (Bello Rodríguez et al., 2012).

Existen condiciones asociadas y predisponentes de este cuadro patológico tales como sedentarismo, incremento de la edad, desbalance hormonal, carga genética, pertenencia étnica y dietas aterogénica y diabetogénica.

A nivel internacional, no existe un criterio único para definir el SM. Esos conceptos muestran diferencias, no solo con relación a los parámetros que se proponen para su diagnóstico (detección de insulinoresistencia, mediciones antropométricas, dosajes en sangre de triglicéridos, HDL, y glucosa, presión arterial y presencia de microalbuminuria), sino también con respecto a los puntos de corte fijados para cada uno de ellos (Wassermann & Grosso, 2013).

Así también, el origen fisiopatológico del síndrome metabólico aún está en discusión. Se ha sugerido que la fisiopatología está basada principalmente en la resistencia a insulina (RI), como origen del conjunto de anormalidades que conforman el síndrome. Sin embargo, hay autores que consideran que se deben tratar por igual cualquiera de los componentes del síndrome y no al conjunto como una sola entidad, o tratar de entenderlo con un origen común (Lizazaburu Robles, 2013).

En cuanto a la epidemiología, en los países iberoamericanos se están alcanzando niveles alarmantes equiparables a los de los países desarrollados. Alrededor del 20% por ciento de individuos en edad adulta padecen este síndrome. La edad de los individuos propensos a padecer de SM ha ido bajando, lo cual obedece a la tendencia hacia los malos hábitos de alimentación y escaso ejercicio físico de la población en general desde etapas muy tempranas de la vida (López, Sosa, & Labrousse, 2007).

La presencia de este síndrome triplica el riesgo de enfermedad vascular tanto coronaria como cerebral, incrementa el riesgo de deterioro de la función renal y quintuplica el riesgo de mortalidad cardiovascular

considerándose como predictor de morbilidad y mortalidad cardiovascular (Wassermann & Grosso, 2013).

### *Fisiopatología del síndrome metabólico*

El aumento del tejido adiposo como consecuencia de las dietas hipercalóricas y el bajo gasto energético, y en particular el incremento de la grasa visceral abdominal, tienen un papel primordial en la patogenia y la morbilidad del SM, al cual se asocia un aumento de la insulinemia y resistencia a su acción en tejidos periféricos.

El metabolismo lipídico normal incluye liberación de ácidos grasos libres (AGL) desde los adipocitos a la sangre circulante, hacia el hígado y el músculo. La tendencia fisiológica es el almacenamiento de triglicéridos (TG) en adipocitos pequeños periféricos, pero cuando la capacidad de estas células se sobrepasa, se acumulan en el músculo y causan resistencia a la insulina de dichos tejidos. Este almacenamiento disfuncional de energía del obeso es, para muchos autores, el punto clave para el desarrollo del SM. En el hígado, una parte es oxidada y la mayoría reesterificada a TG. Si el proceso de reesterificación se satura, la acumulación de TG puede conducir al hígado graso. El aumento de la liberación de AGL y la síntesis de TG son los puntos clave en las alteraciones lipídicas del SM, por lo que un posible aspecto terapéutico sería aumentar la sensibilidad de los adipocitos a la insulina para incrementar su capacidad de almacenamiento de TG.

La obesidad abdominal favorece la aparición de dislipidemia e hipertensión arterial, así como la alteración de las concentraciones de glicemia en ayunas. La circunferencia de la cintura, como reflejo del tejido adiposo

visceral, se asocia con un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular.

El nexo común entre todos estos factores de riesgo es la resistencia insulínica. Cuando hay resistencia a la insulina, el páncreas intenta compensar esta situación mediante un hiperinsulinismo.

La falta de acción inhibidora de la lipólisis sobre los adipocitos produce una activación de la lipólisis de los TG y la liberación a la circulación periférica de AGL. Tanto la hiperinsulinemia como estos AGL disminuyen la acción en el tejido adiposo de la enzima catalítica lipoprotein lipasa, con lo que se produce un aumento de la producción de TG y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

Sin embargo, el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) no está elevado. Por una parte, son tomadas por los macrófagos, que se convierten en células espumosas y, por otra, tienen una acción local inflamatoria, facilitando la formación de la placa de ateroma.

Las HDL son sometidas a la hidrólisis de la lipasa hepática, pierden su poder antioxidante y antiinflamatorio y acortan su vida media, lo que supone un riesgo de enfermedad cardiovascular, independientemente de los valores de LDL y triglicéridos en sangre.

El hiperinsulinismo y la insulino-resistencia del SM pueden promover *per se* la hipertensión arterial. La presión arterial elevada en presencia de dislipidemia favorece el aumento de la filtración de lipoproteínas pequeñas a través de los capilares, produciéndose un aumento de la concentración de lipoproteínas aterogénicas en el tejido intersticial, lo que facilita el depósito de colesterol en la pared de las arterias y en los macrófagos (Fernández-Travieso, 2016).

Además de las repercusiones en el desarrollo de la aterosclerosis, últimamente se han relacionado el SM y la RI con otras enfermedades, como el hígado graso no alcohólico y el síndrome del ovario poliquístico (Gimeno, Martínez, Calleja, & Lenguas, 2005). En cuanto a los factores de riesgo subyacentes, encontramos la Obesidad y la Insulinorresistencia.

## *OBESIDAD*

La incidencia de la obesidad está aumentando a un ritmo alarmante y se está convirtiendo en un importante problema de salud pública.

La obesidad se define de forma general como una "manifestación fenotípica de acumulación anormal o excesiva de grasa que altera la salud y aumenta la mortalidad" (Organización Mundial de la Salud, 1998). Surge de un desequilibrio en la elevada ingesta de energía y el insuficiente gasto energético.

Se trata de una enfermedad crónica compleja, multifactorial, que se considera un factor de riesgo para la génesis o el desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo hipertensión, diabetes tipo 2 (estado prediabético, Zimmet, Alberti, & Rios Serrano, 2005), enfermedad coronaria, patologías inflamatorias básicas, cáncer, complicaciones respiratorias, y osteoartritis (Ahn, Lee, Kim, Park, & Ha, 2008).

Se considera como un complejo trastorno neuroendocrino en el que la predisposición genética y los factores fisiológicos, etiológicos, ambientales y sociales actúan en concierto (González-Castejón & Rodríguez-Casado, 2011).

A nivel tisular, la obesidad es inducida por la hipertrofia de los adipocitos y la generación de nuevos adipocitos a partir de células precursoras. En los

casos en los que se pone de manifiesto hipertrofia, se registra la consecuente pérdida de la capacidad de almacenar energía por mecanismos de translocación ectópica de ácidos grasos libres (depósito en órganos como el hígado, corazón, músculo esquelético, células beta del páncreas donde se observan efectos tóxicos agravados por lipoperoxidación dentro del tejido hasta provocar la disfunción orgánica) e inflamación del tejido adiposo (adipositis crónica, acumulación de macrófagos, producción de citoquinas -proinflamatorias/proaterogénicas- y resistencia a la insulina).

Adicionalmente, la obesidad promueve el estrés oxidativo, aunque aún no está claro si esto se debe a la condición patológica independiente de la obesidad o a alteraciones relacionadas con la homeostasis fisiológica como hiperglucemia e hiperlipidemia.

La respiración mitocondrial, a través de la oxidación de la glucosa y/o ácidos grasos, puede generar estrés oxidativo. Este proceso puede exacerbarse en la obesidad debido a los niveles más altos de sustratos mitocondriales disponibles, es decir, glucosa alta y ácidos grasos, lo que puede causar la producción de superóxido.

Junto con la alteración de la función mitocondrial, la obesidad y la acumulación de masa grasa puede causar un ambiente prooxidativo (Varela-López, Quiles, Cordero, Giampieri, & Bullón, 2015) mediante la estimulación de la inflamación crónica. La inflamación genera altos niveles de producción de radicales libres por las células inmunes como parte de la respuesta inmune.

Este estrés oxidativo podría ser el punto de inflexión molecular en la progresión de la mala salud asociada con la obesidad, pudiendo acelerar la progresión de otras enfermedades y patologías relacionadas con la edad, por ejemplo, Alzheimer y múltiples formas de cáncer (Salmon, 2016), esto último demostrado en modelos murinos.



El tratamiento de la obesidad consiste en la prescripción de dos tipos de medicamentos. El fármaco Orlistat que reduce la absorción intestinal de grasa a través de la inhibición de la lipasa pancreática, y la sibutramina, que es un anorexígeno. Ambos costosos y potencialmente peligrosos (por ejemplo, Orlistat presenta efectos secundarios gastrointestinales indeseables como manchas de grasa, flatulencia, frecuentes deposiciones sueltas, incontinencia fecal, déficit en la absorción de vitaminas liposolubles; en cuanto al nombrado anorexígeno, la FDA (Food and Drug Administration) ha ordenado suspender la comercialización de este medicamento en Estados Unidos debido a sus efectos perjudiciales sobre el aparato cardiovascular. También se ha retirado del mercado por los mismos motivos en la mayor parte de los países de Europa y el resto del mundo.

Por ello hay toda un área de investigación abocada a la selección de productos naturales, incluyendo extractos naturales y compuestos aislados de las plantas, que presenten efectos tendientes a contrarrestar este trastorno.

Entre los compuestos utilizados en la nutrición moderna y la farmacología, los polifenoles que se caracterizan por presentar marcada actividad antioxidante son significativos como agentes antiobesidad. Son capaces de reducir los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol LDL en la sangre, aumentar el gasto energético y la oxidación de grasa, provocar el descenso de peso corporal y adiposidad. Se ha demostrado que también son capaces de inhibir las enzimas relacionadas con el metabolismo de las grasas, incluida la lipasa pancreática, lipoproteín lipasa y glicerofosfato deshidrogenasa (Mashmoul, Azlan, Khaza'ai, Yusof, & Noor, 2013). Los mecanismos antiobesidad de los fitoquímicos parecen implicar la mediación de vías de señalización celular complejas e interconectadas. La combinación de fitoquímicos múltiples puede dar lugar a efectos

sinérgicos. Son capaces de reducir la masa del tejido adiposo mediante la inhibición de la proliferación de células precursoras, aumentar la tasa de apoptosis durante el ciclo de vida de los adipocitos e inhibir la absorción de triglicéridos en la dieta mediante la reducción de la actividad de la lipasa pancreática (Williams et al., 2013).

## *DIABETES MELLITUS*

Más de 400 millones de personas en el mundo padecen diabetes y desde la década del '80 la prevalencia en la población adulta se ha duplicado (del 4,7% al 8,5%, Organización Mundial de la Salud, 2016) y ésta ha tenido un crecimiento acelerado en Iberoamérica, asociado al incremento en las tasas de obesidad y sobrepeso, producto de la rápida urbanización experimentada en los últimos años, la cual determina cambios en actividad física y en los hábitos dietéticos (López-Jaramillo, Rey, Gómez-Arbeláez, Rodríguez, & López-López, 2011). Siendo el riesgo general de morir, entre las personas con diabetes, de al menos del doble de las personas que no la padecen.

La diabetes es una enfermedad crónica progresiva que se caracteriza por la elevación de las concentraciones de glucosa en la sangre, que sobreviene cuando el páncreas no produce suficiente o cuando el organismo no puede usar eficazmente la insulina que produce. Las concentraciones de glucosa plasmática anormalmente altas (hiperglucemia) pueden, lesionar gravemente distintos órganos, llevando a la manifestación clínica de infarto del miocardio, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal, amputación de miembros inferiores, pérdida de agudeza visual y neuropatías.

Existen dos tipos de diabetes. La diabetes de tipo 1 (insulinodependiente) cursa con una producción deficiente de insulina en el organismo.

En la diabetes de tipo 2 (DMT2) el organismo no usa la insulina eficazmente y es la más generalizada de los dos tipos de diabetes. A pesar de tratarse de una enfermedad que tiene su mayor ocurrencia entre los grupos etarios superiores, actualmente se empezó también a diagnosticar en niños. El riesgo de DMT2 se ve determinado por la interacción de factores genéticos y metabólicos, y se incrementa por factores étnicos, antecedentes familiares, edad avanzada, sobrepeso y obesidad, alimentación malsana, falta de actividad física y tabaquismo. El exceso de grasa corporal, cuya medición refleja varios aspectos del régimen alimentario y de la actividad física, es el factor que se asocia más estrechamente con el riesgo de DMT2. El manejo correcto de la hiperglucemia postprandial es importante para la prevención de las complicaciones micro y macrovasculares. La promoción de un régimen alimentario más sano y de la actividad física son más eficaces que los fármacos. Diversas intervenciones farmacológicas (por ejemplo, el tratamiento con metformina y acarbosa) previenen o retrasan la aparición de la DMT2, pero en la mayoría de los estudios no han sido tan eficaces como la modificación de la alimentación y la actividad física, y su efecto se disipa cuando se suprime el medicamento.

Los fármacos tienen como blanco de acción mejoras en la secreción de insulina (por ejemplo, gliburida y glipizida) o la sensibilidad (tiazoloninas y biguanidas como la Metformina) o control de la hiperglucemia. Para este último objetivo se emplean fármacos que retrasan y/o previenen la absorción de glucosa. Las enzimas digestivas,  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, son enzimas clave en la descomposición del almidón en glucosa antes de su posterior captación en el torrente sanguíneo. Fármacos, como el Miglitol y la Voglibosa, son eficaces sólo en

la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa, pero la acarbosa proporciona inhibición tanto de la glucosidasa como de la amilasa. Estos fármacos pueden causar efectos secundarios como disconformidad abdominal, flatulencia y diarrea que reducen el cumplimiento del paciente y la efectividad del tratamiento (Van de Laar et al., 2005). Como resultado, hay interés de descubrir drogas para reemplazarlos (Pantidos, Boath, Lund, Conner, & McDougall, 2014).

En las últimas décadas, la reputación de los remedios herbales ha aumentado globalmente debido a su eficacia terapéutica y seguridad. Muchas plantas han sido estudiadas por su potencial antidiabético (Alamgir, Javid, Hameed, & Mustafa, 2015).

Las dietas a base de alimentos naturales, ricas en compuestos bioactivos, como los polifenoles, son estrategias atractivas para limitar la absorción intestinal de glucosa y una herramienta potencial de control glucémico. Varios polifenoles dietarios y sus metabolitos influyen en el metabolismo de los carbohidratos en muchos niveles (Atkinson, 2005; Rechner et al., 2002) inhibición de la digestión de carbohidratos y absorción de glucosa en el intestino, estimulación de la secreción de insulina de las células  $\beta$ , modulación de la liberación de glucosa del hígado, la activación de los receptores de insulina y la captación de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina son sólo algunos de los mecanismos de acción descritos (Barberis et al., 2017; Kumashiro et al., 2011).

## LEGUMINOSAS COMO ALIMENTOS FUNCIONALES

Las leguminosas son plantas pertenecientes a la familia *Fabaceae* que han sido cultivadas por siglos por una gran variedad de culturas. Se caracterizan por presentar un fruto en forma de vaina generalmente alargada que se abre

por la mitad, encerrando en su interior las semillas, este se denomina legumbre. Desde el punto de vista botánico se considera que las legumbres son frutos secos dehiscentes, que se abren al madurar, derivados de un ovario unicarpelar. Según la especie se consume la vaina, la semilla o ambas (Fraile, García-Suárez, Martínez-Bernal, & Slomianski, 2007).

Las leguminosas por su bajo costo son alimentos importantes, particularmente, en países pobres donde representan una importante fuente proteica. Desde hace un par de décadas aumentó el interés del estudio de las leguminosas debido a su valor nutricional y contenido en metabolitos secundarios biológicamente activos. Un ejemplo destacado de fitoquímicos presentes en las leguminosas son las isoflavonas (Bravo, Siddhuraju, & Saura-Calixto, 1998). Las isoflavonas son compuestos fenólicos tipo flavonoides que presentan actividad estrogénica y son capaces de reducir las molestas manifestaciones típicas de la menopausia (Franke, Custer, Cern, & Narala, 1994). Las isoflavonas están presentes solo en alimentos de origen vegetal, en las leguminosas, en especial la soja (*Glycine max*) y en menor grado el poroto (*Phaseolus vulgaris*) (Franke et al., 1994). En poblaciones que tienen alto consumo de alimentos ricos en isoflavonas (especialmente leguminosas como la soja), se ha detectado una baja incidencia de cáncer atribuidas también a las isoflavonas (principalmente daidzeína y genisteína), por su actividad antiproliferativa y antiangiogénica (Boik, 1996; Kaufman, Duke, Brielmann, Boik, & Hoyt, 1997). A pesar de los beneficios que suponen la ingesta de legumbres como alimentos funcionales, existen limitaciones con respecto a su aprovechamiento y consumo, principalmente la complejidad en la preparación de alimentos a base de leguminosas y problemas gastrointestinales. Estos últimos se atribuyen a la falta de enzimas necesarias para el metabolismo de oligosacáridos, los que al llegar al intestino grueso son hidrolizados por

enzimas bacterianas, que liberan como consecuencia dióxido de carbono, hidrógeno y otros gases (Granito, Champ, David, Bonnet, & Guerra, 2001; Granito, Champ, Guerra, & Frias, 2003). Otro factor que entorpece el aprovechamiento de las legumbres como alimento es la presencia en las mismas de factores antinutricionales como inhibidores de proteasas, lecitinas, fitatos y ciertos compuestos fenólicos como taninos (Carmona, Seidl, & Jaffé, 1991; Kaufman et al., 1997), los cuales disminuyen la utilización de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas y minerales. La inactivación o la eliminación de estos factores se hace necesaria para incrementar su calidad y potencialidad como alimentos funcionales. Generalmente, los tratamientos térmicos usuales a los cuales son sometidas las legumbres para ablandar su textura y poder así ser consumidas, también eliminan o disminuyen los factores antinutricionales e incrementan su valor nutricional, digestibilidad de proteínas y de carbohidratos (Chiou, 2001; Franke et al., 1994). Métodos menos convencionales como la germinación o fermentación de las semillas de leguminosas, practicada desde tiempos muy antiguos en países orientales, son procesos que han demostrado su capacidad de reducir los factores antinutricionales y aumentar los niveles de fitoquímicos presentes en las legumbres mejorando la aceptabilidad por parte del consumidor e incrementando su potencial como alimento funcional (Sathe, Deshpande, Reddy, Goll, & Salunke, 1983; Vidal-Valverde et al., 1994).

## EL GÉNERO *Prosopis*

El género *Prosopis* (Linnaeusemend. Burkart) pertenece a la familia *Fabaceae*. Consta de 45 especies distribuidas principalmente en zonas áridas y semiáridas de América del sur y del norte, el este de Asia y el norte

de África. En América, el género *Prosopis* se encuentra en un área que abarca desde el suroeste de Estados Unidos hasta la Patagonia argentina, siendo característica del desierto del Monte en Argentina, desde la provincia de Salta hasta la provincia de Chubut (Cabrera, Arenas, Jorge, Lopez Hugo, & Bertullo, 1994). En los Estados Unidos y en México se distribuyen 8 especies, mientras que en América del sur existen 32 especies, 28 de las cuales se hallan en Argentina: 16 arbóreas y el resto arbustivas (Burkart, 1976; Fagg & Stewart, 1994). De estas últimas, 13 especies son endémicas de nuestro país (Burkart, 1976; FAO, 1997). La gran diversidad morfológica de las especies de Sudamérica sugiere que el principal centro de irradiación del género *Prosopis* se encuentra en la región del Chaco argentino-paraguayo (Burkart, 1976; Burkart & Simpson, 1977; Roig, 1993a). La expansión del género hacia regiones más frías y secas tales como las regiones biogeográficas del Monte, Prepuna y la Patagonia, implica la adquisición y/o ajuste de características morfológicas y fisiológicas que permiten a las plantas evitar o tolerar recursos limitados y las duras condiciones ambientales características de esas regiones. Entre esas adaptaciones se encuentran el cambio del modo de crecimiento arbóreo a arbustivo, disminución de tamaño de la hoja y modificaciones anatómicas, entre otras (Burkart, 1976; Burkart & Simpson, 1977; Cabrera, Arenas, Jorge, Lopez Hugo, & Bertullo, 1976; Roig, 1993 b). En nuestro país se clasificó la distribución del género *Prosopis* en seis grandes regiones climáticas (Roig, 1993 b):

- 1) Chaqueña-Mesopotámica: Clima subtropical sin estación seca. Predominan las especies arbóreas.
- 2) Chaqueña-xérica: Clima subtropical con estación seca. Predominan especies arbóreas.

3) Pampeana: Clima templado y lluvias alrededor de 600 mm anuales. Predominan especies arbóreas.

4) Preandina: Región xérica con una amplia variación de temperaturas. Predominan especies arbóreas.

5) Monte: Clima árido y semiárido. Predominan especies arbustivas.

6) Patagónica: Clima frío y suelos frecuentemente congelados. Se encuentran especies arbustivas.

En el centro y noroeste de Argentina crecen numerosas especies, siendo las más abundantes *Prosopis alba* Grisebach y *Prosopis nigra* [Grisebach] Hieronymus (Burkart, 1976; Felker et al., 2001; Felker, Geesing, & Bingham, 2000). La mayor concentración de árboles ocurre en el Chaco (Roig, 1993a). El Chaco ocupa en la Argentina la porción centro-norte, con una superficie de 52 millones de hectáreas; se lo divide en tres regiones principales: Chaco árido, semiárido y subhúmedo. Dentro de los algarrobos, *Prosopis flexuosa* y *Prosopis chilensis*, en el Chaco árido, y *Prosopis nigra* y *Prosopis alba*, en el Chaco semiárido y subhúmedo, son las especies más frecuentes e importantes (Coirini & Karlín, 1999).

La capacidad de las especies del género de tolerar sequía y condiciones edáficas adversas, como la salinidad y alcalinidad, así como su adaptación a la herbivoría, son las principales razones de su posición dominante en la vegetación leñosa de zonas áridas y semiáridas de América (Fagg & Stewart, 1994), en regiones donde las precipitaciones fluctúan entre 50 y 400 mm anualmente y las temperaturas oscilan entre 12 °C y 48 °C. La gran capacidad para tolerar la sequía es debido a que se puede comportar como una freatófita obligada o facultativa, es decir, una planta que posee un sistema de raíces extremadamente profundo que le permite alcanzar las fuentes permanentes de agua subterráneas o napas freáticas (Giovannetti,



Lema, Bartoli, & Capparelli, 2008); además es una especie xerofítica, es decir, posee rasgos fisiológicos que incluyen ajuste osmótico, estomas que responden a los déficits de saturación de vapor de agua en la atmósfera y a la elevada intensidad de la luz para evitar la saturación del proceso de fotosíntesis (Cavagnaro & Passera, 1993). Es por ello por lo que las especies del género *Prosopis* son de gran importancia ecosistémica en zonas áridas y semiáridas del mundo, y de vital importancia en la economía rural de las mismas. Existen también especies exclusivas de climas tropicales como *Prosopis pallida* y *Prosopis juliflora* en Perú y América central que por ende son incapaces de tolerar bajas temperatura y otras especies como *Prosopis alba*, *Prosopis glandulosa* y *Prosopis chilensis* que son de clima subtropical capaces de resistir heladas (Pasiiecznik, 2001).

Las especies pertenecientes al género *Prosopis* sp. además son fijadoras de nitrógeno (Bernardi, 2000), es por ello que existe un gran interés en el cultivo de estas especies para detener el avance de la desertificación y erosión del suelo en zonas áridas y semiáridas. Se conoce que el nitrógeno fijado por árboles de la familia de las leguminosas puede variar 30-50 kg de nitrógeno por árbol.

## Usos del género *Prosopis* sp.

Las especies arbóreas del género *Prosopis* sp. tienen usos múltiples, pero sólo algunas tienen importancia económica. Uno de los principales usos de las especies arbóreas del género *Prosopis* es como fuente de combustible, a menudo la principal fuente de leña y carbón. La madera también se utiliza para la construcción y manufactura de muebles (Pasiiecznik, 2001). Las hojas de algunas especies de *Prosopis* pueden ser empleadas para la alimentación animal; tanto el follaje inmaduro, seco y caído como el fresco

(Pasiiecznik, 2001). También se ha reportado el uso de hojas de *Prosopis* como aditivo para mejorar la calidad de los suelos. Se usan tanto frescas como sometidas a un proceso de compostaje (Alzamora Román, 1988; Singh, 1996). El polen y néctar de las flores de *Prosopis* son fuente nutritiva para las abejas (agentes de polinización). La miel de flores de *Prosopis* es de color amarillo claro, de buena calidad, con sabor agradable y un ligero aroma (Pasiiecznik, 2001). La goma cuando está fresca es líquida y amarilla, luego endurece y oscurece lentamente (Pasiiecznik, 2001). Los exudados de goma de *Prosopis alba* son solubles en agua con características similares a la goma arábiga (alta solubilidad en agua, similar contenido en proteína y actividad interfacial) (López-Franco et al., 2012; Vasile, Martinez, Pizones Ruiz-Henestrosa, Judis, & Mazzobre, 2016). Se ha descrito su uso en microencapsulados de aceites, como aditivos de alimentos, emulsionantes, agentes espesantes, para fabricar adhesivos y para preparados farmacéuticos entre los usos principales (López-franco, Goycoolea, Valdez, & Calderón, 2006; Vasile, Romero, Judis, & Mazzobre, 2016). El contenido de taninos de varias partes de diferentes especies del género *Prosopis* varía entre 6-20% (Pasiiecznik, 2001). Los taninos de la corteza, de los extractos de la madera y de los frutos son utilizados en los procesos de curtido y curado de la piel de ganado en la producción de cueros. También se han elaborado fibras a partir de ciertas especies de *Prosopis*. Los extractos de raíz eran utilizados para producir un colorante marrón-violeta empleado para teñir algodón y otros materiales (Díaz Celis, 1995). La corteza y la goma se empleaban para producir tinturas, pinturas, cosméticos y shampoo (Felger, 1977).

En cuanto a sus usos medicinales, en América del sur se utilizan preparaciones a base de brotes frescos de diferentes especies de *Prosopis* para tratar la conjuntivitis. Preparaciones a base de hojas (a menudo

mezcladas con otros productos) para reparar fracturas de hueso, cálculos hepáticos, dispepsia y enfermedades venéreas (D'antoni & Solbrig, 1977). En América del norte se preparan soluciones acuosas o infusiones de la mayoría de las partes de la planta y son empleadas con fines medicinales (Pasiiecznik, 2001). Muchas tribus utilizan las hojas, los brotes, las gomas y la corteza como laxantes, para el tratamiento de dolencias oculares, para aliviar dolores de garganta y afecciones respiratorias, tratamiento de la diarrea y otros desordenes estomacales incluyendo indigestión y ulcera; como desinfectante de heridas y para tratar problemas de piel (Felger, 1977).

### *Frutos de Prosopis*

Los árboles de este género poseen una elevada producción de frutos o vainas en comparación con otras especies que crecen en condiciones medioambientales similares. Florecen y fructifican al tercer o cuarto año después de la germinación (Pasiiecznik, 2001). Junto con los cereales y algunas frutas y raíces tropicales, varias leguminosas han sido la base de la alimentación humana durante milenios, siendo su utilización un compañero inseparable del hombre (Burkart, 1978). El mesocarpo de *Prosopis* ha sido explotado como alimento en diferentes partes del mundo donde el género crece de manera silvestre, y se cuenta con numerosas evidencias tanto arqueológicas como etnohistóricas que avalan la importancia de la utilización de este género (Burkart, 1976). Diferentes partes del fruto de algarrobo han sido registradas arqueológicamente en la Argentina. En el Shincal Inka en la provincia de Catamarca se demostró la presencia de numerosos morteros de piedra cuya superficie era suave mostrando un pulido artificial. Algunos de estos morteros fueron desenterrados y se pudo

recuperar a partir de la superficie de molienda, un sedimento adherido a la superficie interna del orificio de dicho artefacto. Este sedimento se analizó mediante técnicas estandarizadas y se logró recuperar almidón de granos a partir de las mismas; un porcentaje bajo de los granos recuperados fueron identificados preliminarmente como perteneciente al género *Prosopis* (Giovannetti et al., 2008). En el sur de la provincia de Mendoza se registran evidencias de su consumo, mencionadas tanto en las crónicas de los primeros europeos, como así también en el registro arqueológico de hace 4000 años (Hernández, Lagiglia, & Gil, 1999; Lagiglia, 1956, 1968; Llano, 2011), continuando hasta tiempos históricos (Durán, 2004; Michieli, 1978, 1983).

Sorprendentemente en la antigüedad, las técnicas de preparación de alimentos a partir de las vainas de *Prosopis* eran similares entre las poblaciones en América del Norte y del Sur; las vainas secas se machacaban en morteros, las semillas se descartaban y la harina de mesocarpo dulce se preparaba para ser almacenada durante largos períodos de tiempo (Capparelli & Lema, 2011). A menudo la harina de mesocarpo de alto contenido de azúcar se humedecía ligeramente y se moldeaba en forma de bollos similar a una hogaza de pan actual, luego se dejaba secar y se almacenaba hasta la cosecha del año siguiente, sirviendo como alimento durante la época en la que no fructificaban los árboles. Otra alternativa era guardar las vainas en cestos sobre los techos de las viviendas (Bean & Saubel, 1972). Los etnobotánicos conjeturaron que la población indígena podía satisfacer sus requerimientos en proteínas de aproximadamente 50 g diarios mediante el consumo de carne de pequeños animales como aves y reptiles; mientras que su requerimiento energético de 2000 calorías diarias podía satisfacerse mediante el consumo de la harina de vainas de *Prosopis* con alto contenido de azúcares (Felger, 1990). Si bien el consumo de

algarrobo se ha reducido drásticamente, aún quedan comunidades rurales que lo consumen en forma de harinas y bebidas, además de utilizarlo como forraje (Capparelli, 2007).

Las partes del fruto del algarrobo que son explotadas para la obtención de alimentos y bebidas son: exocarpo (epicarpo), mesocarpo (pulpa), endocarpo. Los trabajos etnobotánicos sugieren que la parte más utilizada es el mesocarpo, la cual provee un rico aporte en carbohidratos; en tanto que la semilla no fue ampliamente usada a pesar de su alto contenido en proteínas (Felger, 1977; Nabhan, Weber, & Berry Kiva, 1979).

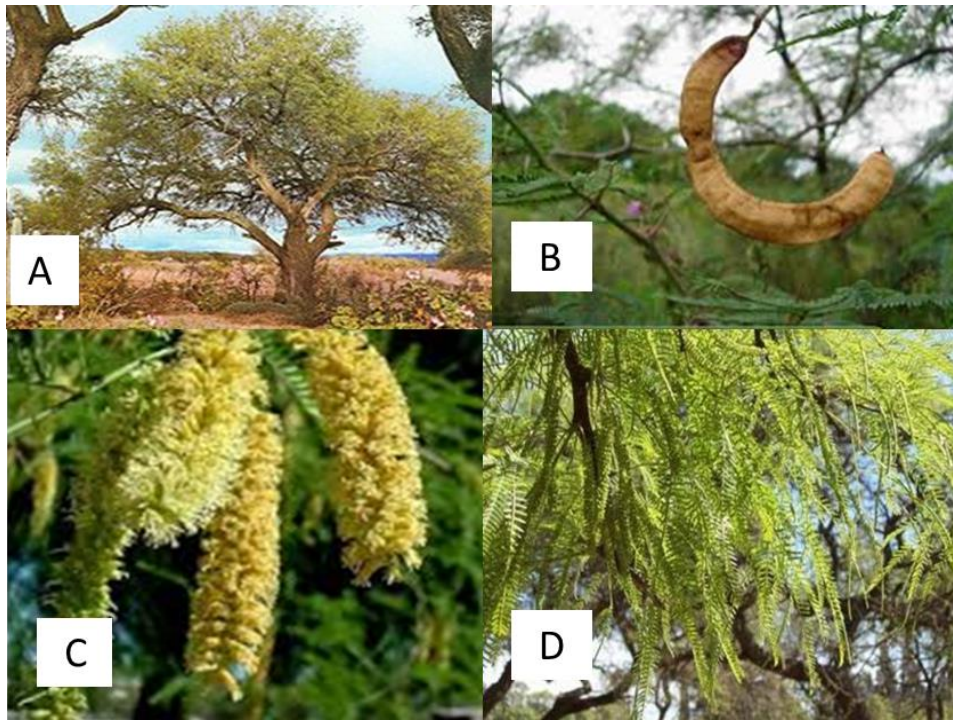
### *Prosopis alba* Grisebach

*Prosopis alba* Grisebach se conoce vulgarmente como algarrobo blanco, también recibe el nombre de: ibopé-pará (en guaraní) que significa “árbol para comer”, takku (en quechua) que significa “el árbol”, patá (en diaguita), maapik y joayuc (en toba), fwayuk (en wichí) (Roig, 1993b). Tiene un área de distribución geográfica muy amplia en la región central del país, donde es un componente común en el bosque chaqueño de maderas duras, ocupando el estrato arbóreo secundario (Burkart, 1952). Esta especie de gran porte se distribuye en la Argentina, en la provincia de Córdoba en su región centro-norte, y se extiende hacia el norte del país, Chaco paraguayo y boliviano, hasta Ecuador. También ha sido mencionada para Chile y Perú. En el límite sur de distribución, las precipitaciones están en un rango que va desde 450 mm a 600 mm, en esta área se comporta como freatófita, encontrándose preferentemente a orillas de cañadas y ciénagas o a lo largo de ríos y arroyos. Alcanzan el mayor crecimiento donde las napas freáticas se encuentran hasta 15 m de profundidad. En el norte, las lluvias superan los 1100 mm. Soporta temperaturas muy elevadas

y heladas no muy fuertes (Galera, Trevisson, & Bruno, 1992). Está presente en las sabanas de suelos arenosos, es común en márgenes de represas y en los bosques en galería de los ríos, estableciendo cinturones boscosos alrededor de depresiones salinas.

El algarrobo blanco (Figura 9) es un árbol de ramas retorcidas, delgadas, largas, con follaje fino. Las espinas, de 1 a 4 cm de longitud, no son muy abundantes. La copa redondeada, extendida de hasta 15 m de diámetro. La altura total varía de 5 a 15 m con diámetro de fuste de hasta 1,5 m. Las flores, dispuestas en racimos cilíndricos densifloros, amarillos de 7 a 11 cm de longitud, son hermafroditas blanco verdosas a amarillentas, pequeñas. Produce de 5 a 40 kg de frutos por año, fructifica entre diciembre y marzo. Los frutos son vainas lineares, arqueadas o anulares, de 12 a 25 cm de largo, 1,2 a 1,8 cm de ancho y 0,5 cm de espesor, color amarillo paja, muy comprimidas, de bordes paralelos, con semillas que se identifican en las caras laterales, y pulpa dulce. Están conformados por una parte externa, el exocarpo (o epicarpo), de naturaleza fibrosa, que envuelve al mesocarpo o pulpa y al endocarpo también fibroso, pero mucho más duro que el exocarpo. Las semillas (15 a 30 por vaina) son de forma ovoidal, de 6 a 7 mm de largo, 4 a 5 mm de ancho, y de color castaño (Biloni, 1990; Burkart, 1976; Felker, 1999). El mesocarpo de las vainas es grueso en la madurez, marrón suave, con endocarpo segmentado longitudinalmente, terminación bastante ancha de 5 a 7 mm, subcoriácea; con la terminación del fruto de 1 cm de longitud recto o curvado en la base, y a veces mostrando las formas de las semillas del interior con una subyacente marca. La sección transversal lo muestra como biconvexo, subcoriáceo, cerrado. Las semillas son de color marrón suave a rojizo, oblongas, sin punta, alisadas, abovedadas transversal y elípticamente, algo asimétricas y protuberantes, la línea de fisura es bastante larga, y el funículo es corto. De terminación

brusca, ahusada, con una grieta en forma de cruz, de 4, 2–7 mm de longitud por 2, 6–3, 9 mm de ancho. El endosperma es vítreo y asimétrico. Los cotiledones son amarillo claro en forma de “s”, con base asimétrica redondeada en la parte de la radícula, más pronunciada que en las otras especies (Briner, 1985).



**Figura 9.** A) Árbol de *Prosopis alba*; B) Vainas (frutos) de *Prosopis alba*; C) Flor de *Prosopis alba* y D) Hojas de *Prosopis alba*.

### *Prosopis nigra* Grisebach Hieronymus.

Se conoce vulgarmente como “Algarrobo”, “Algarrobo negro”, “Árbol negro” (Argentina); “Acacia de catarina”, “Algarrobo morado”, “Algaroba”, “Algaroba negra”, “Algaroba negro”, “Algaroba noir”, “Algarroba”, “Algarroba dulce”, “Algarrobo negro”, “Algarrobi negro”, “Algarrobo amarillo”, “Algeroba negra”, “Árbol negro”, “Aroma”, “Barbasco”, “Bate caixa”, “Bayahonda”, “Black algaroba”, “Carbon”, “Chachaca”, “Cuji yaque”, “Ibope-hu”, “Ibope-saiyu”, “Igope-guazu”,

“Ironwood”, “Jacaranda”, “Manca-caballa”, “Mesquite”, “Mezquite”, “Nacasol”, “Screwbean”, “Tintatico”, “Visna”, “Yura-tacu”, “Zwarte algaroba”. Es un árbol caducifolio de 5 a 10 m de altura, inerme o poco espinoso, ramas flexibles y péndulas con inflorescencias en racimos amarillentos cilíndricos y axilares. Tiene flores muy pequeñas, amarillas con tintes rojizos, reunidas en racimos pedunculados de 3 a 9 cm de long., multifloros y péndulos. Sus hojas son bipinaticompuestas, verde claro brillante durante su brotación primaveral y verde seco opaco en verano y otoño. Raquis foliar central de 2 a 6 cm long., a partir del cual, salen de 1 a 3 pinas de 4 a 9 cm long., con 20 a 35 pares de folíolos de 6 mm long. aproximadamente, oblongos, con ápice redondeado y separados entre sí por una distancia de 1 a 2 mm. Su tallo es un tronco leñoso con corteza pardo-oscura con fisuras longitudinales profundas y ramas flexibles y péndulas dan una copa aparasolada. Los frutos son legumbres rectas, o apenas subfalcadas, gruesas, algo comprimidas, carnosas, submoniliformes, 10 a 16 cm de longitud por 0,7 a 0,9 cm de ancho, de color amarillo a veces rojizo o con manchas violetas a la madurez; comestibles, dulces, con 8 a 27 artejos, oblicuamente subcuadrados (Figura 10). Las semillas son elípticas o rómbicas, más raramente aovadas, 3,5 a 7,5 mm de longitud por 2,7 a 4,2 mm de ancho (Burkart, 1976).

Vive en diversos suelos. Tolera muy bien la sequía (Burkart, 1976). En la Argentina se distribuye por una amplia región, que forma parte de las provincias Fitogeográficas Chaqueñas, parte del Monte y del Espinal. En la provincia de Salta, aparece sólo esporádicamente en el quebrachal, es el árbol peridoméstico por excelencia. En Santiago del Estero da origen a extensas formaciones en los alrededores de las ciudades. Favorecido por el fuego o la tala, juega un importante papel en las etapas de degradación. Es una especie particularmente agresiva. En un área clausurada en Santiago



del Estero, se observa que al desarbustar el campo lo primero que aparece es *P. nigra*; (Roig, 1993a).



**Figura 10.** Frutos de *Prosopis nigra*.

### *Usos en alimentación animal*

La región del Chaco semiárido de Argentina, Bolivia y Paraguay tiene una gran cantidad de cabezas de ganado vacuno, ovino, caprino y equino. El algarrobo es un importante suministro de forraje para los mismos. En lugar de utilizar las vainas para la alimentación humana se las emplea para la alimentación animal debido que el uso de pasturas resulta insuficiente. La importancia del fruto del algarrobo como forraje recae en su calidad debido al elevado contenido proteico, carbohidratos y minerales (Karlin, 1983) así como en la digestibilidad equivalente a la alfalfa (Felker, 1979). El verano es cuando se tiene el mayor rendimiento en frutos para alimentación animal. En esa época las vainas se desprenden y caen al suelo, y a partir de allí son consumidos por animales tanto domésticos como salvajes. Para poder mejorar el uso de las vainas con este fin, es necesario cosecharlas y almacenarlas, de esta manera estará disponible como reserva en épocas de escasez de suministro de forraje. En la actualidad esta práctica se lleva a cabo en el noroeste argentino (Karlin, 1979) donde los frutos son reunidos

manualmente y almacenados en plataformas elevadas. Este procedimiento solo es posible en áreas con escasas lluvias. En Salta el 30% de la dieta de las cabras está representada por vainas molidas. El mayor inconveniente en la utilización de las vainas como forraje, es la elevada variabilidad en la producción de frutos de un año a otro debido a factores tales como las lluvias, el viento y las heladas tardías (Karlin, 1979).

### *Usos en alimentación humana*

El fruto del algarrobo (*Prosopis*) es un recurso valioso para la alimentación puesto que constituye una importante fuente de carbohidratos, proteínas y minerales. Su consumo, reconocido arqueológicamente, abarca un amplio espectro de posibilidades, tanto como materia prima para la elaboración de bebidas fermentadas (aloja) o refrescantes (añaapa), dulces (arrope) o como harina para panes y amasados (patay). Aún hoy, en diferentes regiones del Noroeste Argentino, específicamente en las provincias de Chaco, Formosa, Santiago del Estero, La Rioja y Catamarca, el aprovechamiento intensivo de estos frutos conforma una parte importante de la dieta de sus pobladores, quienes preparan comidas siguiendo procedimientos ancestrales, que se van difundiendo de generación en generación. En la provincia de Santiago del Estero, estas tradiciones alimentarias se mantienen hasta nuestros días (Figuerola & Dantas, 2006). También existen comunidades indígenas en el norte de Argentina como ser los Pilagá y Wichí en Chaco, que aún utilizan el algarrobo (Figuerola & Dantas, 2006).

## HARINA DE ALGARROBO

Durante muchos años, el Código Alimentario Argentino (CAA) definió en su artículo 681 a la “harina de algarrobo” como el producto elaborado solamente con las semillas del algarrobo blanco (*Prosopis alba* Grisebach) y del algarrobo negro (*Prosopis nigra* [Grisebach] Hieronymus), sin embargo, siempre se consumió la harina de mesocarpo. En septiembre de 2010 una Resolución Conjunta de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos (SPReI) y de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP), incorporó al CAA en su artículo 681 tris con el nombre de “Harina de fruto de algarrobo”, al producto de la molienda de los frutos completos, limpios, sanos y secos, del algarrobo blanco (*Prosopis alba* Griseb) y/o algarrobo negro [*Prosopis nigra* (Grisebach) Hieronymus]. El producto deberá rotularse como: harina del fruto de algarrobo, indicando la especie que corresponda: *Prosopis nigra* o *Prosopis alba*, Algarrobo blanco o Algarrobo negro o Mezcla de Algarrobo blanco y negro. La misma Resolución incorporó el Patay, un producto derivado de la harina de mesocarpo de algarrobo (Luchini, 2015).

Sin embargo, en el proceso tradicional de elaboración de la harina de fruto solo se usa el pericarpio, descartándose las semillas debido a la dureza del endocarpio que las recubre.

Según el proceso de producción de los pobladores de la región rural de Añatuya, Santiago del Estero, luego de la cosecha de las vainas el segundo paso para la producción de harina es el secado (Figuroa & Dantas, 2006). Una vez recolectadas las vainas se las extiende de inmediato al sol para que se sequen (el tiempo necesario para lograr el secado no es superior a los 3 a 5 días de buen sol ya sea en el techo de las viviendas o en trojas al aire). Esta costumbre también perdura en zonas del Chaco árido, Figura 11. Al

anochecer son guardados en el interior de la vivienda para evitar que se humedezcan o sean objeto de consumo por parte de depredadores. Este proceso de extendido y guardado diario se repite invariablemente hasta que los frutos se encuentran bien secos y sean fáciles de quebrar (Figuroa & Dantas, 2006).



**Figura 11.** Secado tradicional de vainas de algarrobo al sol.

Una vez secas las vainas se encuentran en condiciones para ser molidas convirtiéndolas en harina. Se emplean morteros de madera de algarrobo o de quebracho colorado para llevar a cabo ese procedimiento. Mientras se muelen las vainas se va tamizando, es decir, se van separando las semillas y restos compuestos de cáscara y fibra (afrecho). Para el tamizado se suele utilizar un instrumento que consiste en una estructura de madera a la que se adosa una rejilla de tela metálica, tela de arpillera y un colador de metal cilíndrico.

Así se obtiene harina que representa el 50 % del peso original de vainas ya apta para el consumo. Las semillas y restos de cáscara y fibra pueden ser

destinados a la alimentación animal como forraje (Figuroa & Dantas, 2006). Tradicionalmente, las vainas secas eran machacadas en un mortero (generalmente de piedra y de diseños diversos) para producir harina cuyas partículas eran de tamaño grosero (Felger, 1977), Figura 12. Otros métodos de molido manual o mecánico han resultado ser exitosos para el procesamiento de vainas de *Prosopis* (Del Valle, Marco, Becker, & Saunders, 1988; Grados & Cruz, 1996; Meyer, D., Becker, R., Gumbmann, M.R., Vohra, R., Neukom, H., & Saunders, 1986; Meyer, 1984; Saunders et al., 1986).

La harina de algarrobo obtenida a partir del mesocarpo es dulce. Si se la tuesta suavemente se obtiene una sustancia semejante al chocolate, tanto sensorialmente como desde el punto de vista del aroma, y si se les da un tostado intenso se crea un sustituto del café, pero libre de cafeína. El consumo de harina de algarrobo fue habitual en los pueblos originarios, pero la aparición de la harina de trigo, incorporada por los españoles, fue relegando su consumo y su valoración, marginando poco a poco su presencia en la dieta y en la consideración de la población.



**Figura 12.** Proceso de molienda tradicional de las vainas de algarrobo.

## **Antecedentes de composición química y propiedades funcionales de vainas de algarrobo**

Se informó en harina de vainas de algarrobo blanco (*Prosopis alba*) la presencia de fitoesteroles, conocidos por su propiedad de reducir el colesterol en sangre y el riesgo a contraer enfermedades cardiovasculares; y polifenoles, conocidos agentes antioxidantes, antiinflamatorios, hepatoprotectores, inmunoestimulantes, entre otros, por lo que la harina tiene potencial como ingrediente funcional (Cardozo et al., 2010). Las preparaciones a base de harina de vainas de algarrobo sometidas a calentamiento y sin someter a altas temperaturas mostraron capacidad antioxidante, en particular depuradora de radicales libres hidroxilo y anión superóxido, lo que estaría relacionado en parte a su contenido de compuestos fenólicos (Cardozo et al., 2010).

Por otro lado, se estudió la harina de cotiledones de semillas de algarrobo o germen de algarrobo, demostrando que la misma presenta un importante contenido de proteínas, semejante al de semillas de soja, y recientes hallazgos podrían sugerir la participación de estas proteínas y péptidos bioactivos en la actividad antioxidante de los frutos de algarrobo (Cattaneo et al., 2014). De este estudio se vio que la obtención de harina de semilla y de un hidrolizado proteico bioactivo, a partir de la misma, podría utilizarse para aumentar el contenido y calidad proteica de otros alimentos y proporcionarles además otras propiedades biológicas, por lo que se podrían diseñar novedosos alimentos funcionales. Recientemente, Cattaneo et al. (2016) demostraron que la harina de semilla al igual que la de mesocarpo de vainas de *Prosopis alba* contienen polifenoles bioactivos como antioxidantes y antiinflamatorios.

## OBJETIVOS

### OBJETIVOS GENERALES

1. Caracterizar químicamente los frutos nativos de *Prosopis alba* y *P. nigra*, focalizado en sus componentes fenólicos nutraceuticos.
2. Relacionar la composición química de frutos de *P. alba* y *P. nigra* con la capacidad antioxidante, antiinflamatoria e inhibitoria de enzimas relacionados al síndrome metabólico.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la diversidad química focalizada en componentes fenólicos de los frutos.
2. Determinar el efecto antioxidante, antiinflamatorio e inhibitorio de enzimas relacionadas con el síndrome metabólico de los fitoquímicos extraíbles de frutos de algarrobo y relacionar este efecto con los diferentes tipos de fenólicos presentes en los frutos.
3. Determinar la toxicidad de los extractos de vaina de *Prosopis*.



## Capítulo 2 : MATERIALES Y MÉTODOS





## 2.1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las vainas de *Prosopis nigra* (Grisebach) Hieronymus y *Prosopis alba* (Grisebach) fueron recolectadas en Amaicha del Valle, Tucumán, Argentina en marzo de 2012-2013. El material vegetal fue identificado por la Dra. Cuello e incorporado al herbario de la Fundación Miguel Lillo/INQUINOA. Las vainas fueron cepilladas para eliminar el material ajeno a la muestra y secadas a 50 °C en una estufa de aire forzado (Tecnodalvo) hasta peso constante.

Se determinaron parámetros cromáticos con un colorímetro Chroma meter CR-400 (Konica Minolta, Tokio, Japón) usando el sistema CIElab. Se determinaron las coordenadas cromáticas L\*, a\* y b\*. La coordenada L\* representa luminosidad (contribución de negro o blanco variando entre cero y cien), a\* representa la contribución del verde o rojo (negativo o positivo) y b\* representa la contribución de azul o amarillo (negativo o positivo).

Los frutos fueron molidos a polvo en un molinillo de hélice (Helix mill, Metvisa) y luego tamizados (Figura 13). Dos fracciones fueron obtenidas: harina de pericarpio (epicarpio + mesocarpio) y semillas con endocarpio. La harina de pericarpio fue tamizada a través de tamices de diferente tamaño de poro 840, 500 y 149  $\mu\text{m}$ . La harina fina de menor granulometría (< 149  $\mu\text{m}$ ) se denominó “Semolina” o harina fina de mesocarpo y es la que se utilizó para llevar a cabo los ensayos que se citan a continuación.



**Figura 13.** Fotografía de los diferentes pasos en el proceso de tamizado para obtener harinas de diferentes granulometrías.

## 2.2. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

La composición proximal de la semolina fue llevada a cabo de acuerdo con los métodos de la Association of Official Analytical Chemistry (AOAC) usando extracciones diferenciales en cada caso.

### 2.2.1. Extracción y cuantificación de azúcares

#### 2.2.1.1. Extracción y determinación de azúcares solubles

La harina (1 g) fue adicionada con etanol 80% (4 mL) a 75 °C asistido con ultrasonido durante 10 min y luego centrifugado a 9000 xg por 5 min. El residuo sólido fue sometido a procesos de extracción sucesivos hasta agotamiento y todos los extractos fueron combinados y sometidos a un proceso de secado mediante evaporación del etanol a presión reducida y posterior liofilización del agua residual.

Para la determinación de azúcares solubles totales se empleó el método del Fenol- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956).

La glucosa fue determinada por el método de glucosa oxidasa/peroxidasa mediante un *kit de Glicemia enzimática* de Wiener lab. 1400101.

Fructosa y sacarosa fueron determinadas siguiendo a Cardini, Cardini, Leloir, & Chiriboga (1955) y Roe & Papadopoulus (1954). Los azúcares reductores se determinaron por el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945). Los resultados fueron expresados como g glucosa, fructosa o sacarosa/100g harina.

### *2.2.1.2. Extracción y determinación del contenido de almidón digerible y resistente*

Esta determinación se llevó a cabo según el método de Holm, Björck, Drews, & Asp (1986) con algunas modificaciones. La harina (0,1 g) fue mezclada con 10 mL de ácido clorhídrico 0,1 M y 0,1 g de pepsina pH 1,5, y mantenida a 40 °C durante 1h. Se le añadió 0,1 g de azida sódica y luego se hidrolizó la mezcla usando 0,5 g de  $\alpha$ -amilasa (10 U/mg) a pH 6,9 durante 16 hs a 37 °C. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 6000 g. El pellet fue dispersado en KOH 2 M y mantenido a temperatura ambiente durante 30 min. Luego, el almidón digerible y el resistente fueron sometidos a un proceso de digestión usando 50  $\mu$ l de una solución de amiloglucosidasa 10 mg/mL (14U/mg) pH 4,75 en baño de agua durante 30 min a 60 °C. El contenido de glucosa fue determinado por el ensayo de glicemia enzimática.

### **2.2.2. Determinación del contenido de proteína total y contenido aminoacídico**

El contenido de proteína cruda fue calculado del total de nitrógeno determinado en la harina por el método de Kjeldahl usando un factor de conversión de 6,25 (AOCS, 1989).

Las muestras se sometieron a hidrólisis de acuerdo con Creamer & Matheson, (1976) y las concentraciones de aminoácidos se determinaron usando un analizador Biochrom 30 (<http://www.biochrom.co.uk>) en una columna de intercambio catiónico. L-Norleucina se usó como estándar interno.

### 2.2.3. Determinación del contenido de grasa cruda

Para la extracción de grasa cruda, se sometió 1 g de harina semolina a un proceso de extracción con éter de petróleo (40–60 °C) en un aparato Soxlet durante 4 hs (AOCS, 1989). El solvente fue evaporado y el contenido de grasas se determinó por diferencia de pesada.

### 2.2.4. Determinación del contenido de fibra cruda

Las fibras totales se determinaron según el método de AOAC (1998). Se pesaron 2 g de harina libre de grasa, luego se colocaron en un vaso de precipitado con 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25% y se incubó a 100 °C por 30 min. Luego se agregaron 50 mL de NaOH 3,52% y se incubó nuevamente a 100 °C por 30 minutos.

Se filtró y se realizaron lavados sucesivos con agua destilada caliente hasta eliminar el álcali. Posteriormente se lavó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25% y nuevamente con agua destilada hasta liberar la muestra de la acidez y luego con etanol. Finalmente se colocó la muestra junto al papel de filtro libre de cenizas en un crisol de porcelana de peso conocido y se dejó secar a 110 °C hasta alcanzar peso constante. Luego se incineró en mufla a 500 °C y se determinó el contenido de fibra cruda por diferencia de pesada. El resultado se expresó en g/100g harina.

### 2.2.5. Determinación de humedad, cenizas y minerales

El contenido de humedad fue determinado por diferencia de peso entre el material fresco y la muestra secada a 40 °C hasta peso constante (AOAC, 1998).

La muestra secada fue incinerada en mufla (500 °C) hasta obtener las cenizas (AOAC, 2000).

El análisis de minerales se realizó usando un Equipo de Plasma Inducido acoplado a espectrometría de masas (ICP-MS) (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Los siguientes iones fueron analizados: sodio, magnesio, potasio, calcio, y hierro. Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{g/g}$  de harina.

## 2.3. DETERMINACIÓN DE FITOQUÍMICOS

### 2.3.1. Extracción y determinación de diferentes tipos de compuestos fenólicos

#### 2.3.1.1. *Extracción de compuestos fenólicos totales libres y ligados*

La harina (2 g) de *Prosopis* fue mezclada con metanol: agua, 70:30 asistido con ultrasonido durante 1h a 25 °C cada vez y hasta agotamiento. Los extractos fueron filtrados y reunidos y, el metanol evaporado *in vacuo* (40 °C). El material acuoso residual fue sometido a un proceso de liofilización hasta obtener un extracto seco el que se denominó extracto crudo (AC= extracto polifenólico de *Prosopis alba*; NC= extracto polifenólico de *Prosopis nigra*). Luego fue resuspendido en agua destilada y extraído con acetato de etilo seis veces con el objetivo de obtener un extracto rico en polifenoles libres y reducido en azúcares (AS= extracto rico en polifenoles libres de *Prosopis alba*; NS= extracto rico en polifenoles libres de *Prosopis nigra*).

El residuo de la harina obtenido luego de la extracción de los polifenoles libres fue mezclado con 20 mL de NaOH 2N, ácido ascórbico al 1% y EDTA 10 mM y mantenido a 30 °C durante 30 min. Luego se ajustó el pH a 2 con HCl 6N y se le agregó 300 mg de NaCl. La mezcla fue filtrada y extraída 6 veces con acetato de etilo (Nardini & Ghiselli, 2004). Se juntaron estas 6 fracciones, se evaporaron y se resuspendieron en 1 mL de MeOH para obtener el extracto rico en polifenoles ligados (AL= extracto rico en polifenoles ligados de *Prosopis alba*; NL= extracto rico en

polifenoles ligados de *Prosopis nigra*). Todos los extractos se almacenaron a -20 °C.

### *2.3.1.2. Determinación de compuestos fenólicos*

#### *Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales*

La cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1999). Los diferentes extractos se pusieron en contacto con 0,2 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) y se llevó a un volumen final de 2 mL con agua destilada. Luego de 2 minutos se agregaron 0,8 mL de carbonato de sodio (15,9%). La absorbancia se midió a 765 nm en espectrofotómetro UV-visible 2400 PC. Los resultados son expresados en mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por 100g de harina.

#### *Determinación del contenido de compuestos fenólicos flavonoides y no flavonoides*

Los compuestos fenólicos no flavonoides fueron medidos luego de la precipitación de los flavonoides con formaldehído acidificado (Isla, Salas, Danert, Zampini, & Ordoñez, 2014). Se procedió a la precipitación de los flavonoides adicionando a cada una de las muestras de extracto 0,5 mL de HCl: H<sub>2</sub>O (1:3 v/v) y 0,25 mL de formaldehído 8 g/L y se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente (volumen final 0,77 mL). Luego se centrifugó a 1200 g durante 7 minutos y se tomó 100 µL del sobrenadante para la determinación del contenido de compuestos fenólicos no flavonoides utilizando el método de Folin-Ciocalteu. El contenido de

compuestos fenólicos flavonoides se calculó por diferencia entre los compuestos fenólicos totales y los compuestos fenólicos no flavonoides. Los resultados son expresados en mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por 100g de harina.

### *Determinación del contenido de flavonas y flavonoles*

El contenido de flavonoides totales fue determinado usando  $\text{AlCl}_3$  de acuerdo con Zhishen, Mengcheng, & Jianming (1999). Se colocaron 0,5 mL de una solución etanólica de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 2% en contacto con igual volumen de cada extracto. La absorbancia se midió a 420 nm, luego de 60 min de incubación a temperatura ambiente. El contenido de flavonoides se expresó como mg equivalentes de quercetina (mg EQ) por 100g de harina.

### *2.3.1.2. Extracción y determinación del contenido de taninos condensados e hidrolizables*

La harina (2 g) fue mezclada con 25 ml de acetona: agua (70:30, 1:10 v/v) con el fin de extraer los taninos. Una porción se utilizó para determinar el total de taninos condensados según Prior et al. (2010). Se mezcla 100  $\mu\text{L}$  de muestra con 900  $\mu\text{L}$  de DMAC (4-Dimetilaminocinamaldehído) al 0,1% en etanol acidificado y 200  $\mu\text{L}$  de etanol 80%. La absorbancia se leyó a 640 nm después de 20 minutos a 25 °C. Los resultados se expresaron en g de equivalentes de procianidina B2 (g EPB2) /100g harina.

Para la determinación de taninos hidrolizables o galotaninos se evaporó la acetona y la porción acuosa se separó en dos fracciones. Una de ellas (2



mL) se sometió a hidrólisis ácida con 4 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N durante 26 horas a 100 °C y se determinó el contenido de ácido gálico liberado o total con el método de Inoue & Hagerman (1988). En la otra fracción se cuantificó por el mismo método el contenido de ácido gálico libre. A 200 µL de cada una de las muestras se le añadieron 300 µL de rodanina (0,667%). Luego de 5 min, se añadieron 200 µL de hidróxido de potasio 0,5N y 4 mL de agua destilada. Las mezclas se dejaron durante 10 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 520 nm. Los resultados se expresaron en g de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100g harina.

El contenido de taninos hidrolizables se calculó por diferencia entre ambos valores

TH= GT-GL.

TH: Taninos hidrolizables, GT: contenido de ácido gálico total; GL: contenido de ácido gálico libre.

### *2.3.1.3. Extracción y determinación del contenido de antocianinas*

La harina (5 g) fue mezclada con metanol acidificado (1%), agua destilada, agua acidificada con HCl 1%, etanol, etanol acidificado con HCl al 1%, mezcla de etanol: H<sub>2</sub>O (1:1, v: v) y/o mezcla de etanol: H<sub>2</sub>O (1;1, v: v) acidificado con HCl 1%. Los compuestos se extrajeron hasta agotamiento. El contenido de antocianinas de cada extracto fue determinado de acuerdo al método de pH diferencial (Abdel-Aal, Young, & Rabalsky, 2006). Los resultados se calcularon con la fórmula:

mg antocianinas/L= (A\* PM\* F\* 10<sup>3</sup>) / (ε x l)

dónde:  $A = \text{Absorbancia (pH 1,0)} - \text{Absorbancia (pH 4,5)}$ ,  $PM = \text{peso molecular (433,2 g/mol)}$ ,  $F = \text{factor de dilución}$ ,  $\epsilon = \text{coeficiente de extinción molar (26.900 L cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$  y  $l = 1 \text{ cm de paso de luz}$ . Y se expresaron en g de equivalentes de cianidina-3-glicósido (EC3G) /100g harina.

Se realizaron estudios de estabilidad del pigmento en los medios de extracción correspondientes durante tres meses midiendo cada 5 días el contenido de antocianina.

El método mas eficiente fue seleccionado para la extracción posterior de antocianinas de algarrobo.

#### *2.3.1.4. Análisis cromatográfico del perfil fitoquímico de las harinas de Prosopis alba y Prosopis nigra*

##### *2.3.1.4.1. Cromatografía en capa fina (CCF)*

Para la CCF se utilizó una fase estacionaria polar de sílica gel 60 F-254 y una fase móvil: Acetato de etilo/Ác. Fórmico/Ác. Acético/H<sub>2</sub>O (100:11:11:27; v:v:v:v) en el caso de los compuestos fenólicos libres, y Cloroformo/Metanol (9:1, v:v) para los compuestos fenólicos ligados. En ambos casos la siembra fue de 10 µg EAG. Los componentes separados fueron visualizados bajo luz ultravioleta (365 nm, Lámpara UV Modelo UV GL-58 Mineralight Lamp) y revelados con solución metanólica al 1% de éster β-etilamino del ácido difenilbórico (NP) (Wagner & Bladt, 1996).

#### 2.3.1.4.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de extractos polifenólicos de las harinas de algarrobo

Los extractos polifenólicos fueron analizados mediante HPLC acoplado a un detector por arreglo de diodos [HPLC Waters 1525 con sistema binario de bombas Serie 1500, válvula de inyección manual con un loop de 20  $\mu$ L (Rheodyne Inc., Cotati, CA), un detector por arreglo de diodos Waters 2998 (PDA) y una columna C18 AXBridge<sup>TM</sup> (4,6x150 mm, 5  $\mu$ m; Waters corporation, Milford, MA)]. Para la elución se utilizó un gradiente de solvente lineal que consistió en ácido acético 0,1% en agua (A) y ácido acético 0,1% en MeOH (B) como sigue: 90% A a 43% A 45 min, seguido por 43% A a 0% A entre los 45 a los 60 min, y 0% A durante 5 min a 35 °C. El flujo fue de 0,5 mL/min y el volumen inyectado 20  $\mu$ L de una solución de 1 mg/mL. Se utilizó el software Empower<sup>TM</sup> 2. Los extractos fueron monitoreados a 254 nm. La presencia de diferentes compuestos fenólicos fue confirmada usando espectrometría UV (220–500 nm) en comparación con estándares y coinyección de compuestos comerciales. Los compuestos se cuantificaron mediante HPLC-DAD utilizando una curva de calibración con schaftósido (021353S), isoschaftósido (021354), vicenina II (23666-13-9), vitexina (021232S) e isovitexicina (021235S), ácido ferúlico (1270311), ácido protocatéquico (03930590) y ácido cumárico (C9008) para determinar la relación entre el área del pico y la concentración de cada compuesto. La concentración fue expresada en mg/100 g de extracto seco. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

#### 2.3.1.4.3. Perfil de compuestos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS

Los datos fueron registrados en un sistema LC-ESI-MS/MS que consiste en un HPLC HP1100 (Agilent Technologies Inc., CA, USA) que se conecta a

través de un espectrómetro de masa Esquire 4000 Ion Trap LC/MS (n) system (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). La ionización se realizó a 3000 V asistida por nitrógeno como gas nebulizante a 24 psi y como gas de secado a 365 °C y un caudal de 6 L/min. Los iones negativos fueron detectados usando full scan ( $m/z$  20–2200) y resolución normal (velocidad de escaneado 10,300  $m/z/s$ ; pico con 0,6 FWHM/ $m/z$ ). Los parámetros de la trampa se establecieron en el control de carga iónica (ICC) utilizando parámetros predeterminados por el fabricante y el tiempo máximo de acumulación de 200 ms. La disociación inducida por colisión (CID) se realizó mediante colisiones con helio presente en la trampa y controlada automáticamente a través de la opción SmartFrag. La identificación de los constituyentes de las vainas de *Prosopis* se realizó mediante la comparación de las propiedades espectrales (UV) y espectrometría de masa (ESI-MS y MS/MS) de los compuestos con los de referencia disponibles o datos de la literatura.

### 2.3.2. Extracción y determinación del contenido de alcaloides

La harina (1 g) fue adicionada con 1 mL de  $\text{NaCO}_3$  10% y 5 mL de MeOH. La mezcla se calentó durante 5 min a 60 °C. Para la cuantificación se usó azul de bromotimol como agente colorante de acuerdo con Önal, Kepekçi, & Öztunç (2005). Un mL de agua, compuesto de referencia o extracto se pusieron en contacto con 2 mL del azul de bromotimol ( $4,78 \times 10^{-4}$  M en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 5). El complejo formado se extrajo con 5 mL de cloroformo con agitación vigorosa durante 1 min. La absorbancia se midió a 414 nm. Los resultados se expresaron como g de equivalentes de clorhidrato de apomorfina (g ECA) /100g harina.

### 2.3.3. Extracción y determinación del contenido de Vitaminas

#### *2.3.3.1. Extracción y determinación del contenido de ácido ascórbico*

La harina (0,2 g) fue mezclada con 0,5 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2% asistida por ultrasonido durante 10 min. La cuantificación se realizó con 2,6-diclorofenol indofenol (iDF) de acuerdo con la metodología descrita por Barros, Carvalho, Morais, & Ferreira (2010). La absorbancia se lee a 515 nm en un espectrofotómetro.

El contenido de vitamina C se expresó como g de ácido L-ascórbico (g L-AA) /100g harina.

#### *2.3.3.2. Extracción y determinación del contenido de carotenoides*

La harina (1 g) fue adicionada con 10 mL de éter de petróleo:acetona (1:1, v/v) y el total de carotenoides se calculó de acuerdo con Rodríguez-Amaya (2001) por lectura directa de la absorbancia de los extractos a 450 nm. Los resultados se expresaron como g de equivalentes de β-caroteno (g Eβ-C) por 100g de harina.

## 2.4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE HARINAS DE ALGARROBO BLANCO Y NEGRO

### 2.4.1. Efecto de los extractos polifenólicos sobre la actividad antioxidante *in vitro*

#### 2.4.1.1. Actividad depuradora del radical catión $ABTS^{\bullet+}$

Los ensayos de depuración de los radicales libres son reacciones de reducción que pueden ser medidas colorimétricamente debido a la decoloración que sufren los radicales cuando un antioxidante es capaz de donar protones o transferir electrones convirtiéndolos en especies no tóxicas e inhibiendo la oxidación de biomoléculas.

Este ensayo se llevó a cabo con el método descrito por Re et al. (1999). El  $ABTS^{\bullet+}$  se genera al reaccionar ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2,45 mM a temperatura ambiente (23 °C) en oscuridad durante 16 hs. La solución de  $ABTS^{\bullet+}$  se diluye con metanol hasta alcanzar una absorbancia de 0,70 a 750 nm. De esta solución, se añaden 100  $\mu$ L a la muestra y se mezclan por agitación. Se lee a 734 nm luego de 6 min de contacto del  $ABTS^{\bullet+}$  con los extractos polifenólicos de *Prosopis* (concentración de compuestos fenólicos hasta 50  $\mu$ g EAG/mL). Los resultados se expresaron como la concentración de polifenoles necesaria para depurar el 50% de los radicales libres ( $CD_{50}$ ). Se utilizó quercetina como compuesto de referencia (0,1-2  $\mu$ g/mL).

#### *2.4.1.2. Actividad depuradora del radical DPPH*

Una solución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (1,5 mL de 300  $\mu$ M en etanol 96°) fue puesta en contacto con diferentes concentraciones de los extractos polifenólicos de algarrobo. Veinte minutos después se registró la absorbancia a 515 nm (Vivot et al., 2001). El porcentaje de depuración se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% = [(A_0 - A_s) / A_0] * 100$$

donde  $A_0$  es la absorbancia del control y  $A_s$  la de la muestra a 515 nm. Los valores de  $CD_{50}$  fueron expresados en  $\mu$ g EAG/mL.

#### *2.4.1.3. Actividad depuradora de peróxido de hidrógeno*

La mezcla de reacción contenía fenol (12 mM), 4-aminoantipirina (0,5 mM),  $H_2O_2$  (0,7 mM), buffer fosfato de sodio a pH 7 (84 mM) y diferentes concentraciones de extractos polifenólico (hasta 50  $\mu$ g EAG/mL). Se mantuvo 20 min a 35 °C y se agregó la enzima peroxidasa de rábano picante (0,1 U/mL) y se incubó a 37 °C, durante 30 min. La absorbancia se midió a 504 nm (Chamira Dilanka & Preethi, 2015). Los resultados se expresaron como valores de  $CD_{50}$  en  $\mu$ g EAG/mL. Se utilizó quercetina como compuesto de referencia (1-30  $\mu$ g/mL).

#### *2.4.1.4. Actividad depuradora de radical hidroxilo*

El estudio de la capacidad depuradora de  $HO^\bullet$  tuvo lugar según la metodología propuesta por (Chobot, 2010). La mezcla de reacción contenía 50  $\mu$ L de 2-deoxi-D-ribosa (10,4 mM), 100  $\mu$ L de  $FeCl_3$  (50  $\mu$ M) y

diferentes concentraciones de extracto (hasta 50 µg EAG/mL). La reacción se ensayó en presencia y ausencia de 100 µL de EDTA (52 µM). Para iniciar la reacción de Fenton se agregaron 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) y 50 µL de ácido ascórbico (1,0 mM). Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 60 min. Luego se añadió 500 µL de ácido 2-tiobarbitúrico (1%, w/v disuelto en ácido tricloroacético 3%, w/v) y se incubó a 100 °C durante 20 min. Se realizaron los correspondientes controles. La absorbancia se midió a 532 nm. Los resultados se presentan como valores de CD<sub>50</sub> en µg EAG/mL requeridos para inhibir el 50% de la degradación de la 2-deoxi-D-ribosa. Se utilizó quercetina como compuesto de referencia (5-50 µg/mL).

#### *2.4.1.5. Actividad depuradora de anión superóxido*

*Ensayo no enzimático.* Los radicales superóxido son generados en un sistema fenazina metosulfato (PMS)-β-nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida, NADH) por oxidación de NADH y ensayado por la reducción de la sal de azul de tetrazolio (nitrobluetetrazolium, NBT). En este experimento, los radicales fueron generados en 300 µL de buffer fosfato de sodio 19 mM, pH 7,4, el cual contenía 30 µL de NBT 500 µM, 40 µL de PMS 60 µM, 40 µL de NADH 2 mM y las muestras a diferentes concentraciones (20-150 µg EAG/mL). Se registró la absorbancia a 550 nm (Valentão et al., 2002). El porcentaje de depuración se calculó con la siguiente fórmula:  $\% = (C - S) / C \times 100$  donde C es la absorbancia del control y S la de la muestra. Se utilizó quercetina como compuesto de referencia (10-70 µg/mL). Los valores de CD<sub>50</sub> denotan los µg EAG/mL requeridos para depurar el 50% de los radicales libres superóxido.



*Ensayo enzimático.* Los radicales superóxido son generados por el sistema xantina/xantina oxidasa (X/XO) siguiendo a Cos et al. (1998) con algunas modificaciones. La reacción consistió en añadir hasta 90 µL de muestra de distintas concentraciones (0,1-5 µg EAG/mL), a 30 µL de xantina oxidasa (0,1 U/mL) en buffer fosfato 0,2 M pH 7,50 y 60 µL de xantina 1 mM. La mezcla (volumen total 180 µL) se incubó 30 min a 37 °C. Se registró la absorbancia a 290 nm. Se utilizó quercetina como compuesto de referencia (1-5 µg/mL). Los valores de concentración inhibidora del 50% de actividad enzimática (CI<sub>50</sub>) denotan los µg EAG/mL requeridos para inhibir el 50% de la enzima.

#### *2.4.1.6. Actividad depuradora de óxido nítrico*

Se siguió el método de Kumaran & Karunakaran, (2006) con algunas modificaciones. Diferentes concentraciones de extracto (hasta 400 µg/mL) se mezclaron con 30 µL de nitroprusiato de sodio (10 mM) y buffer fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,5) a un volumen final de 150 µL. La mezcla de reacción se incubó 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 150 µL de reactivo de Griess. La absorbancia se midió a 550 nm. El ácido ascórbico (10–100 µg/mL) fue usado como control positivo. Los resultados se presentan como valores de CD<sub>50</sub> en µg EAG/mL requeridos para depurar el 50% de NO.

#### *2.4.1.7. Protección contra la peroxidación lipídica: Ensayo de blanqueamiento de β-caroteno*

La capacidad antioxidante se determinó cuantificando los dienos conjugados derivados de la oxidación del ácido linoleico a través de la

decoloración del  $\beta$ -caroteno de acuerdo con Prieto, Pineda, & Aguilar, (1999).

Se añadió al  $\beta$ -Caroteno (1 mg), 20  $\mu$ L de ácido linoleico, 200  $\mu$ L de Tween 40 y 10 mL de agua destilada. Se sometió a la acción de ultrasonido durante 10 min y posteriormente se añadió 40 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mM). A 1 mL de la mezcla se le adicionaron hasta 15  $\mu$ g EAG de los extractos y se mantuvieron durante 120 min a 50 °C. Se registró la absorbancia inicial y cada 30 minutos durante 90 minutos a 470 nm. Quercetina (1,18–27,3  $\mu$ g/mL) y BHT (2,3–9,1  $\mu$ g/mL) fueron usados como controles positivos. Se determinaron los valores de concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) como los  $\mu$ g EAG/mL requeridos para inhibir el blanqueamiento del 50% del  $\beta$ -Caroteno.

## 2.4.2. Efecto de los extractos polifenólicos sobre la actividad inhibidora de enzimas relacionadas con la inflamación

Se calculó el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática (ciclooxigenasa, fosfolipasa A2 y lipooxigenasa) y se determinaron los valores de  $CI_{50}$ . Los valores de  $CI_{50}$  indican los  $\mu\text{g}$  EAG/mL requeridos para inhibir la actividad enzimática en un 50%.

### *2.4.2.1. Efecto de los extractos polifenólicos sobre la actividad de la enzima ciclooxigenasa*

La capacidad de los extractos de inhibir la conversión de ácido araquidónico en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) por la acción de la ciclooxigenasa 2 recombinante humana (COX-2) fue determinada usando un kit comercial (No. 560131; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). La PGF<sub>2</sub> $\alpha$  producida a partir de PGH<sub>2</sub> por la reducción de cloruro de estaño fue medida mediante un inmunoensayo (EIA) en un lector de microplaca (Biotek ELx 808). Se utilizó DMSO como solvente control. Los ensayos se llevaron a cabo en presencia de concentraciones variables de extracto (hasta 3  $\mu\text{g}$  EAG/mL). Se realizó una preincubación de la enzima COX-2 con la muestra durante 10 min y una incubación de 2 min en presencia de ácido araquidónico a 37 °C. Nimesulida (0,10-2  $\mu\text{g}$ /mL) fue la droga antiinflamatoria comercial usada como referencia.

#### *2.4.2.2. Efecto de los extractos polifenólicos sobre la actividad de la enzima lipoxigenasa*

La actividad de la enzima lipoxigenasa (LOX) fue determinada usando un método espectrofotométrico, basado en la oxidación enzimática del ácido linoleico a los correspondientes hidroperóxidos (D'Almeida et al., 2013). Se incubó la mezcla de ensayo que contenía lipoxigenasa de soja (948 U/mL), ácido linoleico (50  $\mu$ M), tampón de borato sódico (200 mM, pH 9,0) y extractos ricos en compuestos fenólicos (hasta 400  $\mu$ g EAG/mL) a 25 °C durante 5 min. La absorbancia a 234 nm se midió durante 5 minutos en un espectrofotómetro. Se utilizó naproxeno (hasta 25  $\mu$ g/mL) como compuesto de referencia.

#### *2.4.2.3. Efecto de los extractos polifenólicos sobre la actividad de la enzima fosfolipasa A2*

La actividad de la enzima fosfolipasa secretora A2 se determinó usando 1,2-diheptanoiltio-glicerofosfocolina (1,2 dHGPC) como sustrato (D'Almeida et al., 2013). La mezcla de reacción contenía 50  $\mu$ L de tampón Tris-HCl (10 mM, pH 8), 10  $\mu$ L de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 10 mM, 10  $\mu$ L de la enzima sPLA2 1  $\mu$ g/mL y 25  $\mu$ g EAG/mL de las muestras ensayadas disueltas en DMSO. La reacción se inició mediante la adición de 150  $\mu$ L de 1,2 dHGPC 1,66 mM y se mantuvo durante 20 minutos a 25 °C. La absorbancia se leyó a 414 nm durante 20 minutos cada 2 min en un lector de microplacas (Biotek ELx808). Se utilizó como compuesto de referencia fármacos antiinflamatorios comerciales (ácido acetilsalicílico, 20-80  $\mu$ g/mL).

### 2.4.3. Actividad inhibidora de enzimas relacionadas con el síndrome metabólico

Se calculó el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática ( $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa y lipasa) y se determinaron los valores de  $CI_{50}$ . Los valores de  $CI_{50}$  indican los  $\mu\text{g}$  EAG/mL requerido para inhibir la actividad enzimática en un 50%.

#### *2.4.3.1. Efecto de los extractos polifenólicos sobre la actividad de la enzima $\alpha$ -glucosidasa*

La inhibición de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa se determinó usando p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido como sustrato de acuerdo con la metodología descrita por Cattaneo et al. (2016). La mezcla de reacción contenía 160  $\mu\text{L}$  de tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 6,9; 5  $\mu\text{L}$  de enzima 5,46 U/mL, extracto polifenólico (4-30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 5  $\mu\text{L}$  de p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido 5 mM. La reacción se incubó 15 min a 37 °C. A continuación, se añadieron 80  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio 0,2 M. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de microplacas (BiotekELx808). Se utilizó acarbosa (1-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) como estándar.

#### *2.4.3.2. Efecto de los extractos polifenólicos sobre la actividad de la enzima $\alpha$ -amilasa*

La actividad inhibidora de la  $\alpha$ -amilasa fue ensayada utilizando almidón como sustrato mediante un Amilokit® (Wiener Lab Group, Rosario, Argentina). La mezcla de reacción contenía 800  $\mu\text{L}$  de tampón de fosfato sódico 0,01 M, pH 7,4, 5  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa 10 U/mL y extractos

polifenólicos (hasta 100 µg EAG/mL). Después de la preincubación de la mezcla de reacción sobre hielo durante 5 minutos, se inició la reacción enzimática añadiendo 500 µL de reactivo A (sustrato) a la mezcla de reacción. A continuación, la reacción se incubó a 37 °C durante 7 min. Luego se añadieron 500 µL de reactivo B (solución de yodo) para el desarrollo de color y la mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 5,3 mL con agua destilada. La absorbancia se midió a 640 nm en un espectrofotómetro (UV2400 PC). Se usó acarbosa (0,1-5 µg/mL) como estándar.

#### *2.4.3.3. Efecto de los extractos polifenólicos sobre la actividad de la enzima lipasa*

La actividad lipasa se ensayó midiendo la hidrólisis enzimática de p-nitrofenil palmitato de acuerdo con Costamagna et al. (2016). Se mezcló solución lipasa (1,0 mg/mL) con los extractos polifenólicos (hasta 100 µg EAG/mL) y se preincubaron en hielo durante 5 min. La mezcla de reacción contenía 330 µL de tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 7 suplementado con Tritón X-100 al 0,6% (p/v) y goma arábiga al 0,15% (p/v) y 20 µL de p-nitrofenil palmitato 10 mM. La reacción enzimática se inició añadiendo 50 µL de la solución de lipasa/extracto polifenólico a la mezcla de reacción, y se incubó a 37 °C durante 20 min. La absorbancia se midió a 400 nm en un lector de microplacas (BiotekELx808). Se usó orlistat (0,1-20 µg/mL) como compuesto de referencia.

## 2.5. TOXICIDAD

### 2.5.1. Evaluación de la toxicidad mediante el ensayo de letalidad con *Artemia salina*

Se evaluó la toxicidad de los extractos (3,13-50 µg EAG/mL) mediante el ensayo de letalidad con *Artemia salina*. Las larvas nauplio eclosionaron en agua de mar artificial en presencia de luz. Se colocaron 10 larvas de *A. salina*, 100 µL de agua de mar artificial y 3 µL de extracto de polifenoles en diferentes concentraciones en DMSO. Después de 24 hs de contacto, se contaron las larvas que sobrevivieron. La toxicidad se expresó en porcentaje de mortalidad y se interpretó: 0-10% no tóxico, 11-50% moderadamente tóxico, 51-90% altamente tóxico y 100% extremadamente tóxico (Borroto et al., 2011). Los ensayos se realizaron por triplicado. Se graficaron los porcentajes de mortalidad en función de la concentración utilizada y se obtuvo la línea de tendencia. A partir de la ecuación de la gráfica se calculó la concentración letal para el 50% de la población expuesta (CL<sub>50</sub>).

### 2.5.2. Ensayo de mutagenicidad

Se evaluó el efecto mutagénico de los extractos polifenólicos frente a dos cepas de *S. typhimurium* (TA98 y TA100) de acuerdo con Maron & Ames (1983).

Las cepas bacterianas fueron cultivadas en caldo nutritivo Oxoid N° 2 a 37 °C durante 12-14 hs, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Diferentes concentraciones (hasta 500 µg EAG/placa) de cada extracto

disuelto en DMSO, fueron agregados a 2 mL de agar blando suplementado con 0,5 mM de L-histidina y 0,5 mM de D-biotina y mezclados con 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana (en fase estacionaria) y la mezcla luego fue vertida en la superficie de una placa conteniendo medio agar mínimo (sin histidina). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 hs y posteriormente se realizó el recuento de las colonias revertantes His<sup>+</sup>. Para evaluar la influencia de la activación metabólica, a otra serie de tubos se agrega además 500  $\mu$ L de mezcla S9, y se vierte en la superficie de una placa con medio agar mínimo. Luego las placas se incuban a 37° C durante 72 hs. Después de la incubación se procedió al recuento de las colonias revertidas en cada placa. Fueron realizados los correspondientes controles negativos y positivos. Como controles positivos se utilizó un mutágeno directo, 4-nitro o-fenilendiamina (NPD) a una concentración de 20  $\mu$ g/placa y un mutágeno indirecto, que requiere activación metabólica con la mezcla S9, 2-aminofluoreno (2-AF) 10  $\mu$ g/placa (Maron & Ames, 1983). El control negativo permite evaluar el número de colonias que reversionen en forma espontánea. Y los controles positivos se realizan para confirmar las características específicas de reversión de cada cepa.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado en dos experiencias separadas. Los resultados fueron expresados como el número de colonias revertantes por placa o a través de la relación de mutagenicidad (RM) que es una razón entre el número de colonias revertantes de la placa de prueba y el número de colonias revertantes en la placa control (colonias revertantes espontáneos).



$RM = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias revertantes en PP}}{\text{N}^\circ \text{ de colonias revertantes espontáneos en PC}}$

PP: placa de prueba

PC: placa control

Una muestra fue considerada mutagénica cuando el número de colonias revertantes por placa fue al menos dos veces las del control negativo o cuando los valores de RM fueron mayores o iguales a 2.

### 2.5.3. Ensayos de citotoxicidad

Las células de epitelio gástrico humano AGS (ATCC CRL-1739) fueron crecidas como monocapas en medio Ham F-12 conteniendo 1 mM L-glutamina y 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Las células se crecieron en presencia del 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C. Para los experimentos, las células fueron plaqueados a una densidad de 2,5 x 10<sup>4</sup> células/mL.

Los cultivos confluentes de AGS se trataron durante 24 hs con medio conteniendo cada uno de los extractos desde 0 hasta 1000 µg/mL. Los extractos secos se disolvieron en medio suplementado con 2% Suero fetal bovino (FBS). Las células tratadas solamente con medio se usaron como control. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT o sal de tetrazolium (Cheli & Baldi, 2011). Cada concentración se testeó por cuadruplicado y los experimentos fueron repetidos dos veces usando diferentes preparaciones celulares. Se determinó la CI<sub>50</sub> (µg/mL).

## 2.6. Análisis estadístico

Los análisis se realizaron al menos tres veces con tres muestras diferentes. Cada valor experimental se expresa como la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Se utilizó el software estadístico InfoStat (Student Version, 2011) para evaluar las diferencias entre los grupos. El criterio de significancia estadística se tomó como  $p \leq 0,05$ .

# Capítulo 3 : RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Los resultados se presentan en dos partes:

**Parte I:** Caracterización fitoquímica preliminar y composición de compuestos fenólicos libres obtenidos de muestras harinas de vainas de 6 individuos de *P. alba* y de 8 individuos de *P. nigra*. Evaluación de la actividad antioxidante de cada una de las muestras de semolinas.

**Parte II:** En base a la similitud química que presentaron las muestras intraespecie, se conformó un pool de muestras de vainas de cada especie para la obtención de harina y su caracterización nutricional y funcional.

# PARTE I

## Objetivos:

- A) Caracterización fitoquímica preliminar de muestras de harinas de vainas de 6 individuos de *P. alba* y de 8 individuos de *P. nigra*.
- B) Composición de compuestos fenólicos libres
- C) Actividades biológicas de los polifenoles y antocianinas de cada una de las muestras de semolinas.





Muestras de vainas maduras de ocho ejemplares de *P. nigra* (Griseb.) Hieron. y seis de *P. alba* (Griseb.) se cosecharon en Amaicha del Valle, Tucumán, Argentina a 2000-2100 m sobre el nivel del mar. Las vainas de *P. alba* presentaron color marrón claro mientras que las vainas de *P. nigra* resultaron de color marrón con manchas negro-moradas de diferente intensidad (Figura 14).

Para confirmar la valoración subjetiva, en cuanto al grado de madurez de las legumbres se realizó una valoración objetiva del color, utilizando un colorímetro. Se observó que las vainas de *P. nigra* presentan en su estadio de madurez óptimo parámetros cromáticos de  $L^* = 46,41 \pm 10$ ;  $a^* = 9,71 \pm 1$ ; y  $b^* = 4,23 \pm 1$  mientras que *P. alba* presentan valores de  $L^* = 58,41 \pm 10$ ;  $a^* = 3,42 \pm 1$  y  $b^* = 33,43 \pm 2$ . *P. nigra* presenta mayor componente rojo que las de *P. alba*, menor luminosidad que *P. alba* observándose variabilidad entre muestras (Figura 15). Las vainas de *P. alba* presentan mayor componente amarillo respecto a *P. nigra*.



**Figura 14.** Fotografías de las vainas de A) *Prosopis nigra* y B) *Prosopis alba*. PNT1 a PNT8: vainas de *Prosopis nigra* de Tucumán muestra 1 a 8; PAT1a PAT6: vainas de *Prosopis alba* de Tucumán muestra 1 a 6.



**Figura 15.** Fotografías de las vainas de *Prosopis nigra* donde se observa la variabilidad fenotípica.

Las vainas provenientes de los distintos árboles se secaron, molieron y tamizaron separadamente para obtener harinas finas de mesocarpo. Las harinas de *P. alba* presentaron aspecto homogéneo, diferentes tonalidades blanco amarillento de acuerdo con el número de muestra. Así la muestra PAT3 resultó la más oscura de las muestras de *P. alba* (Figura 16). Las harinas de *P. nigra* presentaron aspectos homogéneos y color más oscuro que *P. alba* resultando mas oscuras las muestras PNT6, PNT7 y PNT8 (Figura 17).



**Figura 16.** Fotografías de harina de *P. alba*. PAT1a PAT6: harina de vainas de *Prosopis alba* de Tucumán muestra 1 a 6.



**Figura 17.** Fotografías de harina de *P. nigra*. PNT1 a PNT8: harina de vainas de *Prosopis nigra* de Tucumán muestra 1 a 8.



A partir de estas muestras se realizó la caracterización química de compuestos funcionales y el análisis de su actividad antioxidante, antiinflamatoria e inhibitoria de enzimas relacionadas con el síndrome metabólico.

### 3.I.1. Composición fitoquímica y actividad biológica de extractos ricos en polifenoles

#### 3.I.1.1. Cuantificación de fitoquímicos

El contenido de polifenoles libres (P) y ligados (PL) de la harina de vaina de *Prosopis* se muestra en la Tabla 4. El contenido de P en la harina de *P. nigra* y *P. alba* varió de 0,21 a 0,66 g EAG/100g de harina. El contenido de P fue mayor que el encontrado por Cardozo et al. (2010) para extractos etanólicos de vainas de *P. nigra* y *P. alba* y harina de trigo blanco (4,4–14 mg EAG/100 g harina (Hung, Maeda, Miyatake, & Morita, 2009), similar al salvado de trigo de 0,13-0,32 g EAG/100g (Vaher, Matso, Levandi, Helmja, & Kaljurand, 2010) y más bajo que los valores encontrados en harinas de otros frutos nativos argentinos como *Zizhipus mistol* (0,79±0,03 g EAG/100g DW (Cardozo et al., 2010) y *Geoffroea decorticans* (1,24±0,03 g EAG/100g DW (Costamagna, Ordoñez, Zampini, Sayago, & Isla, 2013). Los PL fueron los principales contribuyentes de fenólicos totales (suma de P y PL) en la harina de *P. alba* (hasta 84% del total), mientras que los PL representaron alrededor del 17% del total de compuestos fenólicos en harina de *P. nigra*. Los resultados encontrados en la harina de *P. alba* son consistentes con Adom & Liu (2002), cuyo estudio indicó que los PL de maíz, trigo, avena y arroz contribuyeron predominantemente al contenido total de compuestos fenólicos.

El contenido de flavonoides (flavonas y flavonoles) en *P. nigra* fue mayor que en *P. alba* y semejante a los valores que presentan los frutos de chañar (Costamagna, Ordoñez, Zampini, Sayago, & Isla, 2013). El consumo de alimentos que contienen este tipo de compuestos fenólicos ha sido asociado con una posible prevención de enfermedades crónicas como cáncer, aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares (Anderson & Bryant, 1986; Joven et al., 2013). Distintos estudios evidencian el efecto protector de los compuestos fenólicos frente a estas enfermedades (Catalán, Barrubés, Valls, Solà, & Rubió, 2017; Giampieri et al., 2017; Ishige, Chen, Sagara, & Schubert, 2001; Lule & Xia, 2005; Mena & Llorach, 2017; Moon & Shibamoto, 2009).

También se evaluó el contenido de antocianinas de la harina de *P. nigra* y *P. alba* (Tabla 4). En general, la concentración total de antocianinas fue mayor en la harina de *P. nigra* (7,25 a 65,27 g/100g de harina) que en la harina de *P. alba* (0 a 11,34 g/100g). Los datos sugieren que las concentraciones totales de antocianinas varían no sólo entre especies sino también entre individuos (Tabla 4). Los niveles de este pigmento hidrosoluble en *P. nigra* fueron mayores que los que presentan otros alimentos ricos en antocianinas como los arándanos (1,3-3,8 mg/g fruto fresco) y el maíz morado (6,8-82,3 mg/g fruto fresco) (He et al., 2012; Lao & Giusti, 2017).

No se detectaron taninos hidrolizables y los niveles de taninos condensados fueron muy bajos.

El contenido total de alcaloides mostró valores muy bajos entre los 0,01-0,03 g ECA/100g de harina y fue similar en ambas especies.

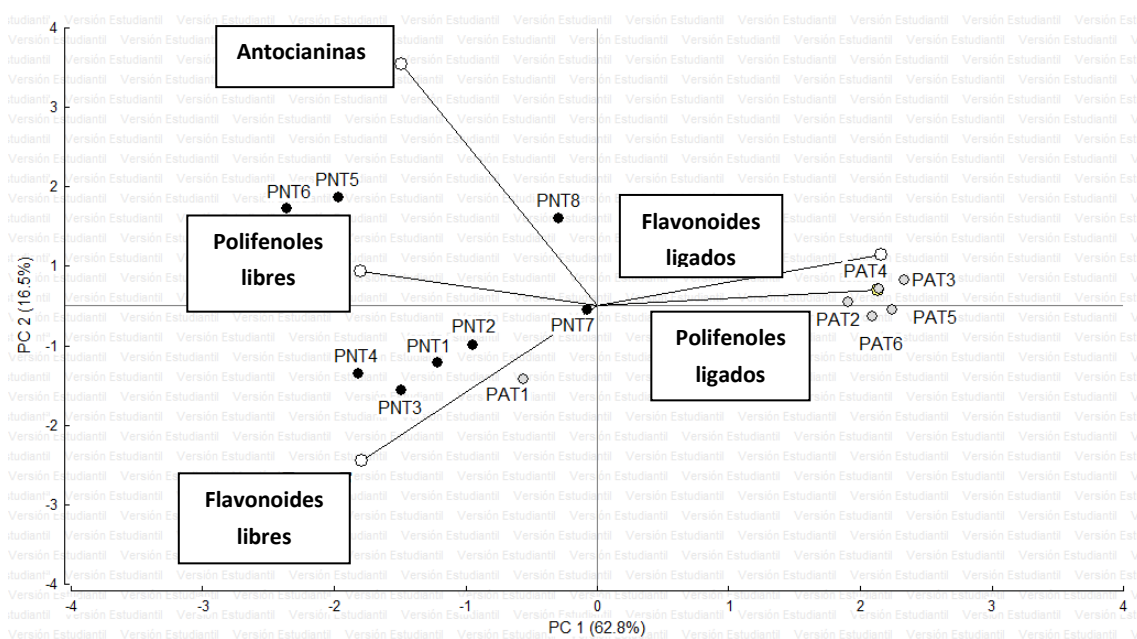
Tabla 4. Contenido de polifenoles de la harina fina de mesocarpio de *P. alba* y *P. nigra*.

	<i>Prosopis alba</i>						<i>Prosopis nigra</i>							
	PAT1	PAT2	PAT3	PAT4	PAT5	PAT6	PNT1	PNT2	PNT3	PNT4	PNT5	PNT6	PNT7	PNT8
P	0,46±0,05 <sup>c</sup>	0,22±0,05 <sup>a</sup>	0,33±0,02 <sup>b</sup>	0,21±0,03 <sup>a</sup>	0,42±0,06 <sup>c</sup>	0,26±0,02 <sup>c</sup>	0,52±0,05 <sup>c</sup>	0,46±0,05 <sup>c</sup>	0,42±0,05 <sup>c</sup>	0,38±0,10 <sup>c</sup>	0,48±0,05 <sup>c</sup>	0,66±0,01 <sup>d</sup>	0,33±0,05 <sup>b</sup>	0,35±0,10 <sup>b</sup>
PL <sup>a</sup>	0,07±0,00	0,60±0,01 <sup>b</sup>	0,93±0,04 <sup>c</sup>	0,74±0,03 <sup>d</sup>	0,47±0,01 <sup>e</sup>	0,49±0,02 <sup>e</sup>	0,05±0,00 <sup>a</sup>	0,04±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>a</sup>	0,05±0,00 <sup>a</sup>	0,04±0,00 <sup>a</sup>	0,07±0,00 <sup>a</sup>	0,05±0,00 <sup>a</sup>
F	0,86±0,00 <sup>b</sup>	0,41±0,00 <sup>a</sup>	0,51±0,00 <sup>a</sup>	0,33±0,00 <sup>a</sup>	0,65±0,00 <sup>b</sup>	0,45±0,00 <sup>a</sup>	0,92±0,01 <sup>d</sup>	1,01±0,02 <sup>d</sup>	1,18±0,02 <sup>d</sup>	1,37±0,01 <sup>d</sup>	0,86±0,00 <sup>b</sup>	0,88±0,01 <sup>b</sup>	0,51±0,00 <sup>a</sup>	0,34±0,00 <sup>a</sup>
TC	0,01±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,07±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,2±0,02 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>a</sup>
TH	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL
A	0,00±0,00 <sup>a</sup>	6,96±1,00 <sup>b</sup>	11,35±1,00 <sup>c</sup>	8,45±1,00 <sup>b</sup>	2,56±0,50 <sup>a</sup>	1,77±0,50 <sup>a</sup>	7,25±0,50 <sup>b</sup>	16,20±1,00 <sup>d</sup>	11,63±1,00 <sup>c</sup>	25,95±1,00 <sup>e</sup>	65,27±1,50 <sup>f</sup>	56,22±1,50 <sup>g</sup>	13,77±1,00 <sup>cd</sup>	38,78±1,00 <sup>h</sup>
AA	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>a</sup>	0,04±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,04±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,05±0,01 <sup>a</sup>
AK	0,01±0,0 <sup>a</sup>	0,01±0,0 <sup>a</sup>	0,03±0,01 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	0,01±0,0 <sup>a</sup>	0,02±0,0 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,01 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>

P: Polifenoles libres (g EAG/100g harina); PL: Polifenoles ligados (g EAG/100g harina); F: Flavonoides (g EQ/100g harina); TC: Taninos condensados (g EPB2/100g harina); TH: Taninos hidrolizables (g EAG/100g harina); A: Antocianinas (g EC3G/100 g harina); AA: Ácido ascórbico (g EL-AA/100g harina); AK: Alcaloides (g ACE/100g harina). DL: Por debajo del límite de detección. Los valores se presentan con su desviación media estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma fila muestran diferencias significativas entre cada individuo tratado, según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).PAT1 a PAT6: harinas de *P. alba*; PNT1 a PNT8: harinas de *P. nigra*.

Se realizó un análisis estadístico multivariado para estudiar la relación entre las variables que hacen referencia a los fitoquímicos presentes en la muestra (polifenoles libres, polifenoles ligados, flavonoides libres, flavonoides ligados y antocianinas) y, así, tratar de evidenciar diferencias, si las hubiere, entre las muestras procedentes de los distintos individuos de las dos especies en estudio y entre ambas especies.

El análisis de componentes principales (PCA) mostró una clara separación en dos grupos: semolina de *P. alba* y semolina de *P. nigra* (Figura 18), de acuerdo con la composición fitoquímica. El diagrama de dispersión mostró claramente discriminación entre especies por componente principal PC1, mientras que PC2 indica principalmente la variación del contenido total de cada tipo de metabolitos dentro de cada especie.



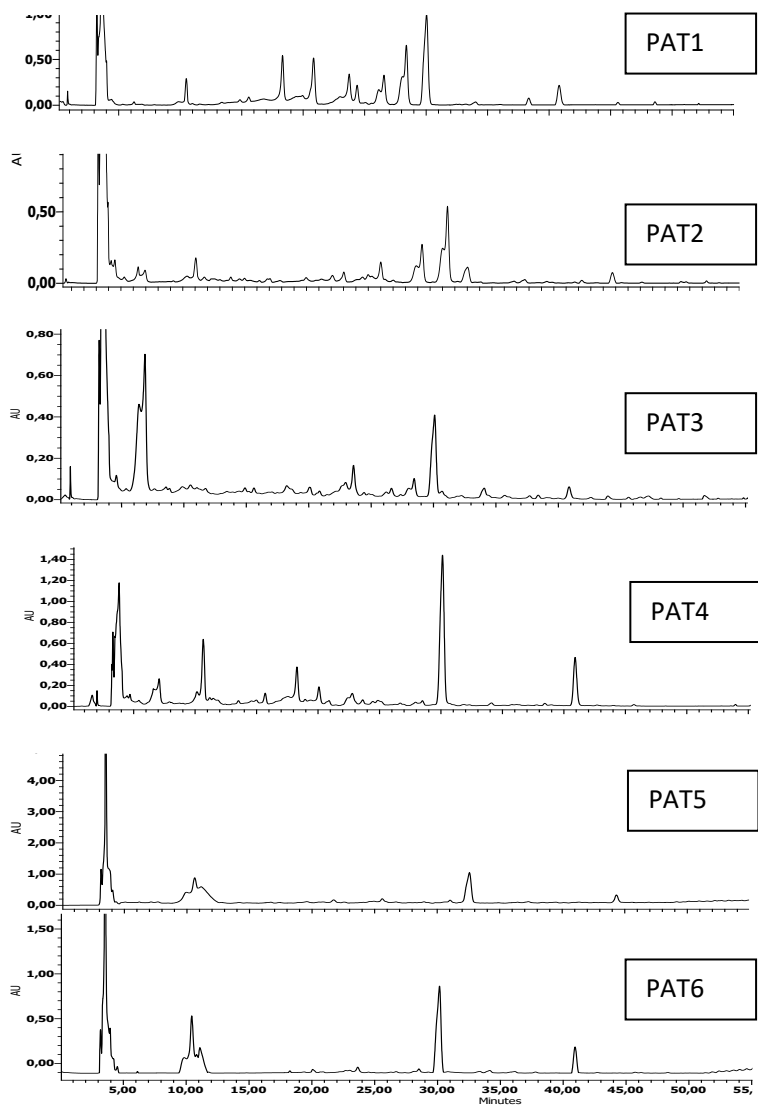
**Figura 18.** Gráfico (PC1 vs. PC2) de análisis de componentes principales (PCA) obtenido del análisis fitoquímico de diferentes muestras de harina de *P. alba* y *P. nigra*.

### 3.I.1.2. Caracterización de extractos de *P. alba* y *P. nigra* ricos en compuestos fenólicos: Perfiles cromatográficos

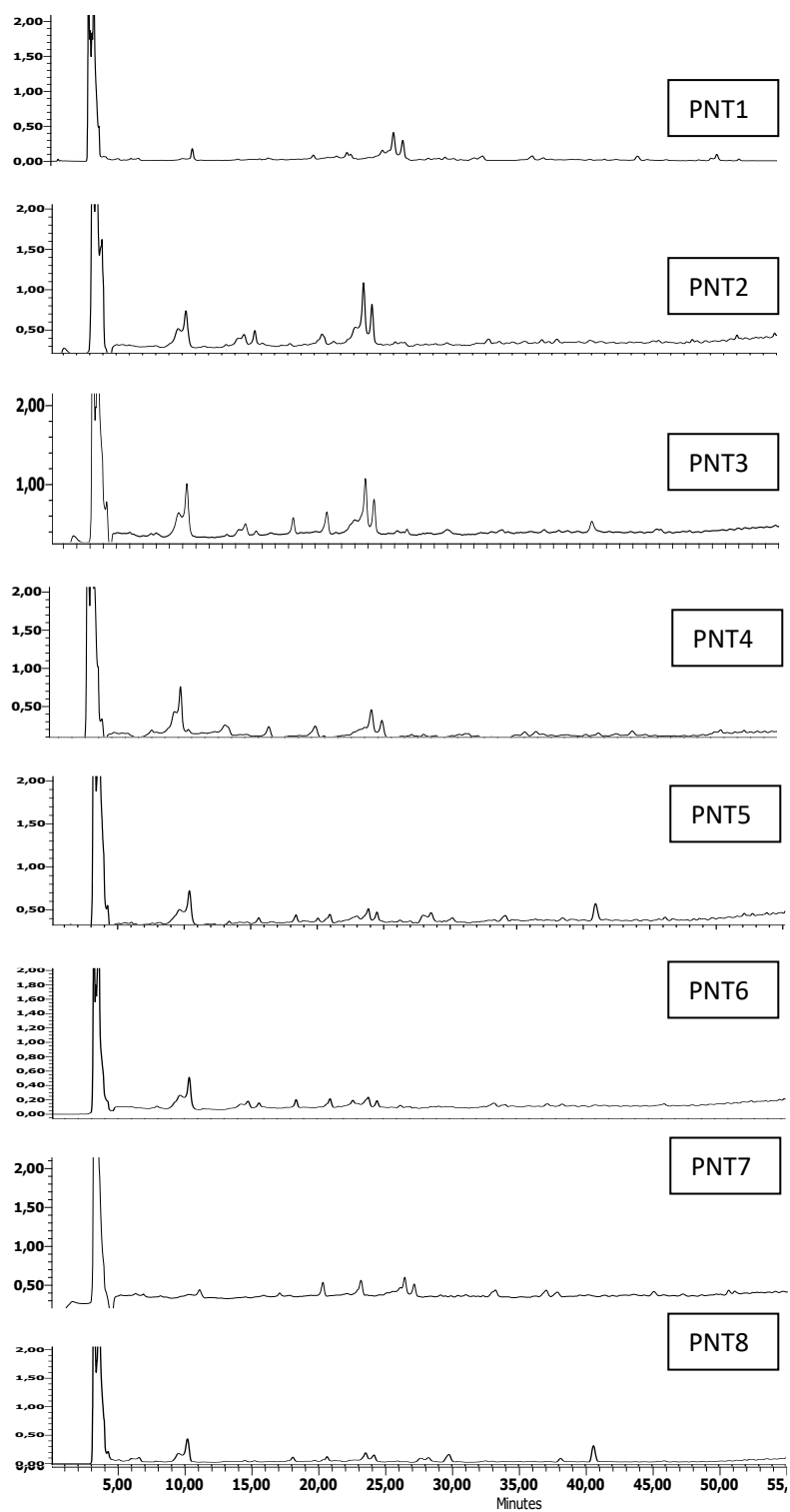
Se realizaron perfiles de HPLC-DAD de los extractos de las diferentes muestras de algarrobo blanco y negro (Figura 19 y 20). En los distintos perfiles de individuos de *P. alba* se observan picos con espectros de absorbancia UV-visible característica de polifenoles a tiempo de retención 11, 30 y 41 min. En los cromatogramas correspondientes a los diferentes individuos de *P. nigra* se observan picos con espectros de absorción UV-visible característicos de compuestos fenólicos de tiempo de retención 10, 24 y 41 min. Los perfiles intraespecies resultaron ser muy similares, manifestándose la presencia de los mismos compuestos, aunque en proporciones variables.

#### **Flavonoides O- y C-glicósidos**

Los principales constituyentes identificados en los extractos ricos en compuestos fenólicos de vainas de algarrobo fueron C-glicosil flavonoides y O-flavonol glicósidos. Los cromatogramas de HPLC de extracto metanólico de harina de *P. alba* y *P. nigra* se muestran en la Figura 21. Las estructuras de algunos constituyentes de la harina se presentan en la Figura 22. Los datos de HPLC-MS/MS de los compuestos fenólicos identificados en los extractos de polifenoles libres de azúcares, de las vainas de *P. alba* y *P. nigra* se presentan en la Tabla 5.



**Figura 19.** Cromatogramas de HPLC-DAD extraídos a maxplot (210-500nm) de muestras de extractos polifenólicos de *P. alba*.



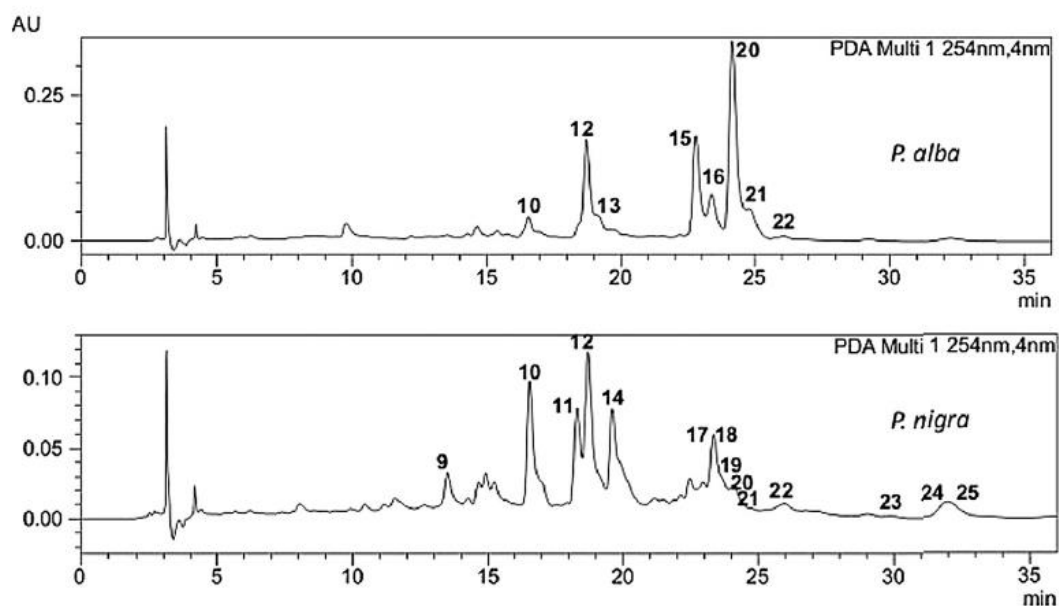
**Figura 20.** Cromatogramas de HPLC-DAD extraídos a maxplot (210-500nm) de muestras de extractos polifenólicos de *P. nigra*.

El análisis HPLC-ESI-MS/MS de los extractos polifenólicos de las harinas de *P. alba* y *P. nigra* permitió la identificación o identificación tentativa de 25 compuestos, incluyendo 8 antocianinas y 17 flavonoides. Se identificaron ocho O y C glucósidos de flavonoides en *P. alba*, mientras que catorce se describieron a partir de extracto de vainas de *P. nigra* mostrando, en consecuencia, mayor diversidad química que *P. alba*. Los glucósidos de quercetina (**10**, **12** y **21**), kaempferol hexósido (**22**) y C-glicósido isovitexina (**20**) resultaron comunes en ambas especies. Los compuestos **10**, **12**, **16**, **18** y **21** se asignaron como glucósidos de quercetina basándose en los experimentos MS/MS. Mientras que el compuesto **10** muestra pérdidas consecutivas de dos hexosas y una ramnosa, el **12**, muestra pérdida de dos hexosas y el **21** una hexosa, dando lugar a una aglicona de m/z 301, que correspondería a la quercetina. Los compuestos **16** y **18** difieren en el tipo de azúcar, ya que el **16** muestra primero la pérdida de una ramnosa y el **18** de una unidad de hexosa. El flavonoide **12**, eluido a tiempo de retención 18,7 min, muestra un espectro UV compatible con un flavonol 3-sustituido que tiene dos o más funciones OH en el anillo B. El espectro MS/MS mostró la pérdida de dos hexosas que conducen a la aglicona de m/z 301, lo que está de acuerdo con un O-dihexósido de quercetina. La asignación coincide con los datos reportados por Ferreres, Llorach, & Gil-Izquierdo (2004) para los glicosil flavonoides. Los derivados de éter metílico de quercetina (**13** y **24**) se detectaron como constituyentes menores y difieren en restos de azúcar, no se puede dar la posición de la función OCH<sub>3</sub> en la aglicona basándose únicamente en el análisis de MS. Los compuestos **19** y **22** se identificaron tentativamente como hexósido-ramnósido y como hexósido de kaempferol, respectivamente, basado, en la pérdida de azúcar y el pico base de m/z 285 que correspondería con la aglicona kaempferol. El derivado **25** difiere de **19** en 14 uma, soportando un éter metílico de kaempferol. Varios flavonoides C-glicosilados (compuestos **9**, **11**, **14**, **15** y **20**) se presentan como constituyentes principales en los extractos polifenólicos de harinas de algarrobo. La mayoría de ellos se basan en la aglicona apigenina. La



diferenciación de la vitexina (**15**) y la isovitexina (**20**) se basó en la secuencia de elución, así como en la abundancia relativa del ión [M-90] a m/z 341. En el compuesto eluido a tiempo de retención 22,8 min, la intensidad de la [M-90] - ion al ion m/z 341 era 9% mientras que para el isómero eluido a tiempo de retención 24,1 min, la abundancia era 31%. Este hallazgo está de acuerdo con el informe de Ferreres et al. (2003) sobre las C-glicosil flavonas procedentes de semillas de membrillo (*Cydonia oblonga*). La secuencia de elución y la abundancia relativa de iones de los compuestos **11** y **14** están de acuerdo con isoschaftósido y schaftósido, reportados previamente en jarabes de vainas de *Prosopis* por Quispe, Petroll, Theoduloz, & Schmeda-Hirschmann (2014).

Los compuestos O-glicósidos de quercetina y C-glicósidos de apigenina presentan reconocida capacidad antioxidante, antiinflamatoria, anticancer, inhibidores de enzimas convertidoras de angiotensina, actividad hipoglucemiante y antiplaquetarias, entre otros (Piccinelli et al., 2008; Zucolotto et al., 2009). Además, son rápidamente absorbidos tras la administración oral y distribuidos por el plasma a los diferentes tejidos (Xiao, Capanoglu, Jassbi, & Miron, 2016).

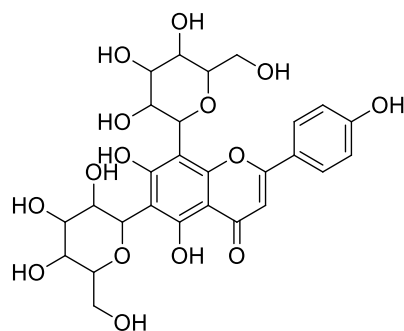


**Figura 21.** Cromatograma de HPLC de extractos metanólico de *P. alba* y *P. nigra*. Detección ultravioleta (UV) a 254 nm. Compuestos: 9: Apigenina-C-dihexósido (Vicenina II); 10: Q-dihexósido ramnósido; 11: Apigenina-C-hexósido-C-pentósido (Isoschaftósido); 12: Q-dihexósido; 13: Q-metileter dihexósido; 14: Apigenina-C- hexósido-C-pentósido (Schaftósido); 15: Apigenina-8-C-glucósido (Vitexina); 16: Q-ramnósido- hexóxido; 17: Desconocido; 18: Q-hexósido-ramnosa; 19: K- hexósido-ramnósido; 20: Apigenina-6-C-glucósido (Isovitexina); 21: Q - hexósido; 22: K - hexósido; 23: Apigenina hexósido-ramnósido; 24: Q metil eter- hexósido-ramnósido; 25: K-metil eter hexósido-ramnósido. Q: quercetina; K: kaempferol. La estructura de los compuestos 9, 11, 14, 15 y 20 se muestra en la Fig. 20.

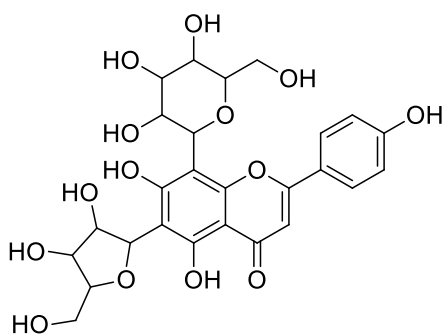
Tabla 5. Identificación de compuestos fenólicos en harinas de vainas de *P. alba* (PA) y *P. nigra* (PN) por datos de HPLC-DAD-ESI-MS.

Pico	TR (min)	$\lambda_{\max}$ UV (nm)	[M-H]	Patrón de fragmentación (abundancia relativa)	Identificación
9	13.5	332, 271	593	575 (5), 503 (30), 473 (100), 383 (18), 353 (28)	Apigenina-C-dihexósido (Vicenina II) PN
10	16.5	351, 295 sh, 265 sh, 257	771	609 (40), 591 (80), 505 (38), 343 (24), 301 (100), 300 (90)	Q-dihexósido ramnosido PA, PN
11	18.3	336, 271	563	503 (41), 473 (100), 443 (64), 383 (24), 353 (33)	Apigenina-C-hexósido-C-pentósido (Isoschaftósido) PN
12	18.7	351, 295 sh, 265 sh, 257	625	505 (33), 463 (42), 445 (46), 343 (12), 301 (100), 300 (87)	Q- dihexósido PA, PN
13	19.4	-	639	477 (100), 315 (1)	Q-metileter dihexósido PA
14	19.6	336, 271	563	545 (16), 503 (10), 473 (100), 443 (50), 383 (30), 353 (37)	Apigenina-C-hexósido-C-pentósido (Schaftósido) PN
15	22.8	338, 295 sh, 268	431	341 (9), 311 (100)	Apigenina 8-C-glucósido (Vitexina) PA
16	23.2	353, 290 sh, 266, 256	609	301 (100)	Q-ramnósido-hexósido PA
17	ca 23.5	-	603	555 (5), 483 (36), 443 (100), 323 (5)	Desconocido PN
18	23.9	345, 275 sh, 267	609	301 (100)	Q- hexósido-ramnosa PN
19	24.0	-	593	285 (100)	K- hexósido-ramnósido PN
20	24.1	338, 296 sh, 270	431	341 (31), 311 (100)	Apigenina-6-C-glucósido (Isovitexina) PA, PN
21	24.9	-	463	301 (100)	Q- hexósido PA, PN
22	25.0	-	447	285 (100)	K-hexósido PA, PN
23	28.5-29.5	-	577	269 (100)	Apigenina hexósido-ramnósido PN
24	31.9	-	623	477 (1), 300 (33), 315 (100)	Q metil éter hexósido-ramnósido PN
25	32.0	347, 298 sh, 265	607	299 (100), 284 (9)	K-metil eter hexósido-ramnósido

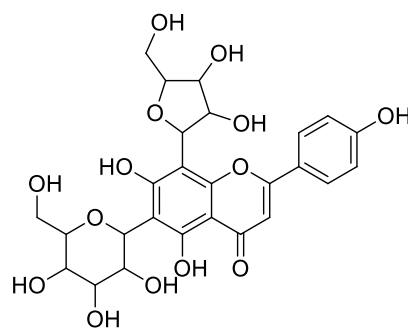
Q: quercetina; K: kaempferol.



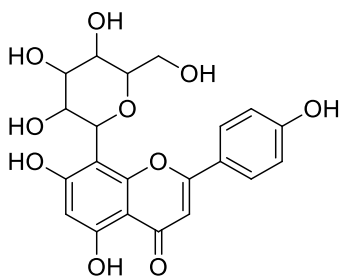
**9** Vicenina II



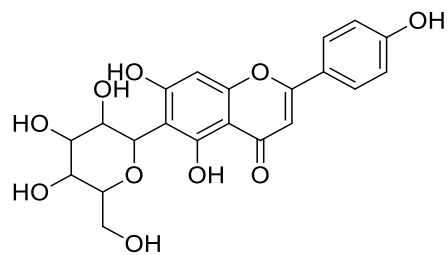
**11** Isoschaftósido



**14** Schaftósido



**15** Vitexina



**20** Isovitexina

**Figura 22.** Estructura de los compuestos C glicosidos derivados de apigenina identificados en extractos polifenólicos de vainas de harina de *Prosopis*.

## 3.1.2. Actividades biológicas

### 3.1.2.1. Capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos polifenólicos de harina de *P. alba* y *P. nigra*

#### 3.1.2.1.1. Actividad depuradora de radicales libres

Los ensayos de depuración de DPPH• y ABTS•<sup>+</sup> permiten evaluar la capacidad de los antioxidantes de donar hidrógeno. Los extractos de compuestos fenólicos libres de las ocho muestras de harina de *P. nigra* son ricos en flavonoides y mostraron capacidad de depurar el radical catión ABTS con valores de CD<sub>50</sub> entre 7 y 29 µg/mL mientras que sólo tres muestras alcanzaron el 50% de depuración de radical DPPH con valores entre 19 y 22 µg/mL. Se obtuvieron resultados similares para *P. alba* (6 a 17 µg/mL para ABTS y 11 a 15 µg / mL para DPPH, Tabla 6). Además, los extractos de *P. nigra* ricos en fenoles ligados mostraron valores de CD<sub>50</sub> entre 4 y 12,5 µg/mL, mientras que *P. alba* mostró valores entre 2,5 y 7 µg/mL para ABTS (Tabla 6). El mismo comportamiento se demostró para fenólicos ligados en la actividad de eliminación de DPPH. De acuerdo con los análisis estadísticos, los compuestos fenólicos ligados resultaron más activos que los compuestos fenólicos libres. Estos resultados están de acuerdo con los reportados para compuestos fenólicos ligados liberados de otros alimentos (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2006). Se considera que los fenoles ligados tienen beneficios para la salud porque pueden escapar de las condiciones de digestión gastrointestinal superior junto con los materiales de la pared celular y son absorbidos en el plasma sanguíneo durante la digestión por la microflora intestinal (Andreasen, Kroon, Williamson, & Garcia-Conesa, 2001). Se observó una correlación significativa ( $p < 0,05$ ) entre el potencial antioxidante determinado por ABTS y DPPH con respecto a los compuestos fenólicos libres de *P. alba* ( $R^2 = 0,6800$  y  $0,7149$ , respectivamente) o

ligados ( $R^2 = 0,8852$  y  $0,7856$ , respectivamente). Por el contrario, no se encontró correlación significativa ( $p \geq 0,1$ ) entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos (ligados o libres) en los extractos de *P. nigra*.

### 3.I.2.1.2. Protección contra la lipoperoxidación

Los lípidos de la membrana son ricos en ácidos grasos insaturados que son muy susceptibles a los procesos oxidativos. Se ensayó la capacidad de extractos fenólicos de inhibir la oxidación acoplada de  $\beta$ -caroteno y ácido linoleico. Tanto los compuestos fenólicos libres como los ligados de *P. alba* y *P. nigra* mostraron efecto protector sobre la peroxidación de los lípidos con valores de  $CD_{50}$  entre 1,5 y 14,5  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 6). Los compuestos fenólicos libres de *P. nigra* fueron más activos que los libres de *P. alba* y que los fenólicos ligados de ambas especies. Hubo una correlación positiva significativa ( $p < 0,05$ ) entre la inhibición de la lipoperoxidación y el contenido de fenólicos libres y ligados en los extractos de *P. alba* ( $R^2 = 0,8001$  y  $0,9174$ , respectivamente). Sin embargo, en *P. nigra* sólo se observó una correlación significativa con el contenido de fenólicos ligados ( $R^2 = 0,6485$ ).

Tabla 6. Capacidad antioxidante de semolina de *P. alba* y *P. nigra*.

		<i>Prosopis alba</i>						<i>Prosopis nigra</i>							
		PAT1	PAT2	PAT3	PAT4	PAT5	PAT6	PNT1	PNT2	PNT3	PNT4	PNT5	PNT6	PNT7	PNT8
ABTS*	P	13,0±1,1 <sup>b</sup>	13,0±1,1 <sup>b</sup>	6,0±1,0 <sup>a</sup>	7,0±1,0 <sup>a</sup>	16,0±0,5 <sup>b</sup>	17,0±0,5 <sup>b</sup>	22,0±1,0 <sup>B</sup>	23,0±1,0 <sup>C</sup>	29,0±1,0 <sup>C</sup>	22,0±0,5 <sup>C</sup>	15,0±0,5 <sup>B</sup>	7,0±0,5 <sup>A</sup>	10,0±1,0 <sup>B</sup>	12,0±1,0 <sup>B</sup>
	PL	4,5±1,0 <sup>a</sup>	3,5±1,1 <sup>a</sup>	2,5±1,0 <sup>a</sup>	3,0±0,5 <sup>a</sup>	7,0±0,5 <sup>a</sup>	3,0±0,5 <sup>a</sup>	6,0±0,5 <sup>A</sup>	12,5±0,5 <sup>B</sup>	4,0±0,5 <sup>A</sup>	9,5±0,5 <sup>B</sup>	4,5±0,5 <sup>A</sup>	ND	ND	ND
DPPH*	P	15,0±0,5 <sup>a</sup>	13,0±0,5 <sup>a</sup>	14,0±1,0 <sup>a</sup>	ND	ND	11,0±1,0 <sup>a</sup>	ND	ND	20,0±1,0 <sup>A</sup>	19,0±1,0 <sup>A</sup>	ND	ND	22,0±0,5 <sup>A</sup>	ND
	PL	ND	1,5±0,5 <sup>a</sup>	1,5±0,5 <sup>a</sup>	1,5±0,5 <sup>a</sup>	1,5±0,5 <sup>a</sup>	1,7±0,5 <sup>a</sup>	30,0±0,5 <sup>B</sup>	17,0±1,0 <sup>A</sup>	17,0±1,0 <sup>A</sup>	ND	18,0±1,0 <sup>A</sup>	ND	17,0±1,0 <sup>A</sup>	17,0±1,0 <sup>A</sup>
β-Caroteno	P	14,5±0,5 <sup>b</sup>	11,0±0,5 <sup>a,b</sup>	10,0±1,0 <sup>a</sup>	13,0±1,0 <sup>a,b</sup>	13,0±1,0 <sup>a,b</sup>	12,5±0,5 <sup>a,b</sup>	7,5±0,5 <sup>B</sup>	3,0±0,5 <sup>A</sup>	9,0±1,0 <sup>C</sup>	7,5±0,5 <sup>B</sup>	7,0±1,0 <sup>B</sup>	1,5±0,5 <sup>A</sup>	4,0±0,5 <sup>A</sup>	9,5±1,0 <sup>C</sup>
	PL	10,0±1,0 <sup>a</sup>	13,0±0,5 <sup>b</sup>	12,5±0,5 <sup>b</sup>	10,0±1,0 <sup>a</sup>	11,5±0,5 <sup>a</sup>	11,5±0,5 <sup>a</sup>	5,0±0,5 <sup>A</sup>	9,0±0,5 <sup>C</sup>	6,5±0,5 <sup>B</sup>	11,5±0,5 <sup>C</sup>	6,5±1,0 <sup>B</sup>	14,0±0,5 <sup>D</sup>	10,5±0,5 <sup>C</sup>	10,0±0,5 <sup>C</sup>

PAT1 a PAT6: harinas de *P. alba*; PNT1 a PNT8: harinas de *P. nigra*, P: Polifenoles libres; PL: Polifenoles ligados. CD<sub>50</sub> concentración depuradora del 40% de los radicales libres (μgEAG/mL) CI<sub>50</sub> concentración inhibidora del 50% de la oxidación del β caroteno (μg EAG/mL). ND: No determinado en el rango de concentración ensayado. Los valores se presentan con su desviación media estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma fila muestran diferencias significativas entre cada individuo tratado, letras minúsculas para *P. alba* y letras mayúsculas para *P. nigra* según la prueba de Tukey (P ≤ 0,05).

### 3.I.2.2. Actividad antiinflamatoria de extractos polifenólicos de *Prosopis alba* y *P. nigra*

La vía del AA es uno de los procesos más importantes involucrados en la respuesta inflamatoria. Las enzimas COX y LOX, llevan a la producción de los mediadores inflamatorios conocidos como eicosanoides, moléculas que regulan la respuesta inflamatoria disparando una serie de reacciones que controlan la quimiotaxis de los neutrófilos, vasodilatación, fiebre, etc (Lucas et al., 2011). Resulta importante suprimir la respuesta inflamatoria en esos niveles, pero al mismo tiempo mantener los niveles fisiológicos de esos mediadores, necesarios para la homeostasis (Hwang et al., 2013). El desbalance prolongado entre los mecanismos oxidantes y antioxidantes llevan a situaciones de daño general conocido como estrés oxidativo que provoca la injuria de los tejidos y activa el proceso proinflamatorio (Khaper et al., 2010) y está asociado a una variedad de enfermedades inflamatorias del tipo de aterosclerosis, cáncer, fibrosis quística, obesidad, artritis, entre otras (Reuter et al., 2010). Se puede esperar que los compuestos que tienen actividad antioxidante tengan potencial terapéutico para controlar varios procesos inflamatorios. En el presente estudio se midió la actividad inhibidora de enzimas proinflamatorias de los extractos polifenólicos de una de las muestras de *P. nigra* (PNT8) y una de *P. alba* (PAT2) contra las enzimas proinflamatorias (COX-2 y LOX). Ambos extractos ricos en polifenoles libres fueron capaces de inhibir la actividad de la enzima COX-2 con valores de  $CI_{50}$  de  $0,66 \pm 0,03$   $\mu\text{g EAG/mL}$  para el extracto polifenólico crudo de *P. nigra*. El mismo efecto se observó en *P. alba* con valores de  $CI_{50}$  de  $0,70 \pm 0,04$   $\mu\text{g EAG/mL}$  para el extracto crudo. El fármaco de referencia, nimesulida, mostró una  $CI_{50}$  de  $0,39$   $\mu\text{g/mL}$ . No se observó inhibición en la enzima LOX para extractos de *P. nigra* y *P. alba* hasta una concentración de  $30$   $\mu\text{g EAG/mL}$ . Los extractos fueron en consecuencia selectivos para la COX-2. Estos hallazgos junto con la actividad antioxidante demostrada sugieren que la harina de *P. nigra* y *P. alba* podrían



utilizarse como un ingrediente funcional con capacidad de reducir procesos oxidativos e inflamatorios.

### *3.I.2.3. Inhibición de la actividad de las enzimas que intervienen en el síndrome metabólico*

#### **3.I.2.3.1. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa y $\alpha$ -amilasa**

El incremento de la glucosa posprandial en sangre puede disminuir a través de la inhibición de enzimas involucradas en la liberación de glucosa desde los alimentos tales como  $\alpha$ -glucosidasa, una enzima localizada en el epitelio intestinal. La continua administración de inhibidores comerciales de  $\alpha$ -glucosidasa (acarbose, voglibosa y miglitol) puede causar malestar abdominal, diarrea, flatulencia y hepatotoxicidad (Abdul-Ghani, Tripathy, & DeFronzo, 2006). Por ello, es necesario encontrar nuevos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa para el tratamiento terapéutico de diabetes mellitus tipo II. Los extractos polifenólicos libres de PAT2 resultaron activos contra  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa con valores de  $CI_{50}$  de 8,2 y 5,1  $\mu$ g EAG/mL mientras que PNT8 muestra valores de  $CI_{35}$  de 3 y 7,5  $\mu$ g EAG/mL para  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, respectivamente. Los resultados sugieren que los extractos de *P. nigra* y *P. alba* podrían ser capaces de reducir la captación y/o absorción de glucosa. En este sentido las harinas de algarrobo podrían ser un suplemento para controlar la hiperglucemia en pacientes diabéticos.

#### **3.I.2.3.2. Inhibición de lipasa pancreática**

La lipasa pancreática es una enzima que juega un importante rol en el síndrome metabólico, en la hidrólisis de los lípidos se liberan ácidos grasos que pueden ser

absorbidos en el tracto digestivo humano. Orlistat es el principal fármaco inhibidor de lipasa para el manejo de la obesidad (Birari & Bhutani, 2007).

Los extractos de polifenoles libres resultaron activos contra la lipasa pancreática. Los valores de  $CI_{50}$  correspondieron a 3  $\mu\text{g}$  EAG/mL para PAT2, 7,5  $\mu\text{g}$  EAG/mL para PNT8. Los valores de  $CI_{50}$  resultaron cercanos a la droga de referencia ( $6,00 \pm 0,02$  Orlistat).

### 3.I.3. Pigmentos presentes en vainas de algarrobos: Antocianinas

#### 3.I.3.1. Identificación de antocianinas en extractos ricos en polifenoles

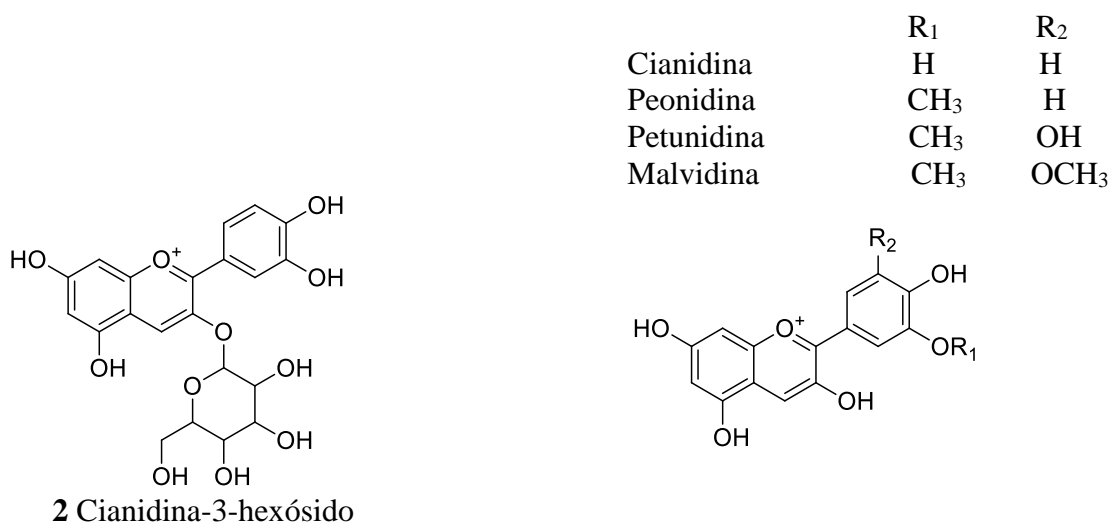
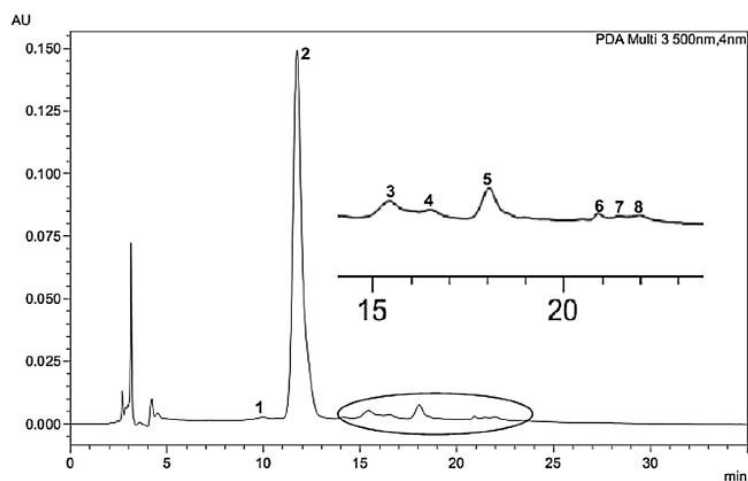
La extracción de polifenoles de la harina de vainas de *P. nigra* con metanol proporcionó extractos de color rojo violáceo. Los patrones de fragmentación y la identificación tentativa de las antocianinas de harina de vainas de *P. nigra* se presentan en la Tabla 7. El análisis por HPLC del extracto rico en polifenoles (Figura 23) mostró un compuesto principal (pico 2) al tiempo de retención (Tr) de 11,7 min, con una absorción máxima de 516 nm y un ión  $[M]^+$  a  $m/z$  449. El análisis MS/MS indicó la pérdida neutra de 162 uma, de acuerdo con una hexosa. El compuesto 2 fue asignado como cianidina-3-hexósido, de acuerdo con la literatura (Tae et al., 2010). También se detectaron siete compuestos menores y se asignaron tentativamente como antocianidinas, a saber, los picos 1, 3-8. Los picos 1, 2 y 5 compartieron la misma antocianidina (cianidina,  $m/z$  287), 4, 7 y 8 presentaron malvidina ( $m/z$  331), el 3 que contenía peonidina ( $m/z$  301) y el 6 petunidina ( $m/z$  317) (Wu & Prior, 2005). El espectro MS/MS del compuesto 1 mostró fragmentos de iones a  $m/z$  449 y  $m/z$  287, de acuerdo con la pérdida consecutiva de una ramnosa y una hexosa, siendo provisionalmente identificados como cianidin-ramnosil-hexósido. El compuesto 5, con  $m/z$  535 y los iones MS/MS a  $m/z$  449 y  $m/z$  287, un malonilo (86 uma) y una hexosa (162 uma), de acuerdo con cianidina

malonil hexóido. Los derivados de malvidina 4 y 7 presentan un ion  $[M]^+$  a 655 y 639 uma, que en MS/MS pierde dos hexosas y una ramnosa y una hexosa, respectivamente, conduciendo a la misma antocianidina. Los diglicósidos se identificaron como malvidina-dihexóido y malvidina ramnosil hexóido, respectivamente. El compuesto 8 pierde una hexosa del ion  $[M]^+$  a m/z 493 y se identifica como malvidina-3-hexóido. Los monoglicósidos 3 y 6 pierden una hexosa de sus iones  $[M]^+$  y se les asignó como peonidina-3-hexóido y petunidina-3-hexóido, respectivamente.

Destacamos los resultados obtenidos en este apartado dado que la presencia de antocianinas en harina de vainas de especies de *Prosopis* así como la identidad de las mismas se informa por primera vez en este trabajo de Tesis doctoral.

Tabla 7. Datos de HPLC-MS/MS de antocianinas de harinas de vainas de *Prosopis nigra*.

Pico	Tr (min)	$\lambda_{\max}$ visible (nm)	$[M]^+$ (m/z)	MS/MS (m/z)	Identificación
1	9,2	-	595	449, 287	Cianidina ramnosil hexóido
2	11,7	516, 280	449	287	Cianidina-3-hexóido
3	15,4	517, 274	463	301	Peonidina-3-hexóido
4	16,5	515, 292	655	493, 331	Malvidina dihexóido
5	18,0	518, 284	535	449, 287	Cianidina malonil hexóido
6	20,8	522, 269	479	317	Petunidina-3-hexóido
7	21,4	-	639	493, 331	Malvidina ramnosil hexóido
8	22,0	520.272	493	331	Malvidina-3-hexóido



**Figura 23.** Cromatograma de HPLC del extracto polifenólicos de vainas de *Prosopis nigra* a 500 nm. 1: Cianidina ramnosil hexósido; 2: Cianidina-3-hexósido; 3: Peonidina-3-hexósido; 4: Malvidina dihexósido; 5: Cianidina malonil hexósido; 6: Petunidina-3-hexósido; 7 Malvidina ramnosil hexósido; 8: Malvidina-3-hexósido. Estructura química de las antocianinas identificadas.

### *3.1.3.2. Estabilidad y capacidad antioxidante del pigmento (antocianina) de P. nigra en diferentes soluciones extractivas*

Las antocianinas, son un grupo de flavonoides hidrófilos, colorantes naturales, responsables de los colores rojo y morado de los cereales, frutos y pétalos pigmentados. El color es una de las propiedades más importantes de los alimentos y bebidas y es la base para su aceptabilidad. La selección de una solución de extracción no tóxica para pigmentos alimentarios naturales es un factor importante en la industria alimentaria. Así, se utilizaron etanol y agua para extraer los pigmentos de harina de vainas de algarrobo. Como lo informamos anteriormente en esta sección, el contenido de antocianinas de *P. nigra* fue mayor que en la harina de *P. alba* (Tabla 8). Por esta razón se seleccionó la harina de *P. nigra* para encontrar el medio adecuado para eficientizar la extracción de antocianinas. Se realizaron diferentes experimentos con medios de extracción, agua pura, etanol y etanol agua acidificados y sin acidificar. En general, la extracción de antocianina fue mayor con solvente acidificados. Esto se puede atribuir principalmente a la disminución del pH a un nivel en el que la absorbancia de las antocianinas es máxima, el ácido estabiliza los pigmentos. El etanol solo o acidificado no resultó adecuado como solvente de extracción, ya que se requiere una cantidad mínima de agua (con y sin ácido) para la extracción de la antocianina hidrófila. La estabilidad de la antocianina en los diferentes medios de extracción se evaluó durante 3 meses (Tabla 4). En todas las condiciones se observó una disminución del contenido de antocianinas después del almacenamiento durante los tres meses, pero las antocianinas fueron más estables en medios acidificados que en otros sistemas de solventes.

Tabla 8. Estabilidad de las antocianinas extraídas de *P. nigra* en diferentes medios de extracción.

Medio extractivo	Antocianinas (gEC3G/100g)	
	T <sub>0</sub>	T <sub>3</sub>
H <sub>2</sub> O	12,44±0,20 <sup>a</sup>	0,91±0,10 <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> O/H <sup>+</sup>	13,98±0,20 <sup>b</sup>	12,41±0,30 <sup>d</sup>
EtOH	0	0
EtOH/H <sup>+</sup>	0	0
H <sub>2</sub> O/EtOH	18,13±0,30 <sup>c</sup>	8,00±0,10 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O/H <sup>+</sup> /EtOH	12,08±0,20 <sup>a</sup>	10,74±0,20 <sup>c</sup>
MeOH/H <sup>+</sup>	12,08±0,30 <sup>a</sup>	8,00±0,10 <sup>b</sup>

Los valores se reportan como la media ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas entre cada grupo tratado, según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Con respecto a la capacidad de depuración de ABTS<sup>•+</sup>, la actividad se determinó a pH 5 y 7. A pH 1,0, las antocianinas se encuentran predominantemente en la forma catiónica de flavilo, mientras que la proporción de esta forma disminuye significativamente a pH 3,0 y prácticamente desaparecen a pH 5,0. De hecho, a pH 5,0 la ausencia de bandas de absorción en el espectro visible indica que las antocianinas presentes en el extracto funcional están principalmente en las formas incoloras de hemiacetales y/o chalconas. El extracto obtenido con agua acidificada ( $CD_{50} = 1,2 \mu\text{g EC3G/mL}$ ) resultó más activo como antioxidante que el etanol/agua/H<sup>+</sup> y etanol/H<sup>+</sup> ( $CD_{50} = 7,4$  y  $8,3 \mu\text{g EC3G/mL}$ , respectivamente). La actividad antioxidante del extracto acuoso acidificado fue similar a la del extracto metanólico/H<sup>+</sup> (Tabla 9). Teniendo en cuenta la fácil extracción de pigmentos de la harina de *P. nigra* y su estabilidad en el sistema acuoso e hidroalcohólico acidulado durante el almacenamiento, así como sus propiedades biológicas, el extracto rico en antocianinas podría añadirse a sistemas alimentarios como antioxidantes y colorantes.

Tabla 9. **Actividad antioxidante de antocianinas de *P. nigra* frente a ABTS<sup>•+</sup>**

Medio extractivo	ABTS <sup>•+</sup> (CD <sub>50</sub> = µg EC3G/mL)
H <sub>2</sub> O/H <sup>+</sup>	1,2 ± 0,5 <sup>a</sup>
EtOH/H <sup>+</sup>	8,3 ± 0,5 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O/H <sup>+</sup> /EtOH	7,4 ± 0,5 <sup>b</sup>
MeOH/H <sup>+</sup>	1,5 ± 0,5 <sup>a</sup>

CD<sub>50</sub> concentración depuradora del 50% de ABTS<sup>•+</sup> expresados como equivalentes de Cianidina-3-glucósido por mL (µg EC3G/mL). Los valores se expresan como la media ± desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas entre cada grupo tratado, según la prueba de Tukey (P ≤ 0,05).

### 3.I.4. Conclusiones parciales

- Las harinas obtenidas de vainas maduras de *P. alba* y de *P. nigra* evidenciaron la presencia de flavonoides O- y C-glicósidos de quercetina y apigenina, identificándose entre estos últimos Schaftósido, Isoschaftósido, Vicenina, Vitexina e Isovitexina. La composición fitoquímica fue diferente entre especies, pero la composición química entre las muestras de la misma especie resultó similar.
- El color oscuro de las vainas algarrobo de *P. nigra* está directamente relacionado con el contenido del pigmento fenólico antocianina, reportado por primera vez en esta tesis para vainas de especies de *Prosopis*.
- Los fitoquímicos fenólicos, tanto libres como ligados, resultaron activos como antioxidantes, antiinflamatorios e inhibidores de enzimas asociadas al síndrome metabólico.



# PARTE II

*En vistas a la profundización de los estudios en composición química y funcional de estas dos especies arbóreas tan relevantes para nuestra región, y, dada la similitud de perfiles químicos intra-especie, así como la similitud en sus actividades biológicas entre individuos de una misma especie, se decidió conformar pooles de muestras de individuos de *P. alba* y otro pool de *P. nigra*. Los resultados se presentan a continuación.*

**Objetivo:** Realizar la caracterización nutricional y química y la evaluación de las actividades biológicas de muestras de mezclas de vainas de *P. alba* o de *P. nigra* sin tener en cuenta el individuo.



## 3.II.1. Composición fitoquímica

### 3.II.1.1. *Macronutrientes, composición de aminoácidos y composición mineral*

#### 3.II.1.1.1. Carbohidratos

Los carbohidratos totales (76,66 y 77,12%) fueron el componente principal de la harina fina de mesocarpo de *P. alba* y *P. nigra*. Las harinas exhibieron mayor contenido en carbohidratos que los extractos acuosos y etanólicos obtenidos a partir de harina de vaina de *P. alba* y *P. nigra* ( $52,08 \pm 0,09$  y  $12,56 \pm 0,10$ ;  $46,37 \pm 0,08$  y  $7,51 \pm 0,09$  g/g100 de harina de vaina, respectivamente) (Cardozo et al., 2010). También resultaron valores superiores a los de harina de cotiledón de *P. alba* ( $8,97 \pm 0,05$  g/g100) (Cattaneo et al., 2016). El azúcar soluble principal en *P. alba* y *P. nigra* fue la sacarosa,  $70,62 \pm 1,96$  y  $30,35 \pm 0,02$ , respectivamente (Tabla 10). En trabajos previos se informaron valores de 44% de sacarosa en harina de pulpa de *P. alba* de Formosa (Sciammaro, Ferrero, & Puppo, 2016). El contenido de glucosa resultó bajo en ambas especies, coincidentemente con datos conocidos para extractos alcohólicos de harina de pulpa de *P. alba* (Cardozo et al., 2010). La harina fina de mesocarpo de algarrobo blanco y algarrobo negro contiene niveles bajos de almidón digerible (AS=1,24 y 0,25%, respectivamente) y almidón resistente (AR=1,22 y 0,09%, respectivamente) en comparación con la harina de trigo que presenta un alto contenido de almidón (aproximadamente 60-80% de almidón total y 30-40% de AR), (Świeca, Dziki, & Gawlik-Dziki, 2017). El almidón resistente es la proporción de almidón que no se hidroliza en el intestino delgado y es parcial o totalmente fermentada en el intestino grueso. En consecuencia, la velocidad de liberación de glucosa del almidón y la sacarosa (el azúcar soluble mayoritario) de harina de algarrobos en el torrente sanguíneo sería lenta, lo que produciría

respuestas postprandiales glicémicas e insulinémicas bajas, en comparación con los cereales.

Tabla 10. **Composición proximal de semolina de *P. alba* y *P. nigra*.**

MACRONUTRIENTES	<i>Prosopis alba</i>	<i>Prosopis nigra</i>
Carbohidratos totales	76,66±0,24 <sup>a</sup>	77,12±0,80 <sup>a</sup>
Ázucares solubles totales	20,24±2,15 <sup>a</sup>	9,90±0,82 <sup>b</sup>
Ázucares reductores	2,93±0,12 <sup>a</sup>	2,37±0,08 <sup>a</sup>
Glucosa	0,12±0,01 <sup>a</sup>	0,12±0,01 <sup>a</sup>
Fructosa	10,31±6,59 <sup>a</sup>	5,28±0,35 <sup>b</sup>
Sacarosa	70,62±1,96 <sup>a</sup>	30,35±2,79 <sup>b</sup>
Almidón digerible	1,24±0,03 <sup>a</sup>	0,25±0,03 <sup>b</sup>
Almidón resistente	1,22±0,04 <sup>a</sup>	0,09±0,02 <sup>b</sup>
Proteínas totales	3,39±0,20 <sup>b</sup>	7,50±0,20 <sup>a</sup>
Lípidos	1,69±0,14 <sup>b</sup>	3,44±0,15 <sup>a</sup>
Fibras	10,05±0,81 <sup>a</sup>	6,34±0,19 <sup>b</sup>
Cenizas	8,10±0,12 <sup>a</sup>	5,61±0,05 <sup>a</sup>
Humedad	38,57±1,02 <sup>a</sup>	39,70±0,27 <sup>a</sup>
Minerales	17,19±0,02 <sup>a</sup>	20,47±0,03 <sup>a</sup>
Na	0,11±0,02 <sup>a</sup>	0,08±0,01 <sup>a</sup>
Ca	1,10±0,10 <sup>a</sup>	0,88±0,03 <sup>a</sup>
Fe	0,04±0,00 <sup>a</sup>	0,04±0,00 <sup>a</sup>
Mg	0,53±0,00 <sup>b</sup>	1,17±0,01 <sup>a</sup>
K	15,40±0,10 <sup>b</sup>	18,30±0,20 <sup>a</sup>

Valores expresados como g/100 g harina (excepto minerales que se encuentran expresados en mg/g). Carbohidratos totales = 100 – peso en gramos de [proteína + grasa + cenizas + humedad + fibra]. Diferentes letras en la misma línea muestran diferencias significativas de contenido de fitoquímicos entre ambas especies, según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Por otra parte, la harina fina de ambos *Prosopis* podría considerarse una "fuente de fibra", ya que su contenido supera los 3 g/100g de harina (Tabla 10). El contenido de fibra de harina de mesocarpo de *P. alba* es similar al informado para harina de cotiledón de la misma especie (Cattaneo et al., 2016). Las legumbres se han sugerido como alimentos dietéticos para pacientes diabéticos durante mucho tiempo debido a su alto contenido de fibra (Peng et al., 2008). El alto contenido de fibra, desde el punto de vista nutricional, convierte estas harinas en ingredientes potenciales para formulaciones de productos de panadería ricos en fibra.

### 3.II.1.1.2. Proteínas

El contenido de proteína bruta en *P. alba* y *P. nigra* (3,39 y 7,5%) fue inferior al informado para harina de *P. nigra* procedente de Bolivia (11,33 g/100g materia seca) (Gonzales Galán, DuarteCorrêa, De Abreu, & Piccolo Barcelos, 2008) e inferior al de la harina de cotiledón de *P. alba* procedente de la misma región fitogeográfica que las muestras en estudio en este trabajo de Tesis Doctoral ( $62,09 \pm 6,21$  g/100g) (Tabla 10). Las proteínas de harina de mesocarpo de *P. alba* y *P. nigra* contienen bajos valores de aminoácidos si los comparamos al valor determinado para cada uno de ellos en harina de semilla de *P. alba* o de harinas comerciales de soja o de trigo (Tabla 11). Esto indicaría la necesidad de procesar la vaina entera (con semilla) del algarrobo para la obtención de la harina ya que así se lograría un producto que no solo tenga un alto valor energético sino también un elevado contenido de aminoácidos esenciales.

### 3.II.1.1.3. Lípidos

La harina fina de algarrobos de Amaicha del Valle, Tucumán presentó un bajo contenido de lípidos (Tabla 10), similar a la harina de pericarpo de *P. alba* de

Formosa (Sciammaro et al., 2016) e inferior a la de cotiledón de la misma especie recolectado en Tucumán ( $12,20 \pm 0,05$  g/100g) (Cattaneo et al., 2016).

Tabla 11. Contenido de aminoácidos de semolina de *P. alba* y *P. nigra*

Aminoácidos (g/100 g proteína)	Semolina de <i>P. alba</i>	Semolina de <i>P. nigra</i>	<sup>a</sup> Harina de cotiledón de <i>P. alba</i>	<sup>b</sup> Soja	<sup>b</sup> Trigo
<b>AA Indispensables</b>					
<b>Arg</b>	0,11	0,24	14,52	3,97	1,43
<b>His</b>	0,11	0,18	3,47	1,44	0,79
<b>Ile</b>	0,10	0,16	2,55	2,43	1,74
<b>Leu</b>	0,22	0,36	7,40	4,09	6,6
<b>Lys</b>	0,16	0,30	4,41	3,31	1,00
<b>Met</b>	0,01	0,02	0,81	0,73	0,79
<b>Phe</b>	0,30	0,18	4,11	2,72	1,58
<b>Thr</b>	0,07	0,08	1,77	2,13	1,34
<b>Tyr</b>	0,18	0,34	3,32	3,60	0,81
<b>Trp</b>	< LD	< LD	0,66	0,74	< LD
<b>Val</b>	0,15	0,32	7,07	2,55	2,20
<b>AA Dispensable</b>					
<b>Cys</b>	0,06	0,10	1,47	0,80	0,70
<b>Ala</b>	0,15	0,35	4,48	2,33	2,08
<b>Asp</b>	0,52	2,27	9,44	6,20	2,23
<b>Glu</b>	0,34	0,56	18,49	9,76	11,7
<b>Gly</b>	0,16	0,25	4,44	2,30	2,70
<b>Ser</b>	0,24	0,42	5,80	2,73	2,17
<b>Orn</b>	< LD	< LD	0,35		
<b>Pro</b>	0,46	1,28	5,40	2,75	15,00

<sup>a</sup>Harina de cotiledón de *P. alba* (Cattaneo et al., 2016) y <sup>b</sup>harinas de soja y trigo (FAO, 2011). Valores expresados como g/100 g harina. < LD menor del límite de detección

#### 3.II.1.1.4. Cenizas y minerales

El contenido de cenizas para las harinas de *P. alba* y *P. nigra* fue de 8,10 y 5,61%, respectivamente. Entre los principales minerales determinados se destaca el potasio

(1540±10 y 1830±20 mg/100g de harina) en ambos casos, seguido de magnesio (117±1 mg/100g de harina) y calcio (88±3 mg/100g de harina) en harina de *P. nigra* y calcio (110±1 mg/100g de harina) y magnesio (53±0 mg/100g de harina) en harina de *P. alba* (Tabla 10). Las harinas resultaron altas en K, pero bajas en Na. Una alta relación K/Na hace interesante la harina *Prosopis* para dietas con un balance electrolítico definido. El alto contenido de K podría ser utilizado beneficiosamente en las dietas de las personas que toman diuréticos para controlar la hipertensión. El contenido de Fe fue de 4±0 mg/100g de harina. La ingesta de estas harinas contribuiría significativamente al suministro de minerales importantes a la salud humana.

### 3.II.1.2. Metabolitos secundarios

#### 3.II.1.2.1. Compuestos fenólicos

El contenido de polifenoles libres totales de harina fina de *P. alba* y *P. nigra* ( $180 \pm 2$  y  $0,45 \pm 0,04$  g EAG/100g de harina) fue similar a los valores encontrados para las muestras individuales descriptas en la Parte I de este trabajo de Tesis, y similar a lo informado para extractos etanólicos de harina de vaina de *P. nigra* y *P. alba* (Cardozo et al., 2010) y, además, superior al informado para harina de trigo blanco ( $4,4$ - $14$  mg EAG/100g de harina) (Hung et al., 2009). El contenido de polifenoles de semolina de algarrobos es inferior al de otros frutos nativos argentinos como *Ziziphus mistol* ( $0,79 \pm 0,03$  g EAG/100g PS) (Cardozo et al., 2010) y *Geoffroea decorticans* ( $1,24 \pm 0,03$  g EAG/100g PS) (Costamagna et al., 2013). Los flavonoides fueron los principales compuestos fenólicos libres presentes en semolina de algarrobo (Tabla 12). En la primera parte de este trabajo de Tesis Doctoral describimos que las harinas de ambos algarrobos presentaban en su composición química principalmente flavonoides C-glicósidos de apigenina. Para reconfirmar estos resultados en el pool de harinas semolinas se realizaron estudios de perfiles cromatográficos y cuantificación de los principales C-glicósidos de apigenina. Se identificaron y cuantificaron en semolina de *Prosopis alba* cuatro C-glicósidos basados en apigenina: apigenina-6, 8-di-C-D-glucopiranósido (Vicenina II:  $1,07 \pm 0,03$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco); Apigenina-C-hexósido-C-pentósido (Schaf-tósido:  $0,42 \pm 0,03$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco), Apigenina-6-C-glucósido (Isovitexina:  $0,60 \pm 0,04$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco) y Apigenina 8-C-glucósido (Vitexina:  $0,91 \pm 0,08$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) mientras que en *P.nigra* se identificaron Vicenina II ( $0,34 \pm 0,01$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco), Isovitexina ( $0,80$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco), Schaf-tósido ( $0,24 \pm 0,00$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco), Isoschaf-tósido ( $0,27 \pm 0,01$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco) (Tabla 13). Los flavonoides C-glucósidos como la Vicenina II,

Schaftósido e Isoschaftósido también están presentes en cereales como el trigo y el arroz tanto libres como esterificados con ácido ferúlico o sinápico.

Tabla 12. **Contenido de metabolitos secundarios en harinas de vainas maduras de *P. alba* y *P. nigra*.**

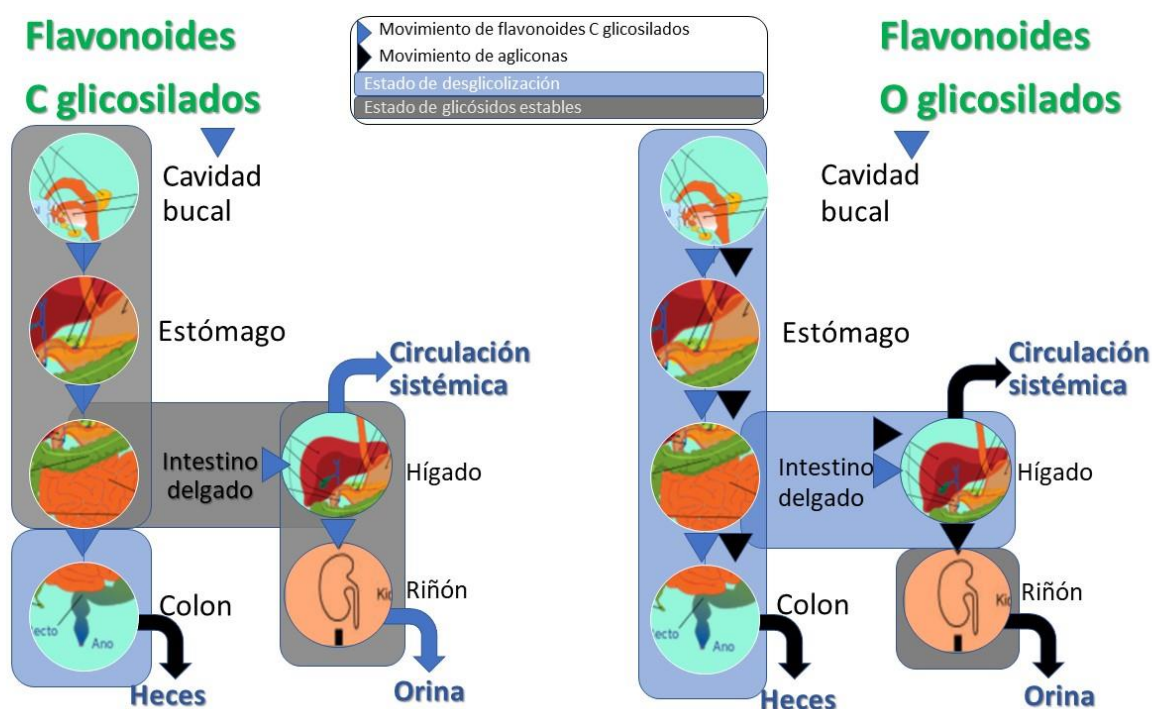
FITOQUÍMICOS	PA	PN
Fenólicos libres	0,18±0,02 <sup>b</sup>	0,45±0,04 <sup>a</sup>
Fenólicos ligados	0,17±0,00 <sup>a</sup>	0,09±0,00 <sup>b</sup>
Flavonoides	0,35±0,00 <sup>b</sup>	0,69±0,07 <sup>a</sup>
Taninos condensados	0,07±0,00 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>a</sup>
Tanninos hidrolizables	< DL	< DL
Antocianinas	< DL	47,47±0,53
Ácido ascórbico	86,36±13,61 <sup>a</sup>	75,76±1,97 <sup>a</sup>
Carotenoides	8,57±0,05 <sup>a</sup>	3,07±0,05 <sup>b</sup>
Alcaloides	0,03±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>

Valores expresados como: Fenólicos libres (g EAG/100 g harina), Fenólicos ligados (g EAG/100 g harina), Flavonoides (g EQ/100 g harina), Taninos condensados (g EPB2/ 100g harina), Taninos hidrolizables (g EAG/100 g), Antocianinas (g EC3G/100 g harina), Ácido ascórbico (mg L-AA/100 g harina), Carotenoides (mg Eβ-C/100g harina), Alcaloides (g ECA/100 g harina). DL: por debajo del límite de detección. Diferentes letras en la misma línea muestran diferencias significativas entre cada grupo tratado, según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Estos compuestos podrían contribuir al color amarillo de las harinas en medio alcalino, por lo que podrían usarse en pastas para reemplazar colorantes sintéticos y además, tienen posibles funciones en salud humana (Wijaya & Mares, 2012). Los flavonoides C-glucósidos han demostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiplaquetaria, anticáncer, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), actividad hipoglucémica, entre otros (Courts & Williamson, 2015; Chen et al., 2014; Liao & Lin, 2015; Xiao, Capanoglu, Jassbi, & Miron, 2016). Además, se absorben rápidamente después de la



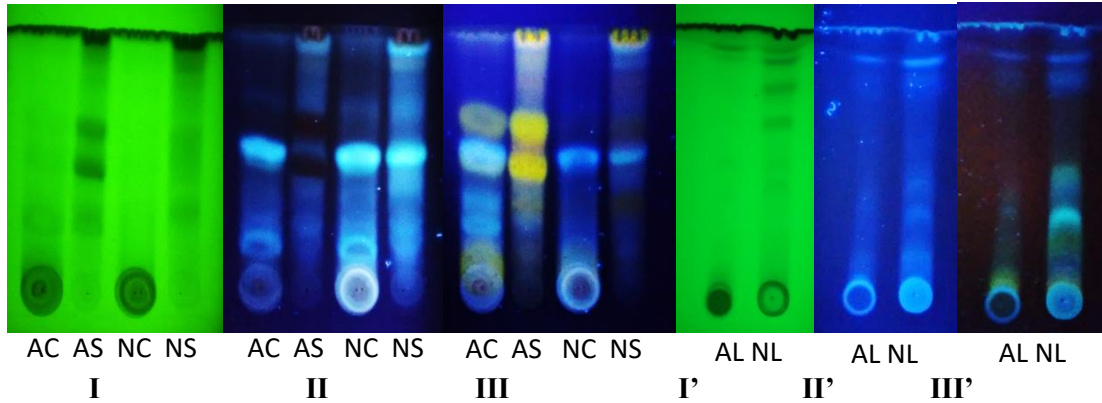
administración oral y se distribuyen por plasma en diferentes tejidos sin sufrir procesos de deglicosilación a diferencia de lo que sucede con los O-glicosil flavonoides (Courts & Williamson, 2015) (Figura 24). Los perfiles obtenidos por cromatografía en capa fina y los de HPLC-DAD se exhiben en las Figuras 25 y 26.



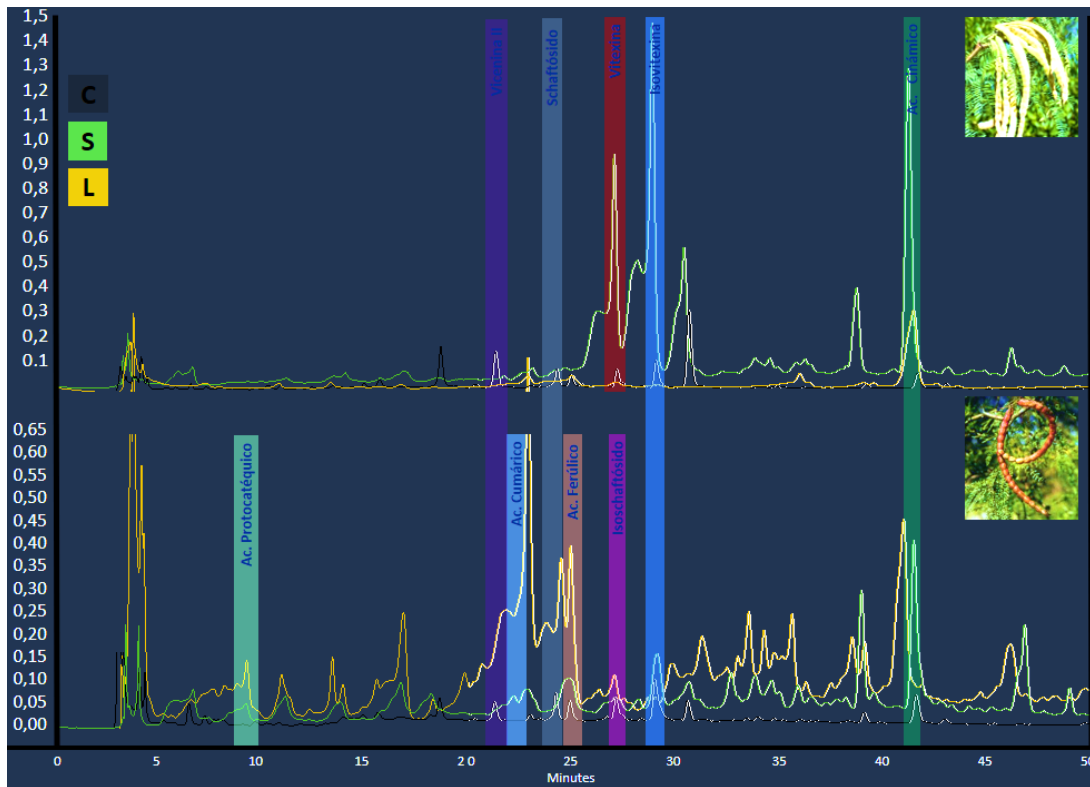
**Figura 24.** Representación esquemática comparativa de la farmacocinética *in vivo* de C y O glicósidos de flavonoides. El ligamiento C-glicosilo resiste los mecanismos de hidrólisis en el tracto gastrointestinal medio y superior y durante el procesamiento hepático, resultando la presencia de C-glicosil flavonoides en la orina humana.

Otros compuestos fenólicos importantes detectados en la harina fina del mesocarpo de *P. nigra* fueron los pigmentos antocianinas (Tabla 10). En comparación con alimentos ricos en antocianinas, como los arándanos (contenido de antocianinas 1,3-3,8 mg/g peso fresco) y maíz púrpura (6,8-82,3 mg/g harina), la harina de algarrobo negro tiene mayor nivel de antocianinas (He et al., 2016; Lao & Giusti, 2017). En los ensayos de identificación que se muestran en la Parte I de esta tesis informamos en la harina de pericarpio de *P. nigra* la presencia de Cianidina ramnosil hexósido,

Cianidina-3-hexósido; Peonidina-3-hexósido; Malvidina dihexósido; Cianidina malonil hexóxido; Petunidina-3-hexósido; Malvidina ramosil hexósido y Malvidina-3-hexósido y también demostramos la capacidad antioxidante de estos compuestos.



**Figura 26.** Cromatografía en capa fina de extractos de compuestos fenólicos libres (C), ricos en compuestos fenólicos libres (S) y extractos ricos en compuestos fenólicos ligados (L) de *P. alba* (A) y *P. nigra* (N). La fase móvil empleada consistió en: Acetato de etilo/ Ac. Fórmico/ Ac. Acético/ H<sub>2</sub>O (100/11/11/27) para los compuestos fenólicos libres y Cloroformo/ Metanol/ H<sup>+</sup> (9/1/ ácido acético) en el caso de los compuestos fenólicos ligados. La concentración de siembra fue de 10µg EAG. Se muestran las placas de sílica gel sin revelado químico a 254nm (I y I') y 365nm (II y II'), y con revelado químico a 365nm (III y III').



**Figura 25.** Cromatogramas HPLC-DAD (280 nm). AC= Extracto polifenólico crudo de *P. alba*; AS= Extracto rico en polifenoles de *P. alba*; AL= Extracto de compuestos fenólicos ligados de *P. alba*; NC= Extracto polifenólico crudo de *P. nigra*; NS= Extracto rico en polifenoles de *P. nigra*; NL= Extracto de compuestos fenólicos ligados de *P. nigra*.

Recientemente se demostró que el maíz púrpura, rico con cianidina-3-glucósido reduce la adiposidad visceral, la masa grasa corporal y la presión arterial, mejora la tolerancia a la glucosa, y la función cardiovascular, disminuye los triglicéridos plasmáticos y el colesterol total en comparación con las ratas control (Bhaswant, Shafie, Mathai, Mouatt, & Brown, 2016). La presión del mercado provocada por los cambios en la legislación y las preferencias de los consumidores han requerido que los alimentos se formulen con ingredientes más naturales. El uso de pigmentos naturales como colorantes alimentarios está recibiendo un creciente interés tanto de los fabricantes de alimentos como por los consumidores (Shahid, Shahid-Ul-Islam, & Mohammad, 2013), de allí el potencial que pueden tener estas matrices vegetales como fuente de pigmentos hidrosolubles con beneficio para la salud.

El contenido de compuestos fenólicos ligados en harinas de *P. nigra* fue menor que el contenido de compuestos fenólicos libres y en el caso de harina de *P. alba* el contenido de ambos tipos de compuestos fueron similares. Los tres componentes principales identificados en el extracto de polifenoles ligados de *P. nigra* fueron el ácido protocatéquico ( $0,33 \pm 0,00$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco), ácido ferúlico ( $4,47 \pm 0,33$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco) y ácido cumárico ( $8,16 \pm 0,63$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco), mientras que en *P. alba* se identificaron dos flavonoides C-glicósidos (vitexina, isovitexina) y un ácido fenilpropanoide (ácido cumárico) (Tabla 13). En la harina de trigo se identificó como principal compuesto fenólico ligado el ácido ferúlico ( $33,7\text{-}625$   $\mu\text{g}/\text{g}$  de harina), (Lv et al., 2012; Moore et al., 2005). Los compuestos fenólicos unidos a los componentes de la pared celular se consideraron saludables porque pueden escapar de la digestión gastrointestinal superior. Algunos autores sugirieron que estos compuestos fenólicos son hidrolizados de su macromolécula unida por enzimas intestinales microbianas (Andreasen, Kroon, Williamson, & Garcia-Conesa, 2001) y en el tracto digestivo pueden tener efecto contra el cáncer de colon y otras enfermedades crónicas (Min, Gu, McClung, Bergman, & Chen, 2012; Ti et al., 2014; Touriño et al., 2011).

En cuanto a los niveles de taninos tanto condensados como hidrolizables resultaron bajos o no detectables (Tabla 12).

### 3.II.1.2.2. Ácido ascórbico, carotenoides y alcaloides

El contenido de ácido ascórbico fue superior al obtenido para harina de cotiledón de *P. alba*. Según la OMS los requerimientos diarios de vitamina C son de 0,05 g/día. Las frutas y las verduras frescas contienen alrededor de 0,02-0,09 g de vitamina C/100g (limón=40 mg/100 g, naranja=50 mg/ 100 g, frutillas=60 mg/100 g, kiwi=90 mg/100 g). Las harinas de algarrobos de Tucumán tienen valores similares al kiwi, un alimento muy rico en este compuesto (Tabla 12).

El contenido de carotenoides de *P. alba* fue similar al de harina de cotiledón de la misma especie (10,55 mg  $\beta$ -CE/100g harina) (Cattaneo et al., 2016) y un poco inferior en el caso de *P. nigra* (Tabla 12).

Los resultados obtenidos para las extracciones diferenciales de alcaloides a partir de la harina de los pooles arrojaron los siguientes datos:  $0,03\pm 0,00$  y  $0,02\pm 0,00$  g ECA/100 g harina (*P. alba* y *P. nigra*, respectivamente).

Tabla 13. Compuestos fenólicos cuantificados por HPLC-DAD en los extractos polifenólicos libres y ligados de *Prosopis alba* y *Prosopis nigra*.

	Glicósidos de Apigenina					Ácidos fenólicos		
	Vicenina II	Schaftósido	Vitexina	Isoschaftósido	Isovitexina	Ac. Protocatéquico	Ac. Cumárico	Ac. Ferúlico
<b><i>Prosopis alba</i> (mg/g)</b>								
Fenólicos libres	1,07±0,03	0,42±0,03	0,91±0,08		0,60±0,04			
Fenólicos ligados			89,90±2,37		73,04±6,90		3,73±0,00	
<b><i>Prosopis nigra</i> (mg/g)</b>								
Fenólicos libres	0,34±0,01	0,24±0,00		0,27±0,00	0,80±0,00			
Fenólicos ligados						0,33±0,00	8,17±0,63	4,47±0,33

## 3.II.2. Actividades biológicas

### 3.II.2.1. Actividad antioxidante *in vitro*

Durante el metabolismo aeróbico, se producen como subproductos especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) y especies no radicalarias como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Aunque el peróxido de hidrógeno en sí no es muy reactivo, puede difundir a través de las membranas biológicas y generar el  $HO^{\cdot}$  altamente reactivo. El  $HO^{\cdot}$  podría actuar sobre lípidos, proteínas, ácido nucleicos y azúcares, y producir alteraciones que desencadenan un proceso de estrés oxidativo. Por lo tanto, la eliminación de peróxido de hidrógeno y  $HO^{\cdot}$  es de vital importancia para evitar enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Todos los extractos resultaron activos como depuradores de  $ABTS^{\cdot+}$ ;  $H_2O_2$ ,  $HO^{\cdot}$  con valores de  $CD_{50}$  entre 1,00 y 23,5  $\mu g$  EAG/mL, destacándose la actividad contra el  $HO^{\cdot}$  en AC, AL, NC y NL (Tabla 14). La capacidad de eliminación de aniones superóxido de todos los extractos fue menor que otras especies reactivas al oxígeno. Sin embargo, todos los extractos inhibieron la enzima xantina oxidasa a bajas concentraciones y, en consecuencia, inhibieron eficientemente la generación de anión superóxido (excepto en el caso de AC y AL, en los cuales se llegó a una  $CI_{30}$  y  $CI_{37}$ , respectivamente). Se observó una relación dosis-respuesta entre el porcentaje de actividad depuradora de radicales libres y el contenido de compuestos fenólicos. En el ensayo de protección contra lipoperoxidación los valores de  $CD_{50}$  estuvieron comprendidos entre 4,5-30,2  $\mu g$  EAG/mL (excepto en el caso de AC y AL, 178,3 y 86,8, respectivamente). Estos resultados indicarían que los polifenoles están actuando como antioxidantes primarios y secundarios o preventivos, en el primer caso transfieren electrones o hidrógenos para romper la cadena de oxidación y descomponen hidroperóxidos y/o depuran especies reactivas de oxígeno (Losada-Barreiro & Bravo-Díaz, 2017). La fuerte actividad

antioxidante demostrada para estos extractos se justifica por la presencia en los extractos polifenólicos de ambas harinas de algarrobo de C-glucósidos de flavonoides y de ácidos fenólicos de reconocida potencia antioxidante (Courts & Williamson, 2015; Chen et al., 2014; Liao & Lin, 2015; Xiao, Capanoglu, Jassbi, & Miron, 2016). Estos resultados indicarían que las harinas de algarrobo y sus extractos polifenólicos podrían utilizarse como ingredientes funcionales o nutraceuticos que ayuden a mejorar el estado oxidativo de una persona.

Tabla 14. Actividad antioxidante de extractos ricos en compuestos fenólicos libres y ligados de *Prosopis alba* y *P. nigra*.

	<i>P. alba</i>			<i>P. nigra</i>			Compuesto de referencia
	AC	AS	AL	NC	NS	NL	
<b>ABTS•+</b>	15,00±0,00 <sup>a</sup>	4,50±0,35 <sup>b</sup>	12,50±0,35 <sup>a</sup>	17,00±0,42 <sup>B</sup>	16,00±1,41 <sup>B</sup>	23,50±3,54 <sup>A</sup>	1,30±0,18 <sup>a</sup>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	10,00±0,00 <sup>b</sup>	22,14±0,21 <sup>a</sup>	3,90±0,28 <sup>c</sup>	12,80±2,26 <sup>B</sup>	17,15±0,35 <sup>A</sup>	8,25±0,35 <sup>C</sup>	13,90±0,00 <sup>d</sup>
<b>OH•</b>	6,00±0,00 <sup>b</sup>	20,00±0,30 <sup>a</sup>	1,00±0,00 <sup>c</sup>	6,00±0,00 <sup>C</sup>	16,00±0,40 <sup>A</sup>	9,00±0,40 <sup>B</sup>	30,00±2,81 <sup>f</sup>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	126,00±3,12 <sup>a</sup>	122±3,36 <sup>a</sup>	32,00±0,98 <sup>b</sup>	140,00±2,00 <sup>A</sup>	93,00±2,02 <sup>B</sup>	57,00±3,74 <sup>C</sup>	60,50±4,70 <sup>C</sup>
<b>XO</b>	CI <sub>30</sub> = 0,29±0,00	0,78±0,04 <sup>a</sup>	CI <sub>37</sub> = 2,52±0,00	4,25±0,06 <sup>B</sup>	1,40±0,04 <sup>A</sup>	4,80±0,07 <sup>B</sup>	2,00±0,07 <sup>A</sup>
<b>NO</b>	12,00±0,40 <sup>c</sup>	31,00±1,70 <sup>b</sup>	71,00±3,80 <sup>a</sup>	7,00±0,60 <sup>C</sup>	74,00±4,10 <sup>A</sup>	26,00±2,30 <sup>B</sup>	37,19±0,33 <sup>B</sup>
<b>β-Caroteno</b>	4,50±0,80 <sup>c</sup>	178,30±0,00 <sup>a</sup>	30,20±0,00 <sup>b</sup>	14,25±1,45 <sup>B</sup>	86,80±13,20 <sup>A</sup>	24,05±0,15 <sup>B</sup>	18,00±1,41 <sup>B</sup>

Se utilizó como compuesto de referencia el ácido ascórbico para la depuración de óxido nítrico y quercetina para el resto de las técnicas. Los valores se expresaron como CI<sub>50</sub> (µg EAG/mL) y CD<sub>50</sub> (µg EAG/mL). AC= Extracto polifenólico crudo de *P. alba*; AS= Extracto rico en polifenoles libres de *P. alba*; AL= Extracto de compuestos fenólicos ligados de *P. alba*; NC= Extracto polifenólico crudo de *P. nigra*; NS= Extracto rico en polifenoles libres de *P. nigra*; NL= Extracto de compuestos fenólicos ligados de *P. nigra*. Diferentes letras en la misma línea muestran diferencias significativas entre cada grupo tratado, letras minúsculas para *P. alba* y letras mayúsculas para *P. nigra* según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).



### 3.II.2.1.2. Efecto de los extractos polifenólicos sobre la actividad inhibidora de enzimas relacionadas con la inflamación

La inhibición de las actividades de enzimas proinflamatoria (LOX, COX-2 y sPLA2) representa el principal tratamiento para muchas enfermedades inflamatorias (D'Almeida et al., 2013).

La actividad sPLA2 se vió afectada por los extractos de polifenoles libres de *P. alba* (96% y 76% con 25 µg EAG /mL). Siendo la primera enzima de la vía del AA, la inhibición de su actividad por los polifenoles libres de *P. alba* reducirían la producción de AA que podría ser convertido en eicosanoide por COX y LOX. Los polifenoles ligados extraídos de *P. alba*, a la misma concentración, solo inhibe su actividad en un 25% la actividad de sPLA2. Un efecto inhibitorio menor se observó para los extractos polifenólicos libres y ligados de *P. nigra*.

Los compuestos fenólicos libres y ligados tanto de *P. alba* como de *P. nigra* fueron capaces de inhibir la actividad de LOX de una manera dependiente de la concentración, resultando el más activo el extracto rico en compuestos fenólicos libres de *P. alba* (CD<sub>50</sub> de 21,50±0,71 µg EAG/mL) (Tabla 15). Cuando se analizó la actividad de los compuestos presentes en los extractos por separado se evidenció una potencia semejante en el isochaftósido (CD<sub>50</sub> de 36,25 ± 1,77 µg EAG/mL) mientras que schaftósido y la isovitexina presentaron una potencia inferior (CD<sub>50</sub> de 65,00±7,07 y 62,50±2,12 µg EAG/mL, respectivamente). Vicenina y Vitexina no fueron activas hasta los 200 µg EAG/mL. En cuanto a los ácidos fenólicos el ácido protocatéquico presentó mayor potencia seguido del ferúlico, cumárico y cinámico (60,00±7,00; 84,00±9,10; 103,00±3,54 y 137,00±14,14 µg EAC/mL, respectivamente).

Los extractos polifenolicos de ambas especies fueron capaces de inhibir el 50% de la actividad COX-2 con baja concentración de compuestos fenólicos 0,5 a 2,0 µg EAG/mL mostrando una gran potencia inhibitoria semejante a la de

antiinflamatorios comerciales como nimesulida. Los extractos de *P. nigra* fueron mas activos que los de *P. alba*. Los extractos crudos y ricos en polifenoles libres y los extractos ricos en polifenoles ligados fueron más eficaces para inhibir a la enzima COX-2 que a las enzimas sPLA2 y LOX. Se ha informado en trabajos previos que la Vicenina II, y en menor medida Vitexina y Schaftósido inhiben la expresión de COX-2 (Courts & Williamson, 2015). Los estudios de relación estructura-actividad de C glicosil flavonoides indican que 1) la glicosilación en el anillo A mejora la actividad antiinflamatoria, 2) la metoxilación reduce la actividad 3) son mas activas que las flavonas O glicosiladas (Xiao et al., 2016). Si bien hay informes del efecto de C glicósidos aislados sobre COX-2 no había informes previos a este trabajo de Tesis Doctoral acerca del efecto de los flavonoides C glicósidos sobre la actividad de estos compuestos sobre otras enzimas proinflamatorias como por ejemplo LOX.

Tabla 15. Actividad inhibitoria de las enzimas proinflamatorias de extractos de compuestos fenólicos libres y ligados de *Prosopis alba* y *P. nigra*.

		Enzimas proinflamatorias		
Muestras		LOX	COX-2	sPLA <sub>2</sub>
		CI <sub>50</sub> (µg EAG/mL)	CI <sub>50</sub> (µg EAG/mL)	% inhibición (25 µg EAG/mL)
<i>P. alba</i>	AC	78,00±4,24 <sup>b</sup>	1,00±0,05 <sup>b</sup>	96,00±5,00 <sup>e</sup>
	AS	21,50±0,71 <sup>a</sup>	2,00±0,10 <sup>c</sup>	76,00±5,00 <sup>d</sup>
	AL	345,00±2,83 <sup>f</sup>	2,00±0,10 <sup>c</sup>	25,00±5,00 <sup>b</sup>
<i>P. nigra</i>	NC	199,00±5,66 <sup>c</sup>	0,50±0,05 <sup>a</sup>	0,00±0,00
	NS	309,00±4,24 <sup>e</sup>	1,00±0,05 <sup>b</sup>	55,00±5,00 <sup>c</sup>
	NL	267,50±1,78 <sup>d</sup>	1,00±0,05 <sup>b</sup>	12,00±5,00 <sup>a</sup>
Compuesto de referencia		Naproxeno	Nimesulida	Ácido acetilsalicílico
	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	14,00 ±0,50 <sup>a</sup>	0,39±0,02 <sup>a</sup>	65,00± 5,00 <sup>c</sup>

Los valores se expresaron como CI<sub>50</sub> (µg EAG/mL). AC= Extracto polifenólico crudo de *P. alba*; AS= Extracto rico en polifenoles de *P. alba*; AL= Extracto de compuestos fenólicos ligados de *P. alba*; NC= Extracto polifenólico crudo de *P. nigra*; NS= Extracto rico en polifenoles de *P. nigra*; NL= Extracto de compuestos fenólicos ligados de *P. nigra*. Diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas entre cada grupo tratado, según la prueba de Tukey (P ≤ 0,05).

### 3.II.2.1.3. Efecto de los extractos sobre enzimas implicadas en el desarrollo del síndrome metabólico

Se analizó el efecto de los compuestos fenólicos libres y ligados sobre enzimas asociadas con el síndrome metabólico, tales como  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -amilasa y lipasa pancreática.

#### 3.II.2.1.3.1. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa y $\alpha$ -amilasa

La diabetes mellitus tipo 2 ha sido reconocida como un serio problema de salud a nivel mundial, que a menudo resulta en una morbilidad y mortalidad sustancial. La  $\alpha$ -glucosidasa es una enzima intracelular que rompe carbohidratos complejos, ayuda a la absorción de los carbohidratos, incrementa la glucemia posprandial y los picos de insulina. Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa se usan habitualmente en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Actúan por una inhibición reversible de la  $\alpha$ -glucosidasa, una enzima presente en el borde del cepillo del intestino delgado. La inhibición de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales podría retrasar la digestión y absorción de carbohidratos y, por consiguiente, disminuir la hiperglucemia postprandial.

Los extractos ricos en compuestos fenólicos libres fueron los más activos en ambas especies. Los extractos de polifenoles libres (vicenina II, schaftósido, vitexina e isovitexina) y ligados (vitexina, isovitexina y ácido cumárico) de *P. alba* resultaron fuertes inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa ( $CI_{50}$  1,53-5,30  $\mu$ g EAG/mL), aún más activos que la acarbosa, un potente inhibidor comercial de esta enzima; mientras que los polifenoles ligados (ácido protocatéquico, cumárico y ferúlico) de *P. nigra* resultaron los más activos sobre  $\alpha$ -amilasa ( $CI_{50}$  de 70  $\mu$ g EAG/mL). Para tratar de analizar cual o cuales de los metabolitos

presentes en los extractos son los responsables del efecto inhibitorio observado sobre la amilasa se ensayó cada uno por separado.

Los ácidos fenólicos aislados resultaron activos contra la  $\alpha$ -amilasa, mientras que los C-glicósidos no mostraron inhibición hasta concentraciones superiores a los 50  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 16).

Tabla 16. Actividad inhibitoria de las enzimas proinflamatorias ( $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa y lipasa pancreática) de extractos de compuestos fenólicos libres y ligados de harina fina de mesocarpio de *Prosopis alba* y *P. nigra*.

Enzimas relacionadas con el síndrome metabólico				
Muestras		$\alpha$ -amilasa	$\alpha$ -glucosidasa	Lipasa
CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}$ EAG/mL)				
<i>P. alba</i>	AC	CI <sub>33</sub> =112,00±5,50 <sup>b</sup>	4,60±0,30 <sup>b</sup>	0,30±0,00 <sup>a</sup>
	AS	40,00±2,00 <sup>b</sup>	1,53±0,39 <sup>a</sup>	0,50±0,20 <sup>a</sup>
	AL	CI <sub>32</sub> =385,00±9,60	5,30±2,30 <sup>b</sup>	1,80±1,10 <sup>a</sup>
<i>P. nigra</i>	NC	CI <sub>35</sub> =97,00±0,70	4,50±1,00 <sup>b</sup>	37,00±1,40 <sup>c</sup>
	NS	30,00±1,10 <sup>b</sup>	22,50±2,50 <sup>d</sup>	82,50±0,60 <sup>d</sup>
	NL	70,00±1,30 <sup>a</sup>	29,00±5,60 <sup>d</sup>	33,50±4,90 <sup>c</sup>
Ácidos fenolicos	Cinámico	72,50±0,80 <sup>a</sup>	7,75±0,35 <sup>c</sup>	15,00±0,00 <sup>b</sup>
	Cumárico	61,00±0,58 <sup>a</sup>	3,15±0,50 <sup>b</sup>	25,00±3,99 <sup>b</sup>
	Ferúlico	66,00±0,71 <sup>a</sup>	3,50±0,00 <sup>b</sup>	13,00±1,41 <sup>b</sup>
	Protocatéquico	76,00±0,63 <sup>a</sup>	5,50±0,00 <sup>b</sup>	8,70±0,57 <sup>b</sup>
C-glicósidos de Apigenina	Schaftósido	No inhibe	3,80±0,00 <sup>b</sup>	13,50±0,00 <sup>b</sup>
	Isoschaftósido	No inhibe	0,52±0,00 <sup>a</sup>	10,50±0,00 <sup>b</sup>
	Vicenina II	No inhibe	10,00±0,00 <sup>b</sup>	8,50±0,00 <sup>b</sup>
	Vitexina	No inhibe	No inhibe	8,40±0,30 <sup>b</sup>
	Isovitexina	No inhibe	0,25±0,02 <sup>a</sup>	8,40±0,00 <sup>b</sup>
Compuesto de referencia		Acarbosa	Acarbosa	Orlistat
		1,25±0,11	29,00±5,60	6,00±0,02

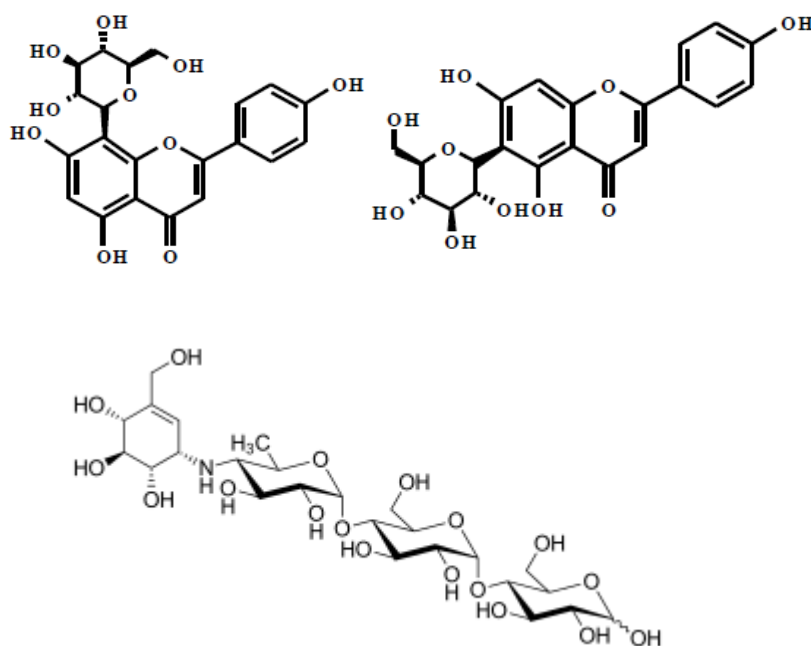
Los valores se expresaron como CI<sub>50</sub> ( $\mu\text{g}$  EAG/mL). AC= Extracto polifenólico crudo de *P. alba*; AS= Extracto rico en polifenoles de *P. alba*; AL= Extracto de compuestos fenólicos ligados de *P. alba*; NC= Extracto polifenólico crudo de *P. nigra*; NS= Extracto rico en polifenoles de *P. nigra*; NL= Extracto de compuestos fenólicos ligados de *P. nigra*. Diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas entre cada grupo tratado, según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

En el caso del efecto sobre la  $\alpha$ -glucosidasa los ácidos fenólicos inhibieron en un rango de CI<sub>50</sub> de 3,15-7,75  $\mu\text{g/mL}$  y los derivados de apigenina tuvieron una

potencia inhibitoria mas marcada (0,25-10,00  $\mu\text{g/mL}$ ), a excepción de la vitexina que no manifesto ningún efecto sobre  $\alpha$ -glucosidasa.

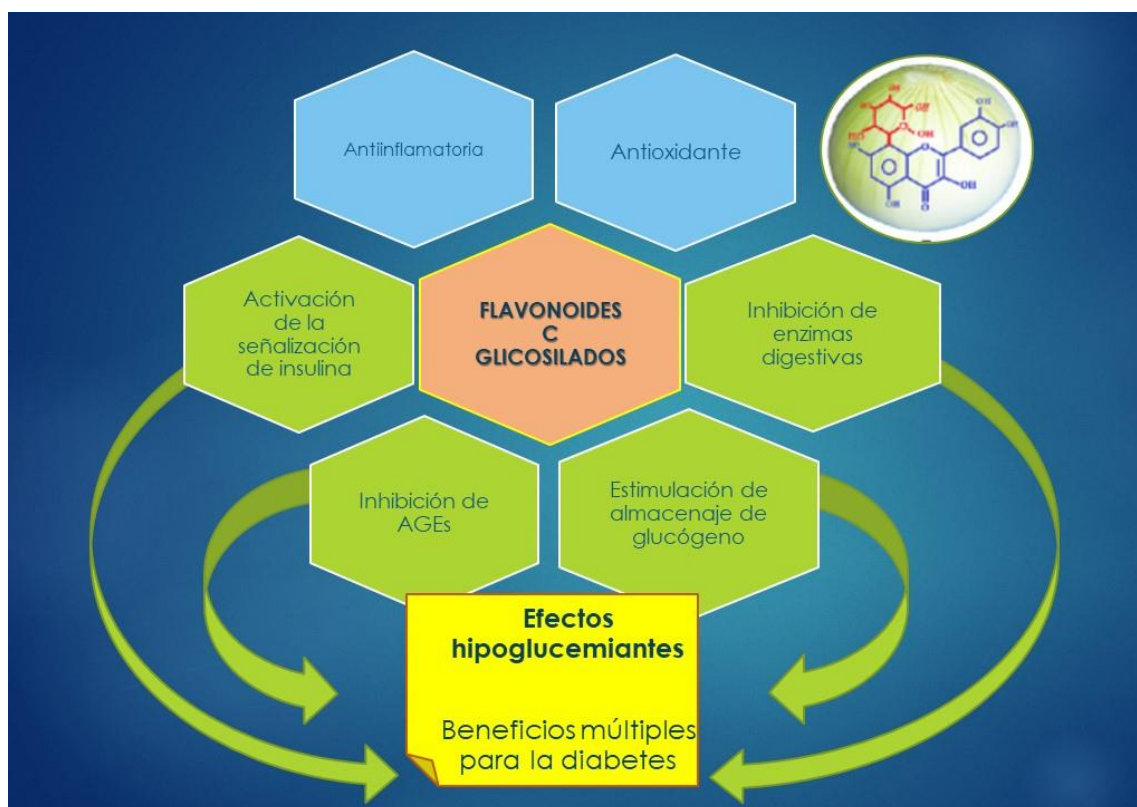
Los resultados sugieren que los extractos podrían ser capaces de reducir la absorción de glucosa.

Dos de los C-glicosidos presentes en los algarrobos, vitexina e isovitexina aisladas de hojas de *Ficus deltoidea* mostraron inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa en modelos *in vivo* (Choo, Sulong, Man, & Wong, 2012). La dosis requerida para reducir la glucemia postprandial fue de 1 mg/Kg de peso de vitexina e isovitexina (una dosis tres veces menor que de acarbosa) (Figura 27) en ratones normoglicémicos con una carga de sacarosa, mientras que en ratones diabéticos con sobrecarga de sacarosa se necesitan 50 mg/Kg de vitexina y 20 mg/Kg de isovitexina (Choo et al., 2012) . Debido a la presencia de grupos hidroxilos en posición 3' del anillo B, esas C glicosil flavonas tienen mayor potencia inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa que la acarbosa (Xiao et al., 2016).



**Figura 27.** Estructura química de flavonoides C glicósidos derivados de apigenina (Vitexina e Isovitexina) y de acarbosa.

Se demostró que las actividades, evaluadas por medio de los valores de  $CI_{50}$ , varía como sigue: luteolina > isoorientina > apigenina > isovitexina y orientina > vitexina (Xiao et al., 2016). La glicosidación en C-6 y C-8 disminuye la actividad sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa (Xiao et al., 2016). También se demostró que estos C glicósidos son capaces de ejercer su efecto antidiabético por inhibición de productos finales de glicación avanzada (AGEs), aldosa reductasa, y fosfatasa tirosin hidroxilasa, estimulación de la acumulación de glucógeno y activación de la señalización de la insulina. En este sentido, la harina podría ser un complemento dietético para controlar la hiperglucemia en pacientes diabéticos. Sin embargo, es necesaria una evaluación adicional de la actividad hipoglucémica *in vivo* para verificar posibles efectos beneficiosos (Figura 28).



**Figura 28.** Mecanismo antidiabético múltiple de las C-glicosil flavonas.

### 3.II.2.1.3.2. Lipasa pancreática

La lipasa pancreática es una enzima que tiene un papel importante en el síndrome metabólico, hidroliza los lípidos y libera ácidos grasos de tal manera que pueden ser absorbidos en el tracto digestivo humano. La inhibición de la lipasa pancreática con inhibidores orales (Orlistat) es el principal tratamiento prescrito para el control del peso y la obesidad (Birari & Bhutani, 2007). Aunque tiene un buen efecto en el tratamiento de la obesidad, el uso a largo plazo puede causar algunos efectos secundarios como heces aceitosas, con manchas de grasa y sanguinolentas y otros trastornos gástricos. En la actualidad, el potencial de los productos naturales para el tratamiento de la obesidad se ha convertido en un tema de investigación muy importante. Se ha informado que polifenoles o algunos flavonoides son inhibidores de la lipasa pancreática (Shi et al., 2014). Con el propósito final de encontrar fuentes naturales alternativas para la prevención de la obesidad, evaluamos el efecto de los extractos ricos en fenólicos libres y ligados sobre la actividad de la lipasa. Los fenólicos libres y ligados de harina de vainas de *P. alba* resultaron más potente que los de *P. nigra* (0,3-1,8 y 37,0-33,5 µg EAG/mL, respectivamente). La potencia de los fenólicos de *P. alba* resultó superior a los reportado para *Geoffroea decorticans* (4,0 µg EAG/mL) (Costamagna et al., 2016) y similares al compuesto de referencia empleado (Orlistat). La actividad inhibidora de los extractos sobre la lipasa también resultó superior a la reportada para polifenoles de té verde y té blanco (Gondoin, Grussu, Stewart, & McDougall, 2010). Para analizar cual o cuales de los compuestos presentes en los extractos son los responsables del efecto observado se analizó la acción de cada uno de ellos sobre la actividad de la lipasa. Todos los ácidos fenólicos aislados de *P. nigra* resultaron activos inhibidores de lipasa con valores de  $CI_{50}$  de 8,7-25,0 µg/mL al igual que los C-glicósidos que presentaron valores de  $CI_{50}$  de 8,4-13,5 (Tabla 16). Para el único



compuesto que ya existían informes previos de actividad hipolipemiante era para el ácido ferúlico. Se demostró que este ácido podría ser efectivo para disminuir el riesgo de obesidad inducida por la dieta alta en grasas, ya que reduce los niveles de colesterol sérico y protege contra la lesión hepática (Williams et al., 2013; González-Castejón & Rodríguez-Casado, 2011).

### 3.II.3. Evaluación de la toxicidad de los extractos de semolina

Hoy en día, la tendencia en las pruebas de toxicidad es reducir el número y el sufrimiento de los animales que se sacrifican. Por ello, los micrométodos han aumentado su popularidad como pruebas de detección preliminares para grandes cantidades de muestras, lo que permite reducir el tiempo requerido y la cantidad de animales necesarios.

Para el presente estudio, evaluamos la toxicidad de los extractos obtenidos de algarrobos en tres niveles celulares: utilizando un organismo procariota para evaluar la actividad mutagénica (*Salmonella typhimurium*), una eucariota célula (líneas celulares humanas) y un organismo complejo (*Artemia salina*).

#### 3.II.3.1. Toxicidad aguda

Para analizar la toxicidad aguda de los polifenoles de algarrobo se utilizó un invertebrado marino, *Artemia salina*, como organismo modelo teniendo en cuenta que este ensayo es recomendable tanto para estudios de toxicología como de ecotoxicología. La prueba de toxicidad utilizando *Artemia salina* se ha utilizado durante décadas como un método de detección rápida a escala de laboratorio. Esta técnica ha demostrado ser altamente ventajosa debido a sus bajos costos, su buena correlación con otros métodos de prueba en animales y la posibilidad de evaluar un gran número de muestras al mismo tiempo y en un

corto período de tiempo (Rajeh et al., 2012). Rajeh et al. (2012) realizaron un estudio comparativo para determinar el nivel de correlación entre la prueba de *A. salina* y la prueba de toxicidad convencional realizada con ratones. Este estudio les permitió establecer una correlación numérica entre los dos ensayos. Según sus resultados, una  $CL_{50} > 25 \mu\text{g}/\text{ml}$  para la prueba de *A. salina* se correlaciona con una  $CL_{50}$  *in vivo* entre 2500 y 8000 mg/ kg, que está por encima de los valores establecidos como tóxicos según la OCDE (OCDE, 2001). Los valores de  $CL_{50}$  obtenido para todos los extractos polifenólicos de algarrobo indican la ausencia de toxicidad en el ensayo de toxicidad aguda *in vivo* frente a *Artemia salina* (% de letalidad menor al 10%) (Borroto et al., 2011).

### 3.II.3.2. Mutagenicidad

Las sustancias se definen como carcinógenas si después de la inhalación, la ingestión, la aplicación dérmica o la inyección inducen tumores (malignos), aumentan su incidencia o malignidad, o acortan el tiempo de incidencia de tumores. Generalmente se acepta que la carcinogénesis es un proceso de múltiples etiologías y de múltiples pasos en la transición de células normales a células cancerosas. Esa secuencia de etapas está fuertemente influenciada por factores tales como genética, edad, dieta, medio ambiente, etc. Dado que la inducción del cáncer implica alteraciones genéticas que pueden ser inducidas directamente o indirectamente, los carcinógenos se han clasificado convencionalmente en dos categorías según su modo de acción: carcinógenos genotóxicos y carcinógenos no genotóxicos. Los primeros tienen la capacidad de interactuar con ADN y/o el aparato celular y por lo tanto afecta la integridad del genoma, mientras que los carcinógenos no genotóxicos ejercen sus efectos carcinógenos a través de otros mecanismos que no implican alteraciones directas en el ADN. El test de Ames (test de mutación reversa en *Salmonella typhimurium*) tiene un efecto altamente predictivo de carcinogenicidad

(alrededor del 80%) a través de mecanismos como mutaciones puntuales, sustituciones en pares de bases o mutaciones frameshift (Bentham et al., 2010). Por ello analizamos la potencial mutagenicidad de los polifenoles del algarrobo por este test con y sin activación metabólica. Los extractos polifenólicos libres y ligados de ambas especies de algarrobos no se comportaron como mutágenos sobre cepas TA98 ni sobre TA100 hasta una concentración de 500 µg/placa presentando en todos los casos una RM < 2 (Tabla 17). Estos resultados son coincidentes con lo informado para decocciones y extractos etanólicos de vaina de *P. alba* y *P. nigra* (Cardozo et al., 2010). Los resultados obtenidos indicarían la ausencia de mutagenicidad de los compuestos fenólicos obtenidos de harinas de algarrobo en el rango de concentraciones en el que presentan actividades biológicas.

Tabla 17. Actividad mutagénica de extractos de compuestos fenólicos libres y ligados de harina fina de mesocarpo de *Prosopis alba* y *P. nigra* sobre cepas de *Salmonella*.

Número de revertantes						
	Muestra	µg /placa	TA 98 (-) S9	TA 98 (+) S9	TA 100 (-) S9	TA 100 (+) S9
<i>P. alba</i>	AC	125	20±0		92±0	
		250	22±5		105±21	
		500	27±5	40±9	101±1	176±16
	AS	125	31±4		102±7	
		250	26±7		93±6	
		500	31±3	68±14	94±4	175±6
	AL	125	24±77		131±11	
		250	16±7		91±2	
		500	15±6	27±16	109±8	213±40
<i>P. nigra</i>	NC	125	21 ± 2		102 ± 0	
		250	24 ± 6		104 ± 10	
		500	29 ± 7	66±10	116 ± 8	223±3
	NS	125	28±5		89±6	
		250	33±7		127±5	
		500	31±8	58±8	126±2	233±13
	NL	125	25 ± 6		82 ± 11	
		250	28 ± 1		130 ± 7	
		500	27 ± 6	52±5	104 ± 5	205±50
	Control Positivo		1078 ± 89		963 ± 62	
	Control Negativo		23 ± 2	36±19	119 ± 8	200±6

AC= Extracto polifenólico crudo de *P. alba*; AS= Extracto rico en polifenoles de *P. alba*; AL= Extracto de compuestos fenólicos ligados de *P. alba*; NC= Extracto polifenólico crudo de *P. nigra*; NS= Extracto rico en polifenoles de *P. nigra*; NL= Extracto de compuestos fenólicos ligados de *P. nigra*.

### 3.II.3.3. Citotoxicidad

Al igual que en los ensayos con animales de experimentación, los ensayos de toxicidad aguda en cultivos de células son óptimos en el sentido de que implican el uso de concentraciones y tiempos de exposición directamente

transferibles a la condición humana en contraste con los ensayos de mutagenicidad y carcinogenicidad a corto plazo por ello se los utiliza como una alternativa al uso de animales de laboratorio en investigaciones de toxicidad (Ekwall, 1983; Ekwall, Silano, Paganuzzi-Stammati, & Zucco, 1990). Por ello se realizaron ensayos de citotoxicidad sobre cultivo de células de estómago humano. Las  $CI_{50}$  de los extractos crudos de polifenoles libres de ambas especies y el de compuestos fenólicos ligados de *P. alba* fueron  $> 500 \mu\text{g/mL}$  indicando ausencia de citotoxicidad frente a células del epitelio gástrico humano. Los valores de  $CI_{50}$  fueron semejantes a los valores encontrados previamente para arropo de algarrobo peruano ( $1000 \mu\text{g/mL}$ ) con esas mismas líneas celulares (Quispe et al., 2014).

Cuando los extractos de *Prosopis alba* se enriquecen en polifenoles libres los valores de  $CI_{50}$  disminuyen a  $144,0 \pm 8,2 \mu\text{g/mL}$  y en el caso de extractos de *Prosopis nigra* rico en polifenoles libres los valores de  $CI_{50}$  descienden a  $168,1 \pm 11,0 \mu\text{g/mL}$  y para el rico en polifenoles ligados  $432,2 \pm 25,9 \mu\text{g/mL}$ . Los resultados obtenidos indicarían la ausencia de citotoxicidad de los compuestos fenólicos obtenidos de harinas de algarrobo en el rango de concentraciones en el que presentan actividades biológicas antioxidante, antiinflamatoria e inhibidora de enzimas del Síndrome metabólico.

### 3.II.4. Conclusiones parciales

- La harina semolina de *P. alba* y *P. nigra* es un alimento rico en carbohidratos, fibras y compuestos fenólicos.
- El perfil de polifenoles libres muestra el predominio de flavonoides C- y O-glicosilados y una mayor diversidad química en *Prosopis nigra* que en *Prosopis alba*. Se demostró la presencia de flavonoides C-glicósidos los que podrían utilizarse como marcadores químicos de *Prosopis nigra* (Isoschaftósido y antocianinas) y de *Prosopis alba* (Vitexina).
- El perfil de polifenoles ligados muestra el predominio de ácidos fenólicos.
- Todos los extractos polifenólicos mostraron buena potencia antioxidante ejerciendo su efecto a través de diferentes mecanismos comportándose tanto como antioxidantes primarios como secundarios.
- Los extractos de *P. alba* mostraron mayor potencia antiinflamatoria para todas las enzimas proinflamatorias indicando que pueden actuar a diferentes niveles de la cascada de proceso inflamatorio.
- Todos los concentrados polifenólicos resultaron activos frente a enzimas relacionadas al síndrome metabólico, siendo más potentes frente a lipasa y  $\alpha$ -glucosidasa los provenientes de harina de *P. alba*. Los de *P. nigra* resultaron más activos frente a la  $\alpha$ -amilasa.
- Ninguno de los extractos resultó tóxico, ni citotóxico ni genotóxico en el rango de concentraciones en las que presentan actividad biológica.

## Capítulo 4 : CONCLUSIONES GENERALES



La harina de algarrobo es rica en carbohidratos, minerales (principalmente potasio) y fibra cruda. Su contenido lipídico y proteico es bajo.

Las harinas obtenidas de vainas maduras de *P. alba* y las de *P. nigra* mostraron una composición fitoquímica diferente entre especies y similares entre las muestras de la misma especie. Se identificaron C-glicósidos de apigenina y ácidos fenilpropanoides. Se demostró que el color oscuro de las vainas de *P. nigra* está directamente relacionado con el contenido de antocianina, pigmento fenólico hidrosoluble con potencialidades de uso en la industria alimenticia.

Los polifenoles libres y ligados a estructuras celulares, componentes mayoritarios en estas harinas, resultaron funcionalmente interesantes debido a que se comportaron como antioxidantes primarios y secundarios, inhibidores de enzimas proinflamatorias principalmente COX-2, inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -amilasa y lipasa, en consecuencia, podrían controlar la hiperglucemia postprandial, el metabolismo de las grasas y procesos oxidativos e inflamatorios.

La harina fina de mesocarpo de *P. alba* y *P. nigra* podría ser utilizada como ingrediente funcional y los concentrados de polifenoles obtenidos a partir de las mismas, como potenciales nutraceuticos.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral agregan valor a esta especie -una especie que es subutilizada debido, principalmente, al desconocimiento de sus propiedades químicas, físicas y funcionales- y podrían impulsar su propagación, conservación y manejo sustentable en regiones semiáridas y áridas, así como fomentar la alimentación saludable e integral.



## Principales aportes de este Trabajo de Tesis



## **Alimentos tradicionales**

La FAO, en colaboración con los países miembros y la comunidad internacional en su conjunto para el logro de los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM), declaró al año 2010 como el Año Internacional de la biodiversidad. Con esta acción, se reconoció que la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad para la alimentación y la agricultura juegan un papel fundamental en la lucha contra el hambre, asegurando al medio ambiente la sostenibilidad y el aumento de la producción de alimentos (UNEP, 2005). Un elemento clave y estratégico para la nación es la utilización sustentable y el incremento de la utilización de alimentos tradicionales subvalorados y de gran potencial económico. Para promover el uso de plantas nativas es imprescindible conocer su composición química, especialmente en términos de nutrientes y de otras sustancias o bioactivos que promueven la salud para darles mayor valor agregado.

La producción de frutos nativos, el aprovechamiento de la biodiversidad en países como Brasil, Colombia y Ecuador se ha convertido en un tema estratégico de estado en la búsqueda de bioactivos. Los frutos de especies nativas de la Argentina como *P. alba* y *P. nigra*, como se explicó en los diferentes capítulos de este trabajo de Tesis fueron ancestralmente consumidos por los pobladores locales hasta que como consecuencia de diversos fenómenos

sociales su consumo disminuyó a tal punto que las generaciones actuales los desconocen completamente y en consecuencia su cultivo e industrialización en Argentina es escaso. Las especies de *Prosopis* nativas de Argentina son especies forestales con características adaptativas a condiciones ambientales adversas tales como sequía, salinidad y temperaturas extremas y con posibilidades de adecuarse a cambios climáticos futuros, características de suma importancia en el contexto del cambio climático global actual. De allí la necesidad de realizar una revalorización de este recurso natural para su conservación, propagación y aprovechamiento en el territorio nacional ya que se trata de una especie con amplias potencialidades.

*Principales aportes de este trabajo de investigación a las bases de datos de Composición de Alimentos nacionales y latinoamericanas y a las Políticas Alimentarias nacionales*

En general los frutos de algarrobo se destacaron por un gran aporte energético debido a su alto contenido de carbohidratos y un bajo aporte de lípidos. De acuerdo con el Reglamento (CE) N° 1924-2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea pueden considerarse como alimentos de **bajo contenido en grasas**. Las harinas obtenidas de mesocarpo de vainas de algarrobo resultaron excelentes **fuentes de fibra insoluble** (5 a 11 %). De acuerdo con lo establecido por el Reglamento (CE) N° 1924-2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, puede considerarse a *P. alba* y a *P. nigra* como un alimento con “alto contenido de fibra” ( $\geq 6$  % fibra).

En general, los frutos secos tienen entre un 13 a 27 % de **proteínas** con un relativo valor biológico (propiedades funcionales) que, adecuadamente combinadas con cereales y legumbres, dan lugar a proteínas completas equivalentes a las de origen animal. Así las nueces, piñones y avellanas tienen alrededor de un 14% y las almendras un 20%. Sin embargo, las harinas de mesocarpo de algarrobo presentaron aportes proteicos (3,39 a 7,50 %) inferiores a los descritos para otros frutos secos. En trabajos previos Cattaneo et al., 2014 demostró que las harinas de semillas de estas especies presentan un elevado contenido de proteínas libres de gluten. Esto indicaría la importancia de obtener la harina del fruto de algarrobo entero. Cabe destacar que actualmente en el proceso de fabricación de harinas de algarrobo se descartan las semillas.

Estos frutos aportan además polifenoles (0,18 y 0,45 g/100 g de harina de algarrobo blanco y negro, respectivamente). Dentro de este grupo de compuestos

merece destacarse la ausencia de los taninos. Vasco, Ruales, & Kamal-Eldin (2008) clasificaron a los frutos de Ecuador en tres grupos de acuerdo con el contenido de compuestos fenólicos solubles: mayor de 450 mg/100g de fruto (alto contenido), entre 100 y 450 mg/100g (intermedio) y menor de 100 mg/100g de fruto (bajo contenido). De acuerdo con esta clasificación los frutos de algarrobo pueden considerarse frutos con contenido intermedio de **compuestos fenólicos**, superior al que presenta la harina de trigo (Hung, Maeda, Miyatake, & Morita, 2009) y otros frutos secos como *Prunus*, *Phoenix*, *Picus*, *Arachis*, *Juglans*, entre otros (Alu'datt et al., 2017; Mohamed, Cesarettin, Anne, Mark, & Fereidoon, 2005; Nair, Nagar, & Gupta, 1998; Rufino et al., 2010; Vijaya Kumar Reddy, Sreeramulu, & Raghunath, 2010). Dado que se considera que en una dieta saludable el aporte de polifenoles diario debe ser de alrededor de 1g (Scalbert & Williamson, 2000), es razonable la ingesta de 100 o 200 g diarios de harina de algarrobo lo que ayudaría a obtener un alto porcentaje de estos requerimientos. Los concentrados de polifenoles obtenidos de estos frutos tienen potencial antioxidante, antiinflamatorio e inhibidores de enzimas que participan del síndrome metabólico por lo que podríamos aconsejar, no solo la obtención de alimentos funcionales que incorporen la harina de algarrobo, sino el uso de concentrados de polifenoles como nutracéuticos o ingredientes funcionales.

Este concentrado de polifenoles libres muestra el predominio de flavonoides **C- y O-glicosilados** y una mayor diversidad química en *Prosopis*

*nigra* que en *Prosopis alba*. Se demostró la presencia de polifenoles del tipo flavonoides C-glicósidos (Isoschaftósido) y pigmentos fenólicos como las **antocianinas** los que podrían utilizarse como marcadores químicos de *Prosopis nigra*. Se demostró que el color negro violáceo de *P. nigra* se debe a la presencia de un elevado contenido de antocianinas, pigmento hidrosoluble con amplias potencialidades de uso en la industria alimenticia. Se proponen en este Trabajo de Tesis una metodología de extracción de este pigmento para mantener su estabilidad y potencia antioxidante al menos durante tres meses y su potencial uso como pigmento y conservante natural de alimentos.

En base a lo expuesto previamente, la inclusión de algarrobo en las bases de datos nacionales y latinoamericanas representaría un aporte importante para el uso de estos frutos nativos en la alimentación.

## REFERENCIAS

- Abdel-Aal, E. M., Young, J. C., & Rabalsky, I. (2006). Anthocyanin Composition in black , blue , pink , purple , and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4696–4704. <https://doi.org/10.1021/jf0606609>
- Abdul-Ghani, M. A., Tripathy, D., & DeFronzo, R. A. (2006). Contributions of cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired Glucose Tolerance and Impaired Fasting Glucose. *Diabetes Care*, 29(5), 1130–1139. <https://doi.org/10.2337/dc05-2179>
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6182–6187. <https://doi.org/10.1021/jf0205099>
- Ahn, J., Lee, H., Kim, S., Park, J., & Ha, T. (2008). The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(4), 545–549. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.077>
- Alamgir, M. A., Javid, R. A., Hameed, A., & Mustafa, I. (2015). Gender difference in components of metabolic syndrome among patients of Type 2 diabetes. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 31(4), 886–890. <https://doi.org/10.12669/pjms.314.6714>
- Alu'datt, M., Rababah, T., Alhamad, M., Al-Mahasneh, M., Almajwal, A., Gammoha, S., Ereifei, K., Johargy, A., & Alli, I. (2017). A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chemistry*, 218, 99–106.
- Alzamora Román, H. E. (1988). *Determinación del N.P.K. (N,P2O5,K2O) en el puño del algarrobo, atendiendo a su uso como abono orgánico*. Universidad de Piura.



- Andersen, O. M., & Markham, K. R. (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. (O. M. Andersen & K. R. Markham, Eds.). New York: CRC Press.
- Anderson, J. W., & Bryant, C. A. (1986). Dietary fiber: diabets and obesity. *American Journal of Gastroenterology*, *81*(6), 898–906. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3020968>
- Andrade, J., & Fasolo, D. (2014). Polyphenol antioxidants from natural sources and contribution to health promotion. *Human Health and Disease*, *1*(20), 253–265. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00020-7>
- Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G., & Garcia-Conesa, M. T. (2001). Intestinal release and uptake of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, *31*(3), 304–314. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00585-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00585-8)
- AOCS. (1989). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- AOAC. (1998). *Official Method of Analysis* (15th Edition). Washington DC.: Association of Official Analytical Chemists. Retrieved from [http://www.scirp.org/\(S\(oyulxb452alnt1aej1nfow45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1353187](http://www.scirp.org/(S(oyulxb452alnt1aej1nfow45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1353187)
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. Washington DC. Retrieved from <http://webpages.icav.up.pt/PTDC/CVT-NUT/4294/2012/AOAC 2000.pdf>
- Atkinson, M. A. (2005). Thirty years of investigating the autoimmune basis for type 1 diabetes: Why can't we prevent or reverse this disease? *Diabetes*, *54*(5), 1253–1263. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.5.1253>
- Ávalos, A., & García, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, *2*(3), 119–145. Retrieved from <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>
- Barberis, A., Garbetta, A., Cardinali, A., Bazzu, G., D Antuono, I., Rocchitta, G., Fadda, A., Linsalata, V., D Hallewin, G., & Serra Pier, A., Minervini, F. (2017). Real-time monitoring of glucose and phenols intestinal absorption through an integrated Caco-2TC7cells/biosensors telemetric device: Hypoglycemic effect of fruit phytochemicals. *Biosensors and*

*Bioelectronics*, 88, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.007>

- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120(1), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.016>
- Bean, L. J., & Saubel, K. S. (1972). *Temalpakh: Cahuilla Indian Knowledge and Usage of Plants*. Malki Museum Press.
- Bech-larsen, T., & Scholderer, J. (2007). Functional foods in Europe : consumer experiences and regulatory aspects, *Trends in Food Science & Technology* 18, 231–234. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.12.006>
- Bello Rodríguez, B., Sánchez Cruz, G., Campos Ferreira Pinto, A., Esther, B. P., Fernández Morín, J., & Achiong Estupiñan, F. (2012). Síndrome Metabólico : un problema de salud con múltiples definiciones Metabolic syndrome : a health problem with many definitions. *Revista Médica Electrónica*, 34(2), 199–213. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2013.11.008>
- Bentham, J. van, Felter, S., Heinonen, T., Poth, A., Serafimova, R., Van Delft, J., Benfenati, E., Phrakonkham, P., Worth, A., & Corvi, R. (2010). Chapter 5 Reproductive toxicity compiled by workgroup 5. In *Draft report on alternative ( non-animal ) methods for cosmetics testing: current status and future prospects* (pp. 1–45).
- Bernal, J., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, 55, 754–774. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.033>.
- Bernardi, C. (2000). *Nutritional facts in vinal (Prosopis ruscifolia) pulp including its iron availability*. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., & Fito, P. (2011). Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 22(9), 498–508. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.05.004>
- Bhaswant, M., Shafie, S. R., Mathai, M. L., Mouatt, P., & Brown, L. (2016). Anthocyanins in chokeberry and purple maize attenuate diet-induced metabolic syndrome in rats. *Nutrition*, 41, 24–31.

<https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.12.009>

- Biloni, J. (1990). *Árboles Autóctonos Argentinos*. Buenos Aires: Tipográfica Editora Argentina.
- Birari, R. B., & Bhutani, K. K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*, 12(19–20), 879–889. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.024>
- Boik, J. (1996). Dietary non-nutrient factors and their effects on cancer. In *Cancer and Natural Medicine: A Textbook of Basic Science and Clinical Research*. Princeton: Oregon Medical Press.
- Borroto, J., Trujillo, R., de la Torre, Y. C., Waksman, N., Hernández, M., & Salazar, R. (2011). Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1), 34–42. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v16n1/pla04111.pdf>
- Bravo, L., Siddhuraju, P., & Saura-Calixto, F. (1998). Effect of various processing methods on the in vitro starch digestibility and resistant starch content of indian pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(11), 4667–4674. <https://doi.org/10.1021/jf980251f>
- Briner, C. (1985). Phenotypic characterization of the tamarugo biotypes at the Tamarugal Pampa. In M. Habit (Ed.), *The Current State of Knowledge on Prosopis tamarugo*. Rome, Italy.: FAO.
- Burkart, A. (1952). *Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas*. Buenos Aires, Argentina.: Acme.
- Burkart, A. (1976). A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). *Journal of Arnold Arboretum*, 57(3), 219–249.
- Burkart, A. (1978). (1978). Leguminosas. Buenos Aires: In: Parodi, L. R. (Ed.) *Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería* 1. Editorial Acme.
- Burkart, A., & Simpson, B. B. (1977). *The genus Prosopis and annotated key to the species of the world*. In: Simpson BB (ed) *Mesquite. Its biology in two desert scrub ecosystems*. US/IBP Synthesis Series 4. Hutchinson & Ross, Dowden, 201–216.

- Cabrera, A. L. A. L. C., Arenas, P., Jorge, V., Lopez Hugo, S., & Bertullo, V. H. V. H. (1976). *Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. Fascículo 1, Regiones fitogeográficas argentinas.*
- Cabrera, A. L. A. L. C., Arenas, P., Jorge, V., Lopez Hugo, S., & Bertullo, V. H. (1994). Fascículo 1, Regiones fitogeográficas argentinas. In *Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería.*
- Capparelli, A. (2007). El algarrobo blanco y negro -*Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz y *P. flexuosa* DS, Fabaceae- en la vida cotidiana de los habitantes del NOA: subproductos alimenticios. *Kurtziana*, 33, 103–119.
- Capparelli, A., & Lema, V. (2011). Recognition of post-harvest processing of algarrobo (*Prosopis* spp.) as food from two sites of Northwestern Argentina: an ethnobotanical and experimental approach for desiccated macroremains. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 71–92.
- Cárdenas-Rodríguez, N., & Pedraza-Chaverri, J. (2005). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*, 12(2), 164–173.
- Cardini, B., Cardini, C. E., Leloir, L. F., & Chiriboga, J. (1955). Biosynthesis of sucrose. *Journal of Biological Chemistry*, 214, 149–155. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/214/1/157.full.pdf>
- Cardozo, M. L., Ordoñez, R. M., Zampini, I. C., Cuello, A. S., Dibenedetto, G., & Isla, M. I. (2010). Evaluation of antioxidant capacity, genotoxicity and polyphenol content of non conventional foods: *Prosopis* flour. *Food Research International*, 43(5), 1505–1510. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.004>
- Carmona, A., Seidl, D. S., & Jaffé, W. G. (1991). Comparison of extraction methods and assay procedures for the determination of the apparent tannin content of common beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56(3), 291–301. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740560305>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>

- Catalán, Ú., Barrubés, L., Valls, R. M., Solà, R., & Rubió, L. (2017). In vitro metabolomic approaches to investigating the potential biological effects of phenolic compounds: an update. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 15(4), 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.12.007>
- Cattaneo, F. (2014). *Proteínas y péptidos bioactivos en alimentos vegetales no convencionales*. Universidad Nacional de Tucumán.
- Cattaneo, F., Costamagna, M. S., Zampini, I. C., Sayago, J., Alberto, M. R., Chamorro, V., Pasos, A., Thomas-Valdes, S., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M. I. (2016). Flour from *Prosopis alba* cotyledons: A natural source of nutrient and bioactive phytochemicals. *Food Chemistry*, 208, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.115>
- Cattaneo, F., Sayago, J. E., Alberto, M. R., Zampini, I. C., Ordoñez, R. M., Chamorro, V., Pasos, A., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.003>
- Cavagnaro, J. B., & Passera, C. B. (1993). Relaciones hídricas de *Prosopis flexuosa* (Algarrobo dulce) en el monte, Argentina. In *Unidad de Botánica y Fisiología vegetal* (pp. 73–77). Contribuciones mendocinas a la quinta reunión regional para América Latina y el Caribe de la Red de forestación del CID: conservación y mejoramiento de especies del género *Prosopis*.
- Cavaiuolo, M., Cocetta, G., & Ferrante, A. (2013). The antioxidants changes in ornamental flowers during development and senescence. *Antioxidants*, 2, 132–155. <https://doi.org/10.3390/antiox2030132>
- Cazarolli, L. H., Demarchi Kappel, V., Zanatta, A. P., Ota, D., Suzuki, H., Yunes, R. A., Nuñez, R., Pizzolatti, M., & Barreto, F. R. (2010). Natural and synthetic chalcones: tools for the study of targets of action-insuline secretagogue or insulin mimetic? In Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 39 (1°, p. 504). Elsevier.
- Ceriello, A., & Motz, E. (2004). Is oxidative stress the pathogenic mechanism

- underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(5), 816–823. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000122852.22604.78>
- Chamira Dilanka, F., & Preethi, S. (2015). Optimized enzymatic colorimetric assay for determination of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) scavenging activity of plant extracts. *MethodsX*, 2, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.05.001>
- Chatzianagnostou, K., Del Turco, S., Pingitore, A., Sabatino, L., & Vassalle, C. (2015). The mediterranean lifestyle as a non-pharmacological and natural antioxidant for healthy aging. *Antioxidants*, 4(4), 719–736. <https://doi.org/10.3390/antiox4040719>
- Cheli, F., & Baldi, A. (2011). Nutrition-based health: cell-based bioassays for food antioxidant activity evaluation. *Journal of Food Science*, 76(9), 197–205. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02411.x>
- Chen, M., Wang, T., Jiang, Z. Z., Shan, C., Wang, H., Wu, M. J., Zhang, Y., Zhang, S., Zhang, L. Y. (2014). Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of total flavonoid C-glycosides from *Abrus mollis* extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(8), 590–598. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60090-X](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60090-X)
- Chiou, R.Y., C. S. L. (2001). Isoflavone transformation during soybean Koji preparation and subsequent miso fermentation supplemented with ethanol and NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3656–3660. <https://doi.org/10.1021/jf001524l>
- Chobot, V. (2010). Simultaneous detection of pro- and antioxidative effects in the variants of the deoxyribose degradation assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2088–2094. <https://doi.org/10.1021/jf902395k>
- Choo, C. Y., Sulong, N. Y., Man, F., & Wong, T. W. (2012). Vitexin and isovitexin from the Leaves of *Ficus deltoidea* with in-vivo alfa-glucosidase inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(3), 776–781. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.062>

- Chow, J. M., Shen, S. C., Huan, S. K., Lin, H. Y., & Chen, Y. C. (2005). Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochemical Pharmacology*, *69*, 1839–1851. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.03.017>
- Coirini, R., & Karlín, U. (1999). El fruto del algarrobo en la alimentación animal, en el Chaco argentino: Estudio económico. In *Cuba, A., Silva, A., Cornejo, C. (eds). Bosques Secos y Desertificación* (pp. 203–211). Lambayeque, Perú: Memorias del Seminario Internacional.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A., & Vanden Berghe, D. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, *61*(1), 71–76. <https://doi.org/10.1021/np970237h>
- Costamagna, M. S., Ordoñez, R. M., Zampini, I. C., Sayago, J. E., & Isla, M. I. (2013). Nutritional and antioxidant properties of *Geoffroea decorticans*, an Argentinean fruit, and derived products (flour, arropo, decoction and hydroalcoholic beverage). *Food Research International*, *54*(1), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.05.038>
- Costamagna, M. S., Zampini, I. C., Alberto, M. R., Cuello, S., Torres, S., Pérez, J., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., & Isla, M. I. (2016). Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process. *Food Chemistry*, *190*, 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.068>
- Courts, F. L., & Williamson, G. (2015). Critical Reviews in Food Science and Nutrition The occurrence, fate and biological activities of C- glycosyl flavonoids in the human diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.694497>
- Creamer, L. K., & Matheson, A. R. (1976). The use of mercaptoethanesulfonic acid as a hydrolyzing agent for the determination of tryptophan in proteins. *Dairy Science of Technology*, *11*, 211–2.
- Cronquist, A. (1977). On the taxonomic significance of secondary metabolites in

angiosperms. *Plant Systematic and Evolution*, 1, 179–189.

- Cseke, L. J. (2006). *Natural products from plants*. CRC/Taylor & Francis. Retrieved from <http://trove.nla.gov.au/work/32316161?selectedversion=NBD40057776>
- D’Almeida, R. E., Isla, M. I., De L. Vildoza, E., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., & Alberto, M. R. (2013). Inhibition of arachidonic acid metabolism by the Andean crude drug *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 1080–1086. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.014>
- D’antoni, H. L., & Solbrig, O. T. (1977). Algarrobos in South American cultures: past and present. In B. B. Simpson (Ed.), *Mesquite: Its Biology in Two Desert Ecosystems* (pp. 189–200). Pennsylvania, USA: Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg.
- Day, L., Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., & Lundin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.05.002>
- Degenhardt, A., Knapp, H., & Winterhalter, P. (2000). Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 338–343. <https://doi.org/10.1021/jf990876t>
- Del Valle, F. R., Marco, E., Becker, R., & Saunders, R. M. (1988). Development of products containing mesquite *Prosopis* (spp.) pod flour and their nutritional and organoleptic evaluation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13, 447–456. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1989.tb00118.x>
- Devi, N. S., Ramanan, M., Paragi-Vedanthi, P., & Doble, M. (2017). Phytochemicals as multi-target inhibitors of the inflammatory pathway- A modeling and experimental study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(3), 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.046>
- Díaz Celis, A. (1995). *Los Algarrobos*. CONCYTEC, Lima, Perú.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956).



- Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dueñas, M., Cueva, C., Muñoz-González, I., Jiménez-Girón, A., Sánchez-Patán, F., Santos-Buelga, C., Moreno-Arribas, M., & Bartolomé, B. (2015). Studies on modulation of gut microbiota by wine polyphenols: From isolated cultures to omic approaches. *Antioxidants*, 4(1), 1–21. <https://doi.org/10.3390/antiox4010001>
- Durán, V. (2004). *Poblaciones indígenas de Malargüe. Su arqueología e historia*. Mendoza: Centro Interdisciplinario de Estudios Regionales, Universidad Nacional de Cuyo.
- Ekwall, B. (1983). Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 407, 64–77. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=6349488&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/258751B8-DC12-468C-9FBD-9422D12C2414>
- Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A., & Zucco, F. (1990). Toxicity tests with mammalian cell cultures. *Short-Term Toxicity Tests for Non-Genotoxic Effects*, 75–98. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Toxicity+Tests+with+Mammalian+Cell+Cultures#1%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Toxicity+tests+with+mammalian+cell+cultures#1>
- Englyst, H. N., Kingman, S. M., & Cummings, J. H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9137206>
- Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.152>
- Escudero Álvarez, E., & González Sánchez, P. (2006). Fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 61–72. Retrieved from [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112006000500007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000500007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

- Fagg, C. W., & Stewart, J. L. (1994). The value of *Acacia* and *Prosopis* in arid and semiarid environments. *Journal of Arid Environments*, 27, 3–25. <https://doi.org/10.1006/jare.1994.1041>
- FAO. (1997). *Especies Arbóreas y Arbustivas para las Zonas Áridas y Semiáridas de América Latina*. Santiago de Chile: FAO.
- FAO. (2011). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2010-11*. FAO. <https://doi.org/0251-1371>
- Felger, R. S. (1977). Mesquite in Indian cultures of southwestern North América. In B. B. Simpson (Ed.), *Mesquite: It's Biology in Two Desert Ecosystems*. (pp. 105–176). Pennsylvania, USA.: Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg.
- Felger, R. S. (1990). Mesquite: a world food crop. *Aridus*, 2(1), 1–3.
- Felker, P. (1979). Mesquite: An all-purpose leguminous arid land tree. In *New Agricultural Crops*, G.A. Ritchie (p. 38, 88–132.). Boulder, CO.: AAAS Symposium, Westview Press.
- Felker, P. (1999). *Oportunidades de inversiones en el algarrobo (Prosopis alba) en Santiago del Estero (Argentina)*. Santiago del Estero, Argentina: Secretaría de Producción y Medio Ambiente.
- Felker, P., Geesing, D., & Bingham, R. L. (2000). Influence of mesquite (*Prosopis glandulosa*) on soil nitrogen and carbon development: Implications for global carbon sequestration. *Journal of Arid Environments*, 46(2), 157–180. <https://doi.org/10.1006/jare.2000.0661>
- Felker, P., Lopez, C., Soulier, C., Ochoa, J., Abdala, R., & Ewens, M. (2001). Genetic evaluation of *Prosopis alba* (algarrobo) in Argentina for cloning elite trees. *Agroforestry Systems*, 53(1), 65–76.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérída, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>
- Fernández-Travieso, J. C. (2016). Síndrome metabólico y riesgo cardiovascular. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 47(2), 106–119. Retrieved from

<http://www.redalyc.org/pdf/1812/181245821006.pdf>

- Ferreres, F., Andrade, P., Ferreres, F., Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. (2003). Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI / MS / MS : Application to seeds of quince ( *Cydonia oblonga* ) Approach to the Study of C -Glycosyl Flavones by Ion Trap HPLC-PAD-ESI / MS / MS : Application to Seeds of Quince ( *Cydoni*, 359(August 2016), 351–359. <https://doi.org/10.1002/pca.727>
- Ferreres, F., Llorach, R., & Gil-Izquierdo, A. (2004). Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(3), 312–321. <https://doi.org/10.1002/jms.586>
- Figuroa, G., & Dantas, M. (2006). Recolección, procesamiento y consumo de frutos silvestres en el noroeste semiárido argentino. Casos actuales con implicancias arqueológicas. *La Zaranda de Ideas. Revista de Jóvenes Investigadores En Arqueología*, 2, 35–50.
- Fraile, M. E., García-Suárez, M. D., Martínez-Bernal, A., & Slomianski, R. (2007). Nutritivas y apetecibles: conozca de leguminosas comestibles. Parte I. Hojas, vainas y semillas. *Contactos*, 66, 27–35. Retrieved from [file:///J:/arboles/Usos arboles de Mexico/Referencias/Nacional/Nutritivas apetecibles leguminosas comestibles.pdf](file:///J:/arboles/Usos%20arboles%20de%20Mexico/Referencias/Nacional/Nutritivas%20apetecibles%20leguminosas%20comestibles.pdf)
- Franke, A. A., Custer, L. R., Cern, C. M., & Narala, K. K. (1994). Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2, 1905–1913. <https://doi.org/10.1021/jf00045a015>
- Galera, M. F., Trevisson, M., & Bruno, S. A. (1992). *Prosopis* in Argentina: Initial results on Cultivation in Greenhouses and Orchards, and Pod Quality for Food or Feed of Native *Prosopis* Species of Córdoba Province. *Prosopis Species Aspects of their Value, Research and Development-CORD*.
- Garcia, G. A., & Garcia Cardona, A. (2009). Fosfolipasas A-2: Grandes familias y mecanimos de acción. *Repertorio medico cir*, 18(4), 199–209.
- García Peris, P., & Gimeno, C. V. (2007). Evolución en el conocimiento de la fibra. *Nutricion Hospitalaria*, 22, 20–25.

- Gerschenson, L., Rojas, A. M., & Fissore, E. N. (2017). Effects of Innovative Processing Techniques. In *Nutraceutical and functional food components* (pp. 39–87). London: Academic Press. Elsevier.
- Giampieri, F., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparri, M., Afrin, S., Cianciosi, D., Reboledo-Rodriguez, P., Varela-Lopez, A., Quiles, J., Mezzetti, B., & Battino, M. (2017). The healthy effects of strawberry bioactive compounds on molecular pathways related to chronic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1398*(1), 62–71. <https://doi.org/10.1111/nyas.13373>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, *125*, 1401–1412.
- Gierse, J. K., Koboldt, C. M., Walker, M. C., Seibert, K., & Isakson, P. C. (1999). Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *The Biochemical Journal*, *339*, 607–614. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3390607>
- Gil Hernández, Á. (2010). *Tratado de Nutrición*. (L. Fontana Gallego, Ed.) (2°). Granada: Edit. Médica Panamericana.
- Gimeno, M. L., Martínez, C. B., Calleja, I. P., & Lenguas, A. C. (2005). Síndrome metabólico: retos y esperanzas. *Revista Española Cardiológica Suplemento*, *5*, 3D–10D. Retrieved from <http://www.revespcardiol.org/es/content/articulo/13083442/>
- Giovannetti, M. A., Lema, V. S., Bartoli, C. G., & Capparelli, A. (2008). Starch grain characterization of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz and *P. flexuosa* DC, and the analysis of their archaeological remains in Andean South America. *Journal of Archaeological Science*, *35*(11), 2973–2985. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.06.009>
- Gondoin, A., Grussu, D., Stewart, D., & McDougall, G. J. (2010). White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase in vitro. *Food Research International*, *43*(5), 1537–1544. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.029>
- Gonzales Galán, A. G., DuarteCorrêa, A., De Abreu, C. M. P., & Piccolo Barcelos, M. D. F. (2008). Caracterización química de la harina del fruto de

*Prosopis* spp. procedente de bolivia y brasil. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 58(3), 309–315. Retrieved from [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222008000300015](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222008000300015)

González-Castejón, M., & Rodriguez-Casado, A. (2011). Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacological Research*, 64(5), 438–455. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.07.004>

Grados, N., & Cruz, G. (1996). New approaches to industrialization of algarrobo (*Prosopis pallida*) pods in Perú. In *Prosopis: Semiarid Fuelwood and Forage Tree*. In P. Felker & J. Moss (Eds.), *Building Consensus for the Disenfranchised at the U.S. National Academy of Sciences*. Kingsville, TX: Center Semi-Arid Forest Resources Publishing. Retrieved from <http://www.udep.edu.pe/upadi/Prosopis/index.html>

Granito, M., Champ, M., David, A., Bonnet, C., & Guerra, M. (2001). Identification of gas-producing components in different varieties of *Phaseolus vulgaris* by in vitro fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(6), 543–550. <https://doi.org/10.1002/jsfa.839>

Granito, M., Champ, M., Guerra, M., & Frias, J. (2003). Effect of natural and controlled fermentation on flatus producing compounds of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(10), 1004–1009. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1388>

Hagerman, A. (2002). Tannin chemistry handbook. *Livro*, 116. <https://doi.org/10.1038/134611a0>

Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481–504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)

Hasler, C. M. (2002). Issues and opinions functional foods : Benefits , concerns and challenges — A position paper from the American council on science and health 1, (August), 3772–3781. Retrieved from <http://jn.nutrition.org/content/132/12/3772.full.pdf+html>

Hausladen, A., & Stamler, J. S. (1999). Nitrosative stress. *Methods*, 300(1993),

1993–1999. [https://doi.org/0.1016/S0076-6879\(99\)00143-3](https://doi.org/0.1016/S0076-6879(99)00143-3)

- He, B., Zhang, L. L., Yue, X. Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X. L., & Yue, P. X. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, *204*, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.094>
- He, Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, *17*(2), 1571–1601. <https://doi.org/10.3390/molecules17021571>
- Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, *28*(3), 718–726. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000300031>
- Hernández, A., Lagiglia, H., & Gil, A. (1999). El registro arqueobotánico en el Sitio Agua de los Caballos-1 (San Rafael, Mendoza). *Anales de Arqueología Y Etnología*, *54–55*, 181–203.
- Holm, J., Björck, I., Drews, A., & Asp, N.-G. (1986). A rapid method for the analysis of starch. *Starch - Stärke*, *38*(7), 224–226. <https://doi.org/10.1002/star.19860380704>
- Hung, P. Van, Maeda, T., Miyatake, K., & Morita, N. (2009). Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Research International*, *42*(1), 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.10.005>
- Hwang, S. H., Wecksler, A. T., Wagner, K., & Hammock, B. D. (2013). Rationally designed multitarget agents against inflammation and pain. *Current Medicinal Chemistry* *20*(13), 1783–1799.
- Inoue, K. H., & Hagerman, A. E. (1988). Determination of gallotannins with rhodanine. *Analytical Biochemistry*, *169*, 363–369. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90296-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90296-5)
- Ishige, K., Chen, Q., Sagara, Y., & Schubert, D. (2001). The activation of

- dopamine D4 receptors inhibits oxidative stress-induced nerve cell death. *The Journal of Neuroscience*, 21(16), 6069–6076.
- Isla. (2017). *Fitoquímica para biólogos*. Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán.
- Isla, M. I., Salas, A., Danert, F. C., Zampini, I. C., & Ordoñez, R. M. (2014). Analytical methodology optimization to estimate the content of non-flavonoid phenolic compounds in Argentine propolis extracts. *Pharmaceutical Biology*, 52(7), 835–840. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.871638>
- Joven, J., Rull, A., Rodriguez-Gallego, E., Camps, J., Riera-Borrull, M., Hernández-Aguilera, A., Martin-Paredero, V., Segura-Carretero, A., Micol, V., Alonso-Villaverde, C., & Menéndez, J. A. (2013). Multifunctional targets of dietary polyphenols in disease: A case for the chemokine network and energy metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 267–279. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.004>
- Kalra, E. K. (2003). Nutraceutical - Definition and Introduction. *Aaps Pharmscitech* 5(3), 1–2. <https://doi.org/10.1208/ps050325>
- Karlin, U. O. (1979). *Manejo de leñosas en regiones ganaderas*. Dean Funes, Córdoba.
- Karlin, U. O. (1983). Recursos forrajeros naturales del Chaco: Manejo de Leñosas. In *II Reunión de Intercambio Tecnología en Zonas Áridas y Semiáridas* (p. 78–96.). Villa Dolores, Córdoba.
- Kaufman, P. B., Duke, J. A., Briemann, H., Boik, J., & Hoyt, J. E. (1997). A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: Implications for human nutrition and health. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 3(1), 7–12. <https://doi.org/10.1089/acm.1997.3.7>
- Khaper, N., Bryan, S., Dhingra, S., Singal, R., Bajaj, A., Pathak, C. M., & Singal, P. K. (2010). Targeting the vicious inflammation–oxidative stress cycle for the management of heart failure. *Antioxidante Redox Signal*. 13(7), 1033-1049. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2930>
- Kim, Y. I. (2000). Impact of dietary fiber on colon cancer occurrence.

*Gastroenterology*, 118(6), 1235–1257.

- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 229-245.
- Kim, J., Lee, K. W., & Lee, H. J. (2014). Polyphenols suppress and modulate inflammation: possible roles in health and disease. In: Polyphenols in human health and disease, Volume 1: Polyphenols in chronic diseases and their mechanisms of action, Cap.29, 393–408.
- Kristo, A., Klimis-Zacas, D., & Sikalidis, A. (2016). Protective role of dietary berries in cancer. *Antioxidants*, 5(4), 37-42. <https://doi.org/10.3390/antiox5040037>
- Krueger, S., Winheim, L., & Morlock, G. E. (2018). Planar chromatographic screening and quantification of coumarin in food, confirmed by mass spectrometry. *Food Chemistry*, 239, 1182–1191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.058>
- Kumaran, A., & Karunakaran, R. J. (2006). Nitric oxide radical scavenging active components from *Phyllanthus emblica* L. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s11130-006-0001-0>
- Kumashiro, N., Erion, D. M., Zhang, D., Kahn, M., Beddow, S. a, Chu, X., Still, C., Han, X., Dziura, J., Petersen, K., Samuel, V., & Shulman, G. I. (2011). Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(39), 16381–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113359108>
- Kwon, K. H., Murakami, A., Tanaka, T., & Ohigashi, H. (2005). Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochemical Pharmacology*, 69, 395–406. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.10.015>
- Lagiglia, H. A. (1956). La presencia del Patay en una tumba indígena de San Rafael (Mza). In *Notas del Museo*, (1), 1-4. Museo de Historia Natural de San Rafael, (pp. 1–4). San Rafael, Mendoza.
- Lagiglia, H. A. (1968). Secuencias culturales del Centro Oeste Argentino: valles



- del Atuel y Diamante. *Revista Científica de Investigaciones*, 1, 159–174.
- Lake, B. G. (1999). Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 37, 423–453. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00010-1)
- Lao, F., & Giusti, M. M. (2017). The effect of pigment matrix, temperature and amount of carrier on the yield and final color properties of spray dried purple corn (*Zea mays* L.) cob anthocyanin powders. *Food Chemistry*, 227, 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.091>
- Levin, D. (1976). The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Annual Review of Ecology Evolution Systematics*, 7, 121–159.
- Liao, Y. R., & Lin, J. Y. (2015). Quercetin intraperitoneal administration ameliorates lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in mice. *Life Sciences*, 137, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.07.015>
- Liyana-Pathirana, C. M., & Shahidi, F. (2006). Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1256–1264. <https://doi.org/10.1021/jf052556h>
- Lizazaburu Robles, J. C. (2013). Síndrome metabólico : concepto y aplicación práctica Metabolic syndrome : concept and practical application Juan Carlos Lizarzaburu Robles. *Articulo De Revision*, 315–320. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.2>
- Llano, C. (2011). *Aprovechamiento de los recursos vegetales entre las sociedades cazadoras-recolectoras del sur de Mendoza*. Universidad Nacional del COMAHUE.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>

- López-Franco, Y., Goycoolea, F., Valdez, M., & Calderón, A. (2006). Una alternativa de uso industrial. *Interciencia*, *31*(3), 183–189. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/339/33911405.pdf>
- López-Franco, Y. L., Córdova-Moreno, R. E., Goycoolea, F. M., Valdez, M. A., Juárez-Onofre, J., & Lizardi-Mendoza, J. (2012). Classification and physicochemical characterization of mesquite gum (*Prosopis* spp.). *Food Hydrocolloids*, *26*(1), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.006>
- López-Jaramillo, P., Rey, J. J., Gómez-Arbeláez, D., Rodríguez, Y. A., & López-López, J. (2011). Combatir la epidemia de diabetes mellitus tipo 2 en Latinoamérica: características especiales que demandan acciones innovadoras. *Clinica E Investigacion En Arteriosclerosis*, *23*(2), 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2011.02.004>
- López, M. E., Sosa, M. A., & Labrousse, N. P. M. (2007). Síndrome metabólico. *Revista de Posgrado de La Via Cátedra de Medicina*, *174*, 12–15. <https://doi.org/10.1157/13083442>
- Losada-Barreiro, S., & Bravo-Díaz, C. (2017). Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *133*, 379–402. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.061>
- Lucas, L., Russell, A., & Keast, R. (2011). Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Current Pharmaceutical Design* *17*, 754–768. <https://doi.org/10.2174/138161211795428911>
- Luchini, L. (2015). Alimentos argentinos, Herencia para Valorar: Harina de Algarrobo. *Dirección de Acuicultura. Subsecretaría de Pesca Y Acuicultura, Secretaría de Agricultura, Ganadería Y Pesca*. Retrieved from <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/pdfs/60/8.pdf%0A>
- Lule, S. U., & Xia, W. (2005). Food Phenolics, Pros and Cons: A Review. *Food Reviews International*, *21*(4), 367–388. <https://doi.org/10.1080/87559120500222862>
- Lv, J., Yu, L., Lu, Y., Niu, Y., Liu, L., Costa, J., & Yu, L. (2012).

- Phytochemical compositions, and antioxidant properties, and antiproliferative activities of wheat flour. *Food Chemistry*, 135(2), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.141>
- Macáková, K., Kolečkář, V., Cahlíková, L., Chlebek, J., Hošťálková, A., Kuča, K., Jun, D., & Opletal, L. (2015). *Tannins and their Influence on Health. Recent Advances in Medicinal Chemistry* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803961-8.50006-3>
- Makkar, H. P. S., Blummel, M., & Becker, K. (1995). Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *British Journal of Nutrition*, 73, 897–913.
- Mamani-Matsuda, M., Rambert, J., Malvy, D., Lejoly-Boisseau, H., Daulouede, S., & Thiolat, D. (2004). Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 924–929. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.924-929.2004>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jime, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/79/5/727.long>
- Maron, D. M., & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3–4), 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- Mashmoul, M., Azlan, A., Khaza'ai, H., Yusof, B., & Noor, S. (2013). Saffron: A natural potent antioxidant as a promising anti-obesity drug. *Antioxidants*, 2(4), 293–308. <https://doi.org/10.3390/antiox2040293>
- Mena, P., & Llorach, R. (2017). New frontiers on the metabolism, bioavailability and health effects of phenolic compounds. *Molecules*, 22(1), 10–13. <https://doi.org/10.3390/molecules22010151>
- Mendoza-Wilson, A. M., Castro-Arredondo, S. I., Espinosa -Plascencia, A., Robles-Burgueño, M. del R., Balandrán-Quintana, R. R., & Del Carmen

- Bermúdez-Almada, M. (2016). Chemical composition and antioxidant-prooxidant potential of a polyphenolic extract and a proanthocyanidin-rich fraction of apple skin. *Heliyon*, 2(2), e00073. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00073>
- Meyer, D., Becker, R., Gumbmann, M.R., Vohra, R., Neukom, H., & Saunders, R. M. (1986). Processing, composition, nutritional evaluation, and utilization of mesquite (*Prosopis* spp.) pods as a raw material for the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(5), 914–919. <https://doi.org/10.1016/10.1021/jf00071a037>
- Meyer, D. (1984). *Processing, utilization and economics of mesquite pods as a raw material for the food industry*. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.
- Michieli, C. (1978). *Los Puelches*. Instituto de Investigaciones Arqueológicas y Museo. Universidad Nacional de San Juan. San Juan.
- Michieli, C. (1983). *Los Huarpes Protohistóricos*. Instituto de Investigaciones Arqueológicas y Museo. Universidad Nacional de San Juan.
- Min, B., Gu, L., McClung, A. M., Bergman, C. J., & Chen, M. H. (2012). Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. *Food Chemistry*, 133(3), 715–722. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.079>
- Moebus, S., & Stang, A. (2007). Das metabolisches Syndrom – ein umstrittenes diagnostisches Konzept Schlüsselwörter, 7, 529–540. <https://doi.org/10.1007/s00059-007-3025-9>
- Mohamed, A., Cesarettin, A., Anne, M., Mark, B., & Fereidoon, S. (2005). Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids and phenolics of three native fresh and sun – dried date varieties grown in Oman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19), 7592–7599. <https://doi.org/10.1021/jf050579q>
- Molinari, G. (2009). Natural products in drug discovery: Present status and perspectives. *Pharmaceutical Biotechnology: Advances in Experimental Medicine and Biology*, 655, 13–27. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419->

- Mollet, B., & Rowland, I. (2002). Functional foods : at the frontier between food and pharma. *Current Opinion Biotechnology*, 13(5), 483–485. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00375-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00375-0)
- Moon, J., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(January), 1655–1666. <https://doi.org/10.1021/jf803537k>
- Moore, J., Hao, Z., Zhou, K., Luther, M., Costa, J., & Yu, L. (2005). Carotenoid, tocopherol, phenolic acid, and antioxidant properties of Maryland-grown soft wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6649–6657. <https://doi.org/10.1021/jf050481b>
- Nabhan, P. G., Weber, C. W., & Berry Kiva, J. W. (1979). Legumes in the Papago-Pima Indian Diet and Ecological Niche. In *First Annual Conference on Ethnobiology in Honor of Lyndon L. Hargrave* (p. 173–190.).
- Nair, S., Nagar, R., & Gupta, R. (1998). Antioxidant phenolics and flavonoids in common Indian foods. *Journal of Association of Physicians of India*, 46, 708–710.
- Nardini, M., & Ghiselli, A. (2004). Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chemistry*, 84(1), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00257-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00257-7)
- Nelson, N. (1944). A photolorimetric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, 3(2), 375–380. Retrieved from <http://xa.yimg.com/kq/groups/22975017/567938699/name/375.full.pdf>
- Ohmiya, A. (2011). Diversity of carotenoid composition in flower petals. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 45(2), 163–171. Retrieved from [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jarq/45/2/45\\_2\\_163/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jarq/45/2/45_2_163/_pdf)
- Önal, A., Kepekçi, Ş. E., & Öztunç, A. (2005). Spectrophotometric methods for the determination of the antidepressant drug Paroxetine hydrochloride in tablets. *Journal of AOAC International*, 88, 490–495.

- Organización Mundial de la Salud. (2016). Informe mundial sobre la Diabetes. *PLoS Medicine*. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
- Palacios-Rojas, N., & Leech, M. (2004). Análisis de iridoides y expresión de genes que codifican enzimas tempranas en la síntesis de alcaloides indol terpenoicos en *Catharanthus roseus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6(1), 36–42. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>
- Panda, S. K. (2012). Assay guided comparison for enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities with special reference to medicinal plants. *Intech open sciences*, 381–400. <https://doi.org/10.5772/50782>
- Pantidos, N., Boath, A., Lund, V., Conner, S., & McDougall, G. J. (2014). Phenolic-rich extracts from the edible seaweed, *Ascophyllum nodosum*, inhibit alfa-amylase and alfa-glucosidase: Potential anti-hyperglycemic effects. *Journal of Functional Foods*, 10, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.06.018>
- Pasiecznik, N. M. (2001). The *Prosopis juliflora* - *Prosopis pallida* Complex : Retrieved from [https://www.gardenorganic.org.uk/.../ Prosopis Monograph Complete.pdf](https://www.gardenorganic.org.uk/.../Prosopis%20Monograph%20Complete.pdf)
- Pavanato, A., Tuñón, M., Sonia, S., Marroni, C., Llesuy, S., & González-Gallego, J. (2003). Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Digestive Diseases and Sciences*, 48, 824–9. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12741479>
- Peng, X., Zheng, Z., Cheng, K. W., Shan, F., Ren, G. X., Chen, F., & Wang, M. (2008). Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chemistry*, 106(2), 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.016>
- Perez, M., Cuello, A. S., Zampini, I., Ordoñez, R., Alberto, M. R., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., & Isla, M. I. (2014). Polyphenolic compounds and anthocyanin content of *Prosopis nigra* and *Prosopis alba* pods fl our and their antioxidant and anti-inflammatory capacities. *Food Reasearch International*, 64, 762–771. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.013>
- Picariello, G., Mamone, G., Nitride, C., Addeo, F., & Ferranti, P. (2013). Trends

in analytical chemistry protein digestomics : Integrated platforms to study food-protein digestion and derived functional and active peptides. *Trends in Analytical Chemistry*, 52, 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.08.001>

Piccinelli, A. L., Mesa, M. G., Armenteros, D. M., Alfonso, M. A., Arevalo, A. C., Campone, L., & Rastrelli, L. (2008). HPLC-PDA-MS and NMR characterization of C-glycosyl flavones in a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantifolia* leaves with antiplatelet activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(5), 1574–1581. <https://doi.org/10.1021/jf073485k>

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>

Prior, R. L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Paynef, M. J., & Reed, J. (2010). Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9), 1473–1478. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3966>

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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.033>

Rajeh, M. A. B., Kwan, Y. P., Zakaria, Z., Latha, L. Y., Jothy, S. L., & Sasidharan, S. (2012). Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L extract on behavior, organs, body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. *Pharmacognosy Research* 4 (3), 170–177. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.99085>

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. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P., & Rice-Evans, C. A. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(2), 220–235.

[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00877-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00877-8)

- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radical Biology and Medicine* 49, 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 797-807. <https://doi.org/10.2174/0929867013373011>
- Ribeiro, D., Freitas, M., Tomé S.M., Silva, A.M., Porto, G., Cabrita, E.J. Marques, M. M. B., & Fernandes, E. (2014). Inhibition of LOX by flavonoids: a structure- activity relationship study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 72, 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.030>
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401–436. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00093-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00093-X)
- Robbins, A. C. T., Hanley, T. A., Hagerman, A. E., Hjeljord, O., Baker, D. L., Schwartz, C. C., & Mautz, W. W. (1987). Role of tannins in defending plants against ruminants : Reduction in protein availability. *Ecology*, 68(1), 98–107. <https://doi.org/10.2307/1938809>
- Rodriguez-Amaya, D. (2001). *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. *Life Sciences*. <http://beauty-review.nl/wp-content/uploads/2014/11/A-guide-to-carotenoid-analysis-in-foods.pdf>
- Roe, J., & Papadopoulus, N. M. (1954). The determination of fructose-6-phosphate and fructose-1, 6-diphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, (210), 703–707. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/210/2/703.full.pdf>
- Roig, F. (1993a). Informe nacional para la selección de germoplasma en especies de *Prosopis* de la República Argentina. In *Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas (eds). Conservación y Mejoramiento de Especies del Género Prosopis*. (pp. 1–36). Mendoza: Quinta Reunión Regional para América Latina y el Caribe de la Red de Forestación del Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo.



- Roig, F. (1993b). Aportes a la etnobotánica del género *Prosopis*. In *Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas (eds). Conservación y Mejoramiento de Especies del Género Prosopis*. (pp. 99–119). Mendoza: Quinta Reunión Regional para América Latina y el Caribe de la Red de Forestación del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.
- Roschek, B., Fink, R. C., Li, D., McMichael, M., Tower, C. M., Smith, R. D., & Alberte, R. S. (2009). Pro-Inflammatory enzymes, Cyclooxygenase 1, Cyclooxygenase 2, and 5-Lipoxygenase, inhibited by stabilized rice bran extracts. *Journal of Medicinal Food*, *12*(3), 615–623. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0133>
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, *121*, 996–1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>
- Salmon, A. (2016). Beyond Diabetes: Does obesity-induced oxidative stress drive the aging process? *Antioxidants*, *5*(3), 24. <https://doi.org/10.3390/antiox5030024>
- Sathe, S. K., Deshpande, S. S., Reddy, N. R., Goll, D. E., & Salunke, D. K. (1983). Effects of germination on protein, raffinose oligosaccharides, and antinutritional factors in the great northern beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of Food Science*, *48*, 1796–1800. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb05087.x>
- Saunders, R. M., Becker, R., Meyer, D., Del Valle, F. R., Marco, E., & Torres, M. E. (1986). Identification of commercial milling techniques to produce high sugar, high fiber, high protein, and high galactomannan gum fractions from *Prosopis* pods. *Forest Ecology and Management*, *16*(1–4), 169–179. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(86\)90017-4](https://doi.org/10.1016/0378-1127(86)90017-4)
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, *30*(12), 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, *130*, 2073S–2085S.
- Sciammaro, L., Ferrero, C., & Puppo, M. C. (2016). Chemical and nutritional

- properties of different fractions of *Prosopis alba* pods and seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(1), 103–112. <https://doi.org/10.1007/s11694-015-9282-z>
- Shahid, M., Shahid-Ul-Islam, & Mohammad, F. (2013). Recent advancements in natural dye applications: A review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 310–331. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.03.031>
- Shi, D., Chen, C., Zhao, S., Ge, F., Liu, D., & Song, H. (2014). Walnut Polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro and have hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(10), 757–763. <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-10-16>
- Silva, K. L. da, & Filho, V. C. (2002). Plantas do genero *Bauhinia*: composicao química e potencial farmacológico. *Quimica Nova*, 25(3), 449–454. Retrieved from [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000300018](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000300018)
- Singh, G. (1996). The role of *Prosopis* in reclaiming high- pH soils and in meeting firewood and forage needs of small farmers. In P. Felker & J. Moss (Eds.), *Prosopis: Semiarid Fuelwood and Forage Tree; Building Consensus for the Disenfranchised*. Kingsville, Texas, USA.: Center for Semi-Arid Forest Resources.
- Singh, R., Akhtar, N., & Haqqi, T. M. (2010). Green tea polyphenol epigallocatechin-3- gallate: inflammation and arthritis. *Life Science*, 86(25-26), 907-918. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.04.013>
- Singh, M., Kaur, M., & Silakari, O. (2014). Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry molecular. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 206–239. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.013>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sivakumar, T., Srinivasan, K., Rajavel, R., Vasudevan, M., Ganesh, M., Kamalakannan, K., & Mallika, P. (2009). Isolation of Chemical

- Constituents from *Prosopis juliflora* bark and anti-inflammatory activity of its methanolic extracts. *Journal of Pharmacy Research*, 2(3), 551–556. Retrieved from <http://jpronline.info/article/view/251/214>
- Slemmer, J., & Weber, J. (2014). Assessing antioxidant capacity in brain tissue: methodologies and limitations in neuroprotective strategies. *Antioxidants*, 3(4), 636–648. <https://doi.org/10.3390/antiox3040636>
- Sohal, R. S. (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process<sup>1,2</sup>. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00856-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00856-0)
- Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. *The Journal of Biological Chemistry*, 160, 61–68. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/160/1/61.short>
- Swain, T. (1973). *Chemistry in evolution and systematics*. Londres: Butterworth.
- Sweeny, J. G., & Iacobucci, G. A. (1981). Synthesis of anthocyanins-III. *Tetrahedron*, 37, 1481–1483.
- Świeca, M., Dziki, D., & Gawlik-Dziki, U. (2017). Starch and protein analysis of wheat bread enriched with phenolics-rich sprouted wheat flour. *Food Chemistry*, 228, 643–648. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.052>
- Tae, J. H., Lee, M. H., Park, C. H., Pae, S. B., Shim, K. B. O., Ko, J. M., Shin, S., Baek, I., & Park, K. Y. (2010). Identification and characterization of anthocyanins in Yard-Long beans (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* L.) by High-Performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization/mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI/MS) analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2571–2576. <https://doi.org/10.1021/jf903883e>
- Ti, H., Li, Q., Zhang, R., Zhang, M., Deng, Y., Wei, Z., Chi, J., & Zhang, Y. (2014). Free and bound phenolic profiles and antioxidant activity of milled fractions of different indica rice varieties cultivated in southern China. *Food Chemistry*, 159, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.029>
- Touriño, S., Pérez-Jiménez, J., Mateos-Martín, M. L., Fuguet, E., Vinardell, M. P., Cascante, M., & Torres, J. L. (2011). Metabolites in contact with the rat digestive tract after ingestion of a phenolic-rich dietary fiber matrix. *Journal*

*of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 5955–5963.  
<https://doi.org/10.1021/jf200159f>

UNEP. Convenio sobre la Diversidad biológica (CBD) (2005).

Vaher, M., Matso, K., Levandi, T., Helmja, K., & Kaljurand, M. (2010). Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. In *Procedia Chemistry* (Vol. 2, pp. 76–82). <https://doi.org/10.1016/j.proche.2009.12.013>

Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Bastos, M. L. (2002). Antioxidative Properties of Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) Infusion Against Superoxide Radical, Hydroxyl Radical, and Hypochlorous Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4989–4993. <https://doi.org/10.1021/jf020225o>

Valente, A., Albuquerque, T. G., Sanches-silva, A., & Costa, H. S. (2011). Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. *Food Research International*, 44(7), 2237–2242. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.012>

Valério, D. A., Georgetti, S. R., Magro, D. A., Casagrande, R., Cunha, T. M., Vicentini, F. T., Vieira, S. M., Fonseca, M. J., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q., & Verri, W. A. (2009). Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. *Journal of Natural Products*, 72, 1975–1979. <https://doi.org/10.1021/np900259y>

Van de Laar, F. A., Lucassen, P. L., Akkermans, R. P., Van de Lisdonk, E. H., Rutten, G. E., & Van Weel, C. (2005). Alfa-glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28, 166–175. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003639.pub2>

Varela-López, A., Quiles, J., Cordero, M., Giampieri, F., & Bullón, P. (2015). Oxidative stress and dietary fat type in relation to periodontal disease. *Antioxidants*, 4(2), 322–344. <https://doi.org/10.3390/antiox4020322>

Vargas, F., Rivas, C., Nursamaa, A., & Zoltan, T. (2007). Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances En Química*, 2(2), 3–15. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/933/93320202.pdf>

- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, *111*(4), 816–823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.054>
- Vasile, F. E., Martinez, M. J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., Judis, M. A., & Mazzobre, M. F. (2016). Physicochemical, interfacial and emulsifying properties of a non-conventional exudate gum (*Prosopis alba*) in comparison with gum arabic. *Food Hydrocolloids*, *56*, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.016>
- Vasile, F. E., Romero, A. M., Judis, M. A., & Mazzobre, M. F. (2016). *Prosopis alba* exudate gum as excipient for improving fish oil stability in alginate-chitosan beads. *Food Chemistry*, *190*, 1093–1101. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.071>
- Velazquez, O. C., Zhou, D., Seto, E. W., Jabbar, A., Lederer, H. M., Rombeau, J. L., & Choi, J. (1996). In vivo crypt surface hyperproliferation is decreased by butyrate and increased by deoxycholate in normal rat colon: Associated in vivo effects on C-Fos and C-Jun expression. *Journal of Parental and Enteral Nutrition*, *20*(4), 243–250. Retrieved from <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0148607196020004243>
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4113–4117. <https://doi.org/10.1021/jf9801973>
- Venereo Gutiérrez, R. J. (2002). Daño Oxidativo, Radicales Libres Y Antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, *31*(2), 126–133. Retrieved from [http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31\\_2\\_02/MIL09202.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf)
- Verri, W., Vicentini, F., Baracat, M., Georgetti, S., Cardoso, R., Cunha, T., Ferreira, S., Cunha, F., Fonseca, M., & Casagrande, R. (2012). Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: Mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. *Studies in Bioactive Natural Products*, *36*, 297-330. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53836-9.00026-8>
- Vidal-Valverde, C., Frías, J., Estrella, I., Gorospe, M. J., Ruis, R., & Bacon, J. (1994). Effect of processing on some antinutritional factors of lentils.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2291–2295.  
<https://doi.org/10.1021/jf00046a039>

Vijaya Kumar Reddy, C., Sreeramulu, D., & Raghunath, M. (2010). Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International*, 43, 285–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.006>

Vivot, E., De Dios Muñoz, J., Del Carmen Cruaños, M., Josefina Cruaños, M., Tapia, A., Schmeda Hirschmann, G., Martinez, E., Di Sapio, O., Gattuso, M., & Zacchino, S. (2001). Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(1), 65–71. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00222-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00222-7)

Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Štefan, M. B., Alegro, A., Koszegi, T., & Petrik, J. (2011). Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected micromeria species from Croatia. *Molecules*, 16(2), 1454–1470. <https://doi.org/10.3390/molecules16021454>

Wagner, H. & Bladt, S. (2009): *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, second edition. Springer, Switzerland, 360-361

Wassermann, A., & Grosso, C. (2013). Síndrome metabólico definición del síndrome metabólico. *Fundación Para El Estudio, La Prevención Y El Tratamiento de La Enfermedad Vasculare Aterosclerótica*, 2–18. Retrieved from [http://www.fepreva.org/curso/curso\\_conjunto\\_abcba/sindrome\\_metabolico\\_definicion\\_y\\_epidemiologia.pdf](http://www.fepreva.org/curso/curso_conjunto_abcba/sindrome_metabolico_definicion_y_epidemiologia.pdf)

Wijaya, G. Y., & Mares, D. J. (2012). Apigenin di-C-glycosides (ACG) content and composition in grains of bread wheat (*Triticum aestivum*) and related species. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.06.007>

Williams, R. J., Spencer, J. P. E., & Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 838–849. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001>

Williams, D. J., Edwards, D., Hamernig, I., Jian, L., James, A. P., Johnson, S.

- K., & Tapsell, L. C. (2013). Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. *Food Research International*, 52(1), 323–333. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.015>
- Wiseman, H. (2013). Phytochemicals: Health Effects. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 4, 47–51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00227-0>
- Wu, X., & Prior, R. L. (2005). Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS / MS in common foods in the United States : Fruits and Berries, 2589–2599. <https://doi.org/10.1021/jf048068b>
- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A. R., & Miron, A. (2016). Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1549-7852. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1067595>
- Yao, M., Xiao, H., & McClements, D. J. (2014). Delivery of lipophilic bioactives : assembly , disassembly , and reassembly of lipid nanoparticles. *Annual Review of Food Sciences Technology*, 5, 53–81. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-072913-100350>
- Yashin, A., Yashin, Y., Wang, J. Y., & Nemzer, B. (2013). Antioxidant and antiradical activity of coffee. *Antioxidants*, (2), 230–245. <https://doi.org/10.3390/antiox2040230>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zimmet, P., Alberti, G. M., & Rios Serrano, M. (2005). Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados. *Revista Española de Cardiología*, 58, 1371–6. Retrieved from <http://www.revespcardiol.org/es/una-nueva-definicion-mundial-del/articulo/13082533/>
- Zucolotto, S. M., Goulart, S., Montanher, A. B., Reginatto, F. H., Schenkel, E. P., & Fröde, T. S. (2009). Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. *Planta Medica*, 75(11), 1221–1226. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185536>