

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

---



Instituto de Ciencias de la Salud  
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería  
Instituto de Ciencias Agropecuarias

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

**TESIS DOCTORAL**

**VALOR NUTRIMENTAL DE HARINAS DE VAINA DE MEZQUITE (*Prosopis laevigata*) Y EFECTO DE SU CONSUMO EN UN ALIMENTO OBTENIDO POR EXTRUSIÓN SOBRE EL DESARROLLO DE DISLIPIDEMIA EN RATÓN C57BL/6J.**

Para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana

**P R E S E N T A**

**M. en C. Luis Díaz Batalla**

Dirigido por  
Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa  
Dr. Juan Pablo Hernández Uribe

San Agustín, Tlaxiaca, Hgo., Junio 2019.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**  
 INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
 INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
 INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA**

ICSa-DCASH-Acta-Tit-1/2019  
 Asunto: Asignación de Jurado de Examen

**M. en A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO**  
**COORDINACIÓN DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado al M en C Luis Díaz Batalla con número de cuenta 342909, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana dio terminación al trabajo de tesis titulado "Valor nutrimental de harinas de vaina de mezquite *Prosopis laevigata* y efecto de su consumo en un alimento obtenido por extrusión sobre el desarrollo de dislipidemia en ratón C57BL/6J" y por lo tanto se autoriza la impresión del documento de tesis en extenso propuesto por el estudiante.

Lo anterior, en función de que, el estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 3 de junio de 2019. Por tal motivo, solicito a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DR. CARLOS ALBERTO GÓMEZ ALDAPA  
 Director de tesis

DR. JUAN PABLO HERNÁNDEZ URIBE  
 Director de tesis

DRA. RAQUEL CARIÑO CORTÉS

DRA. ALMA DELIA ROMÁN GUTIÉRREZ

ATENTAMENTE  
 Pachuca, Hidalgo 7 de junio del 2019  
 "Amor, Orden y Progreso"

M.C. Esp. Adrián Moya Escobera  
 Director del Instituto de Ciencias de la Salud  
 Dean

M. en N. C. Arianna Omiña Covarrubias  
 Jefa del Área Académica de Nutrición  
 Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Lydia López Pontigo  
 Coordinadora de Posgrado del ICSa  
 Director of Graduate Studies of ICSa

Dra. Esther Ramírez Moreno  
 Coordinadora del Programa Educativo  
 Director of Graduate Studies



## Índice.

Índice

Índice de tablas

Índice de figuras

### RESUMEN

1. ANTECEDENTES.	10
1.1. Carga de enfermedad en el mundo y en México.	10
1.2. Génesis de las enfermedades cardiovasculares (ECV).	15
1.3. Metabolismo de lípidos y dislipidemia.	18
1.4. Dieta y enfermedades cardiovasculares.	24
1.5. Leguminosas y enfermedades cardiovasculares.	27
1.6. El mezquite o género <i>Prosopis</i> .	29
2. JUSTIFICACIÓN.	31
3. OBJETIVOS.	31
3.1. Objetivo general.	31
3.2. Objetivos específicos.	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	32
4.1. Preparación de harinas de mezquite.	32
4.2. Análisis proximal.	32
4.3. Contenido de azúcares libres.	33
4.4. Perfil de aminoácidos.	33
4.5. Extrusión de harinas.	33
4.6. Tratamiento térmico por horneado.	33
4.7. Preparación de extractos.	34
4.8. Cuantificación de fenoles totales.	34
4.9. Captación de radical 2,2-difenil-picrilhidrazilo (DPPH).	34
4.10. Productos de la reacción de Maillard.	34
4.11. Flavonoides.	35
4.12. Formulación de dietas.	35
4.13. Ensayo biológico en ratón C57BL/6J.	36
4.14. Química clínica sanguínea.	36
4.15. Análisis estadístico.	37

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1. Caracterización nutrimental de harinas de vaina de mezquite	38
5.1.1. Composición proximal.	38
5.1.2. Contenido de azúcares.	39
5.1.3. Perfil de aminoácidos.	40
5.1.4. Perfil Nutrimental de las harinas de vaina de mezquite y su implicación en aterogénesis.	42
5.2. Propiedades nutraceuticas de las harinas de vaina de mezquite.	44
5.2.1. Compuestos fenólicos totales.	44
5.2.2. Captación de radical DPPH.	46
5.2.3. Productos de la reacción de Maillard – Abs a 290 nm.	47
5.2.4. Flavonoides.	50
5.2.5. Perfil Nutraceutico de las harinas de vaina de mezquite y su implicación en aterogénesis.	53
5.3. Caracterización de dietas formuladas con harina de vaina de mezquite en ratón C57BL/6J.	56
5.4. El ratón C57BL/6J y la disminución del riesgo aterogénico por consumo de dietas basadas en harinas de vaina de mezquite.	63
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	71
7. REFERENCIAS.	73
8. ANEXOS.	93

A. Artículo 1;

Luis Díaz-Batalla, Juan P. Hernández-Urbe, Alma D. Román-Gutiérrez, Raquel Cariño-Cortés, Javier Castro-Rosas, Alejandro Téllez-Jurado & Carlos A. Gómez-Aldapa. (2018) Chemical and nutritional characterization of raw and thermal-treated flours of Mesquite (*Prosopis laevigata*) pods and their residual brans. *CyTA - Journal of Food*. 16:1, 444-451.

B. Artículo 2;

Luis Díaz-Batalla, Juan P. Hernández-Urbe, Roberto Gutiérrez-Dorado, Alejandro Téllez-Jurado, Javier Castro-Rosas, Rogelio Pérez-Cadena and Carlos A. Gómez-Aldapa. (2018). Nutritional Characterization of *Prosopis laevigata* Legume Tree (Mesquite) Seed Flour and the Effect of Extrusion Cooking on its Bioactive Components. *Foods*. 2018, 7, 124; doi:10.3390/foods7080124 .

C. Aprobación de protocolo – Comité de Bioética UAEH.

## Índice de tablas.

<b>Tabla 1.</b> Carga de enfermedad (AVISA) en 1990 y 2017 en México y el mundo.	12
<b>Tabla 2.</b> Factores de riesgos metabólicos y relacionados con la dieta.	13
<b>Tabla 3.</b> Mortalidad 1976 – 2017 por ENT y ET en México (porcentaje).	14
<b>Tabla 4.</b> Formulación de dietas.	36
<b>Tabla 5.</b> Composición proximal de las harinas de vaina de mezquite (%).	39
<b>Tabla 6.</b> Contenido de azúcares en harinas de vaina de mezquite (mg/g).	40
<b>Tabla 7.</b> Perfil de aminoácidos en harinas de vaina de mezquite (mg/g proteína).	41
<b>Tabla 8.</b> Aminoácidos esenciales en harinas de vaina de mezquite (mg/g proteína).	42
<b>Tabla 9.</b> Rasgos nutrimentales de harinas de mezquite y su implicación en aterogénesis.	43
<b>Tabla 10.</b> Efecto del procesamiento sobre compuestos activos de las harinas.	52
<b>Tabla 11.</b> Composición de dietas formuladas con harinas de vaina de mezquite.	56
<b>Tabla 12.</b> Ganancia de peso y consumo de alimento promedio del ratón C57BL/6J en los tratamientos con las dietas 1, 2, 3, y 4.	58
<b>Tabla 13.</b> Química sanguínea de 4 elementos e índice aterogénico en ratón C57BL/6J después del periodo de tratamiento con las dietas 1, 2, 3, y 4.	61

## Índice de figuras.

<b>Figura 1.</b> Fracciones de la molienda de la vaina de mezquite.	38
<b>Figura 2.</b> Fenoles totales en harinas de vaina de mezquite.	45
<b>Figura 3.</b> Fenoles totales en harina integral fermentada de mezquite.	45
<b>Figura 4.</b> Captación de radical DPPH en harinas de vaina de mezquite.	46
<b>Figura 5.</b> Captación de radical DPPH en harina integral fermentada de mezquite.	47
<b>Figura 6.</b> PRM (Abs a 290 nm) en harinas de vaina de mezquite.	48
<b>Figura 7.</b> PRM (Abs a 290 nm) en harina integral fermentada de mezquite.	49
<b>Figura 8.</b> Contenido de apigenina en harinas de vaina de mezquite.	51
<b>Figura 9.</b> Contenido de apigenina en harina integral fermentada de mezquite.	51
<b>Figura 10.</b> Estructura química de la apigenina.	55
<b>Figura 11.</b> Crecimiento del ratón C57BL/6J consumiendo las dietas 1, 2, 3 y 4.	58
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de grasa visceral del ratón C57BL/6J al finalizar el tratamiento con las dietas.	59

## RESUMEN

Las patologías cardiovasculares representan la mayor carga de enfermedades no transmisibles (ENT) en México y en el mundo. La génesis de estas enfermedades tiene en común el desarrollo de la placa aterosclerótica en el tejido vascular. La etapa temprana de la aterogénesis está condicionada a la existencia de dislipidemia, es decir altos niveles de colesterol y de triglicéridos asociados a altos niveles de lipoproteínas de baja densidad (LBD) y la activación del endotelio vascular, que favorecen la formación de células espumosas por acumulación de LBD oxidadas en el endotelio vascular, lo que disminuye la producción y biodisponibilidad del óxido nítrico (NO). Este ambiente aterogénico favorece la formación y evolución de la placa aterosclerótica. En la etapa temprana los antioxidantes pueden inhibir la oxidación de las LBD e incrementar la producción y biodisponibilidad del NO. Alimentos que inducen nivel sanguíneos bajos de colesterol y triglicéridos y que incorporan antioxidantes a la dieta, tienen el potencial de prevenir el desarrollo del ambiente aterogénico, disminuyendo el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV). Las leguminosas han sido descritas como alimentos con el potencial de disminuir la aterogénesis. El mezquite es una leguminosa actualmente subutilizada de amplia distribución en la república Mexicana, incluyendo el estado de Hidalgo, cuya caracterización nutrimental y nutracéutica es limitada. En el presente trabajo se analiza el valor nutrimental y el contenido de compuestos activos en harinas de vainas de la leguminosa *Prosopis laevigata*. Se analiza el efecto del consumo de dietas obtenidas por extrusión, formuladas con harinas de vaina de mezquite, utilizando el ratón C57BL/6J, un modelo de roedor con susceptibilidad al desarrollo de aterosclerosis y de diabetes por estrés oxidativo. Los resultados en los análisis del perfil nutrimental y el contenido de compuestos activos definen a la vaina de *P. laevigata* como un alimento con propiedades anti-aterogénicas. La dieta a base de semilla de mezquite disminuye significativamente los niveles de colesterol y de triglicéridos sanguíneos en ratón C57BL/6J, un efecto asociado con su carga de compuestos activos como la apigenina, que da evidencia de su potencial anti-aterogénico *in vivo*. No obstante, es necesario realizar más estudios para definir los mecanismos moleculares que generan este efecto.

## 1. ANTECEDENTES.

### 1.1. Carga de enfermedad en el mundo y en México.

Paralelo al crecimiento económico, la urbanización y la globalización de las últimas cuatro décadas, se ha generado un cambio en la cantidad y en la calidad de la dieta humana y en la epidemiología de las enfermedades asociadas a ella [1]. Este cambio, es de tal grado, que se ha convertido en uno de los mayores retos en el área de salud a nivel mundial, pues afecta la calidad de vida de una de cada tres personas [1].

La malnutrición se refiere a deficiencias o excesos en la dieta de los individuos, que les acerca a un estado de enfermedad [1]. La doble carga de malnutrición es la coexistencia de desnutrición aguda o crónica, deficiencia de micronutrientes y sobrepeso, obesidad o enfermedades no transmisibles (ENT) en individuos y poblaciones que habitan una misma región durante el curso de su vida [1, 2].

En 2014, el número de personas subalimentadas a nivel mundial, fue de 783.7 millones, para 2017, este número incrementó a 820.8 millones, planteando un retroceso en las tendencias de la última década y un reto a los gobiernos [3, 4]. En 2016, a nivel mundial, se reportaron 264 millones de mujeres en edad reproductiva, con anemia, por deficiencia de hierro, 462 millones de adultos con bajo peso y 207 millones de niños menores de 5 años, con desnutrición aguda o crónica [1, 3].

En 2016, a nivel mundial, se reportaron dos mil millones de adultos con sobrepeso, 600 millones con obesidad y 41 millones de niños menores de 5 años, con obesidad [1]. En 2016, el número de muertes totales en el mundo, fue de 57 millones, el 71% (41 millones) fueron debidas a enfermedades no transmisibles (ENT), principalmente enfermedades cardiovasculares (ECV) (17.9 millones, equivalente al 44%), cáncer (9 millones, equivalente al 22%), enfermedades respiratorias crónicas (3.8 millones, equivalente al 9%) y diabetes (1.6 millones, equivalente al 4%) [5]. El riesgo de morir por alguna de las cuatro principales ENT, entre los 30 y 70 años es del 18%, problema particularmente grave en países de ingreso medio bajo (PIMB), donde se concentra el 75% de carga de ENT del mundo [5, 6].

La carga de enfermedad global total (mortalidad y morbilidad), expresada en años de vida saludable perdidos (AVISA), asociada a enfermedades transmisibles,

desnutrición y saneamiento, ha disminuido considerablemente durante las últimas cuatro décadas, mientras que las ENT han aumentado [7].

En 1990 los principales 12 factores de riesgo, que configuraron la carga de enfermedad global total fueron, en orden decreciente; desnutrición infantil, falta de agua potable, hipertensión arterial, emisión de gases por combustión casera, uso de tabaco, partículas en el ambiente, saneamiento insuficiente, falta de lactancia, falta de lavado de manos, hiperglicemia, consumo de alcohol e hipercolesterolemia. En 2015, los 12 principales factores de riesgo fueron, en orden decreciente; hipertensión, uso de tabaco, hiperglicemia, alto índice de masa corporal (IMC), desnutrición infantil, partículas en el ambiente, hipercolesterolemia, emisión de gases por combustión casera, consumo de alcohol, alto consumo de sal, bajo consumo de granos integrales y bajo consumo de frutas [7].

El 33 % de la carga global de enfermedad (AVISA) de 2015 fue debida a enfermedades cardiovasculares (ECV) [7]. Las ECV, son la principal causa de muerte a nivel mundial, con el 31 % de las muertes totales. En 2016, las ECV, causaron la muerte de 17.9 millones de personas, el 75 % de estas muertes, sucedieron en PIMB. El 35 % de las muertes prematuras (antes de los 70 años) mundiales de 2015, fueron causadas por ECV [8].

El 35 % de esta carga global de enfermedad de 2015, fue debida 5 factores de riesgo; mala alimentación (dietas altas en sodio y en cárnicos procesados y dietas bajas en frutas, verduras, leguminosas y granos integrales), hipertensión, alto índice de masa corporal y niveles altos de glucosa y colesterol en sangre [7]. Aunque las ENT, enfermedades cardiovasculares principalmente, representan el principal problema de salud actual a nivel mundial, la desnutrición materna e infantil aún persiste de forma importante, representando el 7 % de la carga total de enfermedad [7].

Para los países de América Latina y el Caribe, en donde se incluye a México, los principales tres factores de riesgo en la carga de enfermedad de 2015 fueron hipertensión, alto IMC e hiperglucemia [7]. En los PIMB, que han experimentado un desarrollo económico en estas tres décadas, se han reducido considerablemente las enfermedades infecciosas y de nutrición, pero de forma importante las ENT han

surgido como principal tema de salud en estas regiones [7]. La urbanización, el cambio en la dieta y en el tipo de actividades laborales que acompañan al desarrollo económico, factores que se han reconocido como los principales que dirigen este cambio en la salud humana [7].

Las políticas de desarrollo en estos países, incluyendo a México, deben considerar este efecto colateral e incluir los esquemas de prevención adecuados, que atiendan esta tendencia. Las estrategias enfocadas a la modificación de los sistemas alimentarios hacia la reducción en el consumo de sal, azúcar y grasas, no son suficientes y es necesaria la inclusión de estrategias que modifiquen el sistema de consumo de alimentos global, hacia el incremento en el consumo de granos integrales, frutas, vegetales y leguminosas [7].

En México, las enfermedades transmisibles, relacionadas con la maternidad y la desnutrición, han disminuido en las últimas décadas, al mismo tiempo que las enfermedades no transmisibles, se han incrementado considerablemente (**Tabla 1**) [7, 9, 10]. En 1990, la carga de enfermedad, expresada como porcentaje de años de vida saludable perdidos (AVISA), en México se constituyó en un 50 % por ENT, en un 34.7 % por enfermedades transmisibles y enfermedades relacionadas con la maternidad y la nutrición (ETMN) y en un 15.3 % por lesiones. En 2017 esta carga de enfermedad cambio a 71, 12.8 y 16 %, respectivamente [10].

**Tabla 1.** Carga de enfermedad (AVISA) en 1990 y 2017 en México y el mundo.

	Mundo (%)		México (%)	
	1990	2017	1990	2017
ECV	43.2	62	50	71.2
ETMN	46.3	28	34.7	12.8
Lesiones	10.5	10	15.3	16

AVISA; Años de vida saludable perdidos, ECV; Enfermedades cardiovasculares, ETMN; Enfermedades transmisibles y enfermedades relacionadas con la maternidad y la nutrición. Elaborado con datos de la referencia 10.

En 2017, el 24 % de la carga de enfermedad en México, expresada como AVISA, fue debida a ECV (10.3 %) y diabetes e insuficiencia renal (13.7 %), enfermedades

que duplicaron su participación registrada en 1990. La carga de enfermedad por neoplasias pasó de 5.6 % en 1990 a 8.1 % en 2017, mientras que las deficiencias nutrimentales pasaron de 3.3 a 1.2 % en el mismo periodo [10].

La carga de ECV y diabetes se asoció con dos grupos de factores de riesgo principalmente; factores de riesgo metabólicos y factores de riesgo relacionados con la dieta (**Tabla 2**). En 2017 el 76 % de la carga de ECV y el 99 % de la carga de diabetes y enfermedades renales fue atribuido a factores de riesgo metabólicos. A los factores de riesgo relacionados con la dieta se les atribuyó el 50 % de la carga de ECV y el 25 % de la carga de diabetes y enfermedades renales.

**Tabla 2.** Factores de riesgos metabólicos y relacionados con la dieta.

Factores Metabólicos	Factores relacionados con la dieta	
	Dieta baja en	Dieta alta en
Hiperglicemia	Frutas	Carnes rojas
Hipercolesterolemia	Vegetales	Carnes procesadas
Hipertensión	Leguminosas	Bebidas azucaradas
Alto IMC	Granos integrales	Ácidos grasos trans
Baja densidad ósea	Lácteos	Sodio
Insuficiencia renal	Fibra	
	Calcio	
	Omega – 3	
	Ácidos grasos polinsaturados	

IMC; Índice de masa corporal. Elaborado con información de la referencia 7 y 10.

En 1976, las enfermedades transmisibles, fueron la principal causa de muerte en México, con el 39.2 %, para 2017 este grupo de enfermedades se redujeron considerablemente y las enfermedades no transmisibles (cáncer, ECV, diabetes y enfermedad renal), pasaron a ser la principal causa de muerte con el 40 % (**Tabla 3**) [9]. Las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo II, son en la actualidad, las principales causas de muerte en México [9, 11, 12], un país en el que la esperanza de vida al nacer es de 75 años (85 para OCDE), el porcentaje de la población con diabetes es del 16% (la más alta de la OCDE), mientras que más del

73 % de la población adulta y el 35 % de la población infantil presentan sobrepeso u obesidad [12, 13].

Desde la perspectiva de la mortalidad y morbilidad las enfermedades no trasmisibles (ENT), ECV y diabetes mellitus, principalmente, son los retos protagonistas de los actuales sistemas de salud en México y en el mundo. Las ECV y la diabetes mellitus, comparten factores de riesgo metabólico y relacionados con la dieta que son susceptibles de ser modificados a través de esquemas preventivos de modificación de hábitos alimentarios. La información epidemiológica no puede separar a estas dos enfermedades, pues más del 50 % de los individuos con diabetes, mueren por ECV [14]. Lo anterior, representa la mayor área de oportunidad para las políticas de salud y los sistemas de producción y procesamiento de alimentos de alta demanda, dirigidos a mejorar la vida de la población y abatir el costo económico de la carga de enfermedad.

**Tabla 3.** Mortalidad 1976 – 2017 por ENT y ET en México (porcentaje).

Tipo	Enfermedad	% 1976	% 2017
ENT	Cáncer cérvico-uterino	1.5	0.6
	Cáncer de mama	0.6	1.1
	Hipertensiva	0.7	<b>4.2</b>
	Cerebrovascular	4	<b>6.6</b>
	Cardiopatía isquémica	2.8	<b>8.8</b>
	Diabetes mellitus	5.7	16.4
	Insuficiencia renal	2.3	2.8
	<b>Total ENT</b>	<b>17.6</b>	<b>40.5</b>
ET	Tuberculosis pulmonar	2.7	0.2
	Infección intestinal	15.2	0.7
	Afección perinatal	12.7	2
	Neumonía	8.6	4.8
	<b>Total ET</b>	<b>39.2</b>	<b>7.7</b>

ENT; Enfermedades no transmisibles, ET; Enfermedades transmisibles. Elaborado con información de la referencia 9.

## 1.2. Génesis de las Enfermedades Cardiovasculares (ECV).

La principal causa de enfermedad cardiovascular (ECV) es la aterosclerosis, un engrosamiento progresivo de la pared arterial, por desarrollo de la placa aterosclerótica, que reduce la luz o lumen arterial y el flujo sanguíneo en consecuencia [15]. Si la placa aterosclerótica, además de disminuir el flujo sanguíneo, se rompe súbitamente formando un coágulo que obstruye totalmente el flujo sanguíneo, se puede generar un infarto al miocardio o embolia cerebral con consecuencias fatales [15, 16].

La aterogénesis o formación de la placa aterosclerótica es un proceso complejo, que implica diversas etapas y mecanismos moleculares, que modifican la pared vascular [16]. La pared vascular es una estructura tubular, multicapa, que contiene y distribuye el flujo sanguíneo. La capa en contacto directo con la sangre es el endotelio vascular (células endoteliales), posteriormente se encuentra la túnica íntima conformada por tejido conectivo, lamina elástica y músculo liso, después se encuentra la túnica media y más al exterior la túnica adventicia [15, 16].

El primer paso, en el proceso de formación de la placa aterosclerótica, es el paso de lipoproteínas de baja densidad (LBD que contienen apolipoproteína B y son ricas en colesterol), a través del endotelio vascular y su deposición en la túnica íntima. Estas deposiciones de LBD, permiten que en la región de la lesión, se agreguen monocitos a la pared endotelial, que posteriormente también migran a la túnica íntima y se diferencian en macrófagos [15, 16, 17].

Los macrófagos fagocitan y acumulan partículas de LBD transformándose en células espumosas. Estas células espumosas mueren, formando un núcleo necrótico al que se asocian células del tejido muscular liso [15, 16]. Este complejo continúa su desarrollo, generando la deposición de tejido fibroso en la lesión y atrayendo monocitos, que en conjunto, producen una matriz extracelular y hacen más estrecho el lumen vascular [16].

La agregación de células inflamatorias del sistema inmune en la lesión, genera un estado de inflamación crónica. La lesión modifica la estructura vascular, obstruyendo el flujo sanguíneo, que puede romper el epitelio vascular, generando

un trombo expuesto al lumen vascular con consecuencias fatales, infarto al miocardio o embolia [15, 16].

Altos niveles de lipoproteínas de baja densidad (LBD) en sangre son un detonante del proceso aterogénico. Estas lipoproteínas se difunden pasivamente entre las células endoteliales y se acumulan en la matriz sub-endotelial. A mayores niveles de LBD circulante, mayor transporte y acumulación [16, 17]. Las zonas de mayor susceptibilidad son las regiones vasculares curvadas y de ramificación en donde el flujo sanguíneo no es laminar. Una vez que la LBD ha pasado a través del endotelio vascular su fracción ApoB - lipoproteína (a), interacciona con la matriz de proteoglicanos generando su retención y acumulación [16].

Una vez que la LBD es retenida en el sub-endotelio, se expone a ser modificada por oxidación, lipólisis y proteólisis, estimulando al epitelio vascular a producir y exponer moléculas de adhesión que favorecen el reclutamiento de monocitos y linfocitos, fenómeno conocido como “activación del endotelio” [16, 17, 18]. La activación del endotelio, es considerada como un estado pro-inflamatorio, pro-coagulante, pro-oxidante y pro-aterogénico, por su acción de reclutamiento y adhesión al epitelio vascular de células inflamatorias [18].

Una de las principales modificaciones de LBD, es su oxidación por exposición a especies reactivas del oxígeno producidas por actividad lipooxigenasa [16, 17, 18]. Esta LBD oxidada, estimula a las células endoteliales a producir moléculas pro-inflamatorias (factor estimulante de colonias de monocitos y proteína quimio-atrayente de monocitos), que atraen a las células inflamatorias y además, reducen la producción de óxido nítrico, un factor descrito como anti-aterogénico, que favorece la homeostasis vascular y particularmente la vaso-relajación [16].

La producción de especies reactivas del oxígeno por células endoteliales, macrófagos y actividad de enzimas como mieloperoxidasas, esfingomielinasas y fosfolipasas, genera oxidación de la LBD y su posterior fagocitosis por macrófagos, mediado por sus receptores SR-A1, CD36 y CD68 [16]. La acumulación de lípidos en los macrófagos, les convierte en células espumosas, que posteriormente mueren y dan paso a la generación y crecimiento progresivo de la placa fibrosa aterosclerótica, con consecuencias obstructivas que pueden ser fatales [16].

El endotelio vascular, es una mono-capa de células endoteliales que representan una barrera física entre la sangre y los tejidos, además, regula el flujo de sustancias entre ellos. Este tejido endotelial regula la homeostasis vascular, metabolizando, sintetizando y liberando, sustancias con actividad vasodilatadora, vasoconstrictora o que participan en reacciones inflamatorias y en la coagulación [16, 19]. Cualquier acción, como la hipercolesterolemia, hiperglicemia, modificación del flujo laminar y activación del endotelio, que perturbe esta capacidad reguladora puede generar disfunción endotelial, un estado considerado como aterogénico [19, 20].

La disfunción endotelial, implica en general, la pérdida de la homeostasis vascular y particularmente la disminución de la capacidad vasodilatadora por una disminución en la producción o en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) [19, 21]. El NO es un gas soluble, con una vida media de entre 6 y 30 s, que es sintetizado por el endotelio vascular, a partir del aminoácido L-Arginina (Arg) [21, 22]. La óxido nítrico sintetasa (ONS), es la enzima responsable de catalizar la producción de NO a partir de Arg [22].

La producción de NO puede ser afectada por una deficiencia en la disponibilidad de arginina, por la existencia de inhibidores, como la dimetilarginina asimétrica (DMAA), por modificaciones en la actividad catalítica de la ONS y por estrés oxidativo. La hipercolesterolemia, puede inducir disfunción endotelial, reduciendo la producción de NO por las causas antes mencionadas [22].

La concentración de Arg, sustrato de la ONS para la producción de NO, puede ser reducida y condicionada por la acción de la enzima arginasa, que convierte a la arginina en ornitina y urea. La actividad arginasa puede ser estimulada por hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y estrés oxidativo [23, 24, 25, 26]. La inhibición de la arginasa, contribuye a disminuir el desarrollo de disfunción endotelial y aterosclerosis [26, 27, 28, 29]. Algunos de estos inhibidores de la arginasa, son metabolitos secundarios de plantas, del grupo de los compuestos fenólicos [24, 30, 31]. La suplementación de la dieta con arginina o la administración farmacéutica de esta, disminuye los signos de la disfunción endotelial [32, 33, 34, 35].

La dimetilarginina asimétrica (DMAA), es un inhibidor de la ONS que compite con la arginina por el sitio activo, inhibiendo la producción de NO y generando disfunción

endotelial [33, 34, 35]. La presencia de DMAA es el resultado de la metilación de arginina en las proteínas, por acción de las metiltransferasas. La dimetil-amino-hidrolasa transforma a la DMAA en citrulina y dimetilamina, que son eliminadas en la orina [25, 35]. La hipercolesterolemia y niveles altos de LBD favorecen la acción de metiltransferasas e inhiben la acción de dimetil-amino-hidrolasas, induciendo la acumulación de DMAA, que inhibe a la ONS, impidiendo la producción de NO y generando disfunción endotelial [25, 33, 34, 35].

Altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) o nitrógeno (ERN), inducen a una rápida inactivación de NO para formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). El peroxinitrito puede modificar la reacción redox de ONS, oxidando a su cofactor tetrabiopterina (BH<sub>4</sub>) y desacoplando la producción de NO [27, 36]. En ausencia de arginina, la ONS cataliza la transferencia de electrones a oxígeno molecular en lugar de transferirlos a arginina, produciendo superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), en lugar de NO. El superóxido formado, reacciona rápidamente con el NO, produciendo peroxinitrito y agudizando la disfunción endotelial [23, 32, 35].

La hipercolesterolemia, favorece el estrés oxidativo al incrementar la actividad de NADPH oxidasa, xantina oxidasa y mieloperoxidasa en el endotelio vascular activado y produciendo ERO, que disminuyen la disponibilidad y producción de NO [18, 20, 21]. A diferencia de LBD, que es aterogénica, la lipoproteína de alta densidad (LAD), se considera anti-aterogénica. La LAD es la encargada de transportar el colesterol de la circulación y de los tejidos periféricos al hígado, donde es metabolizado y eliminado por vía biliar. Además, la LAD tiene propiedades antioxidantes, que inhiben la oxidación de fosfolípidos [15, 16].

Niveles elevados de colesterol y de LBD, han sido descritos como los principales detonantes del desarrollo temprano de la disfunción endotelial y de la aterosclerosis, dos condiciones patológicas condicionantes de la enfermedad cardiovascular.

### 1.3. Metabolismo de lípidos y dislipidemia.

El colesterol y los triglicéridos, son los principales tipos de lípidos de relevancia en el metabolismo energético, ambos son insolubles en agua y para su transporte y distribución en sangre, a través del sistema circulatorio, deben asociarse a proteínas [36, 37]. Estas proteínas, transportadoras de lípidos, denominadas lipoproteínas

participan en tres principales vías de transporte; vía endógena, vía exógena y transporte reverso [37, 38].

La vía exógena, implica el transporte de los lípidos provenientes de la dieta, del sitio de absorción en el intestino a distribución sistémica y principalmente al hígado. Este transporte es realizado por la lipoproteína denominada quilomicrón, que es una partícula sintetizada por los enterocitos, formada por triglicéridos (93 %), colesterol (3 %) y apolipoproteínas (ApoB-48, ApoAI, ApoAII, ApoC, ApoE) [36, 37]. En su paso por el sistema circulatorio, el quilomicrón, distribuye triglicéridos a otros tejidos (corazón, músculo y tejido graso) por acción de la lipoproteinlipasa (LPL) y su remanente es absorbido en el hígado [38, 39].

La vía endógena implica el transporte de triglicéridos y de colesterol del hígado a otros tejidos. Para esto el hígado sintetiza lipoproteínas de muy baja densidad (LMBD), formadas por triglicéridos (95 %), colesterol (2 %) y apolipoproteínas (ApoB-100, ApoC, ApoE). LPL permite la descarga de triglicéridos de LMBD a los tejidos periféricos (corazón, músculo y tejido graso), convirtiéndose en una lipoproteína de densidad intermedia (LDI) [36, 37]. Esta LDI continúa la distribución de triglicéridos, hasta que interacciona con su receptor en el hígado, donde es transformada a lipoproteína de baja densidad (LBD), compuesta por triglicéridos (30 %), colesterol (45 %) y apolipoproteínas (ApoB-100) [38, 39].

El transporte reverso, implica el transporte de lípidos y colesterol principalmente, de tejidos periféricos y lesiones aterogénicas, al hígado, para su posterior vinculación en la síntesis de ácidos biliares y su excreción en la bilis [36, 39]. Este transporte es realizado por lipoproteínas de alta densidad (LAD), formadas por triglicéridos (30 %), colesterol (25 %) y apolipoproteínas (ApoAI, ApoAII) [40, 41, 42].

Las lipoproteínas LMBD, LDI y LBD, que tienen como componente más importante a la ApoB-100, se consideran aterogénicas, mientras que la LAD, cuyo componente principal es ApoA y no presentan ApoB-100, se consideran anti-aterogénicas [40, 41]. Las LAD pueden transportar colesterol de macrófagos, en lesiones aterogénicas, al hígado. Particular importancia en la aterogénesis tiene LBD, dado su alto contenido de colesterol y su capacidad de retención y acumulación por la matriz extracelular de la túnica íntima [40, 42, 43].

La dieta es la principal fuente de lípidos para el organismo. Los triglicéridos de la dieta, son hidrolizados a ácidos grasos y monoacilglicerol por las lipasas intestinales, posteriormente son emulsificados con ácidos biliares, colesterol, esteroides de origen vegetal y vitaminas liposolubles para formar micelas [42, 43, 44]. La principal fuente de colesterol intestinal no es necesariamente la suministrada por la dieta, considerándose que la reabsorción de los componentes de la bilis, es la principal fuente de colesterol intestinal [43, 44]. Los ácidos grasos y monoacilglicerol son usados para formar triglicéridos en el enterocito y posteriormente, son agrupados junto con los ésteres de colesterol y ApoB-48, para formar quilomicrones [43, 44]. El tamaño y composición de los quilomicrones dependen de la dieta, una dieta alta en lípidos, generara quilomicrones de gran tamaño [43, 45].

Los quilomicrones llegan a la circulación sistémica en donde distribuyen triglicéridos y colesterol al tejido muscular y graso, con ayuda de la lipoproteinlipasa (LPL) presente en estos tejidos [38]. La fracción ApoC del quilomicron permite activar la acción de la LPL y liberar ácidos grasos que pueden ser usados para producción de energía o almacenamiento [43, 44].

La distribución de triglicéridos reduce el tamaño del quilomicron y su remanente esta enriquecido en colesterol. Los fosfolípidos, ApoA y ApoC, del remanente del quilomicron, pueden ser transferidos a LAD, disminuyendo la capacidad del remanente de seguir distribuyendo triglicéridos [38]. Este remanente es capturado por el hígado, utilizando ApoE como ligando y terminando su función. El colesterol del remanente de quilomicron puede ser utilizado para la generación de ácidos biliares y LMBD en el hígado [44].

La disponibilidad de triglicéridos y colesterol en el hígado, determinan la síntesis de ApoB-100 y el ensamble de LMBD [40, 41]. La presencia de fructosa en la dieta genera la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos en el hígado. Esta lipogénesis genera acumulación de lípidos, resistencia a la insulina y síntesis de LMBD [45, 46]. Una vez ensamblada la LMBD, sale del hígado a circulación sistémica y reparte triglicéridos de manera semejante a como lo hace el quilomicron. Dado que el proceso de descarga de triglicéridos del quilomicron y la LMBD a tejidos periféricos

depende de LPL, altos niveles sanguíneos de quilomicrones pueden inhibir la descarga de LMBD [37, 40]. La descarga de LMBD por transferencia de triglicéridos a tejidos periféricos las convierte en lipoproteínas de densidad intermedia (LDI), enriquecidas en colesterol, que son capturadas por el hígado utilizando su fracción ApoE como ligando [44, 45].

Las LDI continúan perdiendo triglicéridos hasta convertirse en lipoproteínas de baja densidad (LBD) [42, 45]. Es decir las lipoproteínas de baja densidad (LBD), altamente aterogénicas, son un producto de las LMBD y estas, a su vez, se producen de forma directamente proporcional a la cantidad de lípidos que llegan al hígado.

La cantidad de LBD presentes en circulación es resultado de su generación y su captura y degradación en el hígado. El receptor de quilomicrones, LMBD, LDI y LBD en el hígado, reconoce a ApoE como ligando para capturar y posteriormente degradar estas lipoproteínas [36, 37]. Una alta expresión y actividad de este receptor, disminuye la producción de LAD debido al incremento en la captura de LDI. Una baja expresión y actividad de este receptor incrementa la producción de LBD, debido a la reducción en la captura de LDI. El 70 % de la captura de LBD es llevada a cabo en el hígado, vía receptor de LBD hepático. El aumento en el número de receptores LBD incrementa la captura de LBD, disminuyendo su concentración en sangre [40, 43, 45].

Los niveles de receptor LBD en el hígado, están regulados principalmente por el contenido de colesterol en el hígado. Si los niveles de colesterol en el hepatocito disminuyen, se estimula la expresión del receptor de LBD y de la enzima HMG CoA reductasa, principal enzima para la síntesis de colesterol. Si los niveles de colesterol en el hepatocito aumentan, no se estimula la expresión de receptor LBD y se activa la degradación de los receptores LBD vía ubiquitinación. Altos contenidos de colesterol en hepatocitos, inhibirán la expresión de receptor LBD y consecuentemente, incrementará los niveles de LBD en sangre, generando un ambiente aterogénico [36, 39, 44].

La lipoproteína de alta densidad (LAD), es sintetizada en el intestino y en el hígado. La LAD circulante, adquiere colesterol de tejidos periféricos y de otras lipoproteínas

[44, 45]. Adipocitos y células musculares expresan el transportador ABCA1 que facilita la transferencia de colesterol a LAD. La LAD, también obtiene colesterol y fosfolípidos de quilomicrones y LBD, con ayuda de la actividad de LPL [36, 38, 40]. El colesterol de las LAD puede ser transferido a apolipoproteínas que contienen ApoB en intercambio por triglicéridos [39, 40, 41]. La lipasa hepática puede remover estos triglicéridos, generando LAD pequeñas, que son degradadas con mayor facilidad. Esta actividad de la lipasa hepática se incrementa en condiciones de resistencia a la insulina, generando bajos niveles de LAD circulante [43, 45].

El colesterol de las LAD es llevado al hígado, principalmente, donde es tomado por el receptor SRB1 y una LAD de menor tamaño es generada y regresada a circulación sistémica [36, 37, 39]. La ApoA, principal lipoproteína de las LAD, es metabolizada independientemente del colesterol que transporta, en su mayoría es degradada en los riñones. Las LAD que han sido desprovistas de su carga lipídica, tienen alta susceptibilidad de ser degradadas [40, 41].

La mayoría de las células del organismo humano, no tienen la capacidad de catabolizar colesterol, algunas de ellas pueden generar hormonas a partir de este, por lo que la principal forma de abatir el contenido de colesterol, es por transporte reverso de este [45, 46, 47]. El paso del colesterol de tejidos periféricos a las LAD, está determinado por el transportador ABCA1 y por difusión simple, principalmente. Altos niveles de colesterol en tejidos, inducen la expresión de ABCA1, incrementando la salida de colesterol a LAD y reducen la expresión de LBD, inhibiendo la absorción de colesterol [47].

Una vez que el colesterol es transferido a las LAD, estas interaccionan con SRB1 en el hígado, descargando el colesterol selectivamente [47, 48]. Las LAD también pueden transferir colesterol a lipoproteínas que contienen ApoB y estas posteriormente son capturadas por el hígado [45, 46]. El colesterol en el hígado puede ser liberado directamente en la bilis o es convertido en ácidos biliares. Altos niveles de colesterol hepático estimulan su liberación en la bilis [37].

La homeostasis del metabolismo de lípidos es un proceso complejo, susceptible de ser modificado por múltiples causas y condiciones [48, 49]. El trastorno en el metabolismo de lípidos, que favorece un ambiente aterogénico, que implica el

incremento en la cantidad de lipoproteínas aterogénicas (ApoB-100) circulantes y una disminución de lipoproteínas anti-aterogénicas (ApoA), se le denomina dislipidemia [48, 49].

La dislipidemia, se caracteriza por niveles elevados en colesterol, triglicéridos y apolipoproteína aterogénica ApoB-100 (LMBD, LDI, LBD) en sangre y una disminución de lipoproteínas de alta densidad (LAD) [49, 50]. La dislipidemia puede ser clasificada como primaria o secundaria, la dislipidemia primaria, es de origen genético o directamente asociado a la dieta y la secundaria, más frecuente, se asocia a modificaciones metabólicas derivadas de otras enfermedades como diabetes e hipotiroidismo [48, 50].

Dietas con alto contenido calórico, ricas en triglicéridos, colesterol y fructosa, generan las condiciones para la síntesis de LMBD [46]. Esta lipoproteína se convierte en LBD, una lipoproteína enriquecida en colesterol que es particularmente aterogénica [47]. La hiperlipidemia inhibe la expresión de receptores de LBD en el hígado, incrementado su concentración en sangre y generando un ambiente aterogénico [48].

El sobrepeso y la obesidad están asociados con el desarrollo de resistencia a la insulina, esta condición incrementa la lipólisis y el flujo de ácidos grasos y triglicéridos del tejido adiposo al hígado, favoreciendo la síntesis de LMBD y el ambiente aterogénico [49, 50]. La insulina inhibe la lipólisis en tejidos periféricos [50]. El sobrepeso y la obesidad, también están relacionados con la reducción en la actividad y en la expresión de la lipoproteinlipasa, lo cual, mantiene en circulación a las lipoproteínas ricas en triglicéridos, como la LMBD [47, 48, 50]. En la mayoría de los casos, la dislipidemia, es una condición asintomática, una vez diagnosticada el riesgo aterogénico puede ser eminente y de pronóstico incierto [50, 51].

Diversas estrategias farmacológicas han sido desarrolladas para su control. Estatinas, fibratos, azetimibe y ácido nicotínico son algunas de las opciones de control farmacológico de la dislipidemia, sin embargo, ninguno de los esquemas farmacológicos puede sustituir a las estrategias dirigidas a prevenir su desarrollo [43, 44, 51]. El ejercicio y dietas de bajo contenido calórico, bajas en grasas y ricas

en fibra pueden contribuir a restaurar la sensibilidad a la insulina y reducir la carga de lípidos, reduciendo la síntesis de LMBD y LBD [44, 51].

#### 1.4. Dieta y enfermedades cardiovasculares.

A nivel mundial, la mortalidad total, disminuye un 56 % cuando se incluye en la dieta un consumo alto de cereales integrales, leguminosas, vegetales, frutas, nueces y pescado, mientras que cuando en la dieta se incluye un consumo alto de azúcares, carnes rojas y cárnicos procesados la mortalidad total, se incrementa considerablemente [52].

En 2017, la carga de enfermedad (mortalidad y morbilidad) asociada a enfermedades cardiovasculares en el mundo y en México, fue atribuida a factores de riesgo en la dieta, con un 56 y 50 %, respectivamente. Los factores de riesgo en la dieta son dos; dietas con bajo consumo de frutas, vegetales, leguminosas, granos integrales, nueces, fibra, pescado y lácteos o dietas con alto consumo de carne roja, cárnicos procesados, bebidas azucaradas, ácidos grasos trans y sodio [7, 10].

Un consumo alto, más de cuatro raciones al día, de frutas, vegetales y leguminosas (una ración = 125 g de frutas o vegetales o 150 g de leguminosas cocidas), se ha asociado con menor incidencia y mortalidad por enfermedades cardiovasculares en Asia, América y Europa [53, 54]. Estos grupos de alimentos contienen antioxidantes, que pueden proteger al endotelio vascular de lesiones aterogénicas [53]. El consumo de granos integrales, también está inversamente relacionado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, mientras que el consumo de azúcares refinadas, carnes rojas y cárnicos procesados, está directamente relacionado al desarrollo de ECV [54].

El consumo diario que permite obtener el beneficio de protección cardiovascular, es de al menos tres raciones de granos integrales (90 g), tres raciones de frutas y vegetales (250 g) y una ración de leguminosas (100 g). El consumo diario, para incrementar en un 60 % el riesgo cardiovascular, es de dos raciones de carne roja (170 g), dos raciones de cárnicos procesados (60 g) y dos raciones de bebidas azucaradas (500 mL), en comparación con su ausencia en la dieta [54, 55].

La evidencia epidemiológica ha generado guías alimentarias dirigidas a reducir el riesgo cardiovascular. Estas, en general, plantean una dieta que priorice la

presencia de granos integrales, vegetales y frutas, que incluya productos lácteos, peces, aves, leguminosas y nueces, que limite la ingesta de azúcares, sal, carnes rojas y cárnicos procesados [54]. Estas guías alimentarias deberán mantener el consumo de grasas saturadas por debajo del 7% de la ingesta energética, sodio menos de 2400 mg/día y el colesterol por debajo de los 200 mg/día [54]. Particular importancia tiene la incorporación de carne magra (pescado o aves) o su sustitución por proteína vegetal de leguminosas [54].

Si bien, se ha reportado que un régimen alimentario vegetariano trae consigo menor riesgo cardiovascular, una dieta que incluye la ingesta recomendada de frutas, verduras, leguminosas, granos integrales y nueces, que no exceda los niveles de azúcares, sodio y grasa saturada, puede incorporar alimentos de origen animal, sin incrementar el riesgo cardiovascular [56]. El consumo alto de carnes rojas se ha asociado a hábitos de vida riesgosos (fumar, inactividad física, alcohol), así como el vegetarianismo se ha asociado a hábitos de vida saludables [55, 56]. Cuando la proteína de origen animal se sustituye por proteína vegetal, la disminución del riesgo cardiovascular solo se presenta en quienes mantienen un estilo de vida poco saludable [56, 57, 58].

Se ha mostrado que el efecto de la reducción en el consumo de grasas saturadas depende de la sustitución. Si las grasas saturadas se remplazan por grasas insaturadas o granos integrales puede reducirse el riesgo cardiovascular, pero si se sustituye por carbohidratos refinados o azúcares, el efecto no será significativo [55, 57]. El riesgo cardiovascular incrementa cuando se supera el consumo de grasa saturada, azúcares, colesterol y sal a expensas de una reducción en el consumo de granos integrales, frutas, vegetales y leguminosas [55, 57].

Los alimentos de origen animal, son una fuente de grasas saturadas y un consumo alto de este grupo de alimentos, implica una carga alta de triglicéridos y colesterol, que favorece el ambiente aterogénico. Adicionalmente, este grupo de alimentos ofrece otro componente importante en la homeostasis cardiovascular. Fosfatidilcolina, colina y carnitina, son metabolitos comúnmente presentes en alimentos de origen animal. Estos metabolitos, una vez ingeridos, son metabolizados por la flora microbiana y transformados en trimetilamina (TMA), la

cual, es absorbida en el intestino y transformada en el hígado por las flavin-monooxigenasas a N-óxido de trimetilamina (TMAO por sus siglas en inglés) [59, 60, 61].

El N-óxido de trimetilamina se ha asociado directamente con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares vía aterogénesis, incrementando la expresión de los receptores SR-A1 y CD36 de los macrófagos, así como la subsecuente formación de células espumosas y la generación de la placa aterogénica [59, 61]. TMAO, también reduce el transporte reverso del colesterol, reduciendo la síntesis de ácidos biliares, la principal forma de eliminación de colesterol [60, 61, 62].

La producción de TMAO, es alta en omnívoros, que ingieren regularmente productos de origen animal, mientras que es muy baja en vegetarianos. El tratamiento con antibióticos abate la flora microbiana y se inhibe la producción de TMAO. En omnívoros productores de TMAO, se advierte una menor diversidad de géneros microbianos y un enriquecimiento en el filo Firmicutes en la flora normal [60, 61, 63]. No todos los alimentos asociados a riesgo cardiovascular, son de origen animal. Uno de los principales factores asociado con riesgo cardiovascular, que involucra a un alimento que no es de origen animal, es el consumo alto de bebidas azucaradas. La fructosa es un monosacárido ampliamente utilizado como edulcorante en la industria alimentaria, junto a la glucosa, se encuentra formando a la sacarosa o azúcar común y también se encuentra en productos procesados, que utilizan jarabe de maíz de alta fructosa en su formulación [64, 65].

La fructosa es absorbida en el intestino y metabolizada en el hígado, principalmente, utilizando transportador y enzimas específicas no involucradas con la glucosa y sin influencia de la insulina. Esta vía metabólica no tiene los puntos de regulación de la glucólisis (inhibición de fosfofructoquinasa por ATP o citrato), por lo que cada molécula de fructosa que llega al hígado, es metabolizada, independientemente del estado energético celular, favoreciendo la producción de ácidos grasos, triglicéridos y la síntesis de LMBD [64, 65, 66, 67].

La primera enzima en el metabolismo de la fructosa es la fructoquinasa o cetoheptosaquinasa, esta enzima cataliza la formación de fructosa-1-fosfato, reduciendo los niveles de ATP y generando AMP [66]. Altos niveles de AMP

estimulan la actividad de la AMP deaminasa (AMPD), que inicia la degradación de AMP a ácido úrico [66, 67]. La alta actividad de AMPD, bloquea la oxidación de lípidos favoreciendo la lipogénesis. El ácido úrico generado, alcanza circulación sistémica, donde reduce la producción y disponibilidad de NO, estimulando la degradación de arginina e inactivando directamente al NO, lo que genera disfunción endotelial y ambiente aterogénico [66, 67, 68].

Los alimentos relacionados con riesgo cardiovascular (alto consumo de cárnicos y bebidas azucaradas), inducen su efecto a través de las etapas tempranas de la aterogénesis y de forma muy ligada al metabolismo de lípidos y dislipidemia. Por su parte, los alimentos asociados con reducción del riesgo cardiovascular (leguminosas, vegetales y frutas), no presentan los elementos de riesgo (altos niveles de lípidos, fosfatidilcolina, colina, carnitina y fructosa) e incorporan elementos que pueden reducir el riesgo (fibra, bajo índice glicémico y antioxidantes) [44].

La dieta, puede ofrecer una forma de control del riesgo cardiovascular, con tres estrategias, la sustitución en la dieta de componentes de riesgo, por aquellos que no lo son, la adición específica de componentes en la dieta, que puedan prevenir el riesgo o por la adición de los dos efectos anteriores.

#### 1.5. Leguminosas y enfermedades cardiovasculares.

Las leguminosas son uno de los grupos de alimentos, cuyo consumo se asocia a la reducción de riesgo cardiovascular [7, 10, 69, 70, 71, 72, 73, 74]. El consumo de al menos 90 g de leguminosas cocidas, cuatro veces a la semana, reduce el riesgo cardiovascular en un 20 %, riesgo de enfermedad de arterias coronarias, principalmente, comparado con la ausencia de este grupo de alimentos en la dieta [69, 70, 71, 72, 73, 74]. El consumo de al menos 4 raciones de leguminosas a la semana, reduce significativamente los niveles de triglicéridos, colesterol y LBD en sangre [75, 76, 77, 78].

Estos efectos se asocian a su perfil nutrimental, en general las leguminosas (sin incluir a la soya), contienen bajos contenidos de lípidos y son de índice glicémico bajo, además contienen metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes y son una excelente fuente de fibra soluble [75, 76, 77, 78]. El efecto hipolipemiante

asociado al consumo de leguminosas se ha relacionado, principalmente, con una mayor eliminación de colesterol por vía biliar, debido a la acción de la fibra y a la producción de ácidos grasos de cadena corta, que reducen la síntesis de colesterol en el hígado [75, 76, 77, 78].

Las principales semillas de leguminosas, consideradas en este grupo de alimentos son frijol (*Phaseolus vulgaris*), lenteja (*Lens culinaris*), chícharo (*Pisum sativum*), garbanzo (*Cicer arietinum*) y haba (*Vicia faba*), la soya también pertenece a este grupo, sin embargo, sus características contrastantes (alto contenido de lípidos) y usos industriales (como oleaginosa y en alimentación animal), le excluyen de la generalidad [74, 79].

La característica general de las leguminosas es su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y acumular altas cantidades de proteína en su semilla (16 – 45 %), en comparación con los cereales (7 – 13 %) [79, 80]. Las semillas de leguminosas, además de ser una buena fuente de proteína, también ofrecen cantidades importantes de carbohidratos complejos y fibra [79, 80].

Asociados a estos macronutrientes, también se encuentran fracciones proteicas o metabolitos secundarios descritos como antinutrientes o con actividad biológica [80, 81]. Las semillas de leguminosas, contienen inhibidores de proteasas, amilasas y lectinas, que tiene la capacidad de disminuir la digestibilidad y absorción de nutrientes, sin embargo, el tratamiento térmico apropiado, abate su actividad mejorando el valor nutricional [80, 81].

Componentes como el ácido fítico, los oligosacáridos y metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos, se mantienen durante el tratamiento térmico [81]. El ácido fítico, puede reducir la biodisponibilidad de minerales y al mismo tiempo, puede restringir su participación como catalizadores de reacciones de oxidación [79, 80, 81]. La fermentación de oligosacáridos, fibra soluble y almidón resistente, por la flora normal, puede generar gases y ácidos grasos de cadena corta, que reducen la síntesis hepática de colesterol y favorecen la saciedad [74, 82, 83].

Las semillas de leguminosas, presentan cantidades importantes de compuestos fenólicos, ácidos fenólicos y flavonoides, principalmente que, dada su capacidad

antioxidante, pueden proteger a moléculas como la LBD de la oxidación en la etapa temprana del desarrollo de la lesión aterogénica [74, 79, 80].

Dada la dinámica alimentaria, epidemiológica y ambiental mundial actual, las leguminosas se han establecido como el grupo de alimentos estratégico para alcanzar la producción sustentable de alimentos y reducir la carga de enfermedades no comunicables, por lo que se deberá duplicar su consumo en las siguientes décadas, sustituyendo a la proteína animal [84, 85].

Esta demanda de leguminosas, de los próximos años, puede enfrentarse haciendo uso de leguminosas ya domesticadas de amplio y conocido valor comercial, sin embargo, la biodiversidad ofrece especies y variedades de leguminosas poco conocidas, aun por describir, que pueden incorporarse en el desarrollo de alimentos de alta demanda [86, 87].

#### 1.6. El mezquite o género *Prosopis*.

El género *Prosopis*, es un grupo de especies arbóreas, de la familia Fabaceae, también denominadas mezquite, que involucra a 44 especies, distribuidas principalmente en regiones áridas y semiáridas de Asia, África y América. Las especies del género *Prosopis* fueron un importante cultivo para los pueblos indígenas antes de la llegada de los españoles [88]. El complejo mezquite se encuentra firmemente establecido en más de 3.5 millones de hectáreas del centro-norte de México e incluye nueve de las siguientes especies autóctonas: *P. glandulosa*, *P. juliflora*, *P. velutina*, *P. pubescens*, *P. reptans*, *P. articulata*, *P. tamaripana*, *P. palmeri* y *P. laevigata* [89]. El fruto maduro del género *Prosopis*, es una vaina indehisciente formada por exocarpo, mesocarpo y un endocarpo leñoso que contiene a la semilla [88, 89]. El perfil nutrimental de las vainas y sus fracciones de las especies de *Prosopis*, ha sido descrito; *P. africana* [90, 91], *P. alba* [92, 93, 94, 95], *P. chilensis* [94, 96, 97], *P. glandulosa* [98, 99, 100, 101], *P. juliflora* [94, 102, 103], *P. laevigata* [104, 105], *P. nigra* [94], *P. pallida* [95, 106], *P. ruscifolia* [107, 108], *P. tamarugo* [97], *P. velutina* [99, 101, 109], así como su contenido de compuestos activos y actividad biológica *in vitro*; *P. alba* [92, 93, 110, 111], *P. chilensis* [97, 112, 113], *P. laevigata* [104], *P. nigra* [110, 111], *P. ruscifolia* [108], *P. tamarugo* [97] y actividad biológica *in vivo*; *P. glandulosa* [114, 115].

Nutritionalmente, las vainas del género *Prosopis* son ricas en proteína libre de gluten (40-60 % en semilla y de 9-11 % en mesocarpo), limitante en aminoácidos azufrados [88, 90, 92, 98, 102, 103, 105, 108] y su mesocarpo es rico en azúcares (31-60 %), principalmente sacarosa [88, 93, 95, 101, 102, 103, 106]. En las semillas del género *Prosopis*, se ha reportado la presencia de inhibidores de tripsina y lectinas, antinutrientes que pueden ser desnaturalizados y abatidos con el tratamiento térmico [88, 94, 98, 104, 105]. Las especies del género *Prosopis*, han sido reportadas como fuente de compuestos activos [88], mesocarpo [112], semilla [92, 93, 108, 113] y vaina integral [92, 93, 97, 104, 110, 111] son una buena fuente de compuestos fenólicos con actividad antioxidante [92, 93, 97, 108, 110, 112, 113], antiinflamatoria [92, 110], antihipertensiva [104, 114] e hipoglucémica [115]. Los miembros del género *Prosopis* mejor descritos son las especies de Sudamérica *P. alba* y *P. chilensis* y la Norteamericana *P. glandulosa*. La especie *P. laevigata* se distribuye en 16 estados de la República Mexicana [116] y está considerada como una especie subutilizada y poco descrita.

## 2. JUSTIFICACIÓN.

Dado que la dieta es uno de los principales factores de riesgo asociado a la creciente y actual carga de enfermedades cardiovasculares, en donde la dislipidemia es una condicionante de su génesis temprana, a través de la aterogénesis, es necesaria la caracterización de alimentos, cuya composición favorezca la prevención del desarrollo de esta enfermedad. En este propósito, particular atención debe ponerse a materias primas, que además de su potencial preventivo, representen una alternativa como fuente de proteína, tal es el caso de las leguminosas. Por lo anterior, en el presente trabajo, se describe el valor nutrimental de harinas de vaina de mezquite y se evalúa el efecto de su consumo en el desarrollo de dislipidemia *in vivo*, utilizando el ratón C57BL/6J como modelo biológico de estudio.

## 3. OBJETIVOS.

### 3.1. Objetivo general.

Describir el valor nutrimental y los compuestos activos de harinas de vaina de mezquite y evaluar el efecto de su consumo en el desarrollo de dislipidemia *in vivo* empleando como modelo, el ratón C57BL/6J, como indicador de etapa temprana de la aterogénesis.

### 3.2. Objetivos específicos.

3.2.1. Describir la composición química y nutrimental de las harinas derivadas de la vaina de mezquite, para conocer su valor alimentario.

3.2.2. Analizar por métodos espectrofotométricos y cromatográficos, el contenido de compuestos activos de las harinas de vainas de mezquite, crudas y procesadas por extrusión.

3.2.3. Formular y describir dietas a base de harinas de vaina de mezquite, obtenidas por extrusión y evaluar el efecto de su consumo en el desarrollo de dislipidemia en ratón C57BL/6J.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

##### 4.1. Preparación de harinas de mezquite.

Las vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*) fueron colectadas en el campo experimental de la Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, en la región del valle del mezquital, en el estado de Hidalgo, México. Las vainas maduras y secas fueron colectadas, seleccionadas y deshidratadas en estufa de convección a 45 °C, durante 1 h. Las vainas secas se pesaron y sometieron a molienda en una y dos etapas, en un molino de cuchillas de 900 W (Nutribullet, CA, USA). Para la molienda en una etapa, las vainas fueron molidas de forma exhaustiva, con destrucción del endocarpio y tamizadas en malla 80, produciendo dos fracciones; *harina integral* de vaina de mezquite y fibras retenidas en la malla. Para la molienda en dos etapas, las vainas de mezquite, fueron molidas, sin destrucción del endocarpio, posteriormente tamizadas en mallas 30 y 80. La malla 30, permitió retener el endocarpio intacto. La malla 80 permitió retener las fibras y obtener la *harina de mesocarpo* que pasó a través de ella. El mesocarpo intacto, fue sometido a una segunda molienda y tamizado en malla 80, obteniendo la *harina de semilla* y fibras. Las fracciones se pesaron, para obtener los rendimientos y se almacenaron hasta su análisis o procesamiento.

Una fracción de harina integral de vaina de mezquite, fue sometida a fermentación. Un kg de harina se dispersó en 2 L de agua, posteriormente se pasteurizó e inoculó con *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentación se desarrolló a 27 °C durante 5 días, hasta el agotamiento de los azúcares. Una vez concluida la fermentación, la mezcla fermentada se deshidrató en estufa de convección (Thermo Scientific, MA, USA) a 65 °C durante 4 h, para su posterior molienda y obtención de la *harina integral fermentada*.

##### 4.2. Análisis proximal.

La composición proximal de las harinas obtenidas a partir de la vaina de mezquite se realizó utilizando los métodos 920.39, 992.15, 925.09, 991.43 y 923.03 de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC), para cuantificar grasa, proteína, humedad, fibra cruda y cenizas, respectivamente [117], los resultados se expresaron en porcentaje.

#### 4.3. Contenido de azúcares libres.

El contenido de azúcares libres en las harinas crudas se cuantificó por cromatografía de líquidos de alta resolución, usando un equipo Dionex-UltiMate 3000 (Thermo Scientific, MA, USA), equipado con una columna REZEX RPM-Monosaccharide PB+2(8 %) (300 × 7.8 mm) trabajando a 80 °C, se utilizó agua como fase móvil. La detección de azúcares se realizó utilizando un detector de índice de refracción [118].

#### 4.4. Perfil de aminoácidos.

El contenido de aminoácidos en las harinas se cuantificó por cromatografía de intercambio iónico, utilizando un analizador de aminoácidos (Sykam GmbH, Eresing, Germany). Las muestras se hidrolizaron con HCl 6 N y se separaron en una columna LCA K06/Na de 4.6 x150 mm a 60 °C (Sykam GmbH, Eresing, Germany), utilizando buffer A de pH 3.45 y buffer B de pH 10.85 como fase móvil. Después de la separación, las fracciones se derivatizaron con ninhidrina y los aminoácidos se cuantificaron espectrofotométricamente a 570 nm [119]. Para aminoácidos azufrados, se utilizó el mismo método, agregando un pretratamiento de oxidación de las muestras con ácido per fórmico, previo a la hidrólisis con HCl [119]. Para cuantificar triptófano, las muestras se hidrolizaron enzimáticamente con papaína, posteriormente, se hicieron reaccionar con *p*-dimetilaminobenzaldehído y se cuantificaron espectrofotométricamente a 620 nm [120].

#### 4.5. Extrusión de harinas.

Para la extrusión las harinas se acondicionaron a 16 % de humedad y se procesaron en un extrusor Brabender (19/25DN, Duisburg, Germany) equipado con un tornillo de 19 mm, con relación de compresión 3:1, trabajando a 170 rpm con temperaturas de barril de 80, 100, 120 y 150 °C en las zonas 1, 2, 3 y 4 respectivamente [121]. La velocidad del alimentador fue de 30 rpm y el diámetro del dado de salida fue de 3mm. Se evaluó el índice de expansión [122] de los extrudidos y posteriormente se molieron y tamizaron en malla 80.

#### 4.6. Tratamiento térmico por horneado de las harinas.

Las harinas obtenidas de la molienda de la vaina de mezquite, *harina de mesocarpo*, *harina integral* y *harina de semilla*, se hidrataron con 15 mL de agua por cada 10 g

de harina, se colocaron en moldes y se hornearon a 190 °C, durante 20 min, posteriormente, se enfriaron y molieron, para obtener las harinas térmicamente tratadas.

#### 4.7. Preparación de extractos.

Para la extracción de compuestos activos en las harinas se realizó una extracción con etanol al 40% [123]. Se pesaron 100 mg de cada muestra y se agregó 1 mL de etanol al 40% en agua (v/v), se agitó a 60 rpm durante 10 min y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se colectó y la extracción se repitió con el sólido residual, ambos extractos se juntaron y se aforaron a 25 mL con etanol al 40 %.

#### 4.8. Cuantificación de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales, se cuantificó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu según [124, 125]. A una alícuota de extracto se agregó el reactivo de Folin-Ciocalteu, la mezcla se alcalinizó con carbonato de sodio y se leyó a 760 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S (Thermo Scientific, MA, USA). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de harina (mg EAG/g) en peso seco.

#### 4.9. Captación de radical 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

La capacidad de captación de radicales libres, se evaluó utilizando el radical libre sintético DPPH [126]. Una alícuota de extracto se hizo reaccionar con una solución de DPPH con absorbancia de 0.7 a 515 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S, Thermo Scientific, MA, USA), el abatimiento de la absorbancia a esta longitud de onda se utilizó para cuantificar la captación del radical DPPH, expresando los resultados como miligramos equivalentes de ácido ascórbico por gramo de harina (mg EAA/g).

#### 4.10. Productos de la reacción de Maillard (PRM).

La presencia de PRM en las harinas crudas y procesadas se estimó espectrofotométricamente a 290 nm [127]. Una alícuota de extracto, se diluyó con una relación 1:9 con etanol al 40 % y se procedió a medir su absorbancia a 290 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S (Thermo Scientific, MA, USA).

#### 4.11. Flavonoides.

El contenido de flavonoides se cuantificó utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución [128]. Una alícuota de extracto se evaporó y suspendió en 3 mL de HCl 2 N, para realizar la hidrólisis de glucósidos a 90 °C durante 90 min. Posteriormente, se extrajo la fase orgánica con acetato de etilo, el cual se evaporó a 60 °C y el residuo se re-suspendió en etanol grado HPLC para su análisis. Para la separación de los flavonoides, 20 µL de las muestras hidrolizadas se inyectaron en un equipo Dionex-UltiMate 3000 (Thermo Scientific, MA, USA) equipado con una columna Acclaim 120 C-18 (4.6 x 100 mm). Como fase móvil se utilizó agua acidificada pH 2.8 como solvente A y acetonitrilo como solvente B. La elución de los flavonoides miricetina, quercetina, daidzeina, genisteína, apigenina y kaempferol se desarrolló con un gradiente lineal hasta el 30 % de B a los 5 min, 45 % de B a los 8 min y 55 % de B a los 14 min. Posteriormente, la columna se lavó con 95 % de B durante 3 min y se equilibró a un 100 % de A durante 3 min para iniciar el análisis de la siguiente muestra, el flujo fue de 1 mL/min con un tiempo total de corrida de 20 min. La detección y cuantificación de flavonoides se realizó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 254 nm utilizando un detector de arreglo de diodos.

#### 4.12. Formulación de las dietas.

Considerando las guías de requerimientos nutrimentales para ratón [129, 130], se formularon dos dietas, con un 17 % de proteína a base de harinas de vaina de mezquite. La primera fue a base de *harina de semilla* de mezquite y la segunda a base de harina integral fermentada, ambas en combinación con maíz y con adición de premezclas de vitaminas y de minerales. Adicionalmente y con propósitos comparativos, se preparó una dieta a base de caseína, maíz y salvado de trigo, suplementada con las premezclas de vitaminas y de minerales (Tabla 4). Las mezclas fueron acondicionadas a un contenido de 16 % de humedad, procesadas por extrusión bajo las condiciones previamente descritas y almacenadas en refrigeración hasta su uso en el ensayo biológico.

**Tabla 4.** Formulación de dietas.

Ingrediente	Dieta1	Dieta 2	Dieta 3
	Semilla	Integral Fermentada	Caseína
Harina de semilla (g)	100		
Harina integral fermentada (g)		150	
Caseína (g)			50
Salvado de trigo (g)			25
Harina de maíz (g)	200	100	200
Vitaminas y minerales (%)	2	2	2

#### 4.13. Ensayo Biológico.

El ensayo biológico considero las guías nacionales [130] e internacionales [131, 132, 133] del manejo y cuidado de animales de laboratorio, particularmente de roedores. El protocolo correspondiente al ensayo aquí descrito, considera el marco internacional de las 3R de las consideraciones éticas del uso de animales [134, 135], y fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6J de 4 semanas de vida, los cuales se mantuvieron en grupos de tres animales por caja de polipropileno, a 25 °C, en ciclos de luz oscuridad de 12 x 12 h, en las instalaciones del bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

En el ensayo biológico, se incluyeron cuatro tratamientos, incluyendo 6 animales en cada uno. Los cuatro tratamientos consistieron en el consumo de las dietas 1, 2, 3 y alimento de bioterio a libre demanda, con cuantificación diaria del consumo de alimento por caja. El consumo de agua se mantuvo a libre demanda durante el experimento que concluyó a las 18 semanas de vida del ratón. Durante el periodo del ensayo se monitoreó la ganancia de peso individual de los animales. Al llegar la semana 18, los ratones se sacrificaron después de un ayuno de 8 h y se colectó sangre por punción cardiaca, el tejido adiposo de la cavidad abdominal y el hígado.

#### 4.14. Química clínica sanguínea.

La sangre obtenida se centrifugó a 4000 rpm /5 min para obtener el suero. En el suero se cuantificó glucosa, triglicéridos, colesterol total y colesterol-HDL utilizando una unidad de química seca (Fujifilm Dri-Chem NX5001) y las respectivas membranas de análisis enzimático.

#### 4.15. Análisis estadístico.

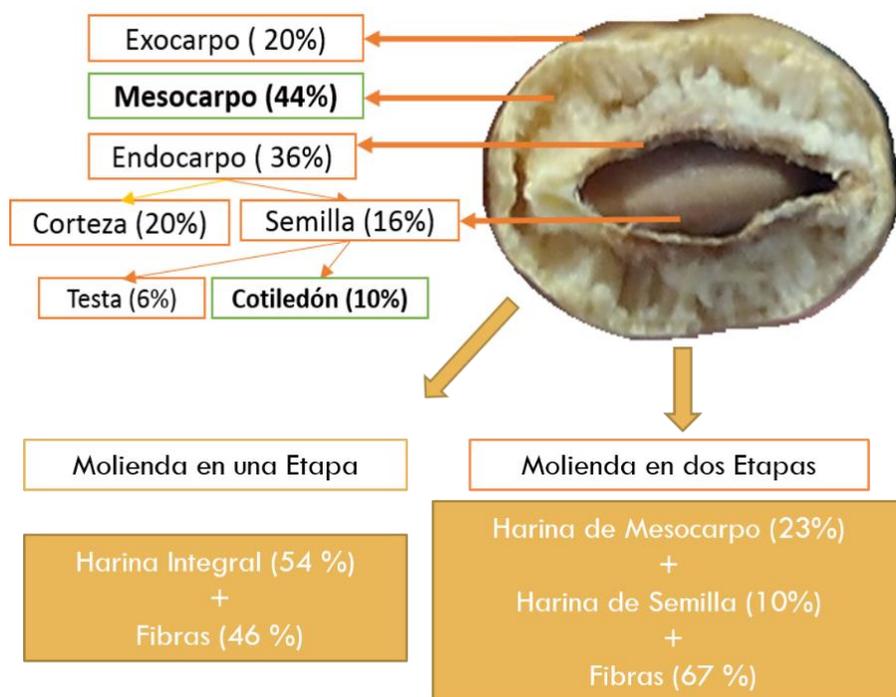
Los análisis se realizaron por triplicado, con los valores resultantes se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, con una prueba de Tukey para comparación de medias ( $P < 0,05$ ), utilizando el software Statistica 8.0.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1. Caracterización nutrimental de las harinas de vaina de mezquite.

#### 5.1.1. Composición proximal.

Según las fracciones resultantes de la molienda de la vaina de mezquite, el exocarpo, el mesocarpo y el endocarpo, constituyen el 20, 44 y 36 % de la vaina, respectivamente [Figura 1]. La semilla, en el endocarpo constituye el 16 % de la vaina. La molienda en una etapa, permitió obtener la *harina integral* (54 %), que incluye al mesocarpo y la semilla de la vaina, más las fibras (46 %). La molienda en dos etapas, permitió obtener *harina de mesocarpo* (23 %), *harina de semilla* (10 %), más las fibras (67 %). Los rendimientos de las fracciones de la molienda de la vaina de mezquite aquí reportados para *P. laevigata* son similares a los reportados para la vaina *P. alba* [95].



**Figura 1.** Fracciones de la molienda de la vaina de mezquite.

La composición proximal de las harinas derivadas de la molienda de la vaina de mezquite (*P. laevigata*) se presenta en la **Tabla 5**. El contenido de proteína para el mesocarpo de la vaina de mezquite fue de 9.2 %, ligeramente más alto a los valores previamente reportados para *P. alba* [95], *P. glandulosa* [98] y *P. pallida* [93] con 8, 7 y 9 %, respectivamente. El contenido de proteína en la semilla de mezquite fue de

36 %, más alto que los valores reportados previamente para semilla de *P. africana* [90] y semejante a los reportados para *P. alba* [93], *P. juliflora* [102] y *P. glandulosa* [98]. El contenido de proteína en harina integral de vaina de mezquite fue de 12.4 %, semejante a los valores previamente reportados para *P. chilensis* [97], *P. glandulosa* [98] y *P. tamarugo* [97]. El contenido de proteína en la harina integral fermentada fue de 21.5 %, no se encontraron reportes previos del contenido de proteína en harinas tratadas por fermentación de otras vainas del género *Prosopis*. El contenido de grasa no superó el 5 % en ninguna de las harinas de mezquite, lo cual coincide con lo reportado anteriormente [95], donde se describe a las vainas del género *Prosopis* como bajas en su contenido de grasa. El contenido de fibra, en las harinas crudas, fue más alto en la harina integral, seguido por la harina de semilla y la harina de mesocarpo, con 11.3, 7.8, y 3.5 %, respectivamente. La fermentación de la harina integral, incrementó en un 55 % el contenido de fibra, al mismo tiempo que redujo significativamente el extracto libre de nitrógeno (ELN).

**Tabla 5.** Composición proximal de las harinas de vaina de mezquite (%).

Harina	Humedad	Cenizas	Proteína	Grasa	Fibra Cruda	ELN*
Semilla	8.28±0.15 <sup>c</sup>	4.14±0.03 <sup>c</sup>	36.51±0.36 <sup>a</sup>	4.83±0.04 <sup>b</sup>	7.78±0.46 <sup>c</sup>	38.45±0.66 <sup>d</sup>
Mesocarpo	9.48±0.22 <sup>b</sup>	4.61±0.21 <sup>b</sup>	9.13±0.1 <sup>d</sup>	1.84±0.03 <sup>e</sup>	3.58±0.38 <sup>d</sup>	71.35±0.57 <sup>a</sup>
Integral	7.7±0.16 <sup>d</sup>	3.81±0.02 <sup>d</sup>	12.41±0.12 <sup>c</sup>	2.25±0.03 <sup>d</sup>	11.34±0.22 <sup>b</sup>	62.47±0.1 <sup>b</sup>
Integral Fermentado	4.08±0.01 <sup>e</sup>	7.25±0.01 <sup>a</sup>	21.54±0.31 <sup>b</sup>	3.98±0.01 <sup>c</sup>	18.58±0.05 <sup>a</sup>	44.54±0.39 <sup>c</sup>
Maíz	10.17±0.26 <sup>a</sup>	1.87±0.03 <sup>e</sup>	7.57±0.19 <sup>e</sup>	7.81±0.06 <sup>a</sup>	0.53±0.01 <sup>e</sup>	72.04±0.14 <sup>a</sup>

ELN; Extracto libre de nitrógeno. Se reporta la media ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma, columna indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05).

### 5.1.2. Azúcares libres.

El contenido de azúcares libres en las harinas de vaina de mezquite se presenta en la **Tabla 6**. En las harinas de vaina de mezquite, se encontraron un disacárido (sacarosa) y tres monosacáridos (glucosa, fructosa, xilosa). En todas las fracciones, la sacarosa fue el principal azúcar, seguido de glucosa, fructosa y xilosa. La fracción con mayor contenido de azúcares, fue la harina de mesocarpo, seguida de la harina

integral, la harina de semilla y la harina integral fermentada con 448, 305, 96 y 29 mg/g, respectivamente. No se encontraron reportes del contenido de azúcares en vaina de *P. laevigata*, pero en la especie *P. alba*, se ha reportado el contenido de sacarosa (382 mg/g), fructosa (96 mg/g), glucosa (26 mg/g) y xilosa (2 mg/g) [88].

**Tabla 6.** Contenido de azúcares en harinas de vaina de mezquite (mg/g).

Harina	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Xilosa	Total
Semilla	69.71±0.64 <sup>c</sup>	13.43±0.69 <sup>c</sup>	10.88±1.19 <sup>d</sup>	1.97±0.09 <sup>d</sup>	96.01±2.33 <sup>c</sup>
Mesocarpo	308.61±4.72 <sup>a</sup>	77.67±0.74 <sup>a</sup>	47.97±1.11 <sup>a</sup>	13.56±0.51 <sup>a</sup>	447.83±4.58 <sup>a</sup>
Integral	256.19±4.28 <sup>b</sup>	26.82±0.39 <sup>b</sup>	14.31±0.61 <sup>c</sup>	7.65±0.27 <sup>c</sup>	304.98±3.52 <sup>b</sup>
Integral Fermentado	1.42±0.04 <sup>e</sup>	1.22±0.05 <sup>d</sup>	16.98±0.21 <sup>b</sup>	9.42±0.23 <sup>b</sup>	29.06±0.34 <sup>d</sup>
Maíz	4.91±0.65 <sup>d</sup>	ND	9.05±0.23 <sup>d</sup>	ND	13.96±0.88 <sup>e</sup>

Se reporta la media ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma columna, indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05).

### 5.1.3. Perfil de aminoácidos.

El perfil de aminoácidos de las harinas derivadas de la vaina de mezquite se presenta en la **Tabla 7** y su contenido de aminoácidos esenciales comparados con los requerimientos de la FAO, se presenta en la **Tabla 8**. Considerando los requerimientos de aminoácidos de la FAO, para humanos mayores de tres años [136], los aminoácidos limitantes fueron Ile y Val, en harina integral, mientras que en la harina de semilla, mesocarpo y harina integral fermentada, los aminoácidos limitantes fueron Val, Ile y Trp, respectivamente. En las cuatro harinas se encontraron valores altos de Lys y aminoácidos azufrados (Met + Cis).

Previamente se ha reportado que, en general, las vainas del género *Prosopis*, son limitantes en aminoácidos azufrados [88], en particular, la semilla de *P. chilensis* y de *P. juliflora*, son deficientes en Val, Thr, Ile, Lys, Trp y aminoácidos azufrados, la harina integral de *P. juliflora*, es deficiente en aminoácidos azufrados [137], la semilla de *P. africana*, es deficiente en Thr [90] y la harina integral de *P. laevigata*, es deficiente en aminoácidos azufrados [105]. Considerando semillas de leguminosas de otros géneros, se ha reportado que en frijol común y en chícharo los aminoácidos limitantes son Trp y aminoácidos azufrados [138]. En el presente

trabajo cuatro aminoácidos (Glu, Arg, Asp y Leu) representan más del 45% del total de aminoácidos en la semilla, un comportamiento antes reportado para *P. alba* [92], frijol y chícharo [138].

**Tabla 7.** Perfil de aminoácidos en harinas de vaina de mezquite (mg/g proteína).

Aminoácido	Semilla	Mesocarpo	Integral	Integral Fermentado
Asp	83.41±1.27 <sup>c</sup>	142.68±0.34 <sup>a</sup>	90.51±0.56 <sup>b</sup>	84.87±0.55 <sup>c</sup>
Thr	30.19±0.44 <sup>b</sup>	34.69±0.55 <sup>a</sup>	30.61±0.07 <sup>b</sup>	31.32±0.24 <sup>b</sup>
Ser	48.15±0.15 <sup>a</sup>	46.70±1.35 <sup>a</sup>	45.93±0.60 <sup>a</sup>	47.93±0.04 <sup>a</sup>
Glu	177.16±2.08 <sup>a</sup>	62.63±1.67 <sup>d</sup>	114.03±1.06 <sup>b</sup>	105.27±0.17 <sup>c</sup>
Pro	62.58±0.95 <sup>d</sup>	195.51±8.69 <sup>a</sup>	100.67±1.44 <sup>c</sup>	109.39±1.11 <sup>b</sup>
Gly	50.58±0.05 <sup>a</sup>	32.95±0.12 <sup>d</sup>	41.02±0.28 <sup>c</sup>	44.14±0.09 <sup>b</sup>
Ala	43.02±0.29 <sup>a</sup>	38.34±0.15 <sup>c</sup>	36.70±0.23 <sup>d</sup>	39.89±0.41 <sup>b</sup>
Val	34.12±0.21 <sup>c</sup>	40.77±0.46 <sup>a</sup>	36.36±0.14 <sup>b</sup>	40.85±0.62 <sup>a</sup>
Ile	28.59±0.09 <sup>a</sup>	28.29±0.69 <sup>a</sup>	26.62±0.12 <sup>b</sup>	29.47±0.35 <sup>a</sup>
Leu	68.92±0.45 <sup>b</sup>	75.53±0.20 <sup>a</sup>	70.23±0.27 <sup>b</sup>	68.67±0.58 <sup>b</sup>
Tyr	22.83±0.61 <sup>b</sup>	23.49±0.22 <sup>b</sup>	22.37±0.31 <sup>b</sup>	24.27±0.19 <sup>a</sup>
Phe	35.62±0.49 <sup>b</sup>	37.76±0.44 <sup>a</sup>	38.44±0.26 <sup>a</sup>	38.31±0.09 <sup>a</sup>
His	24.76±0.27 <sup>b</sup>	25.79±0.20 <sup>b</sup>	29.51±0.26 <sup>a</sup>	30.76±0.19 <sup>a</sup>
Lys	55.07±0.33 <sup>a</sup>	54.00±0.12 <sup>b</sup>	52.51±0.01 <sup>c</sup>	53.09±0.04 <sup>c</sup>
Arg	112.26±1.93 <sup>a</sup>	28.70±0.43 <sup>c</sup>	67.84±0.60 <sup>b</sup>	68.95±0.33 <sup>b</sup>
Cis	25.86±0.12 <sup>a</sup>	18.18±0.02 <sup>d</sup>	21.73±0.12 <sup>b</sup>	20.58±0.03 <sup>c</sup>
Met	9.02±0.21 <sup>a</sup>	8.02±0.08 <sup>a</sup>	7.99±0.07 <sup>a</sup>	9.22±0.62 <sup>a</sup>
Trp	6.49±0.29 <sup>b</sup>	8.79±0.06 <sup>a</sup>	6.40±0.07 <sup>b</sup>	4.85±0.04 <sup>c</sup>
SAA	34.88±0.34 <sup>a</sup>	26.20±0.05 <sup>c</sup>	29.72±0.20 <sup>b</sup>	29.80±0.65 <sup>b</sup>
AAA	58.45±1.10 <sup>b</sup>	61.25±0.67 <sup>a</sup>	60.82±0.57 <sup>a</sup>	62.59±0.09 <sup>a</sup>

Se reporta la media ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma, fila indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05). SAA; Aminoácidos azufrados, AAA; Aminoácidos aromáticos.

**Tabla 8.** Aminoácidos esenciales en harinas de vaina de mezquite (mg/g proteína).

Aminoácido	Semilla	Mesocarpo	Integral	Integral Fermentado	* FAO, 2013
His	24.76±0.27 <sup>b</sup>	25.79±0.21 <sup>b</sup>	29.51±0.26 <sup>a</sup>	30.76±0.19 <sup>a</sup>	16
Ile	28.59±0.09 <sup>a</sup>	28.29±0.69 <sup>a</sup>	26.62±0.12 <sup>b</sup>	29.47±0.35 <sup>a</sup>	30
Leu	68.92±0.45 <sup>b</sup>	75.53±0.21 <sup>a</sup>	70.23±0.27 <sup>b</sup>	68.67±0.58 <sup>b</sup>	61
Lys	55.07±0.33 <sup>a</sup>	54.00±0.12 <sup>b</sup>	52.51±0.01 <sup>c</sup>	53.09±0.04 <sup>c</sup>	48
SAA	34.89±0.12 <sup>a</sup>	26.2±0.33 <sup>c</sup>	29.72±0.21 <sup>b</sup>	29.8±0.26 <sup>b</sup>	23
AAA	58.45±0.21 <sup>c</sup>	61.25±0.08 <sup>a</sup>	60.82±0.09 <sup>b</sup>	62.6±0.32 <sup>a</sup>	41
Thr	30.19±0.44 <sup>b</sup>	34.69±0.55 <sup>a</sup>	30.61±0.07 <sup>b</sup>	31.32±0.24 <sup>b</sup>	25
Trp	6.49±0.29 <sup>b</sup>	8.79±0.06 <sup>a</sup>	6.40±0.07 <sup>b</sup>	4.85±0.04 <sup>c</sup>	6.6
Val	34.12±0.21 <sup>c</sup>	40.77±0.46 <sup>a</sup>	36.36±0.14 <sup>b</sup>	40.85±0.62 <sup>a</sup>	40

Se reporta la media ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma, fila indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05). SAA; Aminoácidos azufrados, AAA; Aminoácidos aromáticos. \*Requerimientos para mayores de 3 años [136].

#### 5.1.4. Perfil nutrimental de harinas de vaina de mezquite y su implicación en aterogénesis.

Los rasgos más importantes de los perfiles nutrimentales de las harinas de vaina de mezquite se resumen en la **Tabla 9**. Por su bajo contenido de grasa y de azúcares y su alto contenido de fibra y arginina, la *harina de semilla* y la *harina integral fermentada*, pueden describirse como alimentos anti-aterogénicos. Bajos niveles de grasa, limitan la producción hepática de LMBD [40, 41, 46, 48]. Bajos niveles de azúcares limitan la lipogénesis hepática y la producción de ácido úrico, dos procesos altamente aterogénicos [64, 65, 66]. Altos niveles de fibra, favorecen la eliminación de colesterol por vía biliar [37, 44, 75]. Altos niveles de arginina, favorecen la producción de óxido nítrico, protegiendo de la disfunción endotelial [22, 32, 33, 35]. A pesar de sus bajos contenidos de grasa, por sus muy altos contenidos de azúcares, la *harina de mesocarpo* y la *harina integral*, no mantienen las características anti-aterogénicas antes descritas.

**Tabla 9.** Rasgos nutrimentales de harinas de mezquite y su implicación en aterogénesis.

Harina	Proximal	Azúcares	Aminoácidos	Implicación en aterogénesis
Semilla	Bajo en grasa (4.8 %), muy alto en proteína (36.5 %) y alto en fibra (7.8 %).	Bajo en azúcares (9 %).	Deficiente en Val, muy alto en arginina (112 mg/g proteína).	Bajos niveles de grasa limitan la producción de LMBD. Bajos niveles de azúcares limitan lipogénesis hepática y producción de ácido úrico. Altos niveles de fibra favorecen la eliminación de colesterol por vía biliar. Altos niveles de arginina favorecen la producción de óxido nítrico.
Mesocarpo	Bajo en grasa (1.8 %), proteína (9.1 %) y fibra (3.6 %). Muy alto en ELN (71.3 %).	Muy alto en azúcares (45 %).	Deficiente en Ile, bajo en arginina (28.7 mg/g proteína).	Bajos niveles de grasa limitan la producción de LMBD. Altos niveles de azúcares favorecen la lipogénesis hepática y producción de ácido úrico. Bajos niveles de arginina no favorecen la producción de óxido nítrico.
Integral	Bajo en grasa (2.2 %), alto en fibra (11.3 %).	Alto en azúcares (30.5 %).	Deficiente en Ile y Val, alto en arginina (67.8 mg/g proteína).	Bajos niveles de grasa limitan la producción de LMBD. Altos niveles de azúcares favorecen la lipogénesis hepática y producción de ácido úrico.
Integral Fermentada	Bajo en grasa (4 %), alto en proteína (21.5 %), muy alto en fibra (18.6 %).	Muy bajo en azúcares (3 %)	Deficiente en Trp y alto en arginina (69 mg/g proteína).	Bajos niveles de grasa limitan la producción de LMBD. Bajos niveles de azúcares limitan lipogénesis hepática y producción de ácido úrico. Altos niveles de fibra favorecen la eliminación de colesterol por vía biliar. Altos niveles de arginina favorecen la producción de óxido nítrico.

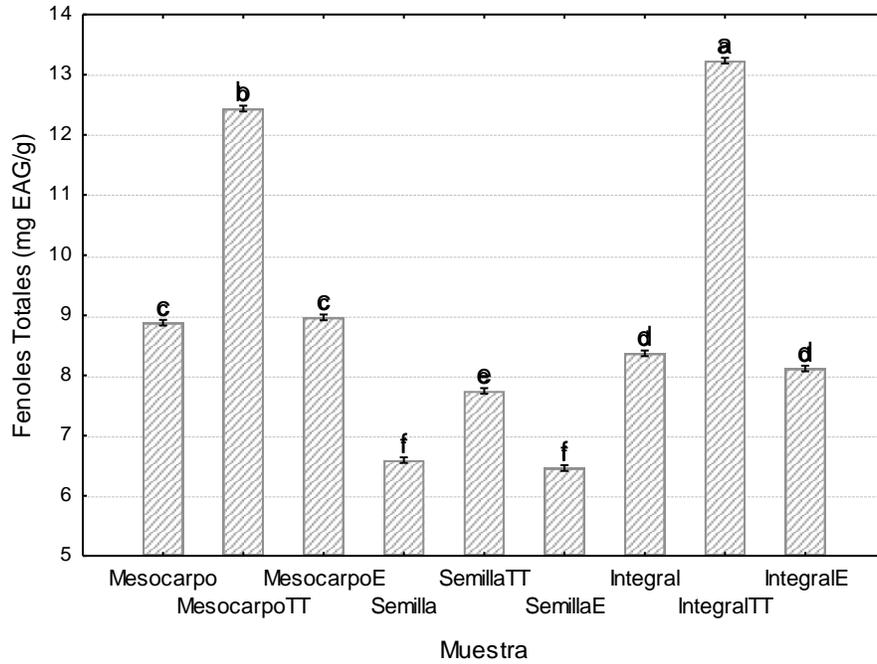
## 5.2. Propiedades nutraceuticas de las harinas de vaina de mezquite.

### 5.2.1. Compuestos fenolicos totales.

El contenido de compuestos fenolicos totales en harinas de mezquite crudas y procesadas, se presenta en la **Figura 2 y 3**. El contenido de fenoles totales, en *harina de semilla*, *harina de mesocarpo*, *harina integral* y *harina integral fermentada* fue de 6.6, 8.9, 8.3 y 11.3 mg EAG/g, respectivamente. Estos valores son más altos a los reportados previamente para harinas de vaina de *P. nigra* (6.2 mg EAG/g) y *P. alba* (4.6 mg EAG/g) [110]. El tratamiento térmico por horneado, incrementó el contenido de fenoles totales de *harina de semilla*, *harina de mesocarpo* y *harina integral*, en un 17, 40 y 58 %, respectivamente.

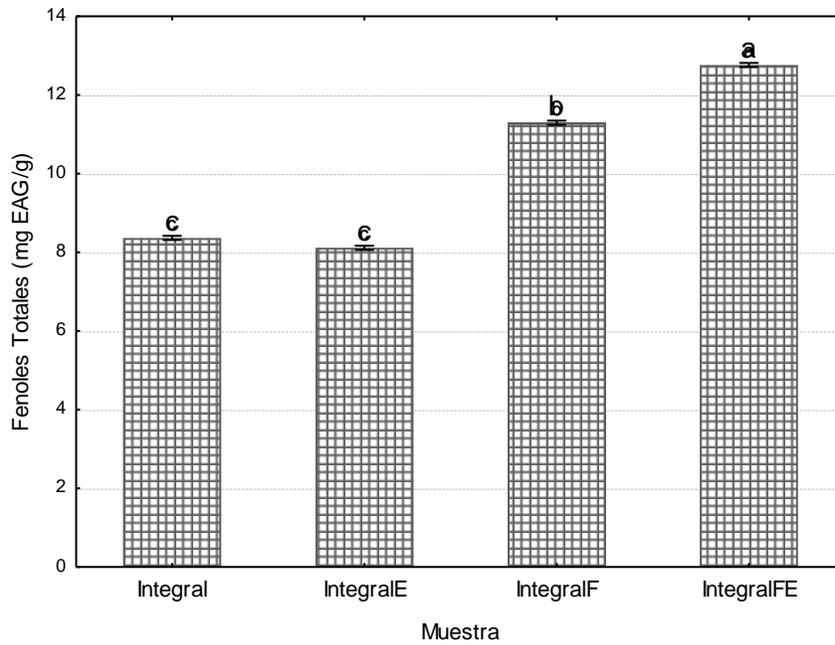
Este incremento puede atribuirse a la generación de productos de la reacción de Maillard (PRM). La cuantificación de fenoles totales, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, no es específico para compuestos fenolicos [124] y compuestos como los PRM, pueden reducir este reactivo, contribuyendo a la medición, fenómeno que ya ha sido reportado en materias primas tratadas por horneado, como el algarrobo [139]. A diferencia del tratamiento térmico por horneado, el tratamiento térmico por extrusión no modifica el contenido de fenoles totales, en las harinas de vaina de mezquite. No se encontraron reportes del tratamiento por extrusión de harinas de mezquite. El procesamiento por extrusión de harinas de leguminosas, como el frijol, incrementa ligeramente el contenido de compuestos fenolicos totales [121].

La fermentación de la harina integral, incrementó significativamente el contenido de compuestos fenolicos, fenómeno debido a la concentración de los componentes durante el proceso. El procesamiento por extrusión de la harina integral fermentada, incrementa ligera, pero significativamente el contenido de compuestos fenolicos totales, fenómeno asociado a la producción de PRM. No se encontraron reportes del contenido de compuestos fenolicos totales en harinas de vaina del género *Prosopis*, procesadas por extrusión o fermentación.



**Figura 2.** Fenoles totales en harinas de vaina de mezquite.

TT; Tratamiento térmico por horneado, E; Extrusión. Se reporta la media  $\pm$  error estándar (n=3). Diferente letra indica diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).



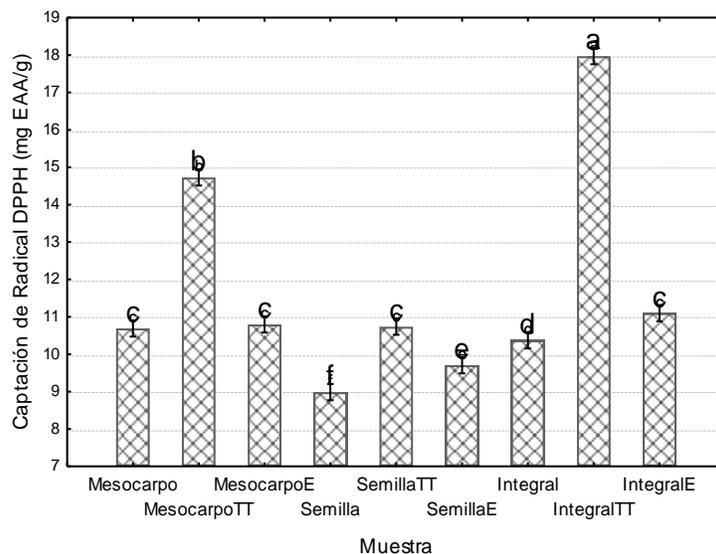
**Figura 3.** Fenoles totales en harina integral fermentada de mezquite.

E; Extrusión, F; Fermentada. Se reporta la media  $\pm$  error estándar (n=3). Diferente letra indica diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

### 5.2.2. Captación de radical DPPH.

La capacidad de captación de radical DPPH de las harinas de vaina de mezquite, se presenta en las **Figura 4 y 5**. La capacidad de captación de radical DPPH para harina de mesocarpo, harina de semilla, harina integral y harina integral fermentada fue de 10.6, 8.9, 10.1 y 14.1 mg EAA/g. El tratamiento térmico por horneado de las harinas de mesocarpo, de semilla e integral, incrementó la capacidad de captación de radical DPPH en un 35, 15 y 80 %, respectivamente. Estos incrementos en la capacidad de captación de radical DPPH, pueden ser atribuidos a la generación de PRM, durante el tratamiento térmico. Los PRM han sido descritos como compuestos con capacidad de captación de radicales libres en materias primas tratadas térmicamente, como el algarrobo [139] y en algunos medios sintéticos [127, 140, 141].

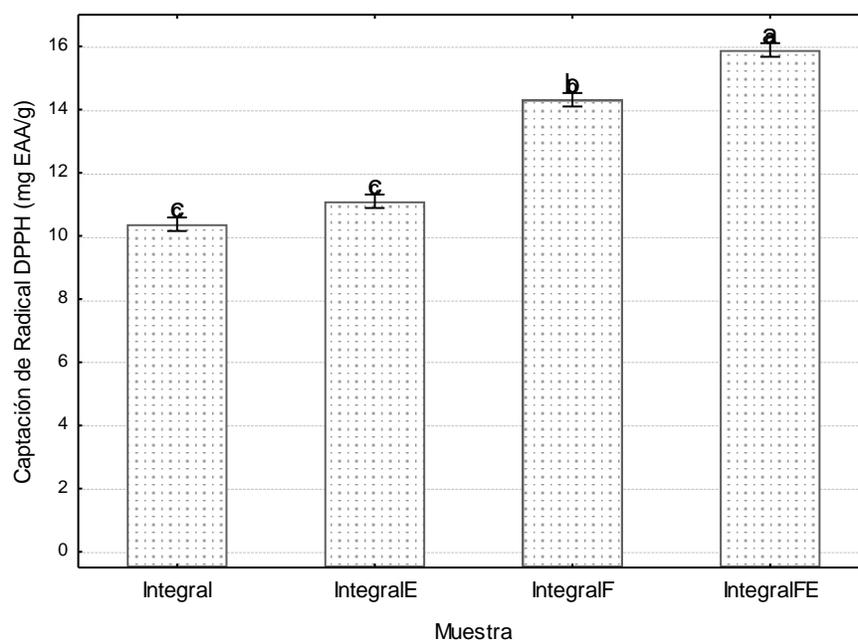
Los principales antioxidantes presentes en alimentos son los compuestos fenólicos, pero compuestos como el ácido ascórbico y PRM, pueden reducir el radical DPPH [127, 141, 141]. A diferencia del tratamiento térmico por horneado, el tratamiento térmico por extrusión, no modificó la capacidad de captación de radical DPPH en la harina de mesocarpo, mientras que en harina de semilla e integral, lo incrementa ligera pero estadísticamente significativa.



**Figura 4.** Captación de radical DPPH en harinas de vaina de mezquite.

TT; Tratamiento térmico por horneado, E; Extrusión. Se reporta la media  $\pm$  error estándar (n=3). Diferente letra indica diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05).

La fermentación de la harina integral, incrementó de forma estadísticamente significativa, la captación del radical DPPH, fenómeno debido a la concentración de los componentes durante este proceso. El procesamiento por extrusión de la harina integral fermentada, incrementó de forma ligera pero estadísticamente significativa, la capacidad de captación del radical DPPH, fenómeno asociado a la producción de PRM. No se encontraron reportes de la capacidad de captación de radical DPPH en harinas de vaina del género *Prosopis* procesadas por extrusión o fermentación.

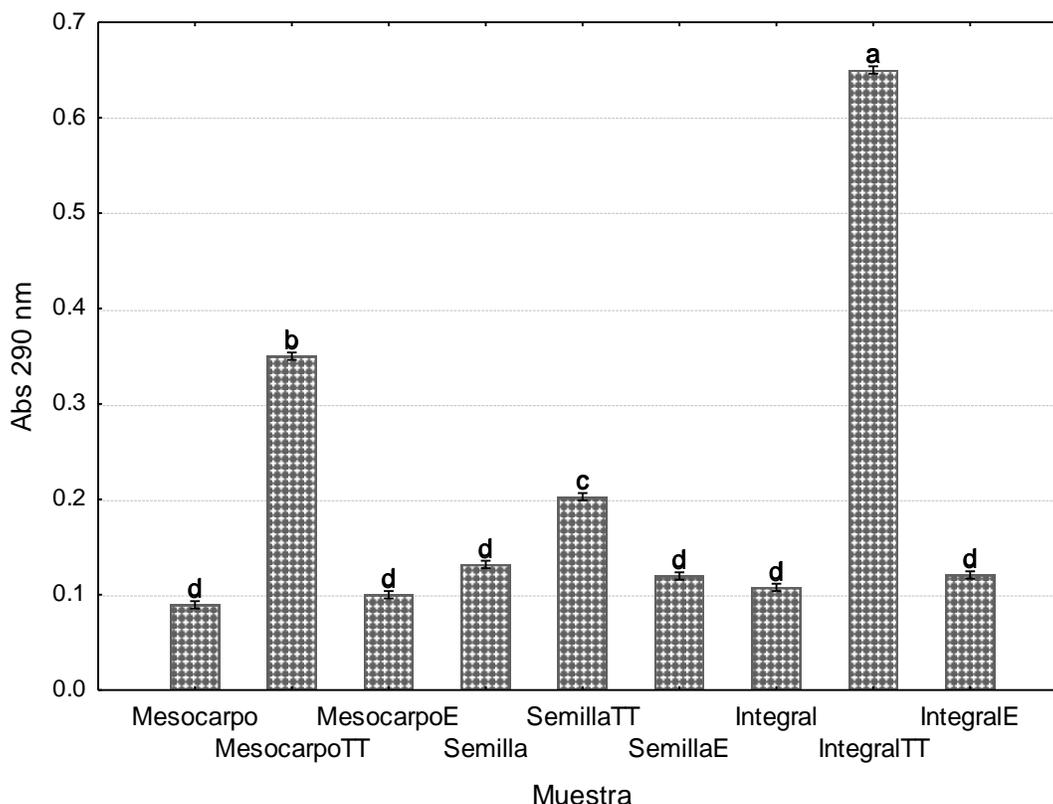


**Figura 5.** Captación de radical DPPH en harina integral fermentada de mezquite. E; Extrusión, F; Fermentada. Se reporta la media  $\pm$  error estándar (n=3). Diferente letra indica diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

### 5.2.3. Productos de la reacción de Maillard – Absorbancia a 290 nm.

La absorbancia a 290 nm como indicador de la presencia de PRM en las harinas de vaina de mezquite, se presenta en las **Figuras 6 y 7**. El mayor incremento en la absorbancia a 290 nm, después del tratamiento térmico por horneado, se presentó en la harina integral, seguida por la harina de mesocarpo y la harina de semilla. La reacción de Maillard, llevada a cabo entre azúcares reductores y el grupo amino de los aminoácidos libres, péptidos o proteínas, durante el tratamiento térmico de los alimentos, produce heterociclos de bajo peso molecular, con máximos de absorción a 290 nm [127, 139].

En el presente trabajo la mayor absorbancia a 290 nm, después del tratamiento térmico por horneado, se presentó en la harina integral y harina de mesocarpio, harinas con alto contenido de azúcares reductores (glucosa, fructosa y xilosa) (Tabla 6), mientras que la harina de semilla, con el menor contenido de azúcares reductores, presentó la absorbancia más baja.



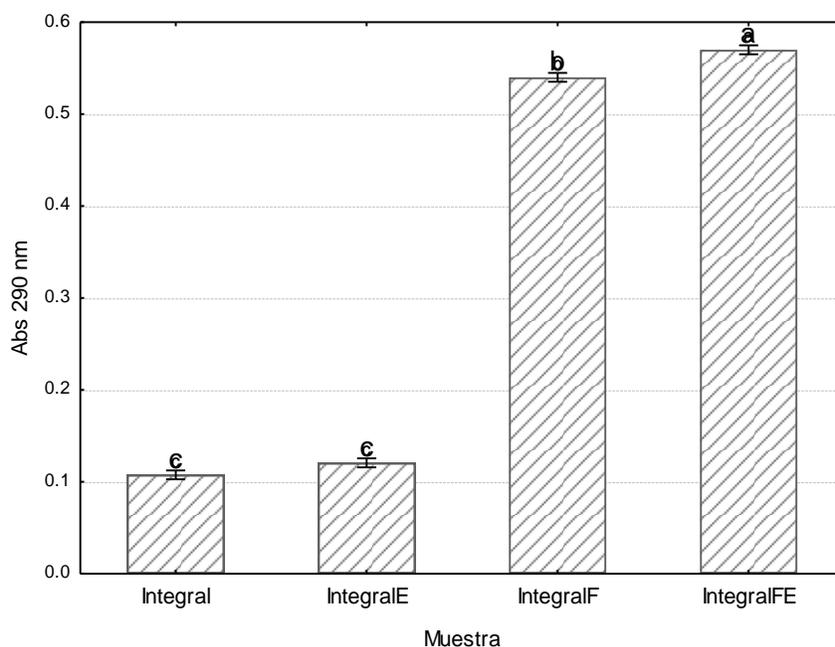
**Figura 6.** PRM (Abs a 290 nm) en harinas de vaina de mezquite.

TT; Tratamiento térmico por horneado, E; Extrusión. Se reporta la media  $\pm$  error estándar (n=3). Diferente letra indica diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

Los PRM pueden provocar la pérdida de aminoácidos esenciales en los alimentos, reduciendo su valor nutrimental o bajo ciertas condiciones generar la producción de compuestos con actividad potencialmente toxica [140]. Recientemente, los PRM, se han asociado a propiedades benéficas en los alimentos, como capacidad antioxidante, quelante, antimicrobiana, antiinflamatoria, prebiótica y antihipertensiva [127, 139, 140].

La producción de PRM, se acompaña de un importante incremento de la capacidad de captación de radicales libres, que correlaciona con la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu en la cuantificación de fenoles totales [139]. La correlación lineal de la absorbancia a 290 nm, con el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad de captación de radicales DPPH, fue de 0.8 y 0.93, respectivamente, sugiriendo la participación de los PRM en la medición de fenoles totales y en la de captación de DPPH. La composición de las harinas de vaina de mezquite les hace una materia prima muy susceptible a la generación de PRM, cuando se tratan térmicamente por horneado, fenómeno que no sucede sí el tratamiento térmico se realiza por extrusión.

La fermentación de la harina integral, incrementó significativamente la absorbancia a 290 nm, lo cual puede atribuirse al tratamiento térmico de la harina, durante la preparación del mosto para la fermentación, que genera PRM. No se encontraron trabajos previos que evalúen la formación de PRM en harinas de vaina del género *Prosopis*, pero se ha reportado que el tratamiento térmico de harinas de vaina del género *Prosopis*, induce su oscurecimiento [88].



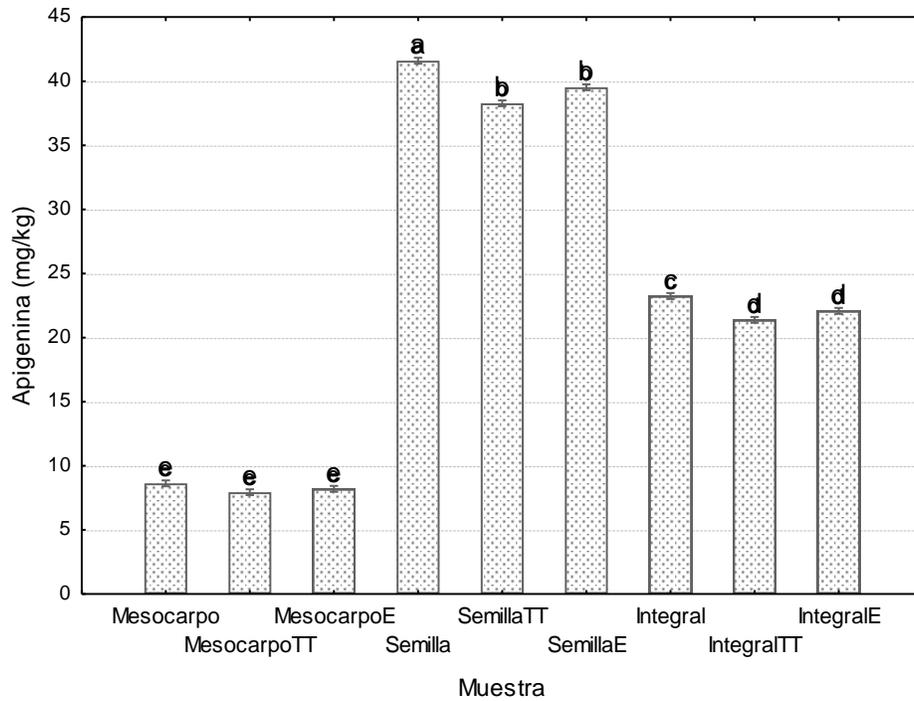
**Figura 7.** PRM (Abs a 290 nm) en harina integral fermentada de mezquite. E; Extrusión, F; Fermentada. Se reporta media  $\pm$  error estándar (n=3). Diferente letra indica diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

#### 5.2.4. Flavonoides.

El análisis para la cuantificación de flavonoides por HPLC, en harinas de vaina de mezquite, permitió la identificación y cuantificación apigenina, los contenidos de este flavonoide, en las harinas de mezquite, se presentan en las **Figuras 8 y 9**. En el presente trabajo, se investigó la presencia de O-glucósidos de miricetina, quercetina, kaempferol, daidzeína, genisteína y apigenina en harinas de mezquite, sin embargo, según el tiempo de retención y su espectro UV-Vis, solo se confirmó la presencia de apigenina. El contenido de apigenina en *harina de mesocarpo, de semilla, integral e integral fermentada*, fue de 8.6, 41.6, 23.2 y 39.7 mg/kg, respectivamente. El tratamiento térmico por horneado y el procesamiento por extrusión no modificaron los contenidos de apigenina en las harinas. Previamente se ha reportado la presencia de C-glucósidos de apigenina en harinas de *P. alba* [92, 112, 142] y *P. nigra* [143] sin la cuantificación del contenido. En harinas de *P. alba*, se ha reportado la presencia de o-glucósidos de quercetina, miricetina y luteolina [142].

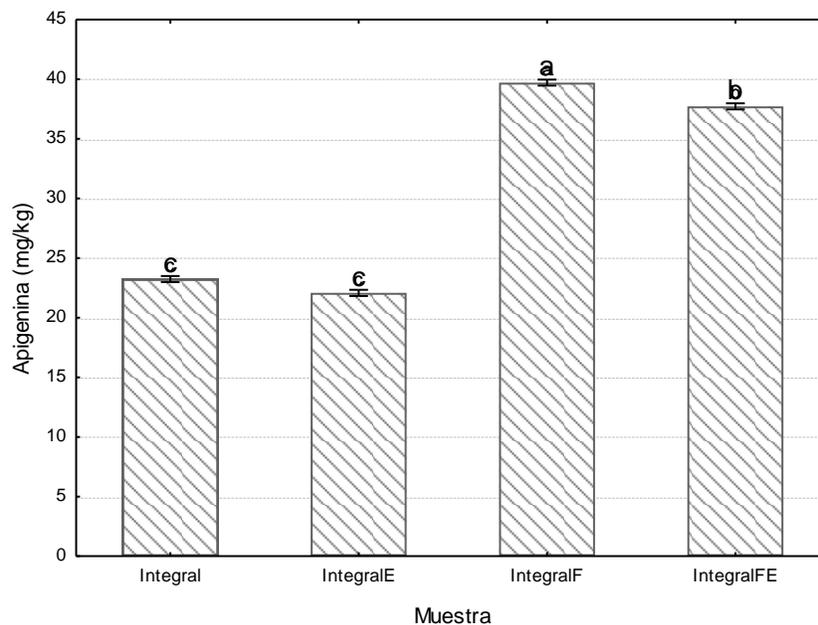
Las semillas de leguminosas han sido descritas como una fuente de flavonoides, la semilla de soya contiene daidzeína y genisteína, mientras que la semilla de frijol común, quercetina y kaempferol y el chícharo quercetina, apigenina y kaempferol [128, 143, 144]. El consumo de flavonoides, incluyendo apigenina, ha sido relacionado con efectos benéficos en la salud, dada su probada actividad en la modulación del estrés oxidativo, función hormonal, expresión genética y programación epigenética [145, 146, 147, 148].

La fermentación de la harina integral, incrementó de forma estadísticamente significativa, el contenido de apigenina, lo cual puede atribuirse a la concertación de los componentes durante el proceso de fermentación, donde se consume más del 90 % de los azúcares presentes en la harina. No se encontraron trabajos previos, que evalúen la presencia de flavonoides en harinas extrudidas o fermentadas del género *Prosopis*.



**Figura 8.** Contenido de apigenina en harinas de vaina de mezquite.

TT; Tratamiento térmico por horneado, E; Extrusión. Se reporta la media  $\pm$  error estándar (n=3). Diferente letra indica diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).



**Figura 9.** Contenido de apigenina en harina integral fermentada de mezquite.

E; Extrusión, F; Fermentada. Se reporta la media  $\pm$  error estándar (n=3). Diferente letra indica diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

El tratamiento térmico de las harinas de vaina de mezquite, incrementó el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad de captación de radical DPPH, debido a la generación de productos de la reacción de Maillard, mientras que el procesamiento por extrusión, no modificó estos parámetros. La fermentación de la harina integral, incrementó el contenido de fenoles totales, la capacidad de captación de radical DPPH y el contenido de apigenina, debido a la concentración de los componentes por remoción de azúcares (**Tabla 10**).

**Tabla 10.** Efecto del procesamiento sobre compuestos activos de las harinas.

Harina	Procesamiento		
	Horneado	Extrudido	Fermentado
Mesocarpo	<b>Incrementa</b> fenoles totales y captación de radical DPPH, <b>genera</b> PRM y <b>no afecta</b> el contenido de apigenina.	<b>No afecta</b> el contenido de fenoles totales, ni la captación de radical DPPH, <b>no genera</b> PRM y <b>no afecta</b> el contenido de apigenina.	
Semilla	<b>Incrementa</b> fenoles totales y captación de radical DPPH, <b>genera</b> PRM y <b>no afecta</b> el contenido de apigenina.	<b>No afecta</b> el contenido de fenoles totales, ni la captación de radical DPPH, <b>no genera</b> PRM y <b>no afecta</b> el contenido de apigenina.	
Integral	<b>Incrementa</b> fenoles totales y captación de radical DPPH, <b>genera</b> PRM y <b>no afecta</b> el contenido de apigenina.	<b>No afecta</b> el contenido de fenoles totales, ni la captación de radical DPPH, <b>no genera</b> PRM y <b>no afecta</b> el contenido de apigenina.	<b>Incrementa</b> fenoles totales y captación de radical DPPH, <b>genera</b> PRM e <b>incrementa</b> el contenido de apigenina.

PRM; Productos de la reacción de Maillard.

El tratamiento térmico de leguminosas es un requisito indispensable para el abatimiento de los factores antinutrimientales que son parte de su composición [80, 81]. La extrusión es un procesamiento eficiente para el abatimiento de estos componentes no deseables [149], además, según los resultados del presente trabajo, la extrusión no modifica las propiedades de las harinas, particularmente, no

genera productos de la reacción de Maillard, a diferencia del tratamiento térmico por horneado, que si los genera. Ya se ha reportado que la extrusión al ser un tratamiento a alta temperatura, corto tiempo y baja humedad, limita la formación de PRM, en comparación con el procesamiento a altas temperaturas, largo tiempo y alto contenido de humedad [149].

El aporte global de compuestos con actividad antioxidante de las harinas de vaina de mezquite, es superior o semejante a las leguminosas de mayor demanda y consumo a nivel mundial (chícharo, frijol, soya, lenteja) [150, 151, 152, 153, 154] con la característica de ser libres de isoflavonas.

#### 5.2.5. Perfil nutracéutico de las harinas de vaina de mezquite y su implicación en aterogénesis.

Las harinas de vaina de mezquite, analizadas en el presente trabajo, destacan particularmente por su aporte de antioxidantes, al compáralas con otras leguminosas. Los antioxidantes de la dieta, pueden contribuir a abatir y controlar la generación y reactividad de radicales libres en el ambiente celular [155, 156, 157, 158, 159]. Los radicales libres son moléculas cuya estructura incluye al menos un electrón sin aparear, la condición altamente inestable de este electrón detona su reacción rápida con otras moléculas, oxidándolas [155, 158, 159].

Los principales radicales libres encontrados de forma constante en el ambiente celular son las especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), los cuales, pueden ser generados durante reacciones de óxido-reducción en el metabolismo celular [156, 157, 159]. Estas reacciones de óxido-reducción, están catalizadas por enzimas, las principales enzimas involucradas en la generación de radicales libres son NADPH oxidasa, xantin oxidasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa, enzimas de la cadena transportadora de electrones, óxido nítrico sintetasa desacoplada y glucosa oxidasa [157, 159], algunos metales divalentes, también pueden catalizar este tipo de reacciones [157].

Los sistemas biológicos, tienen defensas enzimáticas y no enzimáticas ante la generación de estas sustancias altamente reactivas. La superóxido dismutasa, la catalasa, glutatión y glutatión peroxidasa, forman parte del sistema enzimático,

responsable de neutralizar radicales libres [160]. Las defensas no enzimáticas, incluyen al ácido ascórbico (vitamina C) y  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) [160].

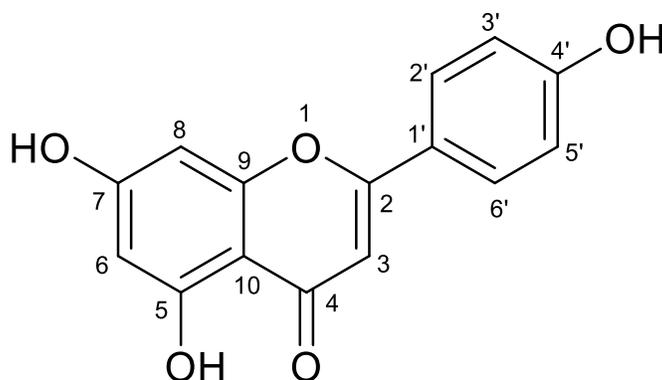
La generación de radicales libres puede superar la capacidad del sistema antioxidante celular, favoreciendo un estado de desequilibrio, denominado estrés oxidativo [160]. El estrés oxidativo, se ha asociado al desarrollo de aterosclerosis por dos mecanismos principales. El primero, es favoreciendo la forma oxidada de las LBD, esta forma oxidada es fagocitada por macrófagos, para producir células espumosas, características de la lesión aterogénica [155, 157]. El segundo, es la disminución en la producción y biodisponibilidad de NO, altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) o nitrógeno (ERN) inducen a una rápida inactivación de NO, para formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el peroxinitrito puede modificar la reacción redox de ONS, oxidando a su cofactor tetrabiopterina (BH<sub>4</sub>), desacoplando la producción de NO, para producir superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y generando disfunción endotelial [160].

La oxidación de la LBD y la disfunción endotelial, son dos procesos reconocidos como iniciadores de la lesión aterogénica, en los cuales el estrés oxidativo es un detonante en común [156, 159, 161]. Los antioxidantes exógenos de la dieta, como la vitamina C, vitamina E y los compuestos fenólicos, pueden contribuir al control del estrés oxidativo, inhibiendo la oxidación de LBD e incrementando la producción y la estabilidad del NO [155, 158, 161]. Debe destacarse que este efecto anti-aterogénico de los antioxidantes es efectivo a etapas tempranas del desarrollo de la lesión aterogénica, por lo que su uso terapéutico en pacientes o modelos con enfermedad desarrollada ha mostrado resultados limitados [158, 159].

Una dieta alta en frutas, hortalizas y leguminosas, puede proveer más de 1 g de compuestos fenólicos al día, nivel asociado a la protección aterogénica [159]. La estructura de los compuestos fenólicos les permite donar un átomo de hidrógeno, para neutralizar radicales libres de forma directa o indirecta, quelar metales que participan en reacciones de oxidación y regenerar antioxidantes presentes en las membranas celulares, como el  $\alpha$ -tocoferol [162]. Esta actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, se ha asociado con la inhibición de la oxidación de LBD y protección del NO [155, 157, 158, 159, 161]. Además, los compuestos fenólicos han

mostrado la capacidad de modular enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, como la xantin oxidasa, la lipoxigenasa y la NADPH oxidasa, principales enzimas asociadas con la producción de radicales libres [155, 157, 159].

Particularmente, el flavonoide apigenina (4',5,7-trihidroxi-flavona) ha sido descrito como un compuesto con actividad antioxidante, su estructura (**Figura 10**), incluye el doble enlace entre el carbono 2 y 3 y un carbonilo en la posición 4, que es característico de compuestos con actividad antioxidante [162]. Esta flavona ha sido descrita como un compuesto con capacidad antiinflamatoria, antitumoral, neuroprotectora, cardioprotectora y antimicrobiana. Además de su capacidad de neutralizar radicales libres, puede quelar metales, modular enzimas de detoxificación, inhibir la oxidación de LBD y la producción de COX-2, IL-8 y TNF- $\alpha$ , factores importantes en el proceso inflamatorio [163, 164].



**Figura 10.** Estructura química de la apigenina.

La ingestión en la dieta, de 40 mg de apigenina al día, incrementa significativamente los niveles de glutatión reductasa y superóxido dismutasa en humanos [163, 165]. En modelo de rata, el consumo de 10 a 40 mg de apigenina por Kg de peso al día, disminuye la oxidación de lípidos [163]. En modelo de ratón, el consumo de 10 mg por Kg de peso corporal, de apigenina al día, incrementa significativamente el transporte reverso de colesterol por aumento en la expresión de ABCA1 [166].

El contenido de antioxidantes y apigenina de las harinas de vaina de mezquite, particularmente en la de *semilla* y en la *integral fermentada*, le confiere un gran potencial de uso a estas materias primas, para ser incluidas en el desarrollo de alimentos con el potencial de inhibir el desarrollo de aterosclerosis en su etapa temprana.

### 5.3. Caracterización de dietas formuladas con harinas de vaina de mezquite en ratón C57BL/6J.

La caracterización nutrimental y nutracéutica de las dietas formuladas con harinas de vaina de mezquite se presentan en la **Tabla 11**. Las harinas de mesocarpo e integral de mezquite, fueron excluidas de la formulación de dietas, debido a su bajo contenido de proteína y a su alto contenido de azúcares. A excepción de la dieta a base de harina integral fermentada, la composición proximal de las dietas presentó los rangos esperados según los estándares internacionales [129] y nacionales [130] para ratones, que consideran del 17 al 24 % de proteína, del 4 al 10 % de grasa y de 3 al 6 % de fibra.

**Tabla 11.** Composición de dietas formuladas con harinas de vaina de mezquite.

Composición		Dieta			
Parámetro	Unidad	1 Semilla	2 Integral Fermentada	3 Caseína	4 Bioterio
Humedad	%	9.5±0.06 <sup>b</sup>	6.5±0.06 <sup>c</sup>	9.6±0.11 <sup>b</sup>	12.1±0.22 <sup>a</sup>
Cenizas	%	2.6±0.15 <sup>c</sup>	5.1±0.12 <sup>b</sup>	3.1±0.12 <sup>c</sup>	7.9±0.32 <sup>a</sup>
Proteína	%	17.2±0.08 <sup>c</sup>	16.1±0.13 <sup>d</sup>	18.9±0.06 <sup>b</sup>	22.9±0.54 <sup>a</sup>
Grasa	%	6.9±0.31 <sup>a</sup>	5.5±0.32 <sup>b</sup>	6.6±0.22 <sup>a</sup>	6.5±0.43 <sup>a</sup>
Fibra cruda	%	2.9±0.25 <sup>c</sup>	11.4±0.27 <sup>b</sup>	4.2±0.24 <sup>b</sup>	4.1±0.75 <sup>b</sup>
ELN	%	60.8±0.25 <sup>a</sup>	55.4±0.52 <sup>b</sup>	57.5±0.08 <sup>b</sup>	46.5±1.27 <sup>c</sup>
Energía	kcal /100 g	373.1	335.6	365.1	336.5
Fenoles totales	mg EAG/g	2.27±0.09 <sup>b</sup>	5.51±0.41 <sup>a</sup>	0.53±0.05 <sup>d</sup>	1.84±0.1 <sup>c</sup>
DPPH	mg EAA/g	2.82±0.38 <sup>b</sup>	6.44±0.28 <sup>a</sup>	0.36±0.03 <sup>d</sup>	1.97±0.05 <sup>c</sup>
Abs 290 nm	290 nm	0.15±0.01 <sup>c</sup>	0.37±0.02 <sup>a</sup>	0.08±0.01 <sup>d</sup>	0.21±0.01 <sup>b</sup>
Apigenina	mg/kg	13.71±0.69 <sup>b</sup>	23.75±0.93 <sup>a</sup>	ND	ND
Isoflavonas	mg/kg	ND	ND	ND	313.5±1.55

ELN; Extracto libre de nitrógeno, ND; No detectada. Se reporta la media ± desviación estándar (n=3). Diferente letra en la columna indica diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05).

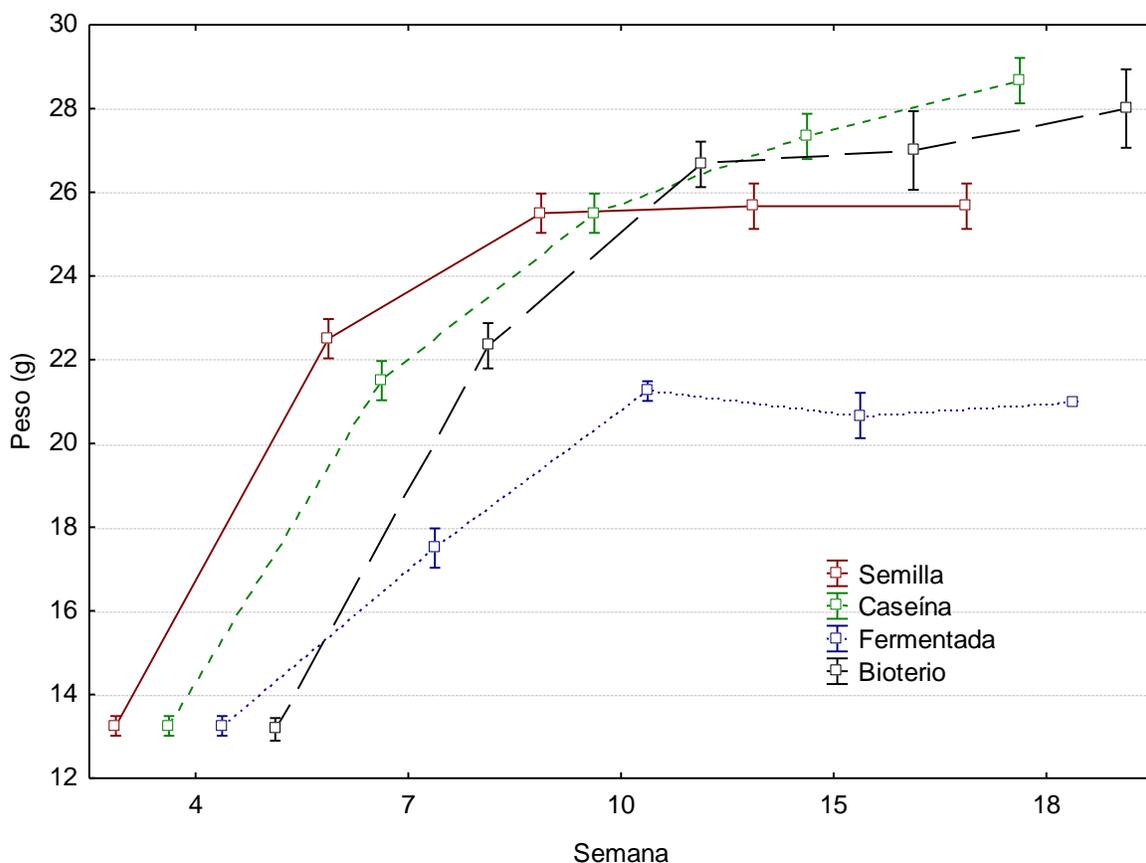
La dieta formulada con harina integral fermentada, presentó valores de proteína (16.1%) ligeramente abajo del rango recomendado, los valores de fibra superaron los rangos recomendados y los niveles de triptófano se mantuvieron en el margen. El requerimiento de triptófano para ratón es de 0.1 % [129] y en la dieta a base de harina integral fermentada el contenido de triptófano fue de 0.082 %. El

requerimiento de triptófano puede disminuir si la dieta incluye suplemento vitamínico, dado que un porcentaje importante del Trp de la dieta es destinado a la producción hepática de nicotinamida (Vitamina B3) [167].

Desde el punto de vista nutracéutico, la formulación con el mayor contenido de fenólicos y antioxidantes, fue la de harina integral fermentada, seguida de harina de semilla, alimento del bioterio y caseína. El flavonoide apigenina se mantuvo presente en la formulación de harina de semilla y en la de harina integral fermentada, mientras que en la formulación de caseína y en el alimento del bioterio no se detectó. En el alimento del bioterio, se encontraron altas cantidades de isoflavonas, que estuvieron ausentes en el resto de las formulaciones. La formulación de caseína, mantuvo los valores más bajos de antioxidantes y compuestos fenólicos y no se detectó la presencia de algún flavonoide.

En la **Figura 11**, se muestra el crecimiento del ratón C57BL/6J, consumiendo la dieta 1 (semilla), 2 (fermentada), 3 (caseína) o 4 (bioterio), de la cuarta a la dieciochoava semana de vida. Considerando las dos primeras semanas de los tratamientos, es decir de la cuarta a la sexta semana de vida, la ganancia de peso promedio para las dietas 1, 2, 3 y 4 fue de 0.51, 0.26, 0.52 y 0.52 g por día, respectivamente (**Tabla 12**). Previamente, se ha reportado ganancia de peso, en las primeras dos semanas después del destete, en la cepa C57BL/6J de 0.53 g/día [168] y ganancia de peso de hasta 1.2 g al día en otras cepas [129].

El consumo promedio de alimento por ratón durante el periodo de evaluación del tratamiento con las dietas 1, 2, 3 o 4 fue de 353, 351, 363 y 384 g, que expresado por día fue de 3.6, 3.5, 3.7 y 3.9 g, respectivamente (**Tabla 12**). Dado el consumo de alimento y la densidad energética de cada dieta, el consumo de energía durante el periodo de evaluación por tratamiento fue de 1316.7, 1142.3, 1324.9 y 1290.2 kcal, que expresado por día, fue de 13.43, 12.1, 13.51 y 13.16 kcal, respectivamente (**Tabla 12**). Considerando la eficiencia energética de la dieta, como la razón de la ganancia de peso entre el consumo de energía [169, 170, 171, 172] en el periodo evaluado, la eficiencia energética de los tratamientos 1, 2, 3 y 4, fue de 0.94, 0.63, 1.16 y 1.15, respectivamente (**Tabla 12**).



**Figura 11.** Crecimiento del ratón C57BL/6J consumiendo las dietas 1, 2, 3 y 4.

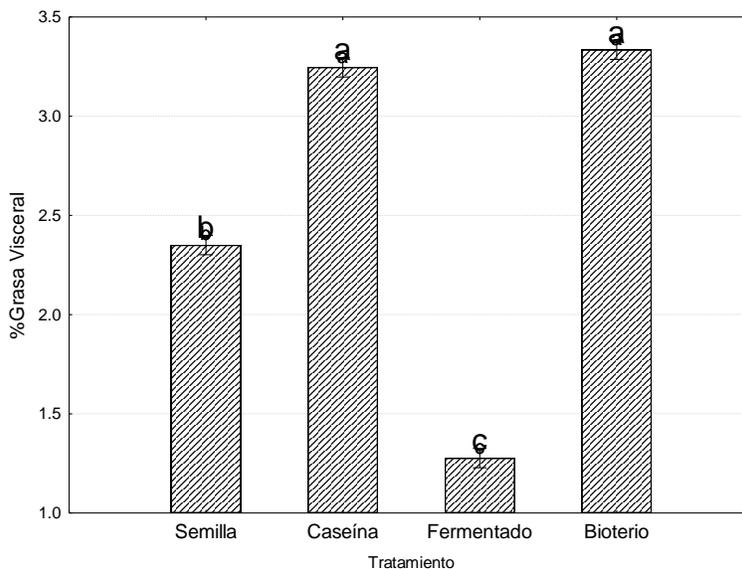
**Tabla 12.** Ganancia de peso y consumo de alimento promedio del ratón C57BL/6J en los tratamientos con las dietas 1, 2, 3, y 4.

Parámetro	Unidad	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
Ganancia de peso*	g/día	0.51	0.26	0.52	0.52
Consumo de alimento**	g/día	3.6	3.5	3.7	3.9
Consumo de energía**	kcal/día	13.43	12.1	13.51	13.26
Eficiencia energética**	%	0.94	0.63	1.16	1.15
Consumo fenoles**	mg/día	8.3	19.2	1.9	7.1
Consumo antioxidantes**	mg/día	10.1	22.5	1.3	7.4
Consumo apigenina**	mg/día	0.05	0.08	-	-
Consumo isoflavonas**	mg/día	-	-	-	1.2

\*Ganancia de peso promedio en la etapa de crecimiento entre la semana 4 y 6 de cada tratamiento. \*\* Consumo promedio durante el periodo de tratamiento. El cálculo de consumo de alimento se realizó en base al registro de consumo por caja.

La eficiencia energética de los tratamientos durante el periodo de evaluación fue semejante para las dieta 3 (caseína – 1.16) y 4 (bioterio – 1.15), donde se observó que ambas superaron la unidad, mientras que las dietas 1 (semilla – 0.94) y dos (integral fermentada – 0.63) fueron menores a uno. Este indicador, refleja la ganancia de peso durante el periodo evaluado, en función de la energía consumida. Estudios previos, llevados a cabo en ratones C57BL/6J de 6 semanas de edad (no incluye etapa de crecimiento), alimentados con una dieta hipercalórica, con más del 40 % de las calorías provenientes de grasa, presentaron una eficiencia energética mayor a uno [170,172]. Esta eficiencia energética alta, fue acompañada de un incremento en la acumulación de grasa visceral después de 10 semanas de tratamiento [170, 171, 172].

La grasa visceral de los ratones al final del tratamiento se muestra en la **Figura 12**. La mayor acumulación de grasa visceral, se presentó en los ratones alimentados con las dietas 3 (Caseína) y 4 (Bioterio), con un 3.4 y 3.6 %, respectivamente, mientras que las dietas 1 (semilla) y 2 (integral fermentada), presentaron valores menores, 2.3 y 1.3 %, respectivamente. Previamente, se ha reportado, que dietas altas en lípidos, pueden generar adiposidad visceral de hasta un 10 %, con relación al peso corporal, en ratones C57BL/6J, en periodos de 15 semanas [170, 172, 173].



**Figura 12.** Porcentaje de grasa visceral del ratón C57BL/6J al finalizar el tratamiento con las dietas.

La dieta 1, formulada a base de harina de semilla de mezquite, puede satisfacer las necesidades nutrimentales, durante la fase de crecimiento, de forma semejante a la dieta basada en caseína o el alimento comercial. Lo anterior, puede deberse a la densidad energética semejante y al buen perfil de aminoácidos de la harina de semilla, deficiente en valina, que se complementa bien con la harina de maíz. Se ha reportado previamente, que la incorporación, en la dieta de roedor, de frijol extrudido como fuente de proteína [174] o en combinación con maíz [175] reduce significativamente el crecimiento en comparación con dietas a base de caseína.

Por su parte, la dieta 2, formulada, a base de harina integral fermentada de vaina de mezquite reduce a la mitad, la velocidad de crecimiento de los animales en comparación con las otras dietas. La disminución en la velocidad de crecimiento puede deberse a la baja densidad energética de la dieta debido al alto contenido de fibra [129] y a la deficiencia de Trp [176].

El consumo, a libre demanda, de las dietas 3 (caseína) y 4 (biotério), durante 15 semanas, favorecen la acumulación de grasa visceral en ratón C57BL/6J, mientras que las dietas 1 y 2, no inducen este efecto. A diferencia de la dieta 2 (integral fermentada), que reduce el crecimiento del ratón, la dieta 1 (semilla) soporta la etapa de crecimiento del ratón, así como las dietas 3 y 4, con la ventaja de que esta dieta no induce acumulación de grasa visceral.

La química sanguínea de cuatro elementos y el índice aterogénico del ratón C57BL/6J, medido después del tratamiento con las dietas 1, 2, 3 y 4, se presentan en la **Tabla 13**. Al final de los diferentes tratamientos, las dietas 3 (caseína) y 4 (biotério) mostraron niveles sanguíneos de glucosa, triglicéridos y colesterol, significativamente más altos que las dietas 1 (semilla) y 2 (integral fermentada).

El índice aterogénico, estimado como la razón entre el colesterol total y el colesterol HDL [42, 49], también fue significativamente más alto en los tratamientos con las dietas 3 (caseína) y 4 (biotério), que en los tratamientos con las dietas 1 (semilla) y 2 (integral fermentada). En comparación con las dietas 3 (caseína) y 4 (biotério), las dietas 1 (semilla) y 2 (integral fermentada), tiene un efecto hipoglucemiante e hipolipemiante en ratón C57BL/6J.

**Tabla 13.** Química sanguínea de 4 elementos e índice aterogénico en ratón C57BL/6J después del periodo de tratamiento con las dietas 1, 2, 3, y 4.

mg/dL	Dieta			
	1 Semilla	2 Integral fermentada	3 Caseína	4 Bioterio
Glucosa	233.6±8.7 <sup>b</sup>	161.3±11.2 <sup>c</sup>	289.6±8.5 <sup>a</sup>	309.6±9.6 <sup>a</sup>
Triglicéridos	101.6±9.1 <sup>b</sup>	81.4±6.9 <sup>c</sup>	158.3±12.5 <sup>a</sup>	167.3±13.8 <sup>a</sup>
C-Total	73.58±5.6 <sup>c</sup>	50.3±6.2 <sup>d</sup>	130.9±11.8 <sup>a</sup>	90.3±6.3 <sup>b</sup>
C-HDL	32.76±4.8 <sup>b</sup>	23.9±4.4 <sup>c</sup>	39.8±6.2 <sup>a</sup>	25.7±4.2 <sup>c</sup>
IA (C/C-HDL)	2.25±0.16 <sup>b</sup>	2.11±0.19 <sup>b</sup>	3.31±0.48 <sup>a</sup>	3.51±0.13 <sup>a</sup>

C; Colesterol, C-HDL; Colesterol en lipoproteínas de alta densidad, IA; Índice aterogénico. Se reporta la media ± desviación estándar (n=6) (mg/dL). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05).

Previamente, se han reportado la actividad cardioprotectora del consumo de harinas de vaina de *P. glandulosa*, en modelo de diabetes inducida en rata, en donde se observó la disminución de los niveles de glucosa en sangre y un estímulo a la secreción de insulina en los animales con inducción de diabetes, tratados con 100 mg/kg/día, de polvo comercial de harina integral de vaina de *P. glandulosa*, en comparación con los animales sin tratamiento, sin embargo, no se reportaron las características nutrimentales o nutraceuticas de los materiales utilizados [115]. En otro trabajo, en el cual se utilizó la dosis del trabajo anterior de harina integral de *P. glandulosa*, se suministró durante ocho semanas, en un modelo de rata, también se mostró el efecto hipoglucemiante del consumo de estas harinas, que además, redujeron significativamente el daño isquémico cardiaco, inducido por perfusión del corazón y la hipertensión, tampoco se reportó una descripción nutrimental o nutraceutica de los materiales utilizados [114].

Otras leguminosas, como el frijol incluidas en la dieta de ratas (Sprague–Dawley) y ratones (C57BL/6J) en un 35 y 60 %, reducen, significativamente, los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre después de 7 días de tratamiento, un efecto asociado al incremento en la actividad de enzimas involucradas con el transporte reverso de colesterol [177]. Además, en el mismo trabajo, ratones obesos, pierden

peso después de 12 días de tratamiento con una dieta a base de frijol [177], sin embargo, no se reportó la descripción nutrimental o nutracéutica de las dietas.

Dietas altas en lípidos que incorporan un 20 % de harina de variedades negras de frijol de soya, disminuyen el peso corporal y los niveles sanguíneos de glucosa, triglicéridos y colesterol, después de 11 semanas de tratamiento. Estas dietas, incrementan la producción de ácidos grasos de cadena corta y diversifican la población de la flora microbiana, un efecto asociado a la fibra y a la presencia de compuestos fenólicos en las harinas de frijol de soya [178].

Utilizando el mismo modelo de ratón (C57BL/6J), con dietas altas en lípidos, se ha evidenciado la actividad antiobesogénica, hipoglucemiante, hipolipemiante y antiaterogénica de extractos de té (ricos en epigallocatequina galato) [179], extractos de bayas rojas (ricos en antocianinas y quercetina) [180], extracto de pitaya (ricos en betacianinas) [181], extractos del hongo *Ganoderma lucidum* (rico en polifenoles) [182], extracto de ginseng (rico en saponinas o ginsenósidos) [183] y extracto de plantas medicinales, como *Sophora tonkinensis* (rico en flavonoides) [184]. El efecto biológico de estos materiales ha sido asociado a su actividad antioxidante, a la modulación de la flora intestinal, a la regulación de genes relacionados con el metabolismo energético-lipídico y a la activación del transporte reverso del colesterol.

En el presente trabajo ninguna de las dietas, fue alta en el contenido de grasas, sin embargo, durante el periodo en el que se evaluaron los diferentes tratamientos, se evidenciaron cambios significativos en la ganancia de peso, la acumulación de grasa visceral y en los parámetros bioquímicos, incluyendo el índice aterogénico. Estas diferencias, sugieren la actividad antiaterogénica de las dietas, basadas en harina de vaina de mezquite, en las que destaca, principalmente su carga de compuestos fenólicos, la actividad antioxidante y la presencia de apigenina, características que adquieren relevancia *per se* y por las características del modelo de ratón utilizado.

5.4. El ratón C57BL/6J y la disminución del riesgo aterogénico por consumo de dietas basadas en harinas de vaina de mezquite.

El ratón C57BL/6J, es utilizado ampliamente en ensayos biológicos de enfermedades metabólicas, debido a que es un modelo con susceptibilidad al desarrollo de aterosclerosis y diabetes. Cuando este modelo se expone a una dieta alta en lípidos, que favorece un balance energético positivo, desarrolla dislipidemia, es decir, incrementan sus niveles sanguíneos de colesterol total, colesterol en lipoproteína de baja densidad (LBD) y triglicéridos, al mismo tiempo que disminuye el colesterol de alta densidad (LAD) [185, 186, 187].

A diferencia de otros modelos, su característica principal, es la disminución en la lipoproteína de alta densidad (LAD), descrita como antiaterogénica, por su papel clave en el transporte reverso del colesterol y por tanto, sus niveles bajos, correlacionan con un incremento de lesiones en el epitelio vascular [185, 186, 187]. La razón de esta disminución, en los niveles de LAD se debe al incremento en el catabolismo de LAD, un efecto asociado al gen *Ath-1* y su ligación al gen *Alp-2*, el gen que codifica a la lipoproteína ApoA-II, el principal componente de la LAD [185, 186, 187].

En condiciones de hipertrigliceridemia, el colesterol transportado en las LAD puede ser transferido a apolipoproteínas que contienen ApoB (LMDB, LDI y LBD) en intercambio por triglicéridos [39, 40, 41]. Los triglicéridos en LAD pueden ser removidos por la lipasa hepática, generando LAD pequeñas que son degradadas con mayor facilidad. La actividad de la lipasa hepática, se incrementa en condiciones de resistencia a la insulina, generando bajos niveles de LAD circulante [43, 45]. Las LAD que han sido desprovistas de su carga lipídica, tienen alta susceptibilidad de ser degradadas [40, 41].

Este incremento en el riesgo aterogénico asociado a la disminución en los niveles de LAD en sangre en ratón C57BL/6J, se asemeja al fenómeno que se observa en humanos, en donde, una disminución en las LAD, también incrementa el riesgo aterogénico [186].

Por otra parte, el ratón C57BL/6J, expuesto crónica o subcrónicamente a una dieta con balance energético positivo, alta en lípidos, desarrolla sobrepeso, resistencia a

la insulina e incrementan sus niveles de glucosa, un perfil metabólico semejante a la diabetes humana tipo II, en la que la obesidad induce el desarrollo de diabetes [188]. Este incremento en los niveles de glucosa se genera por una deficiencia en las células beta del páncreas, para liberar insulina, en respuesta al incremento en los niveles de glucosa y por el desarrollo de resistencia a la insulina en tejidos periféricos [189, 190].

La deficiencia en la liberación de insulina, en el páncreas y la resistencia a la insulina en tejidos periféricos del ratón C57BL/6J, se asocia a una delección en el gen nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (NNT), una enzima mitocondrial transmembranal con función de bomba de protones. La disfunción de este gen, modifica la transducción de señales, que conducen a una limitada capacidad de las células pancreáticas de permitir el flujo de calcio y liberar insulina [189, 190].

NNT cataliza la reducción de NADP a NADPH, utilizando NADH como donador de electrones y generando NAD. El NADPH, generado en esta reacción es utilizado por la glutatión reductasa, para convertir al glutatión a su forma reducida, el glutatión reducido, es usado por la glutatión peroxidasa, para transformar el peróxido de hidrógeno (generado por la superóxido dismutasa, a partir del ion superóxido de la cadena transportadora de electrones) en agua [191, 192].

La ausencia de la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa, en el ratón C67BL/6J, genera una disminución en la capacidad celular de neutralizar radicales libres. En estas condiciones, el ion superóxido y el peróxido de hidrógeno, pueden activar a la proteína desacoplante 2 (UPC-2), que permitirá el paso de protones a través de la membrana interna de la mitocondria, reduciendo el potencial de membrana y la producción de ATP, estableciéndose como un sistema de control, que limita la actividad de la cadena transportadora de electrones y reduciendo la producción global de ATP y de radicales libres [192]. El fenómeno anterior es particularmente importante, cuando se advierte en las células pancreáticas, donde el resultado final es una limitada liberación de insulina [192], sin embargo, en otros tejidos, como músculo o tejido adiposo, puede inducir resistencia a la insulina, que puede revertirse con el tratamiento con antioxidantes [193, 194, 195, 196].

Una dieta, con balance energético positivo, favorece la formación de ATP, debido a una alta actividad de la cadena transportadora de electrones y con ello, incrementa la posibilidad de generar ion superóxido y peróxido de hidrógeno [197]. Este ambiente celular oxidativo, puede afectar la actividad catalítica de muchas enzimas, particularmente de aquellas que contiene cisteína (Cys) en su sitio activo. Se han identificado más de 20,000 proteínas que cumplen esta condición y cuya actividad es susceptible de ser modificada por el estado redox del ambiente celular [197]. El átomo de azufre de la Cys, puede existir en diferentes estados de oxidación, como un tiol reducido (SH), un anión tiolato (S<sup>-</sup>), un disulfuro (S-S), un sulfenato (SO<sup>-</sup>), un sulfinato (SO<sub>2</sub>) o un sulfonato (SO<sub>3</sub>). Estos cambios en el átomo de azufre de la Cys, pueden inducir cambios en la conformación de la proteína, modificando su actividad [197, 198].

Un gran grupo de enzimas, cuyo sitio activo tiene una Cys, es el grupo de las fosfatasas, en general, la actividad de las fosfatasas (remover grupo fosfato), es abatida en respuesta a un cambio oxidativo en el ambiente celular, pues la Cys pierde su forma reducida (SH), necesaria para la actividad catalítica, incrementando, en consecuencia la actividad de las cinasas (agregar grupo fosfato) [197, 198]. Normalmente, en el ambiente celular, la actividad fosfatasa es 10 veces mayor que la actividad cinasa y el estrés oxidativo puede modificar esta relación [197, 198].

El estrés oxidativo, que favorece la actividad cinasa, se ha relacionado con la inactivación por fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1), lo cual interfiere la cascada de señalización de insulina e inhibe la expresión y actividad del transportador de glucosa (GLUT4), generando resistencia a la insulina [199, 200, 201, 202]. Una de las cinasas, relacionada con la inactivación por fosforilación de IRS1, es la Jun N-Terminal cinasa (JNK), también conocida como SAPK (Stress Activated Protein Kinase), que pertenece a la familia de las MAP cinasas (mitogen-activated protein kinase - MAPK). La actividad de JNK es particularmente alta en condiciones de estrés oxidativo y genera resistencia a la insulina [202, 203]. En el ratón C57BL/6J, mantenido con una dieta con balance energético positivo, la actividad elevada de JNK en músculo, está asociada con la resistencia a la insulina

y la hiperglicemia, característica de esta sepa [204]. La inclusión de antioxidantes reduce la actividad de JNK y la resistencia a la insulina [193, 205].

Otra consecuencia de la inactividad de la NNT, en el ratón C57BL/6J es un menor gasto energético. Dado que la reacción catalizada por NNT, se realiza a expensas del gradiente de electrones, que tiene como finalidad principal la producción de ATP, la inactividad de esta reacción disminuye el consumo de energía, de oxígeno y de producción de CO<sub>2</sub>, generando tendencia a la acumulación de tejido adiposo [198]. En resumen, el ratón C57BL/6J, es un modelo de dislipidemia e hiperglicemia, ante una dieta con un balance energético positivo, cuyas características son semejantes a las alteraciones metabólicas encontradas en humanos. La dislipidemia se asocia principalmente, a la disminución en el transporte reverso del colesterol, mientras que la hiperglicemia, se asocia a una limitada liberación de insulina y a una resistencia a la insulina en tejidos periféricos, ambas generadas por estrés oxidativo, debido a la ausencia de la actividad de NNT.

Según los tratamientos evaluados en el presente trabajo, la dieta 1 formulada a base de harina de semilla de mezquite y la dieta 2, a base de harina integral de vaina de mezquite, generan niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol, significativamente más bajos que la dieta 3, a base de caseína y la dieta 4, alimento del bioterio. Al mismo tiempo, los tratamientos con dietas a base de mezquite, presentaron menor índice aterogénico y un menor porcentaje de grasa visceral, en comparación con las dietas 3 (caseína) y 4 (bioterio).

Considerando los patrones de consumo, en cada tratamiento (**Tabla 12**), la velocidad de crecimiento (0.26 g/día) y la energía consumida (12.1 kcal/día), permiten describir a la dieta 2 (integral fermentada), como una dieta cuya deficiencia en Trp, densidad calórica baja y un contenido de fibra alto, que no permite alcanzar un balance energético positivo (eficiencia energética de 0.63), por lo que el modelo animal, no desarrolla el fenotipo de hiperglicemia, dislipidemia y obesidad esperado. El balance energético positivo, en la dieta del ratón C57BL/6J es una condición necesaria para el desarrollo del fenotipo esperado [206].

A diferencia de la dieta 2, el perfil nutrimental de la dieta 1 (semilla), permite mantener una velocidad de crecimiento (0.51 g/día) y un consumo de energía (13.43

kcal/día) semejantes a los de las dietas 3 (caseína – 0.52 g/día y 13.51 kcal/día) y 4 (biotero 0.52 g/día y 13.26 kcal/día), pero con una eficiencia energética menor (0.94), sin desarrollar el fenotipo de hiperglicemia, dislipidemia y obesidad, que si se manifiesta en los tratamientos con las dietas 3 (caseína) y 4 (biotero).

Estas diferencias, no pueden ser explicadas con base al perfil nutrimental y densidad calórica de las dietas. Considerando las características de este modelo de ratón y la asociación de su fenotipo a una deficiencia en la actividad de la NNT, que genera estrés oxidativo, resistencia a la insulina y deficiencias en el transporte reverso del colesterol [185, 190], las diferencias deben ser abordadas en términos de las propiedades antioxidantes de las dietas o de los componentes presentes, capaces de modular el metabolismo de cinasas, como JNK [204].

Considerando la composición de las dietas (**Tabla 11**) y el patrón de consumo durante los tratamientos (**Tabla 12**), el mayor consumo promedio de fenoles totales (19.2 mg/día), antioxidantes (22.5 mg/día) y apigenina (0.08 mg/día), fue en el tratamiento con la dieta 2 (integral fermentada), en este tratamiento, se encontraron los niveles sanguíneos más bajos de glucosa (161.3 mg/dL), triglicéridos (81.4 mg/dL) y colesterol total (50.3 mg/dL), un índice aterogénico bajo (2.11) (tabla 13) y el nivel más bajo de grasa visceral (1.3%) (Figura 12). Podría inferirse que el tratamiento con la dieta 2, la más alta en antioxidantes, inhibe el fenotipo de hiperglicemia, dislipidemia y obesidad en el ratón C57BJ/6J, sin embargo, dada su deficiencia de Trp y su baja densidad calórica, que determinan una baja velocidad de crecimiento (0.26 g/día) y eficiencia energética (0.63) (**Tabla 12**), la dieta no permite obtener el balance energético positivo, necesario para la expresión del genotipo [206], por lo que no es concluyente y más estudios deberán realizarse para explorar esta posibilidad.

El tratamiento con la dieta 1 (semilla), permitió el segundo consumo promedio más alto de fenoles totales (8.3 mg/día), antioxidantes (10.1 mg/día) y apigenina (0.05 mg/día) (tabla 12), con niveles sanguíneos de glucosa (233.6 mg/dL), triglicéridos (101.6 mg/dL) y colesterol total (73.5 mg/dL), índice aterogénico de 2.25 (tabla 13) y el 2.3% de grasa visceral (**Figura 12**). El consumo de fenoles, antioxidantes y apigenina en el tratamiento con la dieta 1 fue significativamente más alto al consumo

en los tratamientos con las dietas 3 y 4 (**Tabla 12**) y los valores de glucosa, triglicéridos, colesterol, índice aterogénico y porcentaje de grasa visceral fueron significativamente más bajos a los valores encontrados en los tratamientos con las dietas 3 y 4 (**Tabla 12 y Figura 12**).

Dado que la velocidad de crecimiento y el consumo de calorías en los tratamientos con las dietas 1 (semilla), 3 (caseína) y 4 (bioterio) fue semejante (**Tabla 12**), puede decirse que las tres dietas permiten un balance energético positivo, sin embargo, la eficiencia energética fue más baja en la dieta 1 (0.94) que en las dietas 3 (1.16) y 4 (1.15), esta eficiencia energética alta en las dietas 3 y 4, coincide con los niveles significativamente más altos de grasa visceral 3.2 y 3.35%, respectivamente, en comparación a la dieta 1. Por lo anterior puede decirse que el tratamiento con la dieta 1, formulada a base de harina de semilla de mezquite pudo inhibir el desarrollo del fenotipo de hiperglicemia, dislipidemia y obesidad en el ratón C57BJ/6J y que es su contenido de antioxidantes y apigenina, los determinantes causales de este efecto.

El efecto inhibitor del fenotipo de hiperglicemia, dislipidemia y obesidad, en el ratón C57BL/6J, de los antioxidantes se ha reportado anteriormente, utilizando antioxidantes naturales [179], extractos ricos en flavonoides y compuestos fenólicos [180, 181, 182, 184], vitaminas [205] o sustancias sintéticas [193, 200]. En estos trabajos, se plantea al efecto antioxidante, como mecanismo para abatir el estrés oxidativo, que domina en el modelo, debido a la ausencia de la actividad NNT y a la reducción de la actividad de las cinasas como JNK, inducibles por estrés oxidativo [202, 203].

El uso de antioxidantes naturales o presentes en la dieta en la protección del desarrollo de estrés oxidativo y sus efectos en el metabolismo, aún no está completamente descrito, se han utilizado sustancias puras como el epigallocatequina galato (3.2 g/kg de alimento) [179], extractos compuestos por mezclas de flavonoides sin cuantificar [180, 182, 184] o sustancias sintéticas, administradas por vía parenteral [193, 200], sin embargo aún debe explorarse la farmacocinética de estos compuestos, a fin de encontrar una relación cuantitativa entre la naturaleza del agente utilizado, la dosis y el efecto.

Particular interés, tiene la presencia de apigenina, en las harinas y dietas a base de harinas de vaina de mezquite. En el presente trabajo, la dosis alcanzada en el tratamiento con la dieta 1, con un contenido de apigenina de 13.7 mg/kg de alimento, es de 3 mg/kg de peso corporal. En el modelo de ratón C57BL/6J, la apigenina ha mostrado su capacidad de reducir los niveles de glucosa y de lípidos en sangre, cuando se administra intraperitonealmente en dosis de 100 mg/kg durante 7 días [207], también cuando se administra en dosis de 10 mg/kg, de peso corporal al día, por vía gástrica [208, 209] o vía intraperitoneal [210]. La apigenina utilizada al 0.005% [211] y 250 mg/kg [212] en la dieta, también reduce significativamente los niveles sanguíneos de glucosa y de lípidos en ratón C57BL/6J.

La apigenina ha mostrado su capacidad de reducir y modular la actividad de JNK en cultivos celulares [213, 214]. En adipocitos de la línea 3T3-L1, la apigenina suprime la adipogénesis, activando a la AMPK (AMP-activated protein kinase) [215]. La exploración de la actividad de apigenina en el contexto celular humano, ha mostrado su capacidad de interactuar con más de 160 genes relacionados con activación de GTPasas, transportadores de membrana y rearrreglos alternativos de ARNm, lo que la establece como un metabolito de alto potencial terapéutico, cuyos alcances están siendo investigados [146]. Particular atención tiene la actividad de este metabolito, en su interacción con la flora intestinal y el gasto de energía, dietas altas en lípidos, favorecen poblaciones microbianas intestinales, que metabolizan apigenina y en consecuencia, disminuyen su biodisponibilidad [216]. Apigenina estimula el consumo de energía en el tejido graso, activando a la proteína desacoplante 1 (UPC-1), con actividad termogénica [216].

Los componentes de las harinas de mezquite, de la semilla en particular, tienen la capacidad de inhibir el fenotipo de hiperglicemia, dislipidemia y obesidad en ratón C57BL/6J, un efecto asociado a su carga de antioxidantes y apigenina. Es necesaria una mejor caracterización del espectro de metabolitos secundarios en las harinas de vaina de mezquite, así como del efecto que el consumo de diferentes dosis, pueden ejercer en la modulación del metabolismo energético en ratón y en humano.

Dado el perfil nutrimental, el contenido de compuestos activos y su efecto en el desarrollo de dislipidemia *in vivo*, las harinas de vaina de mezquite, particularmente

la harina de semilla, pueden ser incorporadas a los sistemas alimentarios de consumo internacional, como un elemento que ayude a modificar las dietas en atención a las recomendaciones internacionales [84, 217], que promueven la reducción del consumo de proteína animal en un 50 % y el aumento en el consumo de leguminas en un 100 %, a fin de abatir el impacto de los riesgos dietarios en la carga de enfermedad mundial y alcanzar un sistema alimentario sustentable y amigable con el ambiente.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

La molienda de la vaina de mezquite, permite obtener tres fracciones, harina de mesocarpo, harina de semilla y harina integral. La harina de mesocarpo tiene un contenido muy alto de azúcares, bajo contenido de proteína y de fibra y es deficiente en Ile. La harina de semilla, tiene un alto contenido de proteína y fibra, bajo contenido de azúcares y es deficiente en Val. La harina integral, tiene un alto contenido de azúcares, alto contenido de proteína y de fibra y es deficiente en Ile y Val. La fermentación de la harina integral, disminuye los niveles de azúcares, de forma muy importante y concentra la fibra y la proteína, siendo deficiente en Trp.

En las cuatro harinas, los niveles de lípidos son muy bajos, mientras que los niveles de fibra y de arginina son altos en la harina de semilla y en la harina integral fermentada. El alto contenido de azúcares en la harina de mesocarpo y en la harina integral, limita su acción antiaterogénica. El perfil nutricional de la harina de semilla y de la harina integral fermentada, favorece la inhibición de la aterogénesis, al ser bajas en grasas generan bajos niveles de LMBD, mientras que los altos niveles de fibra, favorecen el transporte reverso del colesterol, mientras que el contenido de arginina favorece la formación de NO, protegiendo de la disfunción endotelial.

Los altos niveles de compuestos fenólicos totales y la capacidad de captación de radicales DPPH de las harinas se incrementan significativamente durante el tratamiento térmico por horneado, un efecto asociado a la generación de productos de la reacción de Maillard, que no se observa durante el procesamiento por extrusión. La apigenina presente en las harinas, es estable ante el procesamiento por horneado o extrusión. La fermentación de la harina integral fermentada concentra el contenido de fenoles totales, la capacidad de captación de radical DPPH y el contenido de apigenina. Este contenido de compuestos activos puede reducir la aterogénesis, inhibiendo la oxidación de la LBD y estabilizando la producción de NO.

Por su composición las harinas de semilla e integral fermentada, permitieron la formulación de dietas para ratón C57BL/6J, con un contenido de 17 % de proteína. La harina de mesocarpo y la harina integral, no fueron usadas en la formulación de dietas, debido a su bajo contenido de proteína y a su alto contenido de azúcares

libres. El contenido de compuestos activos, en las dietas formuladas a base de harinas de semilla de mezquite e integral fermentada, fue significativamente superior a los encontrados en la dieta formulada a base de caseína y al alimento comercial del bioterio basado en soya.

La dieta a base de harina de semilla, mantiene una velocidad de crecimiento del ratón C57BL/6J, semejante a la de la dieta basada en caseína y a la del bioterio, mientras que la dieta basada en harina integral fermentada genera una disminución importante en la velocidad de crecimiento. El valor nutrimental de la dieta a base de semilla de mezquite, es semejante a las dietas de comparación, mientras que la dieta a base de harina integral fermentada, es energéticamente menos densa y deficiente en Trp.

A pesar de mantener una velocidad de crecimiento adecuada, la eficiencia energética, al final del tratamiento, con la dieta a base de semilla de mezquite, fue significativamente inferior a las dietas de comparación y coincidió con la ganancia de peso y el porcentaje de grasa corporal, sugiriendo que la dieta a base de semilla de mezquite, limita el desarrollo del fenotipo obeso del modelo.

La dieta a base de semilla de mezquite, también reduce significativamente los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre, en comparación con la dieta basada en caseína o la basada en alimento de bioterio, generando un menor índice aterogénico. La carga de antioxidantes y apigenina reduce el estrés oxidativo, que genera resistencia a la insulina y disminución de los niveles de LAD, característicos de este modelo.

El perfil nutrimental y el contenido de compuestos activos, apigenina particularmente, de las harinas de semilla de mezquite, pueden inhibir el desarrollo del fenotipo de hiperglucemia, dislipidemia y obesidad en el modelo, a través de mecanismos que limitan el estrés oxidativo en el modelo, por lo que una dieta basada en semilla de esta leguminosa, puede considerarse como antiaterogénica, a través de la modulación de la dislipidemia. En trabajos posteriores, deberá ponerse mayor atención en una mejor definición de los compuestos activos presentes en las harinas de mezquite y en la búsqueda de los mecanismos moleculares de interacción celular que expliquen el efecto en el ratón C57BL/6J.

## 7. REFERENCIAS.

1. WHO. The double burden of malnutrition. Policy brief. Geneva, World Health Organization; **2017**.
2. Prentice, A. M. The double burden of malnutrition in countries passing through the economic transition. *Annals of Nutrition Metabolism*. **2018**, 72, 47–54.
3. FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. The state of food security and nutrition in the world 2018; Building climate resilience for food security and nutrition. Rome, FAO; **2018**.
4. WHH. Global Hunger Index; Forced migration and hunger. Germany, Welt Hunger Hilfe; **2018**.
5. WHO. World health statistics 2018. Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva, World Health Organization; **2018**.
6. WHO. Global status report on non-communicable diseases 2014. Geneva, World Health Organization; **2014**.
7. GBD – Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet*. **2016**; 388, 1659-1724.
8. WHO. Global hearts initiative working together to beat cardiovascular diseases. Geneva, World Health Organization; **2018**.
9. IMSS. Informe al ejecutivo federal y al congreso de la unión sobre la situación financiera y los riesgos del instituto mexicano del seguro social 2017-2018. México, Instituto Mexicano del Seguro Social; **2018**.
10. The Lancet. Global burden of disease visualizations. 2019. <https://www.thelancet.com/lancet/visualisations/gbd-compare>.
11. WHO. Non-communicable diseases country profiles 2014. Geneva, World Health Organization; **2014**.
12. OCDE. Panorama de la salud 2017 indicadores de la OCDE. Paris, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico; **2018**.
13. OMS. Monitoreo de avances en materia de las enfermedades no transmisibles 2017. Ginebra, Organización Mundial de la Salud; **2017**.
14. Einarson, T. R.; Acs, A.; Ludwig, C. and Panton, U. H. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007–2017. *Cardiovascular Diabetology*. **2018**, 17:83.

15. Rader, D. J. and Daugherty, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*. **2008**, 451, 904-913.
16. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature*. **2000**, 407, 233-241.
17. Baumer Y.; McCurdy, S.; Weatherby, T.M.; Mehta, N. N.; Halbherr, S.; Halbherr, P.; Yamazaki, N. and Boisvert, W. A. Hyperlipidemia-induced cholesterol crystal production by endothelial cells promotes atherogenesis. *Nature Communications*. **2017**, 8, 1129.
18. Incalza, M.A.; D'Oria, R.; Natalicchio, A.; Perrini, S.; Laviola, L. and Giorgino, F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular Pharmacology*. **2018**, 100, 1-19.
19. Su, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World Journal of Cardiology*. **2015**, 7, 719-741.
20. Mudau, M.; Genis, A. Lochner, A. and Strijdom, H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular Journal of Africa*. **2012**, 23, 222-232.
21. Stapleton, P. A.; Goodwill, A. G.; James, M.E.; Brock, R. W. and Frisbee, J.C. Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *Journal of Inflammation*. **2010**, 7:54.
22. Tousoulis, D.; Kampoli, A. M.; Papageorgiou, C. T. and Stefanadis, C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Current Vascular Pharmacology*. **2012**, 10, 4-18.
23. Ryoo, S.; Berkowitz, D. E.; and Lim, H. K. Endothelial arginase II and atherosclerosis. *Korean Journal of Anesthesiology*. **2011** 61, 1, 3-11.
24. Akinyemi, A. J.; Oboh, G.; Ademiluyi, A. O.; Boligon, A. A. and Athayde, M. L. Effect of two ginger varieties on arginase activity in hypercholesterolemic rats. *Journal of Acupuncture Meridian Studies*. **2016**. 9, 80-87.
25. El Assar, M.; Angulo, J.; Santos, R.M.; Ruiz, de Adana, J. C.; Pindado, M. L.; Sánchez, F. A.; Hernández, A. and Rodríguez, M.L. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) elevation and arginase up-regulation contribute to endothelial dysfunction related to insulin resistance in rats and morbidly obese humans. *The Journal of Physiology*. **2016**, 594, 3045–3060.
26. Bhatta, A.; Yao, L.; Xu, Z.; Toque, A. H.; Chen, J.; Atawia, T. R.; Fouda, Y. A.; Bagi, Z.; Lucas, R.; Caldwell, B. R. and Caldwell, W. R. Obesity-induced vascular dysfunction and arterial stiffening requires endothelial cell arginase 1. *Cardiovascular Research*. **2017**, 1-13.
27. Cong, N. M.; Taek, P. J.; Gwan, J. Y.; Hwa, J. B.; Lae, H. K.; Myeong, K. Y.; Kyo, L. H.; and Ryoo, S. Arginase inhibition restores peroxynitrite-induced endothelial dysfunction via l-arginine-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Yonsei Medical Journal*. **2016**, 57, 1329-1338.

28. Hyung, C. J.; Moon, J.; Sue, L. Y.; Hye-Kyung, C.; Lee, S. and Min-Jeong, S. Arginase inhibition restores endothelial function in diet-induced obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2014**. Doi; 10.1016/j.bbrc.2014.07.083.
29. El-Bassossy, M. H.; El-Fawal, R.; Fahmy, A. and Watson, L. M. Arginase inhibition alleviates hypertension in the metabolic syndrome. *British Journal of Pharmacology*. **2013**, 169, 693–703.
30. Minozzo, B. R.; Fernandes, D and Beltrame, F L. Phenolic compounds as arginase inhibitors: New insights regarding endothelial dysfunction treatment. *Planta Medica*. **2018**, 84, 277–295.
31. Girard-Thernier, C; Pham T. N. and Demougeot, C. The promise of plant-derived substances as inhibitors of arginase. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **2015**, 15, 798-808.
32. Heffernan, S. K; Fahs, A. C.; Ranadive, M. S. and Patvardhan, A. E. L-Arginine as a nutritional prophylaxis against vascular endothelial dysfunction with aging. *Journal of Cardiovascular Pharmacology Therapy*. **2011**, 15, 17-23.
33. Paes, L. M.; Casella, F. A. and Palandri, C. A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: implications for atherogenesis. *Clinics*. **2009**, 64, 471-478.
34. Sibal, L.; Agarwal, C. S.; Home, D. P.; and Boger, H. R. The role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Current Cardiology Reviews*. **2010**, 6, 82-90.
35. Di, F. M.; Lucchino, B.; Conti, F.; Valesini, G. and Spinelli, F. R. Asymmetric dimethyl arginine as a biomarker of atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Hindawi Mediators of Inflammation*. **2018**, Doi; 10.1155/2018/3897295.
36. Helkin, A.; Stein, J. J.; Lin, S.; Siddiqui, S; Maier, G. K. and Gahtan, V. Dyslipidemia part 1—review of lipid metabolism and vascular cell physiology. *Vascular and Endovascular Surgery*. **2016**, 50, 107-118.
37. Nguyen, P.; Leray, V.; Diez, M.; Serisie, R. S.; Le Bloch, J.; Siliart, B. and Dumon, H. Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. **2008**, 92, 272-282.
38. Daniels, F. T.; Killinger, M. K.; Michal, J.J; Wright, Jr W. R. and Jiang, Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *International Journal of Biological Sciences*. **2009**; 5, 474-488.

39. Iqbal, J.; Qarni, A.A.; Hawwari, A.; Alghanem, F. A. and Ahmed, G. Metabolic syndrome, dyslipidemia and regulation of lipoprotein metabolism. *Current Diabetes Reviews*. **2019**, *13*, 1-6.
40. Agrawal, S.; Zaritsky, J.J.; Fornoni, A. and Smoyer, E.W. Dyslipidaemia in nephrotic syndrome: mechanisms and treatment. *Nature Reviews Nephrology*. **2018**, *14*, 57-70.
41. Peng, J.; Luo, F.; Ruan, G.; Peng, R. and Li, X. Hypertriglyceridemia and atherosclerosis. *Lipids in Health and Disease*. **2017**, *6*, 233.
42. Musunuru, K. Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention. *Lipids*. **2010**, *45*, 907–914.
43. Ginsberg, N. H.; Zhang, Y. and Hernandez-Ono, A. Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obesity*. **2006**, *14*, 41-49.
44. Hunter, M.P. and Hegele, A. R. Functional foods and dietary supplements for the management of dyslipidaemia. *Nature Reviews Endocrinology*. **2017**, 1-11.
45. Hurtubise, J.; McLellan, K.; Durr, K.; Onasanya, O.; Nwabuko, D. and Fomusi, N. J. The different facets of dyslipidemia and hypertension in atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Report*. **2016**, *18*:82.
46. Singh, A.K.; Singh, K. S.; Singh, N.; Agrawal, N. and Gopal, K. Obesity and dyslipidemia. *International Journal of Biological and Medical Research*. **2011**, *2*, 824-828.
47. Ju, J.U.; and Choi, M. Obesity and its metabolic complications: The role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International. Journal of Molecular Science*. **2014**, *15*, 6184-6223.
48. Klop, B.; Elte, F. W. J. and Castro, C. M. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. **2013**, *5*, 1218-1240.
49. Bamba, V. and Rader, J. D. Obesity and atherogenic dyslipidemia. *Gastroenterology*. **2007**, *132*, 2181–2190.
50. Shulman, I. G. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *The New England Journal of Medicine*. **2016**, 1131-1142.
51. Rader, J. D. New therapeutic approaches to the treatment of dyslipidemia. *Cell Metabolism Review*, 2016, 405-4012.
52. Schwingshackl, L.; Schwedhelm, C.; Hoffmann, G.; Lampousi, A.; Knüpel, S.; Iqbal, K.; Bechthold, A.; Schlesinger, S. and Boeing, H. Food groups and risk of all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Journal of Clinical Nutrition*. **2017**, *105*, 1462–1473.

53. Miller V.; Mente, A.; Dehghan, M.; Rangarajan, S.; Zhang, X.; Swaminath V. S.; Dagenais, G.; Gupta, R.; Mohan, V.; Lear, S.; Bangdiwala, I S.; Schutte, E. A.; Wentzel, E.; Avezum, A.; Altuntas, Y.; Yusoff, K.; Ismail, N.; Peer, N.; Chifamba, J.; Diaz, R.; Rahman, O.; Mohammadifard, N.; Lana, F.; Zatonska, K.; Wielgosz, A.; Yusufali, A.; Iqbal, R.; Lopez, J. P.; Khatib, R.; Rosengren, A.; Kutty, R. V.; Li, W.; Liu, J.; Liu, X.; Yin, L.; Teo, K.; Anand, S. and Yusuf, S. Fruit, vegetable, and legume intake, and cardiovascular disease and deaths in 18 countries (PURE): a prospective cohort study. *Lancet*. **2017**, 390, 2037–2049.
54. Bechthold, A.; Boeing, H.; Schwedhelm, C.; Hoffmann, G.; Knüppel, S.; Iqbal, K.; Henauw, S.; Michels, N.; Devleeschauwer, B.; Schlesinger, S. and Schwingshackl, L. Food groups and risk of coronary heart disease, stroke and heart failure: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2017**, 1-22.
55. Bowen, J. K.; Sullivan, K. V.; Kris, E. M. P. and Petersen, S. K. Nutrition and cardiovascular disease an update. *Current Atherosclerosis Reports*. **2018**, 20, 8.
56. Petersen, S. K.; Floc, R. M.; Richter, K. C.; Mukherjea, R.; Slavin, L. J.; and Kris, E. M. Healthy dietary patterns for preventing cardiometabolic disease: the role of plant-based foods and animal products. *Current Developments in Nutrition*. **2017**, 1-7.
57. Song, M.; Fung, T.T.; Hu, B. F.; Willett, C. W.; Longo, D. V.; Chan, T. A. and Giovannucci, L. E. Association of animal and plant protein intake with all-cause and cause-specific mortality. *JAMA Internal Medicine*. **2016**, 1-18.
58. Tharrey. M.; Mariott. F.; Mashchak. A.; Barbillon. P.; Delattre. M. and Fraser, E. G. Patterns of plant and animal protein intake are strongly associated with cardiovascular mortality: the Adventist health study-2 cohort. *International Journal of Epidemiology*. **2018**, 0, 1-10.
59. Wang, Z.; Klipfell, E.; Bennett, J.B.; Koeth, R.; Levison, S.B.; DuGar, B.; Feldstein, E.A.; Britt, B.E.; Fu, X.; Chung, Y.; Wu, Y.; Schauer, P.; Smith, D.J.; Allayee, H.; Tang, W.H.W.; DiDonato, A.J.; Lusic, J.A.; and Hazen, L.S. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. **2011**, 472, 57-67.
60. Koeth, A.R.; Waung, Z.; Levison, S.B.; Buffa, A.J.; Org, E.; Sheehy, T.B.; Britt B. E.; Fu, X.; Wu, Y.; Li, L.; Smith, D.J.; DiDonato, A.J.; Chen, J.; Li, H.; Gu, D.G.; Lewis, D.J.; Warrier, M.; Brown, M.J.; Krauss, M.R.; Tang, W. H.W.; Bushman, D.F.; , Lusic, J.A. and Hazen, L.S. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine*. **2013**, 19, 576-587.

61. Cho, E.C. and Caudill, A.M. Trimethylamine-N-Oxide: friend, foe, or simply caught in the cross-fire? *Trends in Endocrinology and Metabolism*. **2016**, Doi; 10.1016/j.tem.2016.10.005.
62. Canyelles, M.; Tondo, M.; Cedó, L.; Farràs, M.; Escolà, G.C.J.; and Blanco, V.F. Trimethylamine N-Oxide: a link among diet, gut microbiota, gene regulation of liver and intestine cholesterol homeostasis and HDL function. *International Journal of Molecular Sciences*. **2018**, 19, 3228.
63. Wu, W., Chen, C.; Liu, P.; Panyod, S.; Liao, B.; Chen, P.; Kao, H.; Kuo, H.; Kuo, C.; Chiu, T. H.; Chen, ; Chuang, H.; Huang, Y.; Zou, H.; Hsu, C.; Chang, T.; Lin, C.; Ho, C.; Yu, H.; Sheen, I. and Wu, M. Identification of TMAO-producer phenotype and host–diet–gut dysbiosis by carnitine challenge test in human and germ-free mice. *Gut Microbiota* **2018**, 0, 1–11.
64. Vasanti, S.; Malik, S.; Frank, Hu, M. Fructose and cardiometabolic health what the evidence from sugar-sweetened beverages tells us. *Journal of the American College of Cardiology*. **2015**, 66, 1615-1624.
65. Tappy, L. Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders. *Journal of Experimental Biology*. **2018**, 221, 1-9.
66. Caliceti, C.; Calabria, D.; Roda, A. and Cicero, G. F.A. Fructose intake, serum uric acid, and cardiometabolic disorders: A critical review. *Nutrients*. **2017**, 9, 395, 1-14.
67. Johnson, J. R; Nakagawa, T.; Sanchez, L.G.L.; Shafiu, M.; Sundaram, S.; Le, M.; Ishimoto, T.; Sautin, Y.Y. and Lanaspá, A.M. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes*. **2013**, 62, 3307-3315.
68. Pereira, R.M.; Botezelli, J.D.; da Cruz, R.K.C.; Mekary, R.A.; Esper, C.D.; Pauli, J.R.; Sanchez, R.A.; Rochete, R.E.; and Pereira, M.L. Fructose consumption in the development of obesity and the effects of different protocols of physical exercise on the hepatic metabolism. *Nutrients*. **2017**, 9, 405, 1-19.
69. Bazzano, L.; He, J.; Ogden, L.G.; Lorian, C.; Vupputuri, S.; Myers, L.; Whelton, P. K. Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women. *Archives of Internal Medicine*. **2001**, 161, 2573-2578.
70. Papandreou, C.; Becerra T. N.; Bulló, M.; Martínez, G.M.A.; Corella, D.; Estruch, R.; Ros, E.; Arós, F.; Schroder, H.; Fitó, M.; Serra, M. L.; Lapetra, J.; Fiol, M.; Ruiz, C.M.; Sorli, J.V. and Salas, S. J. Legume consumption and risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in the PREDIMED study. *Clinical Nutrition*. **2018**. 10.1016/j.clnu.2017.12.019.
71. Marventano, S.; Izquierdo, P. M. and Sánchez, G. C. Legume consumption and CVD risk: a systematic review and meta-analysis. *Health Nutrition*. **2016** 20, 2, 245–254.

72. Nouri, F.; Sarrafzadegan, N.; Mohammadifard, N.; Sadeghi, M. and Mansourian, M. Intake of legumes and the risk of cardiovascular disease: frailty modeling of a prospective cohort study in the Iranian middle-aged and older population. *European Journal of Clinical Nutrition*. **2016**, *70*, 217–221.
73. Afshin, A.; Micha, R.; Khatibzadeh, S.; and Mozaffarian, D. Consumption of nuts and legumes and risk of incident ischemic heart disease, stroke, and diabetes: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*. **2014**, *100*, 278–288.
74. Padhi, E.M and Ramdath, D.D. A review of the relationship between pulse consumption and reduction of cardiovascular disease risk factors. *Journal of Functional Foods*. **2017**, Doi;10.1016/j.jff.2017.03.043.
75. Mohammadifard, N.; Sarrafzadegan, N.; Paknahad, Z.; Nouri, F. Dyslipidemia: Isfahan Healthy Heart Program. *Journal of Clinical Lipidology*. **2014**, *8*, 584–593.
76. Hermsdorff, M.H.; Zulet, M.A.; Abete, I. and Martinez, J.A. Legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects. *European Journal of Nutrition*. **2011**, *50*, 61–69.
77. Arnoldi, A.; Zanoni, C.; Lammi, C. and Boschini, G. The Role of Grain Legumes in the Prevention of Hypercholesterolemia and Hypertension. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **2014**, *34*, 144-168.
78. Anderson, J.W. and Major, A.W. Pulses and lipaemia, short- and long-term effect: Potential in the prevention of cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition*. **2002**, *88*, 263-272.
79. Rebello, C.J.; Greenway, F.L. and Finley, J.W. Whole grains and pulses: A comparison of the nutritional and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014**. Doi; 10.1021/jf500932z.
80. Bouchenak, M. and Lamri, S.M. Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review. *Journal of Medicinal Food*. **2013**, *16*, 1–14.
81. Khattab, R.Y. and Arntfield, S.D.; Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. *Food Science and Technology*. **2009**, *42*, 1113–1118.
82. Viuda, M.M.; Lopez, M.M.C; Fernandez, L.J.; Sendra, E.; Lopez, V. J.H.; and Perez, A.J.A. Role of fiber in cardiovascular diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2010**, *9*, 240-262.

83. Canfora, E. E.; Jocken, J. W. and Blaak, E. E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*. **2015**. Doi: 10.1038/nrendo.2015.128.
84. Willett, W.; Rockström, J.; Loken, B.; Springmann, M.; Lang, T.; Vermeulen, S.; Garnett, T.; Tilman, D.; DeClerck, F.; Wood, A.; Jonell, M.; Clark, M.; Gordon, L.J.; Fanzo, J.; Hawkes, C.; Zurayk, R.; Rivera, J.A.; Vries, W.; Majele, S.L.; Afshin, A.; Chaudhary, A.; Herrero, M.; Agustina, R.; Branca, F.; Lartey, A.; Fan, S.; Crona, B.; Fox, E.; Bignet, V.; Troell, M.; Lindahl, T.; Singh, S.; Cornell, S. E.; Reddy, S.K.; Narain, S.; Nishtar, S.; and Murray, C.J.L. the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *Lancet*. **2019**, 1-49.
85. Iriti, M. and Varoni, E.M. Pulses, healthy, and sustainable food sources for feeding the Planet. *International Journal of Molecular Sciences*. **2017**, *18*, 255.
86. Bhat, R. and Karim, A.A. Exploring the nutritional potential of wild and underutilized legumes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2009**, *8*, 305-334.
87. Foyer, C.H.; Lam, H.; Nguyen, H. T.; Siddique, K.H.T.; Varshney, R. K.; Colmer, T. D. Cowling, W.; Bramley, H.; Mori, T.A.; Hodgson, J.M.; Cooper, J. W.; Miller, A. J.; Kunert, K.; Vorster, J.; Cullis, C.; Ozga, J.A.; Wahlqvist, M.L.; Liang, Y.; Shou, H.; Shi, K.; Yu, J.; Fodor N.; Kaiser, B.N.; Wong, F.; Valliyodan, B. and Considine, M.J. Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants*. **2016**, *2*, 1-13.
88. Felker, P.; Takeoka, G. and Dao, L. Pod mesocarp flour of north and South American species of leguminous tree *Prosopis* (mesquite): composition and food applications. *Food Reviews International*. **2013**, *29*, 1, 49-66.
89. Saucedo, R.; Nereyda, E.; Martínez, R.; Enrique, G.; Ramírez, V. B.; Martínez, R. R.; Hermida, C.; Milagros de la Caridad; Medina, T., Martín, S. and Piña, R. H. H. Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) en México. *Ra Ximhai*. **2014**, *10*, 3, 173-193.
90. Igwe, C.U.; Ojiako, O.A.; Anugweje, K.C.; Linus, A. Nwaogu, L.A. and Ujowundu, C. O. Amino acid profile of raw and locally processed seeds of *Prosopis africana* and *Ricinus communis*: potential antidotes to protein malnutrition. *Functional Foods in Health and Disease*. **2012**, *2*, 4, 107-119.
91. Barminas, J.T.; Maina, H.M. and ALI, J. Nutrient content of *Prosopis africana* seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*. **1998**, *52*, 325–328.
92. Cattaneo, F.; Costamagna, M.S.; Zampini, I.C.; Sayago, J.; Alberto, M.R.; Chamorro, V.; Pazos, A.; Thomas, V.S.; Schmeda, H.G. and Isla, M.I. Flour from *Prosopis alba*

- cotyledons: a natural source of nutrient and bioactive phytochemicals. *Food Chemistry*. **2016**. Doi; 10.1016/j.foodchem.2016.03.115.
93. Sciammaro, L.; Ferrero, C. and Puppo, M.C. Chemical and nutritional properties of different fractions of *Prosopis alba* pods and seeds. *Food Measure*. **2015**, 123, 1-11.
94. González, G.A.; Duarte, C.A.; Patt A.C.M. and Piccolo, B. M. F. Caracterización química de la harina del fruto de *Prosopis spp.* Procedente de Bolivia y Brasil. *Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. **2008**, 58, 3, 309-315.
95. Felker, P.; Grados, N.; Cruz, G. and Prokopiuk, D. Economic assessment of production of flour from *Prosopis alba* and *P. pallida* pods for human food applications. *Journal of Arid Environments*. **2003**, 53, 517–528.
96. Escobar, B.; Estévez, A.A.M.; Fuentes, G.C. and Venegas, F.D. Uso de harina de cotiledón de algarrobo (*Prosopis chilensis* (Mol)). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. **2009**, 59, 2, 91-98.
97. Estudillo, L.; Schmeda, H.G.; Herrera, J.P. and Cortes, M. Proximate composition and biological activity of Chilean *Prosopis* species. *Journal of the Science of Food and agriculture*. **2000**, 80, 567-573.
98. Harden, M.L. and Zolfaghari, R. Nutritive composition of green and ripe pods of honey mesquite (*Prosopis granulosa*, Fabaceae). *Economic Botany*. **1988**, 42, 522-532.
99. Sauders, R.M.; Becker, R.; Meyer, D.; Del Valle, F.R.; Marco, E. and Torres, M.E. Identification of commercial milling techniques to produce high sugar, high fiber, high protein, and high galactomannan gum fraction from *Prosopis* pods. *Forest Ecology and Management*. **1986**, 16, 169-180.
100. Zolfaghari, R.; Harden, M. and Huffman, L. Some physical and chemical properties the honey mesquite pod (*Prosopis granulosa*) and applications in food products. *Cereal Chemistry*. **1986**, 63, 2, 104-108.
101. Becker, R. and Grosjean, O.K.A Compositional study of pods of two varieties of mesquite (*Prosopis granulosa*, *Prosopis velutina*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1980**, 28, 22-25.
102. Marangoni, A. and Alli, I. Composition and properties of seeds and pods of the tree legume *Prosopis juliflora* (DC). *Journal of Science of Food and Agriculture*. **1988**, 4, 99-110.
103. Del Valle, F. R.; Escobedo, M.; Muñoz, M. J.; Ortega, R. and Bourges, H. Chemical and nutritional studies on mesquite beans (*Prosopis juliflora*). *Journal of Food Science*. **1983**, 48, 914-919.

104. Gallegos, I.J; Rocha, G.N.E.; Gonzalez, L.R. and García, C.M. Efecto del procesamiento térmico sobre la capacidad antioxidante de pinole a base de vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*). *CyTA - Journal of Food*, **2012**, 11, 162-170.
105. Barba, R.A.P.; Frias, H.J.T.; Olalde, P.V. and Gonzalez, C.J. Processing, nutritional evaluation, and utilization of whole mesquite flour (*Prosopis laevigata*). *Journal of Food Science*. **2006**, 71, 4.
106. Bravo, L.; Grado, N.; and Saura, C. F. Composition and potential uses of mesquite pods (*Prosopis pallida* L.): comparison with carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of the Science of Food and agriculture*. **1994**, 65, 303-306.
107. Freyre, M.; Astrada, E.; Blasco, C.; Baigorria, C.; Rozycki, V. and Bernardi, C. Valores nutricionales de frutos de vinal (*Prosopis ruscifolia*): consumo humano y animal. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. **2009**, 4, 41-46.
108. Bernardi, C.; Sanchez, H.; Freyre, M. and Osella, C. Gluten free bread formulated with *Prosopis ruscifolia* (vaina) seed and corn flours. *International Journal of Food and Nutrition*. **2010**, 61, 3, 245-255.
109. Meyer, D.; Becker, R.; Gumbmann, M.R.; Vohra, P.; Neukom, H.; and Saunders, R.M. 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*. **1986**, 34, 914-919.
110. Pérez, M.J.; Cuello ,A.S.; Zampini, I.C.; Ordoñez, R.M.; Alberto, M.R.; Quispe, C.; Schmeda, H. G. and Isla, M.I. Polyphenolic compounds and anthocyanin content of *Prosopis nigra* and *Prosopis alba* pods flour and their antioxidant and anti-inflammatory capacities. *Food Research International*. **2014**, 64, 762–771.
111. Cardozo, M. L.; Ordoñez, R.M.; Zampini, I.C.; Cuello, A.S.; Dibenedetto, G. and Isla, M.I. Evaluation of antioxidant capacity, genotoxicity and polyphenol content of non-conventional foods: *Prosopis* flour. *Food Research International*. **2010**, 43, 1505–1510.
112. Schmeda, H.G.; Quispe, C.; Soriano, M.C.; Theoduloz, C.; Jiménez, A.F.; Pérez, M.J.; Cuello, A.S.; and Isla, M.I. Chilean *Prosopis* Mesocarp flour: phenolic profiling and antioxidant activity. *Molecules*. **2015**, 20, 7017-7033.
113. Briones, L.V.; Muñoz, C. and Maureira, H. Effect of high hydrostatic pressure on antioxidant capacity, mineral and starch bioaccessibility of a non-conventional food: *Prosopis chilensis* seed. *Food Research International*. **2011**, 44, 875–883.

114. Huisamen, B.; George, C.; Dietrich, D. and Genade, S. Cardioprotective and anti-hypertensive effects of *Prosopis glandulosa* in rat models of pre-diabetes. *Cardiovascular Journal of Africa*. **2013**, 24, 2, 10-16.
115. George, C.; Lochner, A. and Huisamen, B. The efficacy of *Prosopis glandulosa* as antidiabetic treatment in rat models of diabetes and insulin resistance. *Journal of Ethnopharmacology*. **2011**, 137, 298–304.
116. Palacios, R.A. Los mezquites mexicanos: Biodiversidad y distribución geográfica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. **2006**, 41, 1-2, 99 -11.
- 117 AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed.; AOAC: Gaithersburg, MD, USA, 2005; ISBN 0-935584-77-3.
118. Akanni, G.B.; du Preez, J.C.; Steyn, L. and Kilian, S.G. Protein enrichment of an *Opuntia ficus-ndica* cladode hydrolysate by cultivation of *Candida utilis* and *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Science of Food and Agriculture*. **2015**, 95, 1094-1102.
119. Li, P.; Zeng, Z.; Wang, D.; Xue, L.; Zhang, R. and Piao. X. Effects of the standardized ileal digestible lysine to metabolizable energy ratio on performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. **2012**, 3:9.
120. Henrik, K B.; Nielsenl, Klein A. and Hurrell, R.F. Stability of tryptophan during food processing and storage, 2. A comparison of methods used for the measurement of tryptophan losses in processed foods. *British Journal of Nutrition*. **1985**, 53, 293-300.
- 121.-. Espinoza, M.R.J.; Reyes, M.C.; Milán, C.J.; López, V.J.A.; Paredes-López, O. and Gutiérrez, D.R.; Healthy ready-to-eat expanded snack with high nutritional and antioxidant value produced from whole amarantin transgenic maize and black common bean. *Plant Foods Hum Nutr*. **2016**. Doi; 10.1007/s11130-016-0551-8.
122. Mesquita, C.; Leonel, M. and Mischan, M.M.; Effects of processing on physical properties of extruded snacks with blends of sour cassava starch and flaxseed flour. *Food Sci. Technology Campinas*. **2013**, 33, 3, 404-410.
123. Kalia, K.; Sharma, K.; Pratap, S.H.; and Singh, B. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, 56, 10129–10134.
124. Ainsworth, E.A.; and Gillespie, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. **2007**, 2, 875.

125. Singleton, V.L.; Orthofer, R. and Lamuela. R.R.M. Analysis of total phenols and other oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. **1999**, 299, 152-178.
126. Brand, W.W.; Cuvelier, M.E. and Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss u Technol*. **1995**, 28, 25-30.
127. Yu, X.; Zhao, M.; Hu, J.; Zeng, S. and Bai, X. Correspondence analysis of antioxidant activity and UV-Vis absorbance of Maillard reaction products as related to reactants. *Food Science and Technology*. **2012**, 46, 1-96.
128. Diaz-Batalla, L.; Widholm, J.M.; Fahey, G.C.; Castaño, T.E.; and Paredes, L.O. Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 2045-2053.
129. National Academy of Sciences. Nutrient requirements of laboratory animals, fourth revised edition, 1995. Washington, D.C **1995**. ISBN: 0-309-58849-9.
130. NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. **1999**.
131. Donovan, J. and Brown, P. Care and handling of laboratory mice. *Current Protocols in Microbiology*. **2013**. Doi; 10.1002/9780471729259.mca03ns31.
132. Department of Primary Industries. Code of practice for the housing and care of laboratory mice, rats, guinea pigs and rabbits. Victorian Government Department of Primary Industries. Australia. **2004**, 475-485.
133. National Academy of Sciences. Guide for the care and use of laboratory animals eighth edition. Washington, D.C. **2011**. ISBN; 978-0-309-15400-0.
134. Hau, J. and Van Hooiser, J.L. Handbook of laboratory animal science, second edition. Vol 1 Essential principles and practices. Washington D.C. **2003**. 0-8493-1086-5.
135. Mehdi, N.M.; Sarvari, A.; Milanifar, A.; Borjian, B. S. and Mehdi, A.M. Regulations and ethical considerations in animal experiments: International laws and Islamic perspectives. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. **2012**; 4, 114-120.
136. FAO. Dietary protein quality evaluation in human nutrition; Report of an FAO Expert Consultation; FAO Food and Nutrition Paper 92; FAO: Rome, Italy, **2013**; ISBN 978-92-5-107417-6.
137. Felker, P. Protein and amino acid composition of tree legume seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1977**, 28, 791-797.

138. Khattab, R.Y. and Arntfield, S.D. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. *Food Science and Technology*. **2009**, 42, 1113–1118.
139. Sahin, H.; Topuz, A.; Pischetsrieder, M. and Ozdemir, F. Effect of roasting process on phenolic, antioxidant and browning properties of carob powder. *European Food Research and Technology*. **2009**, 230, 155–161.
140. Mondaca, N.B.; Ávila, V.L.; Gonzalez, C.A.; Lopez, C.J.; Sanchez, M.D.; Campas, B. O. and Rodríguez, R.R. Antioxidant and chelating capacity of Maillard reaction products in amino acid-sugar model systems: applications for food processing. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture* **2017**. Doi: 10.1002/jsfa.8206.
141. Norah, V.L. and Van, W.J.; Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose lysine and ribose–lysine model systems. *Food Chemistry*. **2013**, 137, 92–98.
- 142 Young, J.E.; Nguyen, T.; Charlie, Ly C.; Jarman, S.; Diep, D.; Pham, C.; Pesek, J.J.; Matyska, M.T.; and Takeoka, G.R. LC–MS characterization of mesquite flour constituents . *Advances in Food and Beverage Analysis*. **2016**.
143. Amarowicz, R. and Pegg, R. B. Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2008**, 110, 865-878.
144. Magalhães, S.C.; Taveira, M.; Cabrita, A.R.; Fonseca, A.J.; Valentão, P. and Andrade, P.B. European marketable grain legume seeds: Further insight into phenolic compounds profiles. *Food Chemistry*. **2017**, 215, 177–183.
145. Sadhukhan, P.; Saha, S.; and Sil, P.C. An insight into the prophylactic effects of the Leguminosae family plants against oxidative stress-induced pathophysiological conditions. *Reactive Oxygen Species*. **2018**, 6, 16, 220–247.
146. Arango, D.; Morohashi, K.; Yilmaz, A.; Kuramochi, K.; Parihar A.; Brahimaj, B.; Grotewold, E. and Doseff, A.I. Molecular basis for the action of a dietary flavonoid revealed by the comprehensive identification of apigenin human targets. *PNAS*. **2013**. Doi; 10.1073/pnas.1303726110.
147. Jung, U.J.; Cho, Y.Y.; and Choi, M. Apigenin ameliorates dyslipidemia, hepatic steatosis and insulin resistance by modulating metabolic and transcriptional profiles in the liver of high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients*. **2016**, 8, 305.
148. Kanwal, R.; Datt, M.; Liu, X. and Gupta, S. Dietary flavones as dual inhibitors of DNA methyltransferases and histone methyltransferases. *Plos One*. **2016**. 11(9): e0162956.

149. Nikmaram, N.; Leong, S.Y.; Zhenzhou, Z.M.; Barba, F.J.; Greiner, R.; Oey, I. and Roohinejad, S. Effect of extrusion on the anti-nutritional factors of food products: An overview. *Food Control*. **2017**. Doi; 10.1016/j.foodcont.2017.03.027.
150. Amarowicz, R. and Pegg, R.B. Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal Lipid Science and Technology*. **2008**, 110, 865- 878.
151. Singh, B.; Pal, S; Kaur, A. and Singh, N. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*. **2017**, 101, 1–16.
152. Khang, D.T.; Nhan, D.T.; Abdelghany, E.A. and Dang, X.T. Phenolic profiles and antioxidant activity of germinated legumes. *Foods*. **2016**, 5, 27.
153. Singh, G.H.; Sharma, P.; Gupta, N., and Abbas, W.A. Antioxidant properties of legumes and their morphological fractions as affected by cooking. *Food Science and Biotechnology*. **2013**, 22, 187-194.
154. Xu, B.J.; Yuan, S.H. and Chang, S.K.C. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *Journal of Food Science*. **2007**, 72, 2, 167-188.
155. Tousoulis, D.; Psaltopoulou, T.; Androulakis, E.; Papageorgiou, N.; Papaioannou, S.; Oikonomou, E.; Synetos, A. and Stefanadis, C. Oxidative stress and early atherosclerosis: novel antioxidant treatment. *Cardiovascular Drugs Therapy*. **2014**. Doi; 10.1007/s10557-014-6562-5.
156. Siekmeier, R.; Steffen, C. and März, W. Role of oxidants and antioxidants in atherosclerosis: results of in vitro and in vivo investigations. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. **2007**, 12, 4, 265-288.
157. Cherubini, A.; Vigna, G.B.; Zuliani, G.; Ruggiero, C.; Senin, U. and Fellin, R. Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. *Current Pharmaceutical Design*. **2005**, 11, 2017-2032.
158. Toledo, I.P. and Mas, O.J. Antioxidants in the fight against atherosclerosis: is this a dead end? *Current Atherosclerosis Reports*. **2018**, 20, 36.
159. Grassi, D.; Desideri, G. and Ferri, C. Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients*. **2010**, 2, 889-902.
160. Burton, G.J. and Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Practices Research in Clinical Obstetrics and Gynaecology*. **2011**, 25, 3, 287–299.
161. Lonn, M.E.; Dennis, J.M. and Stocker, R. Actions of “antioxidants” in the protection against atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*. **2012**, 53, 863–884.

162. Leopoldini, M.; Prieto, P.I.; Russo, N. and Toscano, M. Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. *Journal of Physical Chemistry A*. **2004**, 108, 92-96.
163. Ali, F.; Rahul; Naz, F.; Jyoti, S. and Hasan, S.Y. Health functionality of apigenin: A review, *International Journal of Food Properties*. **2017**, 20, 6, 1197-1238.
164. Salehi, B.; Venditti, A.; Sharifi, R.M.; Kregiel, D.; Sharifi, R.J.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Santini, A.; Souto E.B.; Novellino, E.; Antolak, H.; Azzini, E.; Setzer, W N. and Martins, N. The therapeutic potential of apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*. **2019**, 20, 1305.
165. Nielsen, S.E.; Young, J.F.; Daneshvar, B.; Lauridsen, S.T.; Knuthsen, P.; Sandstrom, B. and Dragsted, L.O. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *British Journal of Nutrition*. **1999**, 81, 447–455.
166. Ren, K.; Jiang, T.; Zhou, H.; Liang, Y. and Zhao, G. Apigenin retards atherogenesis by promoting abca1-mediated cholesterol efflux and suppressing inflammation. *Cell Physiology and Biochemistry*. **2018**, 47, 2170-2184.
167. Terakata, M.; Fukuwatari T.; Kadota, E.; Sano, M.; Kanai, M.; Nakamura, T.; Funakoshi, H. and Shibata, K. The niacin required for optimum growth can be synthesized from L-tryptophan in growing 1-3 mice lacking tryptophan 2, 3-dioxygenase. *Journal of Nutrition*. **2013**, 143, 1046–1051.
168. JAX Laboratory. Body weight information for C57BL/6J. 2019. <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664>.
169. Grobe, J.L. Comprehensive assessments of energy balance in mice. *Methods in Molecular Biology*. 2017, 1614, 123–146.
170. Fraulob, J.C.; Ogg, D. R.; Fernandes, S.C.; Barbosa, A.M. and Mandarim, C.C. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas diseases (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2010, 46, 212-223.
171. Stephen, D.S.; Bindu, B.S.; Ali, M.M.; Tisha, A.; Deepthi, K.V.; Siona, S.; Santy, F. and Abraham, A. Nutritional profile of high fat simple carbohydrate diet used to induce metabolic syndrome in C57BL/6J mice. *Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism*. **2016**, 3, 41-49.

172. Murase, T.; Mizuno, T.; Omachi, T.; Onizawa, K.; Komine, Y.; Kondo, H.; Hase, T. and Tokimitsu, I. Dietary diacylglycerol suppresses high fat and high sucrose diet-induced body fat accumulation in C57BL/6J mice. *Journal of Lipid Research*. **2001**, 42, 372–378.
173. Della-Vedova, M. C; Muñoz, M.; Santillan, L.; Plateo, P.M.; Germanó, M.J.; Rinaldi, T. M.; García, S.; Gómez, N.N.; Fornes, M.W.; Gómez, M.S. and Ramirez, D.C. A mouse model of diet-induced obesity resembling most features of human metabolic syndrome. *Nutrition and Metabolic Insights*. **2016**, 9, 93-104.
174. Delgado, E.; Vences, M.M.; Hernández, R.J.; Rocha, G.N.; Rodriguez, V.A.; Herrera, G.S.; Medrano, R.H.; Solis, S.A. and Ibarra, P.F. Inhibition of the growth of rats by extruded snacks from bean (*Phaseolus vulgaris*) and corn (*Zea mays*). *Emirate Journal of Food and Agriculture*. **2012**, 24, 3, 255-263.
175. Marzo, F.; Alonso, R.; Urdaneta, E.; Arricibita, F.J. and Ibañez, F. Nutritional quality of extruded kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto) and its effects on growth and skeletal muscle nitrogen fractions in rats. *Journal of Animal Science*. **2002**, 80, 875–879.
176. De Marte, M.L; and Enesco, H.E. Influence of low tryptophan diet on survival and organ growth in mice. *Mechanisms of Ageing and Development*. **1986**, 36, 161-171.
177. Zhu, Z.; Jiang, W. and Thompson, H.J. Edible dry bean consumption (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates cardiovascular risk factors and diet-induced obesity in rats and mice. *British Journal of Nutrition*. **2012**, 108, 66-74.
178. Jing, C.; Wen, Z.; Zou, P.; Yuan, Y.; Jing, W.; Li, Y.; and Zhang, C. Consumption of black legumes glycine soja and glycine max lowers serum lipids and alters the gut microbiome profile in mice fed a high-fat diet. : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2018**. Doi; DOI: 10.1021/acs.jafc.8b02016.
179. Bose, M.; Lambert, J. D.; Ju, D.; Reuhl, K.R.; Shapses, S.A. and Yang, C.S, The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat–fed mice. *Journal of Nutrition*. **2008**, 138, 1677–1683.
180. Heyman, L.; Axling, U.; Blanco, N. and Sterner, O. Evaluation of beneficial metabolic effects of berries in high-fat fed C57BL/6J mice. *Journal of Nutrition and Metabolism*. **2014**, 1-12.
181. Song, H.; Chu, Q.; Yan, F.; Yang, Y.; Han, W. and Zheng, X. Red pitaya betacyanins protects from diet-induced obesity, liver steatosis and insulin resistance in association with modulation of gut microbiota in mice. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **2016**, 31, 1462-1469.

182. Meneses, M.E.; Martínez, C.M.; Torres, N.; Sánchez, T.M.; Aguilar, L.M.; Morales, P.; Sobal, M.; Bernabé, T.; Escudero, H.; Granados, P.O.; and Tovar, A.R. Hypocholesterolemic properties and prebiotic effects of mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 mice. *Plos One*. **2016**, 11, 7, 1-23.
183. Liu, H.; Wang, J.; Liu, M.; Zhao, H.; Yaqoob, S.; Zheng, M.; Cai, D. and Liu, J. Antiobesity effects of ginsenoside Rg1 on 3T3-L1. Preadipocytes and high fat diet-induced obese mice mediated by AMPK. *Nutrients*. **2018**, 10, 830, 1-12.
184. Huang, M.; Deng, S.; Han, Q.; Zhao, P.; Zhou, Q.; Zheng, S.; Ma, X.; Xu, C.; Yang, J. and Yang, X. Hypoglycemic activity and the potential mechanism of the flavonoid rich extract from *Sophora tonkinensis* Gagnep in KK-Ay mice. *Frontiers in Pharmacology*. **2016**, 7, 288, 1-14.
185. Paigen, B.; Mitchell, D.; Reue, K.; Morrow, A.; Lusis, A.J. and Leboeuf, R. C.Ath-1 a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *PNAS*. **1987**, 84, 3763-3767.
186. Paigen, B.; Albee, D.; Holmes, P. A.; and Metchell, D. Genetic analysis of murine strains C57BL/6J and C3H/HeJ to confirm the map position of Ath-1 a gen determining atherosclerosis susceptibility. *Biochemical Genetics*. **1987**, 25, 7/8, 1-11.
187. LeBoeuf, R.C.; Doolittle, M. H.; Montcalm, A.; Martin, D. C.; Reue, K. and Lusis, A.J. Phenotypic characterization of the Ath-1 gene controlling high density lipoprotein levels and susceptibility to atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*. **1990**, 31, 91-101.
188. Surwith, R.S.; Kuhn, C.M.; Cochrane, C.; McCubbin, J.A. and Feinglos, M.N. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*. **1988**, 37, 1163-1167.
189. Toye, A.A.; Lippiat, J.D.; Proks, P.; Shimomura, K.; Bentley, L.; Hugill, A.; Mijat, V.; Goldsworthy, M.; Moir L.; Hayne, A.; Quarterman, J.; Freeman, H.C.; Ashcroft, F.M. and Cox, R.D. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*. **2005**, 48, 675–686.
190. Freeman, H.C.; Hugill, A.; Dear, N.T.; Ashcroft, F.M.; and Cox, R.D. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J Mice. *Diabetes*. **2006**, 55, 2153-2156.
191. Ronchi, J.A.; Figueira, T.R.; Ravagnani, F.G.; Oliveira, H.C.F.; Vercesi, A.E.; Castilho, R.F. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radical Biology and Medicine*. **2013**, 63, 446–456.

192. Freeman, H.; Shimomura, K.; Cox, R.D. and Ashcroft, F.M. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a link between insulin secretion, glucose metabolism and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. **2006**, 34, 96, 806-810.
193. Houstis, N.; Rosen, E.D. and Lander, E.S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. **2006**, 440, 944-949.
194. Rindler, P.M.; Crewe, C.L.; Fernandes, J.; Kinter, M. and Szweda, L.I. Redox regulation of insulin sensitivity due to enhanced fatty acid utilization in the mitochondria. *American Journal of Physiology-Heart and Circulation Physiology*. **2013**, 305, 634–643.
195. Meo, S.D.; Iossa, S. and Venditti, P. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources. *Journal of Endocrinology*. **2017**, 233, 1, 15-42.
196. Anderson, E.J.; Lustig, M.E.; Boyle, K.E.; Woodlief, T.L.; Kane, D.A.; Lin, C.T.; Price, III J.W.; Kang, L.; Rabinovitch, P.S.; Szeto, H.H.; Houmard, J.A.; Cortright, R.N.; Wasserman, D.H.; and Neuffer, P.D. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*. **2009**, 119, 3, 573-583.
197. Fisher, W.K. and Neuffer, D. P. Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. *Trend in Endocrinology and Metabolism*. **2012**, 23, 3.
198. Fisher, W.K.; Lin, C.; Muoio, D.M.; Ryan, T.E.; Neuffer, P.D.; Reese, L.R.; Gilliam, L.A.; Cathey, B.L.; Lark, D.S. and Smith C.d. Pyruvate dehydrogenase complex and nicotinamide nucleotide transhydrogenase constitute an energy-consuming redox circuit. *Biochemistry Journal*. **2015**, 467, 271–280.
199. Boura, H. S. and Zick, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. **2009**, 296, 581–591.
200. Hoehn, K. L.; Salmon, A.B.; Hohnen, B. C.; Turner, N.; Hoy, A.J.; Maghzal, G.J.; Stocker, R.; Remmen, H.V.; Kraegen, E.W.; Cooney, G.J.; Richardson, A.R.; and James, D.E. Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *PNAS*. **2009**, 106, 42, 17787–17792.
201. Rains, J.L. and Jain, S.K. Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*. **2011**, 50, 5, 567–575.
202. Zick, Y. Ser/Thr Phosphorylation of IRS Proteins: A molecular basis for insulin resistance. *Science's STKE*. **2005**. Doi; 10.1126/stke.2682005pe4.

203. Solinas, G. and Becattin, B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. *Molecular Metabolism*. **2016**, 1-96.
204. Sabio, G.; Kennedy, N.J.; Cavanagh, K. J.; Young, J. D.; Jin, K. H.; Ong, H.; Barrett, T.; Kim, J.K. and Davis, R.J. Role of muscle c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase 1 in obesity-induced insulin resistance. *Molecular and Cellular Biology*. **2010**, 106–115.
205. Vinayagamoothi, R.; Bobby Z. and Sridhar M.G. Antioxidants preserve redox balance and inhibit c-Jun-N-terminal kinase pathway while improving insulin signaling in fat-fed rats: evidence for the role of oxidative stress on IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance. *Journal of Endocrinology*. **2008**, 197, 287–296.
206. Nikonova, L.; Koza, R.A.; Mendoza, T.; Chao, P.M.; Curley, J.P. and Kozak, L.P. Mesoderm-specific transcript is associated with fat mass expansion in response to a positive energy balance. *The FASEB Journal*. **2008**, 22, 3925-3938.
207. Escande, C.; Nin, V.; Price, N.L.; Capellini, V.; Gomes A.P.; Barbosa, M.T.; O’Neil, L.; White, T.A.; Sinclair, D.A. and Chini, E.N. Flavonoid apigenin is an inhibitor of the NADase CD38, implications for cellular NAD<sup>+</sup> metabolism, protein acetylation, and treatment of metabolic syndrome. *Diabetes*. **2013**, 62, 1084-1094.
208. Gentile, D.; Fornai, M.; Colucci, R.; Pellegrini, C.; Tirota, E.; Benvenuti, L.; Segnani, C.; Ippolito, C.; Duranti, E.; Viridis, A.; Carpi, S.; Nieri, P.; Zolta’n H.; Ne’meth, Pistelli, L.; Bernardini, N.; Blandizzi, C. and Antonioli, L. Motor dysfunctions associated with high fat diet-induced obesity. *Plos One*. **2018**, 13, 4, 1-24.
209. Myoung, H.J.; Kim, G. and Woo N. K. Apigenin isolated from the seeds of *Perilla frutescens* Britton var *Crispa* (Benth.) inhibits food intake in c57bl/6j mice. *Archives of Pharmacal Research*. **2010**, 33, 11, 1741-1746.
210. Feng, X.; Weng, D.; Zhou, F.; Owen, Y.D.; Qin, H.; Zhao, J.; Yu, W.; Huang, Y.; Chen, J.; Fu, H.; Yang, N.; Chen, D.; Li, J.; Tan, R. and Shen, P. Activation of PPAR $\gamma$  by a natural flavonoid modulator, apigenin ameliorates obesity-related inflammation via regulation of macrophage polarization. *EBioMedicine*. **2016**, 9, 61-76.
211. Ju, J. U.; Yun, Y. C. and Myung, S. C. Apigenin ameliorates dyslipidemia, hepatic steatosis and insulin resistance by modulating metabolic and transcriptional profiles in the liver of high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients*. **2016**, 8, 305.
212. Wong, T., Y.; Tan, Y.Q.; Lin, S. and Leung, L.K. Apigenin and luteolin display differential hypocholesterolemic mechanisms in mice fed a high-fat diet. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. **2017**, 1-8.

213. Kim A. and & Chung Soo Lee. Apigenin reduces the toll-like receptor-4-dependent activation of NF- $\kappa$ B by suppressing the Akt, mTOR, JNK, and p38-MAPK. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. **2017**, 1-16.
214. Lv, X.; Qiu, M.; Chen, D.; Zheng, N.; Jin, Y.; Wu, Z. Apigenin inhibits enterovirus 71 replication through suppressing viral and modulating cellular JNK pathway. *Antiviral Research*. **2014**, 109, 30–41.
2015. Ono M. and Fujimori K. Antiadipogenic effect of dietary apigenin through activation of AMPK in 3T3-L1 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, 59, 13346–13352.
216. Thaïss, C.A.; Itav, S.; Rothschild, D.; Meijer, M.T.; Levy M.; Moresi, C.; Dohnalová, L.; Braverman, S.; Rozin, S.; Malitsky, S.; Dori, B. M.; Kuperman, Y.; Biton, I.; Gertler, A.; Harmelin, A.; Shapiro, H.; Halpern, Z.; Aharoni, A.; Segal, E. and Elinav, E. Persistent microbiome alterations modulate the rate of post-dieting weight regain. *Nature*. **2016**. Doi; 10.1038/nature20796.
217. GBD 2017 Diet Collaborators. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. **2019**, 393, 1958–72.

## 8. ANEXOS.

### A. Artículo 1;

Luis Díaz-Batalla, Juan P. Hernández-Uribe, Alma D. Román-Gutiérrez, Raquel Cariño-Cortés, Javier Castro-Rosas, Alejandro Téllez-Jurado & Carlos A. Gómez-Aldapa. (2018) Chemical and nutritional characterization of raw and thermal-treated flours of Mesquite (*Prosopis laevigata*) pods and their residual brans. *CyTA - Journal of Food*. 16:1, 444-451.

### B. Artículo 2;

Luis Díaz-Batalla, Juan P. Hernández-Uribe, Roberto Gutiérrez-Dorado, Alejandro Téllez-Jurado, Javier Castro-Rosas, Rogelio Pérez-Cadena and Carlos A. Gómez-Aldapa. (2018). Nutritional Characterization of *Prosopis laevigata* Legume Tree (Mesquite) Seed Flour and the Effect of Extrusion Cooking on its Bioactive Components. *Foods*. 2018, 7, 124; doi:10.3390/foods7080124 .

### C. Aprobación de protocolo – Comité de Bioética UAEH

## Chemical and nutritional characterization of raw and thermal-treated flours of Mesquite (*Prosopis laevigata*) pods and their residual brans

Luis Díaz-Batalla<sup>a,b</sup>, Juan P. Hernández-Uribe<sup>c</sup>, Alma D. Román-Gutiérrez<sup>a</sup>, Raquel Cariño-Cortés<sup>d</sup>, Javier Castro-Rosas<sup>a</sup>, Alejandro Téllez-Jurado<sup>e</sup> and Carlos A. Gómez-Aldapa <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Área Académica de Química, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México; <sup>b</sup>Ingeniería Agroindustrial, Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Tepatepec, Hidalgo, México; <sup>c</sup>Ingeniería Agroindustrial, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad Km 1, Rancho Universitario, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México; <sup>d</sup>Área Académica de Medicina, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Circuito Actopan-Tilcuautla s/n. Ex hacienda La Concepción, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México; <sup>e</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Pachuca, Zempoala, Hidalgo, México

### ABSTRACT

Species of the genus *Prosopis* were a major staple food in Aridoamerica before the arrival of Europeans. In the present work, chemical and nutritional properties of *Prosopis laevigata* pods were described. The composition in weight of pods of *P. laevigata* was 44% mesocarp, 35% endocarp, and 21% exocarp. Sugars, including sucrose, glucose, fructose, and xylose, were important components of pods, reaching a total sugars content of 447 g/kg in mesocarp flour. Considering the FAO-recommended amino-acid scoring patterns for humans older than 3 years, high values of Lys and sulfur-containing amino acids were found in flours. Thermal treatment of flours increases significantly the phenolic compounds content and free-radical scavenging capacity, an effect associated with the generation of Maillard reaction products. Flours of mesquite pods are a good source of phenolic compounds, with significantly higher free-radical scavenging capacity than soybean and common bean.

### ARTICLE HISTORY

Received 31 July 2017  
Accepted 12 December 2017

### KEYWORDS

*Prosopis laevigata*; sugars; amino-acid profile; phenolic compounds; free-radical scavenging capacity; Maillard reaction products

### PALABRAS CLAVE

*Prosopis laevigata*; azúcares; perfil de aminoácidos; compuestos fenólicos; capacidad captadora de radicales libres; productos de la reacción de maillard

### Caracterización química y nutrimental de harinas crudas y térmicamente tratadas de vainas de Mesquite (*Prosopis laevigata*) y sus salvados residuales

### RESUMEN

Especies del genero *Prosopis* fueron alimento importante en Aridoamérica antes de la llegada de los Europeos. En el presente trabajo se describen las propiedades químicas y nutrimentales de vainas de *Prosopis laevigata*. La composición en peso de las vainas de *P. laevigata* fue de 21% exocarpio, 44% mesocarpio y 35% endocarpio. Azúcares, incluyendo sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, fueron importantes componentes de la vaina, alcanzando un contenido total de azúcares de 447 g/kg en harina de mesocarpio. Considerando los valores de aminoácidos recomendados por la FAO para mayores de 3 años, altos valores de Lys y aminoácidos azufrados fueron encontrados en las harinas. El tratamiento térmico de las harinas incrementa significativamente el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad captadora de radicales libres, un efecto asociado a la generación de productos de la reacción de Maillard. Las harinas de vaina de mezquite son una buena fuente de compuestos fenólicos, con una capacidad captadora de radicales libres más alta que las semillas de soya y frijol.

## 1. Introduction

Legumes have been an essential part of the human diet for centuries, with a major role in global food security, environmental challenges and healthy diets (FAO, 2016). The genus *Prosopis* is a group of nitrogen-fixing trees belonging to the Fabaceae family, which involves 44 species distributed mainly in arid and semiarid regions of Asia, Africa, and America (Felker, Takeoka, & Dao, 2013). *Prosopis* species were a major staple food for indigenous peoples in arid regions of America before the arrival of Europeans. The mature fruit of the genus *Prosopis* is an indehiscent pod conformed by an exocarp, a developed mesocarp, and a woody endocarp which protects the seed (Felker et al., 2013). Pods and pods fractions of *Prosopis* species have been described in their nutritional profile: *P. africana* (Igwe, Ojiako, Anugweje, Nwaogu, & Ujowundu, 2012), *P. alba* (Cattaneo et al., 2016; Felker, Grados, Cruz, & Prokopiuk, 2003;

Sciammaro, Ferrero, & Puppo, 2016), *P. chilensis* (Astudillo, Schmeda-Hirschmann, Herrera, & Cortes, 2000), *P. glandulosa* (Harden & Zolfaghari, 1988), *P. juliflora* (Marangoni & Alli, 1988), *P. laevigata* (Barba de la Rosa, Frias-Hernandez, Olalde-Portugal, & Gonzalez-Castañeda, 2006; Gallegos-Infante, Rocha-Guzman, Gonzalez-Laredo, & Garcia-Casas, 2013), *P. nigra* (Felker et al., 2003), *P. ruscifolia* (Bernardi, Sanchez, Freyre, & Osella, 2010), and *P. tamarugo* (Astudillo et al., 2000); active compounds content and *in vitro* biological activity: *P. alba* (Cardozo et al., 2010; Cattaneo et al., 2016; Perez et al., 2014; Sciammaro et al., 2016), *P. chilensis* (Astudillo et al., 2000; Briones-Labarca, Muñoz, & Maureira, 2011; Schmeda-Hirschmann et al., 2015), *P. laevigata* (Gallegos-Infante et al., 2013), *P. nigra* (Cardozo et al., 2010; Perez et al., 2014), *P. ruscifolia* (Bernardi et al., 2010), and *P. tamarugo* (Astudillo et al., 2000); and *in vivo* biological activity: *P. glandulosa* (George, Lochner, & Huisamen, 2011; Huisamen, George, Dietrich, & Genade,

**CONTACT** Carlos A. Gómez-Aldapa  [cgomez@uaeh.edu.mx](mailto:cgomez@uaeh.edu.mx)  Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, Mineral de la Reforma, Hidalgo 42183, México

© 2018 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Article

# Nutritional Characterization of *Prosopis laevigata* Legume Tree (Mesquite) Seed Flour and the Effect of Extrusion Cooking on its Bioactive Components

Luis Díaz-Batalla <sup>1,2</sup>, Juan P. Hernández-Uribe <sup>3</sup>, Roberto Gutiérrez-Dorado <sup>4</sup> , Alejandro Téllez-Jurado <sup>5</sup>, Javier Castro-Rosas <sup>1</sup>, Rogelio Pérez-Cadena <sup>5</sup> and Carlos A. Gómez-Aldapa <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, Mineral de la Reforma, C.P. 42184 Hidalgo, Mexico; ldiaz@upfim.edu.mx (L.D.-B.); jcastro@uaeh.edu.mx (J.C.-R.)

<sup>2</sup> Ingeniería Agroindustrial, Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Tepatepec, C.P. 42660 Hidalgo, Mexico

<sup>3</sup> Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad Km 1, Rancho Universitario, Tulancingo de Bravo, C.P. 43600 Hidalgo, Mexico; hdezspark@hotmail.com

<sup>4</sup> Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria, Culiacan, C.P. 80040 Sinaloa, Mexico; robe399@hotmail.com

<sup>5</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Pachuca, Zempoala, C.P. 43830 Hidalgo, Mexico; alito@upp.edu.mx (A.T.-J.); rpcadena1904@gmail.com (R.P.-C.)

\* Correspondence: cgomez@uaeh.edu.mx; Tel.: +52-771-717-2000 (ext. 2518)

Received: 8 July 2018; Accepted: 25 July 2018; Published: 1 August 2018



**Abstract:** Mesquite (*Prosopis laevigata*) is a legume tree widely distributed in Aridoamerica. The mature fruit of this legume is a pod, which is currently underutilized and has high nutritional potential. In the present work, mesquite seed flour is described in terms of its nutritional value, as well as the effect of extrusion cooking on its bioactive components. Mesquite seed flour is rich in fiber (7.73 g/100 g) and protein (36.51 g/100 g), with valine as the only limiting amino acid. Total phenolic compound contents in raw and extruded seed flour were 6.68 and 6.46 mg of gallic acid equivalents/g (mg GAE/g), respectively. 2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity values in raw and extruded seed flour were 9.11 and 9.32 mg of ascorbic acid equivalent/g (mg AAE/g), respectively. The absorbance at 290 nm, as an indicator of generation of Maillard reaction product (MRP), was the same for raw and extruded samples. Apigenin was the only flavonoid found in mesquite seed flour (41.6 mg/kg) and was stable in the extrusion process. The water absorption index (WAI) and water solubility index (WSI) were changed significantly during extrusion. The expansion of mesquite seed flour extrudates was null due to the high protein and fiber content in the sample. Extrusion cooking of mesquite seed flour is a useful form of technology for the industrialization of this underutilized and nutritionally valuable legume.

**Keywords:** mesquite; *Prosopis laevigata*; extrusion; phenolic compounds; radical scavenging capacity; apigenin

## 1. Introduction

Legumes have been an essential part of the human diet for centuries, with a major role in global food security, environmental challenges, and healthy diets [1]. Legumes have mastered symbiotic nitrogen fixation, leading to significant advantages for agricultural sustainability; however, they contribute to just a small portion of staple foods worldwide compared with cereals [2]. A shift in



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
COORDINACIÓN ACADÉMICA  
DSA-BIOTERIO  
CIECUAL  
DICTAMEN DE EVALUACIÓN**

INSTITUCIÓN (Subdirección, Departamento o área de trabajo): Doctorado en Ciencia de los Alimentos y Salud Humana, Instituto de Ciencias de la Salud, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería.		FECHA SOLICITUD: Fecha de solicitud: 12 de Enero de 2018		
PROYECTO: Evaluación del consumo de alimentos extrudidos a base de mezquite sobre la metilación de ADN e indicadores de síndrome metabólico en ratón C57BL.		Responsable del Proyecto: Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa. E mail: cgomez@uaeh.edu.mx lbatalad@yahoo.com.mx Teléfono y fax: 717172000 ext. 2518		
ASPECTOS A EVALUAR:	RESULTADO			
	ACEPTABLE	NO ACEPTABLE	SUGERENCIAS	
JUSTIFICACIÓN DEL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO	X			
BIENESTAR Y ESTRÉS ANIMAL	X			
PROCEDIMIENTOS Y CUIDADOS APLICADOS EN EL ANIMAL	X			
ASPECTOS ÉTICOS DEL PROTOCOLO	X			
PUNTO FINAL Y EUTANASIA	X			
OBSERVACIONES GENERALES: Los miembros del CIECUAL consideran completo y claro la descripción y el manejo de los animales de experimentación.				
FECHA DE REVISIÓN:	RESULTADO	SI	NO	OBSERVACIONES
31 enero 2018	Aprobado	X		
	Negado			
	Propuesta de Cambios			
Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa. 	PRESIDENTE DEL CIECUAL DR. HÉCTOR PONCE MONTER 		DIRECTOR DEL BIOTERIO ING. DANIEL RAMÍREZ RICO FIRMA ELECTRÓNICA 