

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO Informe Científico¹

PERIODO ²: 2013

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: APHALO

NOMBRES: Paula

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información): paphalo@gmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACION

Péptidos de amaranto con actividad antihipertensiva: acción biológica, mecanismo de acción y su posible aplicación en alimentos.

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: Octubre de 2009

ACTUAL: Categoría: Asistente desde fecha: Octubre de 2009

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos (CIDCA)

Facultad: Facultad de Ciencias Exactas

Departamento: --

Cátedra: --

Otros: --

Dirección: Calle: 47 y 116 N°: s/n

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 425 4853

Cargo que ocupa: Investigador Asistente

5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres: Añón María Cristina

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: --

Dirección electrónica: mcacidca@gmail.com

¹ Art. 11; Inc. "e" ; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2008 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2006 al 31-12-2007, para las presentaciones bianuales.

.....
Firma del Director (si corresponde)

.....
Firma del Investigador

6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

Los resultados que se describen a continuación, corresponden a las actividades y objetivos propuestos en el plan de trabajo del período anterior.

Como punto de partida, se prepararon aislados de amaranto por extracción acuosa en medio alcalino (pH 9) y posterior precipitación isoeléctrica (pH 5), según el procedimiento utilizado comúnmente en nuestro laboratorio (Martínez y Añón, 1996). Se determinó la solubilidad de los aislados, en dos buffers: a) con elevada fuerza iónica (K₂HPO₄ 32,5 mM, KH₂PO₄ 2,6 mM con NaCl 0,4M pH 7,5) y b) de baja fuerza iónica (K₂HPO₄ 33,3 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM pH 8,5), en ambos la solubilidad fue cercana al 80%. Los aislados fueron posteriormente hidrolizados en diferente extensión haciendo uso de la enzima alcalasa (8 µl enzima/100 mg proteína) a 37° C durante 1, 2, 4, 6, 22 y 26 horas. La reacción enzimática se detuvo por calentamiento a 80°C durante 10 minutos. Las muestras fueron congeladas, liofilizadas y almacenadas en desecador hasta su uso. El grado de hidrólisis de las muestras fue determinado mediante el ensayo de OPA (Nielsen y col 2001), obteniéndose los siguientes resultados: 1h 8,70 ± 0,78 %, 2h 8,82 ± 0,81 %, 4h 16,48 ± 1,76 %, 6h 19,84 ± 0,72 %, 22h 30,2 ± 3,01 % y 26h 35,2 ± 2,20 %. Los hidrolizados obtenidos fueron caracterizados mediante SDS-PAGE tricina; los perfiles electroforéticos obtenidos permitieron concluir que la hidrólisis de las moléculas de mayor tamaño presentes en el aislado entero son completamente hidrolizadas en el transcurso de la primera hora de reacción. Los polipéptidos de mayor resistencia a la hidrólisis fueron las subunidades básicas (20 kDa) las cuales fueron detectadas hasta las 6 horas de hidrólisis; a tiempos más largos, 21 y 26 horas, los mismos no pudieron ser detectados mediante el ensayo de electroforesis. Los hidrolizados también fueron analizados mediante Cromatografía de exclusión molecular (AKTA-purifier). Para ello, se utilizó una columna con un rango de separación de masas moleculares entre 100-7000 Da, y una longitud de onda para la detección de 214 nm. Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que a partir de las 21 horas de hidrólisis se encuentran presentes en los hidrolizados mayoritariamente moléculas con una masa molecular no mayor a los 2000 Da; a tiempos menores se detectan especies con una masa molecular mayor a los 7000 Da que eluirían a volúmenes coincidentes con el volumen muerto de la columna. Continuando con las actividades planteadas, todos los hidrolizados obtenidos con alcalasa fueron sometidos a una digestión gastrointestinal simulada (item 2 plan de trabajo presentado). Brevemente, la digestión se inició con la adición de un fluido símil saliva (conteniendo diferentes sales y 290 mg/l α-amilasa a pH 6,8) a las muestras en estudio (aislado no tratado e hidrolizados con alcalasa), al cabo de 5 min se les adicionó un símil fluido gástrico (conteniendo NaCl 0,03 M y 2,5 gr/l pepsina pH 2,0). Luego de 1 h se agregó un símil de fluido duodenal conteniendo bicarbonato de sodio 0,1 M y pancreatina, de manera de alcanzar un pH 7 - 7,5; manteniéndose la incubación por 1 h adicional. Las muestras se mantuvieron con agitación por inversión a 37 °C durante todo el proceso. Una vez finalizada la simulación de la digestión gastrointestinal, se detuvo la reacción enzimática por calentamiento a 80 °C durante 10 minutos. Las muestras digeridas obtenidas, fueron congeladas, liofilizadas y almacenadas en desecador hasta su uso.

El grado de hidrólisis de las muestras hidrolizadas y digeridas fue determinado mediante el ensayo de OPA; los resultados obtenidos fueron los siguientes: aislado digerido: 25 %, 1 h: 25,4 %- 2 h: 27,3 %- 4 h: 27, %- 6 h: 29,6 %- y 22 h: 35,8 %.

Estas muestras fueron analizadas mediante cromatografía de exclusión molecular: en todos los casos se observó un aumento significativo de las poblaciones peptídicas con un tamaño molecular que no superarían a los 6 aminoácidos.

A efectos de determinar la potencial actividad antihipertensiva de los péptidos obtenidos y caracterizados y vistos los problemas de importación existentes se se tuvo que extraer enzima conversora de angiotensina (ECA) a partir de pulmones de conejo. (ítem 3 del plan de actividades anteriormente presentado). Se realizaron extracciones con diferentes buffers (fosfato y borato de sodio) a idéntica concentración y pH 8,3. La medida de actividad enzimática de los extractos crudos obtenidos se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Hurst y Lowell 1981. Los resultados obtenidos, evidenciaron que la ECA fue activa cuando se utiliza buffer borato como solvente de extracción.

Se realizaron corridas electroforéticas en condiciones desnaturalizantes de los extractos crudos obtenidos a partir de los pulmones de conejo y de una ECA comercial (marca Sigma-Aldrich) y se compararon los perfiles obtenidos. Los mismos fueron coincidentes, observándose una banda de mayor intensidad con una masa molecular de 140 kDa, masa molecular de la ECA según datos registrados en bases de datos para proteínas secuenciadas. Se encuentran en curso los ensayos tendientes a determinar la actividad antihipertensiva potencial de los hidrolizados con alcalasa y aquellos posteriormente sometidos a la digestión gastrointestinal simulada. Los resultados presentados, contribuirán en forma parcial a la realización del trabajo final del Sr. Víctor Témpera, alumno de la carrera de Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos (UNLP). Dicho trabajo se encuentra en ejecución bajo mi codirección y la dirección de la Dra. María Cristina Añón.

En el próximo período se pretende: continuar con el estudio in vitro de la capacidad inhibitoria de las muestras obtenidas sobre las siguientes enzimas: ECA (actualmente en curso), renina y ruta de las quimasas. El trabajo de brotes de amaranto, incluido como trabajo terminado en el informe anterior, fue enviado a la revista Cereal Chemistry (ítem 7.3) del presente informe.

En forma paralela, se trabajó en colaboración con la Dra. María Victoria Avanza de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) en la caracterización estructural de las proteínas mayoritarias en una variedad de interés regional de poroto cowpea (*Vigna unguiculata*). Los resultados obtenidos fueron incluidos en el trabajo enviado al Journal of the Science of Food and Agriculture (ítem 7.3) del presente informe.

Hurst, P.L. y Lovell-Smith, C.J. 1981. Optimized assay for serum angiotensin-converting enzyme activity. Clin. Chem. 27: 2048-2052.

Martínez, E.N. y Añón, M.C. 1996. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates: an electrophoretic and calorimetric study. J.Agric. Food Chem. 44: 2523-2530.

Nielsen, P.M., Petersen D. y Dambmann C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. Food Chem. & Technol. 66 (5) 642-646.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

7.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue*

publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.

7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

1. Amaranth sprouts: a potential health promoting and nutritive natural food.

Amaranth sprouts are an edible food with good nutritional qualities. In this work the chemical composition of the sprouts was determined and the antioxidant and ACE inhibitory activity of their proteins were investigated. Amaranth sprouts presented a protein content (16% w/w) similar to that of the seeds and showed a high (17% w/w) content of fibre (both values on a dry basis). It was demonstrated that the sprout proteins presented a capacity to inhibit ACE activity similar to other plant proteins ($IC_{50} = 0.9 \pm 0.6$ mg/mL). This capacity ($IC_{50} = 0.26 \pm 0.07$ mg/mL) increased after in vitro gastrointestinal digestion indicating the release of bioactive peptides during the hydrolytic process. Results also showed that, besides other non protein molecules, the amaranth sprout proteins presented ABTS+ scavenging activity ($TEAC = 0.32 \pm 0.05$ micromol/mg) that increased after in vitro gastrointestinal digestion $TEAC = 0.72 \pm 0.08$ micromol/mg).

According to these results amaranth sprouts are a nutritive food with potential health promoting properties.

Enviado a la revista Cereal Chemistry (se adjunta copia de recepción de trabajo)

2. Physicochemical and structural properties of major protein fractions of two varieties of cowpea (*Vigna unguiculata* L.): A comparative study.

The polypeptide composition, structural and physicochemical properties of the major protein fractions from two cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp) varieties (CU: Cuarentón; CO: Colorado) were determined. In both cowpea varieties, the globulin was the major protein fraction, followed by albumins, glutelins and prolamins with 48 ± 2 g/100 g, 33 ± 2 g/100 g, 8 ± 1 g/100 g and 2 ± 0.5 g/100 g of the total seed protein content, respectively. Under non-reducing conditions, the CU and CO globulin fractions, showed four major polypeptides with molecular masses of 80 ± 3 , 65 ± 3 , 56 ± 2 and 52 ± 2 kDa and some minor polypeptides with molecular masses distributed over a range of 45-25 kDa. The minor values of enthalpy (ΔH)

obtained for the major protein fractions of CU when compared to CO suggest that the former are partially denatured. The conformational studies performed on the globulin fraction of both varieties showed a higher content of aromatic amino acids than that of the albumin fraction and displayed a more hydrophobic behaviour. Results provide useful data that will be supplemented with further studies on functional properties of these proteins fractions, followed by the development of legume protein products.

Enviado a la revista Journal of the Science of Food and Agriculture (se adjunta copia de recepción de trabajo)

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.
Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.

7.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.*

8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

8.2 PATENTES O EQUIVALENTES. *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRASNFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO. *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*

8.5 *Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.*

9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS. *Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.*

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

10.2 DIVULGACIÓN

11. **DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.** *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*
12. **DIRECCION DE TESIS.** *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*
13. **PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*
14. **CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*
15. **SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*
16. **OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.** *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*
17. **DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**
18. **ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.** *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*
19. **TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.** *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*
Jefe de Trabajos Prácticos-Simple dedicación. Cátedra: Biología. Facultad de Ciencias Exactas. La cantidad de horas destinadas al trabajo docente son 9 una vez a la semana.
20. **OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.** *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*
Co dirección del alumno Víctor Témpera perteneciente a la carrera de Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UNLP).
21. **TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.** *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*
Péptidos de amaranto con actividad antihipertensiva: acción biológica, mecanismo de acción y su posible aplicación en alimentos.

Introducción

El estudio de la prevención de la hipertensión ha sido sin lugar a dudas uno de los mayores desafíos científico-tecnológicos; con una importante incidencia en la salud pública y la economía.

En relación a esto, los alimentos funcionales han surgido como una ayuda o alternativa a las terapias químicas destinadas al manejo de enfermedades crónicas de amplia distribución, como hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia y obesidad. (Kris-Etherton y col., 2002).

A partir de lo anterior y basándonos en los antecedentes bibliográficos publicados por nuestro grupo de trabajo y otros autores, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

Objetivo general

Medir la posible capacidad inhibitoria de hidrolizados de amaranto luego del tratamiento con altas presiones y péptidos sintéticos (VIKP y ALEP) sobre diferentes enzimas de regulación (ECA enzima convertidora de angiotensina, renina y ruta de las quimasas) del sistema renina-angiotensina (RAS)

Objetivos específicos

1 Obtención y caracterización de hidrolizados de amaranto con diferente grado de hidrólisis luego del tratamiento con altas presiones.

2 Caracterización de los ingredientes activos obtenidos en el ítem 1 y de péptidos sintéticos (VIKP y ALEP), luego de ser sometidos a una digestión gastrointestinal simulada..

3. Medida de la resistencia de la capacidad inhibitoria de las muestras de estudio después de atravesar el sistema gastrointestinal simulado sobre diferentes enzimas del sistema renina angiotensina mencionadas anteriormente.

Antecedentes

En la actualidad ha habido un resurgimiento de los llamados cultivos andinos (amaranto, chía y quinoa) cuyos granos presentan conocidos beneficios a nivel nutricional y con posibilidad de encontrar péptidos y/o ingredientes con posibles propiedades biológicas.

Por ésta razón, los péptidos bioactivos se han transformado en un tema de interés para el sector industrial. Los consumidores, buscan adquirir alimentos alternativos no sólo con posibles beneficios nutricionales sino que además colaboren en el mantenimiento de su buena salud. (Udenigwe y Aluko 2012).

En este sentido han sido estudiados péptidos provenientes de diferentes fuentes (animal, vegetal y/o productos subindustrializados) capaces de inhibir a las enzimas involucradas en el sistema renina angiotensina (principalmente a la ECA). Nuestro grupo ha ensayado hidrolizados con actividad in vitro e in vivo (Vecchi y Añón 2009, Fritz y col 2011 y Quiroga y col 2012), al igual que otros autores (Luna- Suarez 2010). Se han obtenido resultados promisorios, pero aún continúan discutiéndose distintos aspectos relacionados con los mecanismo de acción, transporte y alcance del órgano blanco en modelos in vivo (Udenigwe 2014). Más allá de la capacidad de los péptidos de inhibir la ECA, se ha demostrado la existencia de otros mecanismos de acción como inhibición de la enzima renina y otros efectos directos en el sistema vascular mediante la ruta de las quimasas (Hirota y col., 2007; Sipola y col., 2002).

El tratamiento con altas presiones hidrostáticas APH,100-300 MPa (Peñas y col. 2004 y 2006), de mezcla de proteínas de suero de leche y soja con enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina y quimotripsina) se ha traducido en un mayor GH y en un perfil de péptidos diferente al obtenido en condiciones de presión atmosférica. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, nos han mostrado que las proteínas aisladas del grano de amaranto son muy sensibles a las APH, las cuales se desnaturalizan en

aproximadamente un 80 % luego de 5 min a 200 MPa (Condés y col., 2012), por lo que realizar la hidrólisis a presiones de 100 o 200 MPa se podría esperar la exposición de nuevos sitios de corte a la enzima, sin que la APH afecte a la misma.

Actividades y metodología

1. Obtención y caracterización de hidrolizados de amaranto con diferente grado de hidrólisis luego del tratamiento con altas presiones.

Las muestras que se utilizarán serán: hidrolizados extensivos de amaranto obtenidos por acción enzimática exógena (alcalasa). A éstos hidrolizados se los someterá a un tratamiento con altas presiones y se evaluará el posible cambio en la actividad biológica específica de los péptidos liberados. Los hidrolizados se prepararán, bajo condiciones controladas, por acción de alcalasa a 37 °C y pH 10, de acuerdo a resultados previos obtenidos en el laboratorio. La acción de la enzima se detendrá por calentamiento cuando se haya alcanzado un grado de hidrólisis superior al 30%. Con el fin de estudiar la cinética de la proteólisis se determinarán los grupos aminos libres utilizando el método del reactivo o-ftalaldehído (OPA) (Nielsen y col 2001). Los hidrolizados serán caracterizados mediante electroforesis en geles Tricina-SDS-PAGE y RP-HPLC..

2. Caracterización de los ingredientes activos obtenidos en el ítem 1 y de péptidos sintéticos (VIKP y ALEP), luego de ser sometidos a una digestión gastrointestinal simulada.

Las distintas muestras en estudio serán sometidas a un proceso simulado de digestión gastrointestinal en el que se mantendrán condiciones imperantes a nivel fisiológico: composición química del fluido digestivo, pH y tiempos de residencia típicos de cada compartimento del tracto. Se simularán los procesos que ocurren a nivel de la boca, el estómago y el intestino. Brevemente, la digestión simulada se iniciará por adición de un fluido similar saliva, pH 6,8, a las muestras en estudio, al cabo de 5 min se adicionará un similar fluido gástrico conteniendo pepsina, pH 2,0. Luego de 1 h se adicionará un similar de fluido duodenal conteniendo pancreatina, pH 7-7,5 manteniéndose la incubación por 1 h. Las muestras se mantendrán con agitación a 37 °C. Una vez finalizado el proceso de simulación de la digestión, las muestras serán calentadas para inhibir la acción enzimática y serán centrifugadas 5 min a 2750 xg a temperatura ambiente.

3. Medida de la resistencia de la capacidad inhibitoria en las muestras de estudio después de la digestión gastrointestinal simulada sobre diferentes enzimas del sistema renina angiotensina.

3.1 Extracción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) a partir de pulmones de conejo

La extracción de la enzima se realizará de acuerdo al protocolo de Hayakari y col (1978) con algunas modificaciones. Una vez obtenidos los pulmones, se los cortará y homogenizará en un Ultraturrax en presencia de buffer fosfato de potasio 0,1 M y sacarosa 0,25 M pH 8,3 en un baño de agua y hielo en una relación solvente: tejido de 1:5. A esta preparación se le agregará un inhibidor de proteasas, PMSF, en una concentración final de 0,1 mM. La suspensión así obtenida se centrifugará durante 5 minutos a una velocidad de 17400 xg a 4°C. El sobrenadante, será almacenado a -80°C hasta su uso. Los pulmones de conejo serán cedidos por la cátedra de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales-UNLP. Luego de la obtención y caracterización del hidrolizado antes y después de la digestión gastrointestinal simulada

y de los péptidos sintéticos se medirá la posible capacidad antihipertensiva en cada una de las etapas mencionadas anteriormente. La presencia de péptidos que presenten posible actividad inhibitoria de la ECA se determinará mediante el ensayo de Hurst y Lowell (1981), donde la potencia de los péptidos será estimada utilizando curvas dosis respuesta que permitirán calcular el parámetro IC50.

3.2 Inhibición de la actividad de renina

La renina es una enzima que cataliza la conversión del angiotensinógeno secretado por el hígado en angiotensina I, por consiguiente es un paso esencial del sistema angiotensina-renina involucrado en el control de la presión arterial. La determinación de la inhibición de la actividad de renina se llevará a cabo mediante espectrofotometría de fluorescencia según el método descrito por Yuan y col. (2006). Para ello se utilizará un kit de ensayo específico de inhibición de renina. Se analizará la actividad de distintas concentraciones de las muestras en estudio: ALEP, VIKP y los dos hidrolizados extensivos. La actividad enzimática se expresará como la velocidad de reacción, haciendo uso de una unidad de intensidad de fluorescencia arbitraria. Las longitudes de onda a utilizar serán 340 nm (excitación) y 490 nm (emisión). Los controles no contendrán muestra. Se determinará la cinética de reacción con la muestra más activa, haciendo uso de diferentes cantidades de sustrato (10 mM) y diferentes concentraciones de péptidos (0,5 - 2 mg/ml) de manera de poder estimar el IC50 de los mismos.

3.3 Actividad de quimasa

La quimasa es una enzima que cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II que juega un rol preponderante en la regulación de la presión. Se analizará la posible acción inhibitoria de esta enzima por parte de las muestras en estudio: ALEP, VIKP y los hidrolizados extensivos. Para la determinación de la actividad enzimática se hará uso de la técnica espectrofotométrica descrita por Takai y col. (2000). Como sustrato se usará SucAAPFPNA. El seguimiento de la reacción se hará a 405 nm. Como control negativo se utilizará DMSO y como control positivo quimostatina. Se calculará el porcentaje de inhibición, considerándose el mismo significativo cuando supere el 50 %.

Los resultados obtenidos permitirán aportar al conocimiento del o de los mecanismos involucrados en la regulación de la presión arterial en el sistema renina angiotensina mediante la utilización de péptidos provenientes de semillas de amaranto.

Bibliografía

- Condes, C., Speroni, F., Mauri, A., Añón, M.C. 2012. Physicochemical and structural properties of amaranth protein isolates treated with high pressure. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 14, 11-17
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., Añón, M.C. 2011. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chem.*, 126: 878-884.
 - Hayakari M., Kondo Y., Izumi H. 1978 A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin- converting enzyme. *Anal. Biochem.*, 84: 361-369.
 - Hirota, T.K., Ohki, R., Kawagishi, Y., Kajimoto, S., Mizuno, Y., Nakamura, L., Kitakaze, M. 2007. Casein hydrolysate containing the antihypertensive tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves vascular endothelial function independent of blood pressure-lowering effects: contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. *Hypertens. Res.*, 30: 489-496.
 - Hurst, P.L., Lovell-Smith, C.J. 1981. Optimized assay for serum angiotensin-converting enzyme activity. *Clin. Chem.*, 27: 2048-2052.

- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D. 2002. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*, 113: 71S-88S.
- Luna-Suárez, S., Medina-Godoy, S., Cruz-Hernández, A., Paredes-López, O. 2010. Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory peptide of the angiotensin I converting enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 148: 240-247.
- Nielsen P., Petersen D, Dambmann C 2001 Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Food Chem & Toxicology* 66: 642-646.
- Peñas, E., Préstamo, G., Gómez, R. 2004. High pressure and the enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins. *Food Chem.*, 85: 641-648.
- Peñas, E., Préstamo, G., Baeza, Martínez Molero, Gómez, R. 2006. Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. *Int. Dairy J.*, 16: 831-839.
- Quiroga, A.V., Aphalo, P., Ventureira, J.L., Martínez, E.N., Añón, M.C. 2012. Physicochemical, functional and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) 7S globulin. *J. Sci. Food Agric.*, 92: 397-403.
- Sipola, M.P., Finckenberg, R., Korpela, H., Vapaatalo, S., Nurminen, N.L. 2002. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J. Dairy Res.*, 69: 103-111.
- Takai S., Yuda A., Jin D., Nishimoto M., Sakagichi M., Sasaki S., Miyazaki M 2000 Inhibition of chymase reduces vascular proliferation in dog grafted veins. *FEBS Letters* 467 141-144
- Udenigwe, C.C., Aluko, R.E. 2012. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J. Food Sci.*, 77: R11-R24.
- Udenigwe, C.C. 2014. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Sci & Techn* 36:137-143.
- Vecchi, B., Añón, M.C. 2009. ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*, 70: 864-870.
- Yuan, L., Wu, J., Aluko, R.E., Ye, X. 2006. Kinetics of renin inhibition by sodium houltuyfonate analogs. *Biosci. Biotech. Bioch.*, 70: 2275-2280.

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
 - a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
 - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
 - a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: ininvest@cic.gba.gov.ar (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas

revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.