

## **INFORME CIENTIFICO DE BECA**

Legajo N°:

**BECA DE ESTUDIO** Primer año  
Legajo N°: 6976

**PERIODO 2015**

**1. APELLIDO:** Loria

**NOMBRES:** Karina Gabriela

**Dirección Particular: Calle:**

**Localidad:** Luján **CP:** 6

**Dirección electrónica (donde desea recibir información):**

**2. TEMA DE INVESTIGACIÓN** (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

USO DEL CASEINOMACROPÉPTIDO PARA FORTIFICAR ALIMENTOS CON CALCIO

**3. OTROS DATOS** (Completar lo que corresponda)

**BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO:** Fecha de iniciación: 01/04/2015

**2º AÑO:** Fecha de iniciación:

**BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO:** Fecha de iniciación:

**2º AÑO:** Fecha de iniciación:

**4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS**

**Universidad y/o Centro:** Universidad Nacional de Luján

**Facultad:** Sede Central

**Departamento:** Tecnología.

**Cátedra:** -

**Otros:** Laboratorio Avanzado de Alimentos Int 1435

**Dirección: Calle:** Rutas 5 y 7 **N°:**

**Localidad:** Luján **CP:** 6700 **Tel:** 02323-423171

**5. DIRECTOR DE BECA**

**Apellido y Nombres:** Farías Maria Edith

**Dirección Particular: Calle:** **Localidad:** San Miguel

**CP:** 1663 **Tel:** **Dirección electrónica:**

**6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.** (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

El Objetivo General de este plan de trabajo fue el siguiente:

o Explorar y caracterizar el desempeño del Caseinomacropéptido (CMP) como potencial quelante de calcio.

Durante el primer año de la beca (desde 1 de Abril de 2015) se abordaron los siguientes objetivos particulares:

A) Hipótesis: El CMP tiene una cadena peptídica con alto contenido de aminoácidos afines al calcio y además contiene ácido siálico que es reconocido por su capacidad de quelar calcio. Bajo condiciones adecuadas podría propiciarse la máxima capacidad del CMP para quelar calcio.

Objetivo Particular A: Explorar las condiciones de concentraciones de CMP y de sales de calcio, tipo de contraión, pH y temperatura que podría propiciar el quelado del calcio.

B) Hipótesis: El CMP en presencia de cloruro de calcio en solución presenta autoensamblaje a pH neutro que se evidencia en el incremento de viscosidad de la solución a tiempos muy largos (Farias, 2012). Sería de esperar que las soluciones de CMP y sales de calcio presentaran características reológicas diferentes a las soluciones de CMP solo a pH neutro.

Objetivo particular B: Explorar los cambios en los parámetros reológicos de las soluciones de sales de calcio y CMP y analizar el efecto de la temperatura.

C) Hipótesis: Una de las consecuencias de la unión del calcio a las proteínas es un cambio en la solubilidad de las sales (Eckert et al., 2014). El ácido siálico, predominante en el CMP glicosilado, es conocido por su habilidad para quelar calcio preferentemente a pH 7,0 (Jaques et al., 1977). Sería de esperar que la presencia de CMP aumente la solubilidad de las sales de calcio a pH neutro y que este efecto sea potenciado por la presencia de ácido siálico.

Objetivo particular C: Determinar la influencia ejercida por el CMP sobre la solubilidad de distintas sales de calcio.

Dichos objetivos particulares fueron concretados en un 100% en lo que respecta al análisis de la interacción entre el CMP y el cloruro de calcio. A la vez se analizaron las interacciones entre el cloruro de sodio y el CMP para comparación. Cabe destacar que tanto el CMP como el cloruro de calcio son altamente solubles en agua. El desafío que comenzó a trabajarse a fin del año 2015 fue la utilización del carbonato de calcio que es una sal muy insoluble y alcaliniza el medio. Como consecuencia se tuvieron que realizar algunas adaptaciones en las técnicas utilizadas hallándose resultados muy alentadores. Se planea durante este año 2016, continuar la exploración con carbonato de calcio e introducir el estudio de las sales citrato, acetato y lactato de calcio.

Con respecto al plano material, este proyecto fue aprobado por resolución N° 270/15 por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica bajo la denominación PICT 2014-1402 como grupo en formación (Temas abiertos, Tipo D). Además también fue validado por la Universidad Nacional de Luján (DISPOSICIÓN CDD-T:120-15), recibiendo subvención tanto de la ANPCyT como de la UNLu.

Con respecto al equipamiento, durante el año 2015, la Ing. Karina Loria fue capacitada en el uso de equipos de última generación (reómetro de estrés controlado, texturómetro y colorímetro). También trabajó en la puesta a punto de diversas técnicas que evaluaron la capacidad de ligante del CMP con el calcio (solubilidad de las sales en buffer pH 8.0, solubilidad de las sales en solución de etanol, determinación de calcio soluble por titulación) que deben ser puestas a punto para cada sistema en particular.

Las técnicas desarrolladas durante este período para cumplir con los objetivos particulares fueron las siguientes:

Objetivo particular A:

1- Caracterización de la asociación espontánea entre el CMP y el calcio en solución y 2- Reversibilidad de la asociación espontánea entre el CMP y el calcio en solución

Este objetivo se cumplió para el estudio de la interacción entre el CMP y los cloruro de calcio y sodio. Falta realizar los estudios con otras sales de calcio que esperamos puedan realizarse durante 2016-2017. Los resultados serán en breve publicados.

Como alternativa, se realizó un ensayo más económico, midiendo el autoensamblaje del CMP a pH 3,5 a partir del cambio de color de la dispersión. Con este objetivo, se utilizó un colorímetro portátil MiniScan® EZ (Hunter Lab, Reston, USA). Para ello se trabajó matemáticamente los datos de forma de obtener una ecuación que representara la evolución del tamaño de partícula en el tiempo. En este nuevo ensayo, que no está incluido en el plan original, se ajustó el CMP con diferentes ácidos orgánicos (acético, láctico, cítrico y fosfórico) y HCl y se compararon los datos con los obtenidos por Dispersión Dinámica de Luz Láser, siendo estos alentadores. Dichos ensayos se publicaron en forma de póster en el CONGRESO CYBIA 2015 realizado en Montevideo, Uruguay. Durante el año 2016 se trabajará con las dispersiones mixtas CMP/sales de calcio, debido a la rapidez y economía del método.

Objetivo particular B:

3- Comportamiento reológico de las soluciones CMP en presencia de calcio;

Se realizó un exhaustivo estudio reológico de la gelificación a pH 3,5 del CMP (12% p/p) en presencia de cloruro de sodio y calcio (0 a 0,5 M), utilizando al ácido clorhídrico como acidificante. También se realizaron geles a temperatura ambiente y se realizaron análisis de perfil de textura en un texturómetro (modelo TA-XT2i; Stable Microsystems, Godalming, UK). Este ensayo, que no estaba inicialmente en el plan propuesto, es muy interesante para analizar el efecto de la presencia de sales en los geles de CMP y su efecto en la percepción que tendrá el consumidor.

Por otro lado, se analizó mediante ensayos de flujo con el reómetro de estrés controlado en dispersiones de CMP en diferentes condiciones de pH entre 4,5 y 9,0. Un avance de estos ensayos fueron publicados en forma de póster en el CONGRESO CYBIA 2015. También se analizó el efecto de la presencia de cloruro de calcio en dichos ensayos que no han sido publicados todavía.

También se realizó una cinética de gelificación del CMP en presencia de cloruro de calcio y sodio, para analizar el efecto de la temperatura en la energía de activación de la formación del gel. Estos resultados están siendo actualmente analizados.

Objetivo particular C:

4- Influencia de las sales de calcio en el pH de las soluciones de CMP

Una de las formas más sencillas que indican interacción entre el calcio y el CMP es el cambio de pH. Dicho ensayo se realizó con cloruro de calcio y carbonato de calcio, quedando para este año el análisis de otras sales. Estos resultados aún no han sido publicados.

5- Efecto de la presencia de CMP en la solubilidad de las sales de calcio

Estos ensayos fueron realizados en buffer fosfato a pH 8,0 para el análisis de la interacción del CMP y el cloruro de calcio o el carbonato de calcio. Las determinación del calcio soluble fueron realizadas por un equipo de última generación: espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo A Analyst 200 (EEUU). Dicho análisis fue llevado a cabo por el grupo de Química Analítica de la UNLu.

Se incorporó al plan de trabajo otra técnica de evaluación de la capacidad quelante de calcio de CMP. Ésta consistió en la precipitación con etanol del complejo Ca-CMP. El calcio no ligado se determinó por valoración con EDTA. Los avances de estos resultados fueron publicados en el Congreso Argentino de Nutrición 2015.

6- Fracción de calcio dializable de las soluciones de CMP-Ca

Dicho ensayo fue realizado para analizar la capacidad ligante de calcio del CMP en presencia de cloruro de calcio. Estos resultados serán publicados en la brevedad. Se analizarán durante este año 2016, las otras sales propuestas. Para optimizar este ensayo se ha adquirido un electrodo selectivo de calcio.

## **7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.**

**7.1. PUBLICACIONES.** Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

**7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA.** (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

**7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN.** (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

**7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN.** (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

**7.5. COMUNICACIONES.** (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

1-Séptimo Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, INNOVA 2015 y Décimo Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, X CIBIA.

Trabajo presentado en forma de póster: "Un método alternativo para medir el autoensamblaje del caseinomacropéptido"

Autores: Loria K. y Farías M. E.

ISSN: 2301-0819

ISSNe:2301-0940

Pág. 77

Lugar: Buenos Aires, Argentina

Fecha: 7 al 9 de Octubre de 2015

2-Séptimo Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, INNOVA 2015 y Décimo Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, X CIBIA.

Trabajo presentado en forma de póster: "Comportamiento al flujo del caseinomacropéptido"

Autores: Loria K.; Torregiani S.; Pilosof A.M.R y Farías M. E.

ISSN: 2301-0819

ISSNe:2301-0940

Pág. 89

Lugar: Buenos Aires, Argentina

Fecha: 7 al 9 de Octubre de 2015

3- XX Congreso Argentino de Nutrición. SAN 2015

Resumen presentado en forma de póster: "Evaluación del caseinomacropéptido como ligante de calcio"

Autores: Farías, María E., Loria, Karina; Torregiani, Sofía; Gómez, Gustavo; Pighin, Andrés y Pilosof, Ana M.R.

Lugar: Buenos Aires, Argentina

Fecha: 25 al 27 de Noviembre de 2015

Actualización en Nutrición volumen 16 Número especial XX Congreso Argentino de Nutrición. Pág 46

ISSN 1667-8052

#### **7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN.** (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

#### **8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS.** (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

##### **8.1. DOCENCIA**

##### **8.2. DIVULGACIÓN**

**Título del trabajo: "Evaluación de la solubilidad del calcio en presencia de caseinomacropéptido"**

**Segundo Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la provincia de Buenos Aires.**

**Organizado por: la Comisión de Investigaciones Científicas del gobierno de la Provincia de Buenos Aires (CIC).**

**Trabajo presentado en forma de póster.**

**Autores: Loria, K.; Pilosof, Ana M. y Farías, Ma. Edith.**

**Fecha: 1 Octubre de 2015**

**Lugar: La Plata, Argentina**

##### **8.3. OTROS**

#### **9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS.** (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

Asistencia al Séptimo Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, INNOVA 2015 y Décimo Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, CIBIA.

Trabajos presentados:

"Un método alternativo para medir el autoensamblaje del caseinomacropéptido", 2015. Loria, Karina G. y Farías, Ma.Edith.

"Comportamiento al flujo del caseinomacropéptido", 2015. Loria, Karina G.; Torregiani, Sofía; Pilosof, Ana M.R. y Farías, Ma.Edith.

Fecha : 7 al 9 de Octubre de 2015.

Lugar : Montevideo, Uruguay.

Asistencia al Segundo Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la provincia de Buenos Aires.

Organizado por: la Comisión de Investigaciones Científicas del gobierno de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

Trabajo presentado:

“Evaluación de la solubilidad del calcio en presencia de caseinomacropéptido”. Loria, K.; Pilosof, Ana M. y Farías, Ma. Edith.

Fecha: 1 Octubre de 2015

Lugar: La Plata, Argentina

**10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

Durante el año 2015 Karina Loria realizó los siguientes CURSOS DE POSGRADO, correspondientes a su plan de formación doctoral:

- “MODELACIÓN CON ECUACIONES DIFERENCIALES, EN DIFERENCIAS Y ECUACIONES CON RETARDO EN LA BIOLOGÍA”. (Se adjunta certificado)

Universidad Nacional de Luján

Dictado por: Dr. José Ignacio Barradas Bribiesca (Universidad de Guanajuato, México).

Disposición: CD-CB N° 109/15

Del 27/04/15 al 30/04/15. Duración: 32 horas teórico-prácticas.

- “PRINCIPIOS DE NANOBIOLOGÍA”. (Se adjunta certificado)

Universidad Nacional de Luján

Dictado por: Dr. Martín Federico Desimone, Dra. Marisa M. Fernández, Dra. Gisela S. Álvarez y Farm. María Lucía Foglia.

Disposición: CD-CB N° 369/14

Del 30/04/15 al 03/07/15. Duración: 32 horas.

- “ESTADÍSTICA APLICADA”. (Se adjunta certificado)

Universidad Nacional de Luján

Dictado por: Olga Susana Filippini (Dto de Cs. Básicas, Universidad Nacional de Luján).

Disposición: CD-CB N° 285/15

Del 27/08/15 al 18/09/15. Duración: 32 horas.

-“REDACCIÓN DE MATERIALES CIENTÍFICOS: PLANIFICACIÓN, ORGANIZACIÓN Y COMPOSICIÓN” (Certificado en trámite)

Universidad Nacional de Luján

Dictado por: Mg. Dellamea Amalia Beatriz (Universidad Nacional de Buenos Aires).

Disposición: CD-CB N° 283/15

Del 13/10 al 28/11. Duración: 30 horas

- “PROPIEDAD INTELECTUAL EN INVESTIGACIONES BIOTECNOLÓGICAS”. (Certificado en trámite)

Universidad Nacional de Luján

Dictado por: Dr. Ardila Fernando.

Disposición: CD-CB N° 281/15

Del 23/10/15 al 03/12/15. Duración: 32 horas.

-“TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEINAS NATIVAS Y RECOMBINANTES” (Se adjunta certificado)

Universidad Nacional de Luján

Dictado por: Mirtha Biscoglio, Osvaldo Cascone y Carlos Pavan.  
Disposición: CD-CB N° 350/15  
Del 16/11/15 al 20/11/15. Duración: 32 horas teórico-prácticas.

#### **11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO**

-

#### **12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO**

Ayudante de primera con carácter ad honorem  
Asignatura: Fisicoquímica- División Tecnología.  
Periodo: 01/04/15 al 31/12/15  
Lugar de desarrollo: Universidad Nacional de Luján  
Disposición DD-T N°011/15

#### **13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES** (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

Durante el año 2015, Karina Loria participó como integrante de los siguientes Proyectos de Investigación acreditados:

"UTILIZACIÓN DEL CASEINOMACROPÉPTIDO COMO NUEVA ESTRATEGIA DE FORTIFICACIÓN CON CALCIO"

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.  
Vigencia: 2015-2018  
Directora: María Edith Farías  
Código del proyecto: PICT-2014-1402  
Monto del proyecto: \$252.000

"UTILIZACIÓN DEL CASEINOMACROPÉPTIDO COMO NUEVA ESTRATEGIA DE FORTIFICACIÓN CON CALCIO"

Universidad Nacional de Luján. Departamento de Tecnología.  
Vigencia: 2015-2017  
Directora: María Edith Farías  
Disposición: CDT N° 120/15  
Monto del proyecto: a designar

"DISEÑO DE NANO-MICROESTRUCTURAS PARA ALIMENTOS".

Universidad Nacional de Luján. Departamento de Tecnología.  
Vigencia: 2014-2016  
Directora: María Edith Farías  
Codirector: Dr. Oscar Pérez (FCEyN- UBA)  
Disposición: CDD-T: 121/15  
Monto del proyecto: \$ 10000

#### **14. TÍTULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA** (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Plan de trabajo del Segundo Año de la Beca de Estudio:

UTILIZACIÓN DEL CASEINOMACROPÉPTIDO COMO NUEVA ESTRATEGIA DE FORTIFICACIÓN CON CALCIO

Se continuará con el Plan de Beca anterior, haciéndose incapié en el estudio de las interacciones de otras sales de calcio (carbonato, lactato, acetato y citrato) con el caseinomacropéptido.

El Objetivo General de este plan de beca, continuará siendo el mismo:

- Caracterizar el desempeño del CMP como potencial ligante de calcio.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

A) Hipótesis: El CMP tiene una cadena peptídica con un importante número de aminoácidos afines al calcio y además contiene ácido siálico que es reconocido por su capacidad de quelar calcio. Bajo condiciones adecuadas podría propiciarse la máxima capacidad del CMP para quelar calcio.

Objetivo 1: Explorar las condiciones de concentraciones de CMP y de sales de calcio, tipo de contracción, pH y temperatura que podría propiciar el quelado del calcio.

B) Hipótesis: El CMP en presencia de cloruro de calcio en solución presenta autoensamblaje a pH neutro que se evidencia en el incremento de viscosidad de la solución a tiempos muy grandes (Farias, 2012). Sería de esperar que las soluciones de CMP y sales de calcio presentaran características reológicas diferentes a las soluciones de CMP solo en las condiciones de pH en que no se autoensambla (pH > 4,5).

Objetivo 2: Explorar los cambios en los parámetros reológicos de las soluciones de sales de calcio-CMP a diferentes temperaturas y condiciones de pH.

C) Hipótesis: Una de las consecuencias de la unión del calcio a las proteínas es un cambio en la solubilidad de las sales (Eckert et al., 2014). El ácido siálico, predominante en el CMP glicosilado, es conocido por su habilidad para quelar calcio preferentemente a pH 7,0 (Jaques et al., 1977). Sería de esperar que la presencia de CMP aumente la solubilidad de las sales de calcio a pH neutro y que este efecto sea potenciado por la presencia de ácido siálico.

Objetivo 3: Determinar la influencia ejercida por el CMP y la presencia de ácido siálico sobre la solubilidad de diferentes sales de calcio.

Sobre la base de los puntos expuestos, el diseño de la investigación incluirá los siguientes bloques de actividades:

- 1) Explorar las condiciones de concentraciones de CMP y sales de calcio, tipo de contracción, pH y temperatura que podría propiciar el quelado del calcio.
- 2) Explorar los cambios en los parámetros reológicos de las soluciones de sales de calcio y CMP y analizar el efecto de la temperatura.
- 3) Determinar la influencia ejercida por el CMP y la presencia de ácido siálico sobre la solubilidad de diferentes sales de calcio.

#### Materiales

Se utilizarán dos productos comerciales de caseinomacropéptido (CMP).

- BioPURE-GMP® que es la marca comercial del CMP provisto por Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, USA).
- LACPRODAN® CGMP-10 que es la marca comercial del CMP de Arla Foods Ingredients (Viby J., Dinamarca).

Se utilizarán sales de calcio de calidad analítica: fundamentalmente CaCl<sub>2</sub> y carbonato de calcio; lactato de calcio; acetato de calcio; citrato de calcio.

## Métodos

La metodología se divide en cuatro partes, cada una correspondiente a cada objetivo planteado en el ítem anterior:

Bloque 1) Explorar las condiciones de concentraciones de CMP y de sales de calcio, tipo de contraión, pH y temperatura que podría propiciar el quelado del calcio.

Este objetivo será evaluado por las siguientes técnicas:

### 1- Caracterización de la asociación espontánea entre el CMP y el calcio en solución

El autoensamblaje del CMP en presencia de diferentes concentraciones (0 a 0,1 M) de las sales de calcio se caracterizarán por dispersión dinámica de luz (DLS) en un equipo Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, provisto con un láser He-Ne (633 nm) y un correlador digital, modelo ZEN3600. El equipo Zetasizer Nano-ZS determina tamaño de partículas cuyo diámetro hidrodinámico se encuentra en el rango de 0,6 nm a 6  $\mu$ m. Se evaluarán al CMP solo y las mezclas con sales a partir de las distribuciones de tamaño de partícula en intensidad y volumen (análisis de CONTIN) y del valor del diámetro hidrodinámico promedio (análisis de cumulantes). Las mediciones se realizarán entre 25 y 70 °C. Las concentraciones de CMP oscilarán entre 1 y 5% (p/p). Se evaluará el efecto del pH (entre 2,5 y 8,0), el ajuste se llevará a cabo con HCl o NaOH de alta normalidad. Las determinaciones se harán por duplicado que serán la media de al menos 5 mediciones. Los mismos ensayos se realizarán utilizando los buffers apropiados para simular las condiciones fisiológicas.

Como método alternativo al DLS, se analizará la evolución del color de las muestras de CMP y calcio con un colorímetro portátil MiniScan® EZ (Hunter Lab, Reston, USA).

### 2- Reversibilidad de la asociación espontánea entre el CMP y el calcio en solución

Se utilizarán las técnica empleada en Farías et al. (2010) y Martínez et al. (2010). La reversibilidad de la asociación espontánea entre el CMP y el calcio al cambio de pH (por ejemplo llevando desde pH 7,0 a 3,5 y retornando al inicial) se evaluará en un equipo Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments.

También se evaluará la reversibilidad de la asociación espontánea entre el CMP y el calcio al cambio de temperatura (por ejemplo, calentando la solución desde 25 °C hasta 70 °C y enfriando nuevamente a 25 °C) en el mismo equipo Zetasizer Nano-Zs.

Bloque 2) Explorar los cambios en los parámetros reológicos de las soluciones de sales de calcio y CMP y analizar el efecto de la temperatura.

Este objetivo será evaluado por la siguiente técnica:

### 3- Comportamiento reológico de las soluciones CMP en presencia de calcio

Se analizará el comportamiento reológico por ensayo rotacional de las soluciones del CMP (1,0 y 5,0% p/p) en presencia de diferentes concentraciones (0 a 0,25 M) de las sales de calcio a diferentes valores de pH entre 2,5 y 9,0. Los ensayos se realizarán en un reómetro Paar Physica MCR 301 (Graz, Austria), con una velocidad de cizalla entre 0,1 y 100  $s^{-1}$  a temperaturas entre 25 y 70 °C. Se registrarán la viscosidad aparente, el esfuerzo de corte y la velocidad de cizalla. Se utilizarán los modelos de la potencia o el de Hershel–Bulkley, según corresponda, para el análisis de los datos. Se obtendrán las constantes características:  $\tau_0$  (esfuerzo inicial de corte), K (índice de consistencia plástica) y n (factor exponencial).

Bloque 3) Determinar la influencia ejercida por el CMP y la presencia de ácido siálico sobre la solubilidad de diferentes sales de calcio.

Este objetivo será evaluado por las siguientes técnicas:

4- Influencia de las sales de calcio en el pH de las soluciones de CMP

Se analizará la influencia de la incorporación de sales de calcio (0 a 0,06 M) en el pH de soluciones de CMP de concentraciones entre 1,0 y 5,0% (p/v) según la técnica descrita por Pitkowski et al. (2009). También se medirá la conductividad de las soluciones.

5- Efecto de la presencia de CMP en la solubilidad de las sales de calcio

- Solubilidad de las sales de calcio en buffer fosfato

Según Eckert et al. (2014) la mínima solubilidad de las sales de calcio es a pH 7,0 a 25 °C. Las sales de calcio se disolverán en diferentes concentraciones (0 a 0,06 M) en buffer fosfato a pH 8,0 a temperatura ambiente para el reconocimiento de la mínima solubilidad. Las soluciones se agitarán vigorosamente a temperatura ambiente por 2 horas y serán centrifugadas para remover los minerales insolubles. La cantidad de calcio en el sobrenadante será medida con un espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo A Analyst 200 (EEUU) con llama aire-acetileno.

- Solubilidad de las sales de calcio en presencia de CMP en buffer fosfato

Se disolverá el CMP hasta una concentración final de 1% (p/p) en las soluciones de las sales de calcio de concentraciones 0 a 0,06 M en buffer fosfato a pH 8,0. Las soluciones se agitarán vigorosamente a temperatura ambiente por 2 horas, serán centrifugadas para remover los minerales insolubles. La cantidad de calcio en el sobrenadante será medida con un espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo A Analyst 200 (EEUU) con llama aire-acetileno, previa calcinación en mufla. La capacidad de unir calcio será calculada como el incremento de iones calcio en el sobrenadante en presencia de CMP en relación al control.

$$S (\%) = (C_{pep} / C_{tot}) \cdot 100$$

Siendo  $C_{pep}$  la solubilidad de la sal de calcio en el sobrenadante en presencia de CMP y  $C_{tot}$  la solubilidad de la sal de calcio.

6- Fracción de calcio dializable de las soluciones de CMP-Ca

Para poder cuantificar la capacidad ligante del CMP se estudiará la interacción del CMP al 1% (p/p) en solución con las sales de calcio. Se mezclarán las soluciones de CMP y de sales de calcio para obtener una relación 10:1 y se usará como control una mezcla en igual proporción de agua y de cada sal de calcio. Luego de ajustar el pH de las muestras según corresponda a la mínima solubilidad de las sales, se incubará con agitación a 37 °C durante 30 min. Finalizada la incubación se realizará una diálisis (membranas de diálisis de éster de celulosa de Biotech, MWCO: 100 – 500 Da) durante 24 h a las mezclas CMP-Ca con el objetivo de eliminar el calcio no ligado. Finalmente, se cuantificará la cantidad de calcio no ligado del CMP (que quedó fuera de la membrana de diálisis) empleando un espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin Elmer modelo A Analyst 200 (EEUU).

7- Análisis estadísticos

Los datos obtenidos del estudio de las variables involucradas en la presente investigación serán objeto de análisis estadístico empleando el software de análisis SPSS para Windows (versión 15.0; IBM, Inc., Chicago, IL, USA) del cual la Universidad Nacional de Luján tiene uso de licencia. Se aplicarán las pruebas estadísticas correspondientes para un análisis correcto. Los promedios y desvíos se inspeccionarán a través de estadísticos descriptivos

para registrar errores y valores atípicos. Se construirán las unidades de análisis de la información recolectada, respondiendo a la validación de las diferentes hipótesis planteadas. De ser factible se aplicarán diseños experimentales.

---

### Condiciones de 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 Becario, la que deberá incluir:
- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
  - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
  - c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

---

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

.....  
Firma del Director

.....  
Firma del Becario

para registrar errores y valores atípicos. Se construirán las unidades de análisis de la información recolectada, respondiendo a la validación de las diferentes hipótesis planteadas. De ser factible se aplicarán diseños experimentales.

---

### Condiciones de 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 Becario, la que deberá incluir:
- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
  - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
  - c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

---

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

  
.....  
MONICA EDITH FARGAS  
Firma del Director

  
.....  
KARINA LOUA  
Firma del Becario