

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE ESTUDIO

Legajo N°:

PERIODO 2016

1. APELLIDO: *Loria*

NOMBRES: Karina Gabriela

Dirección Particular: Calle: N°: 430

Localidad: Luján *CP:* 6700 *Tel:*

Dirección electrónica (donde desea recibir información): kloria@mail.unlu.edu.ar

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:* 01/4/2016

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°:* s/n

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

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: Farías Maria Edith

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: San Miguel *CP:* 1663 *Tel:*

Dirección electrónica: efarias@mail.unlu.edu.ar

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 la Beca de Estudio (desde el 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. 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. Durante este año 2016, se continua la exploración con carbonato de calcio y se planea realizar experimentos con otras sales de calcio (citrato, acetato y lactato de calcio). En este momento se está evaluando la capacidad ligante de calcio del CMP por el método del calcio libre y calcio ligado, mediciones obtenidas a través de un electrodo selectivo de calcio. Poner a punto esta técnica fue muy dificultoso para el caso del CMP, y recientemente pudimos obtener los primeros resultados. En forma paralela, también estamos realizando ensayos de diálisis para obtener la capacidad ligante con otra metodología.

Mi plan de trabajo fue aceptado en el Doctorado de Ciencias Aplicadas de la UNLu. Por consiguiente fui admitida al doctorado el 27/6/2016, RESOLUCIÓN RESHCS-LUJ:0000474-16

También trabajé mucho en lo que respecta a la escritura de material científico, presentación de seminarios e interpretación de resultados. Esta es la tarea más difícil del becario, que insume mucho tiempo pero altamente necesaria para mi formación doctoral. El 15 de Septiembre de 2016, daré mi primer seminario en el marco del Doctorado de Ciencias Aplicadas, explicando la fundamentaciones de mi plan de tesis.

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, fui capacitada en el uso de equipos de última generación (reómetro de estrés controlado, texturómetro y colorímetro). También trabajé 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, diálisis de proteínas, uso de electrodo de ion selectivo de calcio) que deben ser puestas a punto para cada sistema en particular.

Las técnicas desarrolladas 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. 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. Se envió un resumen de estos resultados al Congreso CICYTAC 2016.

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. Un avance de estos resultados fueron publicados en el TERCER CONGRESO INTERNACIONAL CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES.

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. Un avance de estos resultados se envió al CICYTAC 2016, el resumen se encuentra en evaluación en este momento.

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. Se espera en breve analizar en presencias de otras sales 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

4- VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016)

Resumen aprobado "Efecto de la presencia de NaCl y CaCl₂ sobre la dinámica de la gelificación, el color y la textura del caseinomacropéptido"

Autores: Loria, KG; Aragón, J.C.; Pilosof, A.M.R. y Farías, M.E.

ISBN:

Lugar: Córdoba, Argentina

Fecha: 2 y 4 de Noviembre de 2016

5- VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016)

Resumen enviado “EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL CASEINOMACROPÉPTIDO EN LA BIODISPONIBILIDAD DE CALCIO: SOLUBILIDAD EN BUFFER FOSFATO”

Autores: LORIA, KG; ARAGÓN, JC; TORREGIANI S; GÓMEZ, GA; PIGHIN A; PILOSOFF, AMR y FARIAS, ME

ISBN:

Lugar: Córdoba, Argentina

Fecha: 2 y 4 de Noviembre de 2016

6- VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016)

Resumen enviado “Utilización de un electrodo de ión selectivo para la evaluación de la capacidad ligante de calcio del caseinomacropéptido”

Autores: Loria, KG; Aragón, J.C.; Pilosof, A.M.R. y Farías, M.E. (3,4).

ISBN:

Lugar: Córdoba, Argentina

Fecha: 2 y 4 de Noviembre de 2016

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

1- “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

2-Cinética de la gelificación del CMP con NaCl y CaCl₂

2016 TERCER 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)

Autores: LORIA, K.; ARAGÓN, J. y FARIAS, M. E.

Fecha: 1 Septiembre de 2016

Trabajo presentado en forma de póster

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.

2015 Asistencia al Segundo Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la provincia de Buenos Aires.

2016 Asistencia al Segundo Tercer Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la provincia de Buenos Aires.

2016 Asistencia a I Jornada de Actualización "Los lácteos y la Nutrición"

Fecha: 01/06/16.

Organizado por: Inti Lacteos. Certificado de asistencia

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:

- "MODELACIÓN CON ECUACIONES DIFERENCIALES, EN DIFERENCIAS Y ECUACIONES CON RETARDO EN LA BIOLOGÍA".

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 NANOBIOOTECNOLOGÍA".

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"

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"

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"

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"

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.

Durante el año 2016:

-"PREPARACIÓN DE MUESTRAS ANALÍTICAS"

Universidad Nacional de Luján

Dictado por: Dra. María Cristina Vescina - Prof. Horacio Napolitano

Disposición: Disp. CD-CB N° 209/16

Del 28/06 al 02/07. Duración : 32 horas teórico-prácticas

- En Curso: Inglés - Nivel Pre-intermedio

Carga horaria: 3 horas semanales. Duración: Cuatrimestral.

Responsable del programa: CIDELE. Año lectivo: 2016

Disposición CD-E N° 241/15

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

-

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

Ayudante de primera con dedicación simple

Cargo ordinario en la Disciplina Procesamiento y Conservación de Alimentos de la División Tecnología de Alimentos. Asignatura: Transformación de leche I y II.

Periodo: 01/05/16- Actualidad.

Lugar de desarrollo: Universidad Nacional de Luján.Sede central y Sede Chivilcoy

RESHCS-LUJ: 122-16

Ayudante de primera con carácter ad honorem

Asignatura: Físicoquímica- División Tecnología.

Periodo: 01/04/15 al 30/04/16

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)

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)

Para la beca de Pefecccionamiento se realizará el siguiente plan de trabajo aprobado en la admisión del Doctorado de Ciencias Aplicadas de la UNLu:

a) El tema de investigación

UTILIZACIÓN DEL CASEINOMACROPÉPTIDO COMO NUEVA ESTRATEGIA DE FORTIFICACIÓN CON CALCIO

b) Antecedentes sobre el tema

El calcio es el quinto elemento más abundante en la corteza terrestre y por ese motivo debería estar fácilmente disponible en los alimentos que ingerimos y para ello, debe disolverse en el medio ácido del estómago o mantenerse en solución (si ya está disuelto) durante el tránsito intestinal de pH neutro o ligeramente alcalino (Gueguen y Pointillart, 2000). El 90% de la absorción del calcio tiene lugar en el intestino delgado (Wasserman, 2004) a través de su forma ionizada (Ca^{2+}) o unido a una molécula orgánica soluble (Gueguen et al., 2000). La absorción del calcio en el estómago representa una fracción muy menor y el calcio restante (menos del 10%) se absorbe en el colon (Vavrusova y Skibsted,

2014). El calcio es un mineral esencial para la correcta salud ósea, ya que su depósito se realiza principalmente en los huesos y dientes que depende de varios factores como la ingesta dietética, la absorción intestinal, la excreción renal y el remodelamiento óseo. El requerimiento de calcio está afectado por diversos factores como edad, sexo, embarazo, lactancia o enfermedades como la insuficiencia renal, por ejemplo. En Argentina, el requerimiento recomendado de calcio para la edad entre los 19 y 50 años es de 1000 mg (FAO, 2001). El criterio actualmente utilizado para establecer las necesidades de calcio se basa en la conservación de un adecuado pico de masa ósea (PMO), es decir, en lograr la adquisición máxima del mineral al finalizar el crecimiento. Durante el crecimiento, embarazo y lactancia los requerimientos de calcio son superiores y disminuyen progresivamente con la edad.

Una dieta con alto contenido de calcio previene la osteoporosis. La osteoporosis, la enfermedad en la cual los huesos se vuelven frágiles y más propensos a la fractura por la reducción de la densidad ósea provocada por la pérdida de calcio, afecta estimadamente a 75 millones de personas en todo el mundo (Vavrusova et al., 2014). Esta epidemia oculta es cada vez más significativa por el envejecimiento de la población.

En los ancianos disminuye la biodisponibilidad del calcio por la hipoclorhidria y la aclorhidria que son los trastornos generados por el decrecimiento de la secreción de ácido gástrico en el estómago, y la falta de la misma, respectivamente. Esta condición disminuye la disolución de las sales de calcio en agua en el estómago y contribuye a la mala absorción de calcio ya que el calcio circula por los intestinos en forma de sales insolubles no asimilables (Straub, 2007).

No solo los factores endógenos como la aclorhidria pueden convertir al calcio en menos disponible sino que factores exógenos como la interacción con otro componente de la dieta pueden disminuir su biodisponibilidad, por ejemplo, la presencia de ácido fítico de los granos de cereal no procesados, de ácido oxálico en vegetales verdes como acelga y espinaca. Si bien la precipitación de los ácidos grasos de cadena larga saturada por el calcio dietario tiene un efecto positivo sobre la salud mediante la eliminación del anión de ácido graso, el mismo proceso hace al calcio esté menos disponible para la absorción (Vavrusova et al., 2014). Otros factores que afectan la absorción del calcio son la deficiencia en vitamina D, una inadecuada relación Ca/P (la correcta es 2/1), el exceso de sodio y el consumo de café mayor a 90 mg/día (Fernández et al., 2011).

En la Insuficiencia Renal Crónica (IRC) se aconseja la administración de una dieta equilibrada adaptada a la edad y sexo que cubra los requerimientos de calcio en cantidad adecuada a las recomendaciones. Los pacientes afectados con IRC no dializados requieren entre 600 y 1400 mg/día de calcio, que será aportado con la dieta y suplementos orales, mientras que los que se encuentran en diálisis crónica suelen requerir de 1200 a 1600 mg de calcio diarios para lograr un balance positivo o neutro. Las recomendaciones actuales son de proporcionar una ingesta diaria de calcio total (dieta y complementos) que no supere los 2000 mg/día de calcio para evitar una sobrecarga que condicione la aparición de calcificaciones cardio-vasculares (Douthat et al., 2009).. Al disminuir la función renal se produce una acumulación corporal de fósforo en forma directamente proporcional a la cantidad ingerida en los alimentos. La hiperfosfatemia, inhibe la actividad de la hidroxilasa renal, disminuyendo la producción de calcitriol y de esta manera, en forma indirecta a la hipocalcemia por menor absorción intestinal de calcio. El control de la hiperfosfatemia requiere disminuir el ingreso de fosfato (dieta, captadores orales de fosfato) e incrementar las pérdidas (diálisis), entre las medidas más importantes. Para disminuir la ingesta de fosfato es necesario que los pacientes con IRC tengan una dieta equilibrada. Además es necesario que se disminuya la absorción intestinal del fosfato ingerido, por este motivo se recomienda la ingesta de suplementos de calcio. Entre los más utilizados se encuentran el carbonato de

calcio y el acetato de calcio. Ambas sales han demostrado ser eficaces cuando se los utiliza en altas dosis y tienen un costo relativamente bajo de tratamiento. Ambos medicamentos son más efectivos si se administran durante las comidas. Su principal limitación es el riesgo de producir hipercalcemia (elevación de los niveles de calcio total por encima de 10,5 mg/dL), la escasa tolerancia digestiva y la escasa palatabilidad (estas sales son ingeridas en forma de tabletas poco agradables y de gran tamaño).

En este marco, se ha estudiado mucho la fortificación de los alimentos con calcio a través de sales solubles en agua como el cloruro de calcio, carbonato de calcio, citrato de calcio, lactato de calcio y acetato de calcio (Soto et al., 2014). Todas estas sales presentan menor solubilidad a pH neutro o básico (Eckert et al., 2014). Se han realizado estudios para la utilización de péptidos de cadena corta como ligantes de calcio como medio de suplementación de este mineral (Charoenphun et al., 2013; Eckert et al., 2014; Ferraretto et al., 2001; Phelan et al., 2009). Es sabido que los aminoácidos Asp (constante de equilibrio aparente, K_{ass} : 7 L mol⁻¹) y Glu (K_{ass} 3 L mol⁻¹) son los ligantes de calcio más fuertes entre los otros aminoácidos, pero bastante más débiles que, por ejemplo, el ión lactato (K_{ass} : 12 L mol⁻¹). Sin embargo, se evidencia un efecto sinérgico en péptidos como GluAsp (K_{ass} : 23 L mol⁻¹) (Vavrusova et al., 2014) y para caseinfosfopéptidos (CPP) de cadena corta con una K_{ass} de 38 L mol⁻¹ (Zong et al., 2012).

El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido que presenta valiosas propiedades bioactivas que lo hacen un ingrediente particularmente útil para aumentar la calidad de diversos productos alimenticios (Tolkach y Kulozik, 2005). Originalmente, el estudio del CMP se enfocó en su detección, en especial para reconocer la falsificación de leche por el agregado de suero de queso (Thöma-Worringer et al., 2006) o como seguimiento del proceso enzimático de la coagulación del queso (Coolbear et al., 1996). En la actualidad, la investigación se centra principalmente en sus propiedades bioactivas y en menor lugar en sus propiedades funcionales (Kreuz et al., 2009). El CMP está considerado como un péptido intrínsecamente desordenado, IDP por sus siglas en inglés. Mientras que las proteínas ordenadas "normales" son ricas en aminoácidos promotores del orden como Ile, Leu, Val, Trp, Tyr, Phe, Cys y Asn, los IDP son sustancialmente ricos en Ala, Arg, Gly, Gln, Ser, Glu, Lys y Pro (Uversky, 2011). Los IDP, caracterizados por una secuencia única de aminoácidos, tienen además baja hidrofobicidad y alta carga neta. Las investigaciones en los IDP son uno de los campos más dinámicos de la ciencia moderna de las proteínas (Uversky, 2011). El CMP no contiene aminoácidos aromáticos por lo que es útil para el tratamiento de la fenilcetonuria (La Clair et al., 2009; Lim et al., 2007; Marshall, 1991; Ney et al., 2008). Sin embargo, su elevado contenido de Thr puede causar hipertreoninemia en lactantes (Rigo et al., 2001).

Las propiedades biológicas del CMP han sido muy estudiadas (Brody, 2000; Dziuba y Minkiewicz, 1996; El-Salam et al., 1996; Kawasaki et al., 1993; Thomä-Worringer et al., 2006). Entre ellas se encuentran la inhibición de infecciones bacterianas y virales, neutralización de endotoxinas, inhibición de las toxinas del cólera, inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* (Isoda et al., 1992; Nakajima et al., 2005), *Salmonella typhimurium* (Otani y Monnai, 1993), *Salmonella enteritidis* (Nakajima et al., 2005) y *Shigella flexneri* (Brück et al., 2006), de la adhesión de las bacterias *Streptococcus mutans* (Janer et al., 2004b), *S. Vangis* y *S. Sobrinus* en la cavidad oral (causante de caries) y del virus de la influenza (Dosako et al., 1992). Se conoce que el CMP cumple un efecto en la modulación de las hormonas de saciedad, especialmente colecistocinina (CCK) (Burton-Freeman, 2008; Requena et al., 2009) además inhibe la secreción gástrica en terneros y ratas (Chung Chun Lam et al., 2009). En humanos, su efecto en la saciedad no está aún demostrado (Chung Chun Lam et al., 2009; Gustafson et al., 2001; Keogh y Clifton, 2008; Veldhorst et al., 2009). Sin embargo, Xu et al. (2011) mostraron que el CMP puede inhibir la proliferación,

diferenciación y acumulación de lípidos en preadipositos in vitro. El CMP ha sido objeto de estudio por su efecto en la modulación de la composición de la placa dental bacteriana, la reducción de la disolución de hidroxapatita (componente estructural de los dientes) (Nejad et al., 2009) y la promoción de la remineralización (Aimutis, 2004).

El CMP es promotor del crecimiento de prebióticos (Janer et al., 2004a) y Bifidobacteria (Idota et al., 1994) y tiene un efecto anti-inflamatorio indirecto en el intestino (Brück et al., 2006; Brück et al., 2003; Daddaoua et al., 2005; Requena et al., 2009; Requena et al., 2010); Brück et al., 2003; Daddaoua et al., 2005; Requena et al., 2009; Requena et al., 2010). Está considerado como antitrombótico (Chabance et al., 1995; Rutherford y Gill, 2000); como también algunos péptidos resultado de su digestión (Chabance et al., 1995).

Estudios en animales revelaron un efecto antihipertensivo del CMP hidrolizado (Miguel et al., 2007). Kelleher, Chatterton, Nielsen y Lønnerdal, (2003) hallaron que suplementando una fórmula para monos rhesus lactantes con CMP aumentó la absorción de Zinc, permitiendo una reducción de este mineral en la fórmula.

Algunos estudios han considerado que no sólo el péptido sino también los grupos glicosilados son responsables de las propiedades biológicas y funcionales del CMP (Li y Mine, 2004; Manso y Lopez-Fandiño, 2004). El ácido siálico es particularmente importante en la actividad biológica del CMP y en algunos casos su pérdida reduce la bioactividad (Daali et al., 2001).

El CMP es altamente hidrofílico por su elevada carga negativa a pH superior a 4,5 (Farías et al., 2010). La motivación para usar al CMP como péptido ligante de calcio está basada en cuatro consideraciones principales: su alto contenido de ácido siálico (Nakano y Ozimek, 1999), su cadena peptídica rica en Glu y Asp con una composición aminoacídica única (Thöma-Worringer et al., 2007), su alta carga negativa que le confiere solubilidad a pH superior a 4,5 y las importantes propiedades biológicas del CMP (Brody, 2000). Estudiar nuevas aplicaciones del CMP, que se obtiene del suero de quesería, es una manera de revalorizar al suero de queso que está considerado como GRAS (sustancias generalmente reconocidas como seguras, por sus siglas del inglés "generally recognized as safe") por el Departamento de Administración de Alimentos de Estados Unidos (USFDA). En este plan de tesis de doctorado se propone analizar las interacciones de este componente bioactivo con sales de calcio de muy bajo costo y amplio uso en la industria alimentaria. No existe en la literatura información sobre mezclas de CMP con sales de calcio, por lo cual teniendo en cuenta sus propiedades funcionales y las características bioactivas del CMP resulta de gran interés su estudio para el desarrollo de nuevos ingredientes funcionales. Este plan de tesis de doctorado se encuadra en el área de los alimentos funcionales y la nanotecnología. En primer lugar, el hecho de trabajar con un componente bioactivo, como el CMP, resulta de gran interés tanto para la industria alimentaria que se interesa por brindar a los consumidores cada vez más productos que contengan ingredientes funcionales como para la industria farmacéutica que proporcionaría suplementos dietarios aumentando no solo la biodisponibilidad sino también la palatabilidad.

A partir de estudios realizados previamente (Farias, 2012), el CMP incrementa su grado de asociación desde la forma monomérica hasta la hexámerica según la concentración de CaCl₂ en condiciones de pH neutro. Además, la forma hexamérica se satura para concentraciones de aproximadamente 1,2 mmoles de Ca²⁺/g de CMP. Considerando que el peso molecular promedio del CMP es 7,5 kDa podría estimarse por este método que cada molécula de CMP puede unir aproximadamente 9 moles de Ca²⁺. Estos resultados son alentadores, por ejemplo, un mol del péptido Ser(P)Ser(P)Ser(P)GluGlu puede unir 12 moles de calcio, según Zong et al. (2012).

c) HIPÓTESIS GENERAL

Análogamente a lo que ocurre con otros tipos de péptidos obtenidos de la hidrólisis de proteínas nativas, el Ca^{2+} también se uniría al CMP vía interacciones electrostáticas incrementando el calcio iónico en solución a pH neutro o ligeramente básico. El quelado del calcio estaría favorecido por varios motivos: la importante cantidad de aminoácidos Glu y Asp (Meisel y Olieman, 1998) una secuencia de aminoácidos que sería sinérgica (Vavrusova et al., 2014), la presencia de Ser (44) fosforilada (Brody, 2000) y el grado de glicosilación donde predomina el ácido siálico (pKa 2,1) que permitiría la interacción con el calcio iónico aún en condiciones muy ácidas. El CMP podría incrementar la biodisponibilidad de los fortificantes de calcio de uso frecuente (cloruro de calcio; lactato de calcio; citrato de calcio, acetato de calcio y carbonato de calcio) cuando estas sales se ingieran junto al CMP por vía oral.

En este marco, como Objetivo General de este plan de tesis de doctorado se propone:

- 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 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 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.

D) Hipótesis: Se ha estudiado que los péptidos derivados de la caseína pueden prevenir o retardar la formación de sales insolubles de calcio en el intestino, aumentando la absorción y la utilización del calcio (Zong et al., 2012). Los péptidos obtenidos de la digestión gástrica del CMP deberían aumentar el calcio iónico en el intestino que tiene pH neutro o ligeramente alcalino.

Objetivo 4: Evaluar la eficiencia de la absorción de calcio bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas in-vitro.

d) Naturaleza del aporte original.

Construcción de la Hipótesis y Justificación General de la Metodología de Trabajo

La hipótesis de la presente propuesta está basada en las siguientes justificaciones:

I. En los últimos años, ha habido un creciente interés en el diseño de sistemas de liberación sitio dirigida o liberación sitio específica (delivery systems) basados en estructuras alimenticias. De esta manera se encapsulan, protegen y liberan compuestos bioactivos beneficiosos para el cuerpo humano. Es más, estos sistemas pueden ser construidos para liberar controladamente componentes bioactivos en regiones específicas del tracto digestivo como respuestas a cambios de pH, fuerza iónica o actividad enzimática.

II. Según la fuente de autores y bibliografía específica Elsevier los trabajos publicados en los años 2015-2016, que tocan por lo menos algún tópico referente a “fortificación con calcio; suplementación con calcio”, rondan los 3500. La fortificación con calcio, si bien se estudia desde hace muchísimos años sigue siendo un tema de relevancia actual con respecto a su biodisponibilidad. El término “biodisponibilidad” es de suma importancia porque la presencia de algunos ingredientes en los alimentos puede reducir la absorción del calcio en el intestino como consecuencia de procesos involucrados en la digestión y absorción. La misma fuente enumera 6700 trabajos que incluyen los términos “péptidos y calcio” en los años 2015-2016, en el empleo de péptidos en los distintos aspectos de la fortificación de calcio, principalmente hidrolizando proteínas nativas. El CMP hoy es de venta comercial con un grado de pureza muy elevado, tiene interesantes propiedades bioactivas que lo hacen único. Como contrapartida no hemos encontrado trabajos que aborden la estrategia de aumentar la biodisponibilidad de sales con CMP.

III. Con el desarrollo de la nanotecnología, existe mucho para investigar en lo relativo al complejamiento de biopolímeros con minerales. Nuestra motivación para este proyecto de tesis de doctorado es generar estrategias que permitan incrementar la biodisponibilidad de sales de calcio utilizando al péptido bioactivo CMP. Estos a su vez serían usado como medicamentos (suplementos dietarios) o ingredientes adicionados a alimentos, con lo cual el beneficio sería doble: 1) asegurar por dieta la suplementación del calcio y, 2) incluir en la dieta un péptido bioactivo con múltiple beneficios para la salud.

IV. Se propone a la Dra. Ana Pilosof (profesora titular del Dto. de Industrias y Investigadora Superior del CONICET) como directora externa de esta tesis doctoral y como codirectora interna a la Dra. María Edith Farías. La Dra. Farías tiene experiencia en el área de los biopolímeros y coloides alimentarios con el grupo de la Dra. Pilosof estudiando propiedades fisicoquímicas, funcionales y de interacción proteína- proteína, incluyendo actividad interfacial y autoensamblaje. La Dra. Farías ha realizado su carrera de grado en la Universidad Nacional de Luján y es docente investigadora allí desde hace 16 años. También participó de los proyectos de investigación en Fisicoquímica de los Alimentos con la Dra. Susana Vidales y Mg. Nelsi Ramos, según consta en su respectivo CV.

V. La Ing. Karina Loria tiene una beca de estudio de doctorado otorgada por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), cuya directora es la Dra. Farías con el siguiente plan de trabajo: “USO DEL CASEINOMACROPÉPTIDO PARA FORTIFICAR ALIMENTOS CON CALCIO”. Su plan de beca está relacionado en un 100% con este plan de trabajo. El primer año de su beca corresponde al año 2015 y el segundo al año 2016. Para los siguientes dos años, y para poder finalizar el doctorado se pedirá la “Beca de Perfeccionamiento”.

VI. La Dra. Farías es la investigadora responsable del proyecto PICT-2014-1402: “Utilización del caseinomacropéptido como nueva estrategia de fortificación con calcio” de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Con vigencia: 2015-2018. Los

integrantes del proyecto son la Dra. Ana Pilosof, la Dra. María Julia Martínez (FCEN-UBA), el Ing. Mariano Marchini (Dto. de Tecnología-UNLu) y el Mg. Andrés Pighín (Dto. de Cs. Básicas-UNLu). El mismo proyecto fue validado por el Dto. de Tecnología de la UNLu (Disposición CDT N° 120/15). Además, recientemente se incorporó al proyecto con una Beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas CIN (2015) (Resolución P. del CIN N° 318/15. RESHCS-LUJ:0000861-15), a la alumna de la carrera de Ing. en alimentos la señorita Jimena Aragón con el siguiente tema “Interacción del caseinomacropéptido con sales de calcio”. La directora de dicha beca es la Dra. Farías y el codirector el Ing. Marchini.

El grupo de investigación, del cual provienen la directora externa Dra. Ana Pilosof y la codirectora interna Dra. María Edith Farías, posee una larga trayectoria en el estudio de las propiedades funcionales de proteínas alimentarias (gelificación, propiedades de absorción de agua, de espumado, emulsionantes, interfaciales) en diferentes estados: nativas, desnaturalizadas, hidrolizadas, como también en interacciones con polisacáridos.

La línea de investigación sobre CMP comenzó durante el año 2007 con las tesis doctorales de María Edith Farías y de María Julia Martínez. En estas tesis doctorales se ha caracterizado mediante la técnica de dispersión dinámica de luz la auto-asociación (self-assembly) del CMP que se halló dependiente del pH. Los resultados obtenidos permitieron describir por primera vez el fenómeno de auto-asociación del CMP a pH menor a 4,5, que lleva a una gelificación espontánea a temperatura ambiente con el tiempo. Se postuló un modelo para interpretar el comportamiento.

Los resultados se encuentran en las publicaciones que se detallan y que constan en el respectivo CV:

-“Casein glycomacropeptide pH dependent self-assembly and cold gelation”. 2010. Farías, María Edith; Martínez, María Julia y Pilosof, Ana M. R. International Dairy Journal, 20, 79-88. ISSN: 0958-6946.

-“Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating”. 2011. Martínez, María Julia, Farías, María Edith y Pilosof, Ana M. R. Food Hydrocolloids, 25, 860-867. ISSN: 0268-005X.

-“The dynamics of gelation of casein glycomacropeptide – β -lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase”. 2010. Martínez, María Julia; Farías, María Edith y Pilosof, Ana M. R. International Dairy Journal, 20, 580-588. ISSN: 0958-6946.

Este trabajo ganó el tercer premio, en el congreso 6to NIZO Dairy Ingredients: Innovations in functionality, Papendal, The Netherlands (Holanda). 30 de Septiembre al 2 de Octubre de 2009.

Link:

http://www.elsevier.com/authoried_subject_sections/L01/L01_404/misc/foodscinews1009.htm

-“The influence of acid type on self-assembly, rheological and textural properties of caseinmacropeptide”. En revisión “minor revisión for acceptance” 2015. Farías, María Edith y Ana M. R. International Dairy Journal, Ref. No.: INDA-D-15-00382

-“Agregación y propiedades de espumado del caseinomacropéptido”. Farías, M.E. y Pilosof, A.M.R. 2007 Publicado en: Libro (CD) del Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XI CYTAL). Tomo análisis físico y químico de alimentos y polímeros alimentarios. ISBN 978-987-22165-2-8

-“Influencia de la temperatura en la gelificación del caseinoglicomacropéptido”. Farías, M.E. y Pilosof, A.M.R.. Publicado en: Libro (CD) Congreso Latinoamericano de Ciencias y Tecnologías Aplicadas (CLICAP 2009). ISBN N°: 978-987-575-079-1

-“Diseño de un alimento funcional y apto para fenilcetonúricos con caseinoglicomacropéptido”. Farías, M.E. y Pilosof, A.M.R. 2009. Publicado en: Libro (CD) Tomo III. Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Avances en Ingeniería y Tecnología III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Páginas: 83-89 ISBN N°: 978-987-24620-9-3.

-“Influencia del pH y la concentración en la gelificación del caseinoglicomacropéptido”. Farías, M.E. y Pilosof, A.M.R.. Publicado en: Libro (CD) Tomo IV. Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Avances en Análisis Físicos, Químicos y Sensoriales. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Páginas: 133- 139. ISBN N°: 978-987-24620-9-3.

- “Efecto del tipo de ácido en la cinética de la agregación por pH del caseinoglicomacropéptido”. 2009. Farías, María Edith; Martínez, María Julia y Pilosof, Ana M.R. Publicado en: Libro (CD) del XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XII CYTAL®). ISBN: 978-987-22165-3-5.

-“Estudio de la reversibilidad por pH de agregados y geles de caseinoglicomacropéptido”. 2009. Farías, María Edith; Martínez, María Julia y Pilosof, Ana M.R. Publicado en: Libro (CD) del XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XII CYTAL®). ISBN: 978-987-22165-3-5.

-“Gelificación por calentamiento del caseinomacropéptido en presencia de HCl”. 2013. Farías, María Edith y Pilosof, Ana M.R. Publicado en: Libro (CD) del XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XIV CYTAL®). ISBN: 978-987-22165-5-9.

-“Gelificación por calentamiento del caseinomacropéptido en presencia ácidos orgánicos”. 2013. Farías, María Edith y Pilosof, Ana M.R. Publicado en: Libro (CD) del XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XIV CYTAL®). ISBN: 978-987-22165-5-9.

-“Gelificación del caseinomacropéptido en presencia de cloruro de calcio”. 2014. Farías M. E. y Pilosof A. M. R. Publicado en: Libro de trabajos completos del Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2014). En prensa.

Con la tesis doctoral de Dra. Farías se han realizado estudios exploratorios con respecto a las propiedades de autoensamblaje, gelificación y espumado del CMP en presencia de NaCl y CaCl₂ de los cuales se han publicado hasta el momento los siguientes trabajos:

-“Efecto de la fuerza iónica en el autoensamblaje del caseinomacropéptido: i) interacción con NaCl”. 2011. Farías, María Edith y Pilosof, Ana M.R. Publicado en: Libro (CD) del XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XIII CYTAL®). ISBN: 978-987-22165-4-2.

-“Efecto de la fuerza iónica en el autoensamblaje del caseinomacropéptido: ii) interacción con CaCl₂”. 2011. Farías, María Edith y Pilosof, Ana M.R. Publicado en: Libro (CD) del XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XIII CYTAL®). ISBN: 978-987-22165-4-2.

-“Influencia de las sales en las nanoestructuras de CMP”. 2014. Farías, María Edith y Pilosof, Ana M.R. Publicado en: Revista Tecnología y Ciencia, Año 12, N° 24, 193-200. ISSN N°: 1666-691720

-“Potencialidad del caseinomacropéptido como ligante de calcio”. 2014. Farías M. E., Pighin A y Pilosof A. M. R. Publicado en: Libro de trabajos completos del Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2014). En prensa

e) Plan de trabajo, incluyendo materiales y métodos y cronograma de actividades previstas.

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 contraión, 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.

4) Evaluar la eficiencia de la absorción de calcio bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas in-vitro.

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 CaCl₂ 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 µm. 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: τ_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.

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

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.

La misma metodología se realizará para CMP digerido según la técnica 8 y CMP deglicosilado según la técnica 7 de manera tal de evaluar los efectos de la digestión y de la deglicosilación en la solubilidad de las sales 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- Deglicosilación del CMP

Se seguirá la técnica empleada por Mikkelsen et al (2005). A una solución de CMP de 1 mg/ml se añadirá la enzima neuraminidasa (de *C. perfringens*) el pH se ajustará a 5,0. Simultáneamente se preparará un control sin enzima. Luego las soluciones se incubarán 37 °C durante 18 horas, la reacción terminará elevando el pH a 7,4 con NaOH de alta concentración y será almacenada a -20 °C hasta su análisis y posterior ultrafiltración. Luego se trabajará con las técnicas 1, 2, 3, 5 y 6.

Bloque 4) Evaluar la eficiencia de la absorción de calcio bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas in-vitro.

Este objetivo será evaluado por la siguiente técnica:

8- Digestión gastroduodenal in vitro simulando las condiciones fisiológicas humanas.

La digestión se llevará a cabo en dos etapas que simulan la digestión en el estómago y en el duodeno a fin de analizar el efecto de los diferentes pH gástrico y duodenal a 37 °C y bajo agitación, diferentes concentraciones de proteasas (pepsina, tripsina, quimotripsina) y presencia de surfactantes como fosfatidilcolina y sales biliares (Martos et al., 2010). Se emplearán enzimas digestivas purificadas (Sigma-Aldrich). Un volumen adecuado de muestra se incubará a 37 °C a pH 2 durante un período adecuado de tiempo en presencia de pepsina. A continuación, se ajustará a 7, se añadirán las enzimas y las sales biliares disueltas en buffer a la concentración requerida a la muestra y se incubarán con agitación. Para simular las condiciones in-vivo, como la peristalsis, la mezcla será incubada durante dos horas a temperatura fisiológica y agitada. El pH será mantenido constante con el sistema de control pH-STAT.

9- Caracterización de los productos de la digestión.

Se caracterizarán los productos obtenidos luego de la digestión gastroduodenal in vitro por medio de HPLC y MS/MS de acuerdo a la metodología descrita por Gómez-Ruiz et al. (2007) para identificar mediante esta técnica, acompañada de las bases de datos, cada uno de los péptidos originados durante la digestión. Luego de la digestión, los productos obtenidos serán separados por ultrafiltración tangencial con una membrana de ultrafiltración Amicon de celulosa regenerada (Millipore, USA), para ser utilizados en los ensayos de solubilidad (según la técnica 5) y quelado (según la técnica 6).

También se utilizará un sistema de cromatografía a alta presión (FPLC) Aktapurifier 10 (Suecia) para separar y caracterizar a los productos de la digestión gástrica y duodenal.

10- Efecto de la digestión gastroduodenal del CMP en la solubilidad y la capacidad de quelación de las sales de calcio.

Las técnicas 5 y 6 se realizarán para CMP digerido.

11- 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.

Cronograma de actividades previstas

| Actividad | Meses del PRIMER año | | | | | | | | | | | |
|---|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Búsqueda bibliográfica | | | | X | X | X | X | | | | | X |
| X | X | X | | | | | | | | | | |
| Bloque 1 | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | |
| Bloque 2 | | | | | | | | X | X | X | | |
| Plan de formación (cursos de posgrado) | | | | | | | X | X | X | X | X | X |
| X | X | X | X | X | X | | | | | | | |
| Redacción de informes y trabajos de investigación | | | | | | | | | | | X | X |
| X | X | X | | | | X | | | | | | |
| Actividad | Meses del SEGUNDO año | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Búsqueda bibliográfica | | | | X | X | X | | | | | | |
| X | X | X | | | | | | | | | | |
| Bloque 1 | | | | X | X | X | X | X | | | | |
| Bloque 2 | X | X | X | X | X | X | | | | | | |
| Bloque 3 | | | | | | | X | X | X | X | X | X |
| X | | | | | | | | | | | | |
| Redacción de informes y trabajos de investigación | | | | | | | | | X | X | X | |
| | | | X | X | X | X | | | | | | |
| Plan de formación (cursos de posgrado) | | | | | | | X | X | | | | |
| X | X | X | X | | | | | | | | | |
| Actividad | Meses del TERCER año | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Búsqueda bibliográfica | | | | X | X | X | | | | | | |
| X | X | X | | | | | | | | | | |
| Bloque 2 | | | X | X | X | X | X | | | | | |
| Bloque 3 | | | | | | X | X | X | X | X | | |
| Bloque 4 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | |
| Redacción de informes y trabajos de investigación | | | | | | | | | | | | |
| | | | X | X | X | X | | | | | | |
| Actividad | Meses del CUARTO año | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |

| | | | | | | | | |
|---------------------------------|---|---|---|--|---|---|---|---|
| Búsqueda bibliográfica | X | X | X | | | | | X |
| X X X | | | | | | | | |
| Redacción de TESIS DE DOCTORADO | | | | | X | X | X | X |
| X X X X X | | | | | | | | |

f. Disponibilidad de infraestructura

Para el desarrollo de esta investigación se utilizarán los recursos y equipamiento que cuenta la Universidad Nacional de Luján. En la Universidad Nacional de Luján disponemos de un laboratorio recién inaugurado denominado “Laboratorio Avanzado de Alimentos” localizado en la Sede Central de la Universidad. Todos los laboratorios localizados en la Sede Central de la Universidad Nacional de Luján cuentan con todas las instalaciones básicas y se comparte sectores de equipamiento común con balanzas, dispensadores de agua destilada, dispensador de agua ultrapura Milli Q, etc. Para ello dispone de personal técnico-administrativo formado para dar respuesta a las necesidades de apoyo generadas en los ámbitos mencionados. Entre el equipamiento más especializado se puede mencionar: reómetro dinámico Paar Physica MCR 301, texturómetro TA.XT Express, colorímetro colorímetro portátil MiniScan® EZ, liofilizador Labconco, modelo Freezer dry system, ultracentrifuga preparativa Beckman Coulter; espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin Elmer modelo A Analyst 200; espectrofotómetro Infrarrojo por Transformadas de Fourier modelo FTIR-IR Prestige-21, Shimadzu; cromatógrafo gaseoso con detectores clásicos GC-2010 PLUS Shimadzu, modelo QP-2010 ULTRA; espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu; detector de masas sistema ACQUITY UPLC "H-Class"; equipo digestor para preparación de muestras por microondas, Modelo MW3000 "PLUS" ANTON PAAR; FPLC optimizado sistema líquido para purificación de proteínas Aktapurifier 10; equipo de electroforesis, sistema de ultrafiltración tangencial; baños termostáticos con capacidad de calentamiento y enfriamiento (-20°C a 110 °C).

La Universidad Nacional de Luján posee una planta piloto, con servicios básicos y una biblioteca con suscripciones y libros pertinentes a las áreas de investigación en ingeniería en alimentos, y además con servicio de internet WIFI en aulas, oficinas y laboratorios. Las búsquedas bibliográficas se realizan a través de la biblioteca electrónica del Ministerio de Ciencia y Tecnología de la República Argentina. Se cuenta además con aulas destinadas a clases, aulas de computación y oficinas personales para investigadores.

Los ensayos de DLS se realizarán con el equipo Zetasizer Nano-Zs perteneciente al laboratorio de la Dra. Pilosof “Laboratorio de Biopolímeros, Nano partículas y Coloides Alimentarios” ubicado en el Dto. de Industrias, facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires.

g. Recursos financieros

“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

“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

“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 CDT N° 030/14.

h. Bibliografía

- Aimutis, W.R. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *JN The Journal of Nutrition*, 989S-995S.
- Brody, E.P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, 84(SupplementS1), 39-46.
- Brück, W.M., Kelleher S.L., Gibson G.R., Graverholt G. y Lönnerdal B.L. (2006). The effects of α -lactalbumin and glycomacropeptide on the association of CaCo-2 cells by enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *FEMS Microbiol Lett*, 259, 158-162.
- Brück, W.M., Kelleher S.L., Gibson G.R., Nielsen K.E., Chatterton D.E.W. y Lönnerdal B. (2003). rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 37, 273-280.
- Burton-Freeman, B.M. (2008). Glycomacropeptide (GMP) is not critical to whey-induced satiety, but may have a unique role in energy intake regulation through cholecystokinin (CCK). *Physiology & Behavior*, 93(1-2), 379-387.
- Coolbear, K.P., Elgar D.F. y Ayers J.S. (1996). Profiling of genetic variants of bovine κ -casein macropeptide by electrophoretic and chromatographic techniques. *International Dairy Journal*, 6(11-12), 1055-1068.
- Chabance, B., Jolles P., Izquierdo C., Mazoyer E., Francoual C. y Drouet L. (1995). Characterization of an antithrombotic peptide from κ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *British Journal of Nutrition*, 73, 583-590.
- Charoenphun, N., Cheirsilp B., Sirinupong N. y Youravong W. (2013). Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. *Eur Food Res Technol*, 236, 57-63.
- Chung Chun Lam, S.M.S., Moughan P.J., Awati A. y Morton H.R. (2009). The influence of whey protein and glycomacropeptide on satiety in adult humans. *Physiology & Behavior*, 96(1), 162-168.
- Daali, Y., Cherkaoui S. y Veuthey J.-L. (2001). Capillary electrophoresis and high-performance anion exchange chromatography for monitoring caseinoglycomacropeptide sialylation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(5-6), 849-856.
- Daddaoua, A., Puerta V., Zarzuelo A., Suárez M.D., Medina F.S.d. y Martínez-Augustin O. (2005). Bovine Glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *Journal of Nutrition*, 135, 1164-1170.
- Dosako, S., Kusano H., Deya E. y Idota T. (1992). Infection protectant. In). United States Patent 5147853.
- Douthat, W., Cardozo G., Dauverne L., Nores L., Orozco S., Garay G. et al. (2009). Rol de la dieta sobre los trastornos del metabolismo óseo y mineral en pacientes con IRC en diálisis. *Experiencia médica*, 2, 76-82.
- Dziuba, J. y Minkiewicz P. (1996). Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's κ -casein. *International Dairy Journal*, 6(11-12), 1017-1044.
- Eckert, E., Bamdad F. y Chen L. (2014). Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. *Food Chemistry*, 159(0), 498-506.
- El-Salam, M.H.A., El-Shibiny S. y Buchheim W. (1996). Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 6(4), 327-341.
- FAO. (2001). Human Vitamin and Mineral Requirements, Report 07a. Joint FAO/OMS Expert Consultation. Bangkok, Thailand.
- Farias, M.E. (2012). Autoensamblaje del caseinomacropéptido (CMP) y su impacto en la gelificación y espumado. Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Farías, M.E., Martínez M.J. y Pilosof A.M.R. (2010). Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, 79-88.

- Fernández, A., Sosa P, Setton D, Desantadina V, Fabeiro M, Martinez M et al. (2011). Calcio y nutrición [Internet]. In Sociedad Argentina de Pediatría. Disponible en:<http://www.sap.org.ar/docs/calcio.pdf>. Buenos Aires.
- Ferraretto, A., Signorile A., Gravaghi C., Fiorilli A. y Tettamanti G. (2001). Casein Phosphopeptides Influence Calcium Uptake by Cultured Human Intestinal HT-29 Tumor Cells. *The Journal of Nutrition*, 131 (6), 1655-1661.
- Gueguen, L. y Pointillart A. (2000). The bioavailability of dietary calcium. *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 119S-136S.
- Gustafson, D.R., McMahon D.J., Morrey J. y Nan R. (2001). Appetite is not influenced by a unique milk peptide: caseinomacropeptide (CMP). *Appetite*, 36(2), 157-163.
- Idota, T., Kawakami H. y Nakajima I. (1994). Growth-promoting effects of N-acetylneuraminic acid-containing substances on Bifidobacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 1720-1722.
- Isoda, H., Kawasaki Y., Tanimoto M., Dosako S. y Idota T. (1992). Use of compounds containing or binding sialic acid to neutralize bacterial toxins. In). European Patent 385112.
- Janer, C., Peláez C. y Requena T. (2004a). Caseinomacropeptide and whey protein concentrate enhance Bifidobacterium lactis growth in milk. *Food Chemistry*, 86 263-267.
- Janer, C., Peláez C. y Requena T. (2004b). Caseinomacropeptide and whey protein concentrate enhance Bifidobacterium lactis growth in milk. *Food Chemistry*, 86(2), 263-267.
- Jaques, L.W., Brown E.B., Barrett J.M., Brey W.S. y Weltner W. (1977). Sialic Acid: A calcium-binding carbohydrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 252, N° 13, 4533-4538.
- Kawasaki, Y., Kawakami H., Tanimoto M., Dosako S., Tomizawa A., Kotake M. et al. (1993). pH-Dependent molecular weight changes of k-casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. *Milchwissenschaft*, 48, 191-196.
- Kelleher, S.L., Chatterton D., Nielsen K. y Lönnerdal B. (2003). Glycomacropeptide and a-lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *Am J Clin Nutr*, 77, 1261-1268.
- Keogh, J.B. y Clifton P. (2008). The effect of meal replacements high in glycomacropeptide on weight loss and markers of cardiovascular disease risk. *Am J Clin Nutr*, 87, 1602-1605.
- Kreuz, M., Krause I. y Kulozik U. (2009). Influence of glycosylation on foaming properties of bovine caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 19(12), 715-720.
- La Clair, C., Ney D., Leod E.M. y Etzel M. (2009). Purification and use of glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria. *Journal of Food Science*, 74(4), 199-206.
- Li, E.W.Y. y Mine Y. (2004). Immunoenhancing effects of bovine glycomacropeptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophage cells, U937. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 2704-2708.
- Lim, K., van Calcar S.C., Nelson K.L., Gleason S.T. y Ney D.M. (2007). Acceptable low-phenylalanine foods and beverages can be made with glycomacropeptide from cheese whey for individuals with PKU. *Molecular Genetics and Metabolism*, 92(1-2), 176-178.
- Manso, M.A. y Lopez-Fandiño R. (2004). k-Casein macropeptide from cheese whey: physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International*, 20, 339-355.
- Marshall, S. (1991). Casein macropeptide from whey -a new product opportunity. *Food Research Quarterly*, 51, 86-91.
- Martinez, M.J., Farías M.E. y Pilosof A.M.R. (2010). The dynamics of heat gelation of casein glycomacropeptide - b-lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase. *International Dairy Journal*, 20(9), 580-588.
- Martos, G., Contreras P., Molina E. y López-Fandiño R. (2010). Egg White Ovalbumin Digestion Mimicking Physiological Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5640-5648.
- Meisel, H. y Olieman C. (1998). Estimation of calcium-binding constants of casein phosphopeptides by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 372(1-2), 291-297.

- Miguel, M., Manso M.A., López-Fandiño R., Alonso M.J. y Salaices M. (2007). Vascular effects and antihypertensive properties of κ -casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 17(12), 1473-1477.
- Mikkelsen, T.L., Frøkiær H., Topp C., Bonomi F., Iametti S., Picariello G. et al. (2005). Caseinomacropeptide Self-Association is Dependent on Whether the Peptide is Free or Restricted in κ -Casein. *Journal of Dairy Science*, 88(12), 4228-4238.
- Nakajima, K., Tamura N., Kobayashi-Hattori K., Yoshida T., Hara-Kudo Y., Ikedo M. et al. (2005). Prevention of intestinal infection by Glycomacropeptide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 2294-2301.
- Nakano, T. y Ozimek L. (1999). Determination of sialic acid by the thiobarbituric acid reaction in sweet whey and lites fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2613-2616.
- Nejad, A.S., Kanekanian A. y Tatham A. (2009). The inhibitory effect of glycomacropeptide on dental erosion. *Dairy Sci. Technol.*, 89(3-4), 233-239.
- Ney, D.M., Hull A.K., van Calcar S.C., Liu X. y Etzel M.R. (2008). Dietary Glycomacropeptide supports growth and reduces the concentrations of phenylalanine in plasma and brain in a murine model of phenylketonuria. *J. Nutr.*, 138(2), 316-322.
- Otani, H. y Monnai M. (1993). Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes by bovine Kappa-casein digests. *Food and Agricultural Immunology*, 5, 219-229.
- Phelan, M., Aherne A., FitzGerald R.J. y O'Brien N.M. (2009). Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19, 643-654.
- Pitkowski, A., Nicolai T. y Durand D. (2009). Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. *Food Hydrocolloids*, 23, 1164-1168.
- Requena, P., Daddaoua A., Guadix E., Zarzuelo A., Suárez M.D., Medina F.S.d. et al. (2009). Bovine glycomacropeptide induces cytokine production in human monocytes through the stimulation of the MAPK and the NF- κ B signal transduction pathways. *British Journal of Pharmacology*, 157, 1232-1240.
- Requena, P., González R., López-Posadas R., Abadía-Molina A., Suárez M.D., Zarzuelo A. et al. (2010). The intestinal antiinflammatory agent glycomacropeptide has immunomodulatory actions on rat splenocytes. *Biochemical Pharmacology*, 79, 1797-1804.
- Rigo, J., Boehm G., Georgi G., Jelinek J., Nyambugabo K., Sawatzki G. et al. (2001). An infant formula free of Glycomacropeptide prevents hyperthreoninemia in formula-fed preterm infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 32, 127-130.
- Rutherford, K.J. y Gill H.S. (2000). Peptides affecting coagulation. *British Journal of Nutrition*, 84 Suppl. 1, S99-S102.
- Soto, A.M., Morales P., Haza A.I., García M.L. y Selgas M.D. (2014). Bioavailability of calcium from enriched meat products using Caco-2 cells. *Food Research International*, 55(0), 263-270.
- Straub, D.A. (2007). Calcium supplementation in clinical practice: a review of forms, doses, and indications. *Nutrition in Clinical Practice*, 22, 286-296.
- Thöma-Worringer, C., Siegert N. y Kulozik U. (2007). Foaming properties of caseinomacropeptide -II. Impact of pH and ionic strength. 62(3), 253-255.
- Thomä-Worringer, C., Sørensen J. y López-Fandiño R. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 16(11), 1324-1333.
- Thöma-Worringer, C., Sørensen J. y López-Fandiño R. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 16, 1324-1333.
- Tolkach, A. y Kulozik U. (2005). Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 13-20.
- Uversky, V.N. (2011). Intrinsically disordered proteins from A to Z. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(8), 1090-1103.

- Vavrusova, M. y Skibsted L.H. (2014). Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. LWT - Food Science and Technology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.034>.
- Veldhorst, M.A.B., Nieuwenhuizen A.G., Hochstenbach-Waelen A., Westerterp K.R., Engelen M.P.K.J., Brummer R.-J.M. et al. (2009). A breakfast with alpha-lactalbumin, gelatin, or gelatin+TRP lowers energy intake at lunch compared with a breakfast with casein, soy, whey, or whey-GMP. Clinical Nutrition, 28(2), 147-155.
- Wasserman, R.H. (2004). Vitamin D and the Dual Processes of Intestinal Calcium Absorption. The journal of Nutrition, 134, 3137-3139.
- Xu, S.P., Mao X.Y., Ren F.Z. y Che H.L. (2011). Attenuating effect of casein glycomacropeptide on proliferation, differentiation, and lipid accumulation of in vitro Sprague-Dawley rat preadipocytes. Journal of Dairy Science, 94(2), 676-683.
- Zong, H., Peng L., Zhang S., Lin Y. y Feng F. (2012). Effects of molecular structure on the calcium-binding properties of phosphopeptides. European Food Research and Technology, 235(5), 811-816.

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:
- Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
 - Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
 - 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