

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2014

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: Aphalo

NOMBRES: Paula

Dirección Particular: Calle:

Localidad: La Plata CP: B1900ASS Tel:

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

2. TEMA DE INVESTIGACION

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

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: 01/10/2009

ACTUAL: Categoría: Asistente desde fecha: 01/10/2009

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

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

Facultad: Ciencias Exactas

Departamento:

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 47 esquina 116 N°:

Localidad: La Plata CP: B1900AJJ Tel: 425-4853

Cargo que ocupa: Investigador Asistente

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

Apellido y Nombres: Añón María Cristina

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: La Plata CP: B19 AWZ Tel:

Dirección electrónica: mcacidca@gmail.com

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

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

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

.....
Firma del Investigador

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

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

Los resultados que se presentarán a continuación, corresponden a las actividades y objetivos planteados en el informe anterior.

Hidrolizados y digeridos de amaranto en buffer fosfato pH 7,5. En una primera etapa de ensayos, se continuó con el estudio de la posible capacidad inhibitoria sobre la enzima ECA (extracto crudo de enzima convertidora de angiotensina obtenida a partir de pulmones de conejo). Las muestras fueron: - hidrolizados obtenidos por acción de la alcalasa preparados en buffer fosfato a pH 7,5.e - hidrolizados obtenidos por acción de la alcalasa sometidos posteriormente a una digestión gastrointestinal simulada in vitro. El protocolo de preparación de los mismos, al igual que los resultados obtenidos de la caracterización estructural (cromatografía y electroforesis) y grados de hidrólisis alcanzados, de dichos hidrolizados e hidrolizados digeridos in vitro fueron detallados en el informe anterior. En cuanto a la capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina, ECA, de estas muestras se ha podido arribar a los siguientes resultados:

- Se registró un incremento progresivo de la capacidad inhibitoria sobre ECA, en los aislados de amaranto tratados con alcalasa a diferentes tiempos. El porcentaje obtenido de inhibición se incrementa, con el tiempo de hidrólisis, lo que permitiría sugerir que habría una liberación progresiva de péptidos con posible capacidad inhibitoria de ECA. Este incremento de la capacidad inhibitoria, también fue observado al someter a un aislado de amaranto proveniente de una harina entera a un proceso de digestión gastrointestinal simulada.
- Los hidrolizados sometidos a una digestión gastrointestinal simulada, posterior al tratamiento con alcalasa, muestran una significativa disminución de la capacidad inhibitoria de ECA, independientemente del tiempo de hidrólisis en cuestión. Este resultado estaría indicando que las enzimas involucradas en la digestión gastrointestinal habrían escindido los péptidos bioactivos a aminoácidos, lo que conlleva a la disminución de capacidad inhibitoria.

Además de los ensayos sobre la ECA se probó la capacidad de inhibición del un aislado de amaranto y de un hidrolizado extensivo con alcalasa. Si bien los resultados con el hidrolizado son preliminares y hacen falta más réplicas, se habría comprobado que el mismo sería capaz de inhibir a la renina en un 5 %.

Los resultados obtenidos de esta sección, permitirán concluir con el armado y escritura del trabajo final del alumno Víctor Témpera.

Preparación de un hidrolizado extensivo de amaranto a pH 1. Medida de capacidad inhibitoria de dicho hidrolizado sobre diferentes enzimas del sistema RAS.

En una segunda etapa de ensayos, se preparó a partir de un aislado un hidrolizado extensivo de amaranto con alcalasa (,16 ml/ 1

mg de proteína). La reacción se llevó a cabo durante 6 h a 37 °C, en agua a pH 1, alcanzandose un grado de hidrólisis de 36% (determinado mediante el ensayo de OPA). El hidrolizado se caracterizó mediante SDS-PAGE-tricina y cromatografía de exclusión

molecular (Superdex peptide GE Healthcare). El análisis de los geles mostró la desaparición de los polipéptidos de mayor tamaño molecular incrementándose la cantidad de péptidos de baja masa molecular (menores a 14 kDa). El análisis del perfil cromatográfico de exclusión molecular fue acorde con el perfil electroforético obtenido y mostró que la mayoría de los péptidos presentes en el hidrolizado tienen una masa molecular entre 6

y 1

Da.

La actividad antihipertensiva del hidrolizado se ensayó haciendo uso de kits comerciales específicos para la determinación de la inhibición de la actividad de las enzimas renina y quimasa. Se midió además su capacidad inhibitoria sobre ECA obtenida a partir de pulmones de conejo dando un IC50

de

,1 mg/ml.

El hidrolizado de amaranto mostró una capacidad inhibitoria de renina superior a la del aislado. Los resultados obtenidos para el hidrolizado de amaranto mostraron un comportamiento dosis respuesta, alcanzando un 5 % de inhibición a una concentración de proteína aproximada de 2 mg/ml. Esta misma muestra además fue capaz de inhibir la enzima quimasa en una 4 % a 4,125 mg/ml. El hidrolizado estudiado resultó una fuente promisorias de péptidos con actividad antihipertensiva con acción sobre diferentes enzimas del sistema renina-angiotensina. Si bien es necesaria la realización de más estudios, los péptidos presentes en este hidrolizado podrían atravesar el tracto intestinal sin ser degradados por las enzimas digestivas permitiendo alcanzar el órgano blanco. Esta hipótesis se basa en el tamaño de los péptidos presentes y sus características de hidrofobicidad.

Los resultados obtenidos en esta sección, fueron presentados en el V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC 2014). Trabajo: “Propiedades antihipertensivas de péptidos provenientes de proteínas de amaranto”.

Cabe mencionar que se están realizando ensayos para determinar los parámetros cinéticos de renina, con los péptidos sintéticos VIKP y ALEP a efectos de aclarar el mecanismo de acción de los mismos.

En el próximo período se pretende:

- continuar con el estudio in vitro de la capacidad inhibitoria de los péptidos sintéticos (VIKP y ALEP) sobre las siguientes enzimas: renina y ruta de las quimasas.
- analizar la resistencia de los péptidos sintéticos y del hidrolizado extensivo a la digestión gastrointestinal simulada, al igual que el efecto de las altas presiones sobre el hidrolizado extensivo de amaranto.

Resultados obtenidos en el período anterior han sido incluidos en el trabajo “Amaranth sprouts: a potential health promoting and nutritive natural food”, el cual se encuentra en prensa en el International Journal of Food Properties (2015) doi: 10.1080/10407179.2015.1042912.2

4585) (ítem 7.2 del presente informe.)

Paralelamente se trabajó en colaboración con la Dra. María Victoria Avanza de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) en la caracterización estructural de las proteínas mayoritarias de una variedad de poroto cowpea (*Vigna unguiculata*) de interés regional. Los resultados obtenidos fueron enviados para su publicación al *The Protein Journal* (ítem 7.3 del presente informe). Previamente había sido remitidos al *Journal of Food Science and Agriculture* pero se consideraron fuera del scope de la revista.

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

7.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

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

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

Aphalo Paula, Martínez E. Nora y Añón M. Cristina

Amaranth sprouts are an edible food with good nutritional qualities. In this work the chemical composition of the sprouts was determined and the antioxidant and ACE inhibitory activity of their proteins were investigated. A. hypochondriacus sprouts presented a protein content (16% w/w) similar to that of the seeds and showed a high (17% w/w) content of fibre (both values on a dry basis). It was demonstrated that the sprout proteins presented a capacity to inhibit ACE activity similar to other plant proteins (IC50 =

0.9 ± 0.6 mg/mL). This capacity (IC50 = 0.26 ± 0.12 mg/mL).

7 mg/mL) increased after in vitro gastrointestinal digestion indicating the release of bioactive peptides during the hydrolytic process. Results also showed that, besides other non protein molecules, the amaranth sprout proteins presented ABTS+ scavenging activity (TEAC= .32±

5 micromol/mg) that increased after in vitro gastrointestinal digestion TEAC= .72±

8 micromol/mg).

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

Se adjunta copia de aceptación de trabajo para su publicación.

La participación en este trabajo, incluyó la realización de experiencias, discusión de resultados y armado del manuscrito.

7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.

Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.

1. Physicochemical and structural properties of major protein fractions of two varieties of cowpea (*Vigna unguiculata* L.): A comparative study. The polypeptide composition, structural and physicochemical properties of the major protein fractions from two cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp) varieties (CU: Cuarentón; CO: Colorado) were determined. In both cowpea varieties, the globulin was the major protein fraction, followed by albumins, glutelins and prolamins with 48 ± 2 g/100 g, 33 ± 2 g/100 g, 8 ± 1 g/100 g and 2 ± 0.5 g/100 g of the total seed protein content, respectively. Under non-reducing conditions, the CU and CO globulin fractions, showed four major polypeptides with molecular masses of 80 ± 3 , 65 ± 3 , 56 ± 2 and 52 ± 2 kDa and some minor polypeptides with molecular masses distributed over a range of 45-25 kDa. The minor values of enthalpy (ΔH) obtained for the major protein fractions of CU when compared to CO suggest that the former are partially denatured. The conformational studies performed on the globulin fraction of both varieties showed a higher content of aromatic amino acids than that of the albumin fraction and displayed a more hydrophobic behaviour. Results provide useful data that will be supplemented with further studies on functional properties of these proteins fractions, followed by the development of legume protein products.

Enviado a la revista The Protein Journal (se adjunta copia de recepción de trabajo)

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.

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

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

8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o*

internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.

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

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

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

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

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

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

10.2 DIVULGACIÓN

11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*

Co dirección de la Srta. Eliana Isabel Fernández Sosa (CUIL 27-36112977-1) en el marco de las becas de pregrado CIN 2 13-2

14.

Dirección: Dra. María Guadalupe Chaves
 Tema: "Aislamiento y caracterización de las fracciones proteicas de Dolichos lab-lab y Cajanus cajans cultivados en el NEA"
 Lugar de trabajo: Laboratorio de Tecnología Química Dr. Jorge R. Avanza. Universidad Nacional del Nordeste (UNNE)

Se adjunta copia de la resolución

12. DIRECCION DE TESIS. *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

- 13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

Evento: V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC 2

14).

Carácter de participación: expositor

Trabajo: "Propiedades antihipertensivas de péptidos provenientes de proteínas de amaranto"

Autores: Quiroga, A.V; Aphalo, Paula; Añón, Maria Cristina.

Lugar: Córdoba. Fecha: Noviembre de 2

14.

- 14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

- 15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

- 16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.** *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

- 17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**

- 18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.** *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

- 19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.** *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Cargo: Jefe de Trabajos Prácticos

Dedicación: simple. Interino (por concurso)

Cátedra: Biología. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

Periodicidad:

1/1

/2

11-hasta

la

fecha.

Cargo: Ayudante Diplomado

Dedicación: simple. Ordinario

Cátedra: Biología. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

Periodicidad:

1/

5/2

14 (con pedido de licencia por cargo de mayor jerarquía)

El tiempo destinado a las tareas docentes es de 9hs semanales

20. 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.*

Co dirección del alumno Víctor Témpera perteneciente a la carrera de Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UNLP).

21. TÍTULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

PLAN DE TRABAJO PROPUESTO

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

Introducción

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

En relación a esto, los alimentos funcionales han surgido como una ayuda o alternativa a las terapias químicas destinadas al manejo de enfermedades crónicas de amplia distribución, como hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia y obesidad. (Kris-Etherton y col., 2

2).

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

Objetivo general

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

Objetivos específicos

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

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

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

Antecedentes

En la actualidad ha habido un resurgimiento de los llamados cultivos andinos (amaranto, chía y quinoa) cuyos granos presentan conocidos beneficios a nivel nutricional y con posibilidad de encontrar péptidos y/o ingredientes con posibles propiedades biológicas. Por ésta razón, los péptidos bioactivos se han transformado en un tema de interés para

el sector industrial. Los consumidores, buscan adquirir alimentos alternativos no sólo con posibles beneficios nutricionales sino que además colaboren en el mantenimiento de su buena salud. (Udenigwe y Aluko 2012).

En este sentido han sido estudiados péptidos provenientes de diferentes fuentes (animal, vegetal y/o productos subindustrializados) capaces de inhibir a las enzimas involucradas en el sistema renina angiotensina (principalmente a la ECA). Nuestro grupo ha ensayado hidrolizados con actividad in vitro e in vivo (Vecchi y Añón 2009, Fritz y col 2011 y Quiroga y col 2012), al igual que otros autores (Luna-Suarez 2011).

Se han obtenido resultados promisorios, pero aún continúan discutiéndose distintos aspectos relacionados con los mecanismo de acción, transporte y alcance del órgano blanco en modelos in vivo (Udenigwe 2014). Más allá de la capacidad de los péptidos de inhibir la ECA, se ha demostrado la existencia de otros mecanismos de acción como inhibición de la enzima renina y otros efectos directos en el sistema vascular mediante la ruta de las quimasas (Hirota y col., 2007; Sipola y col., 2002).

El tratamiento con altas presiones hidrostáticas APH, 1-3 MPa (Peñas y col. 2004

4, de mezcla de proteínas de suero de leche y soja con enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina y quimotripsina) se ha traducido en un mayor GH y en un perfil de péptidos diferente al obtenido en condiciones de presión atmosférica. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, nos han mostrado que las proteínas aisladas del grano de amaranto son muy sensibles a las APH, las cuales se desnaturalizan en aproximadamente un 80% luego de 5 min a 12 MPa (Condés y col., 2012), por lo que realizar la hidrólisis a presiones de 10 MPa se podría esperar la exposición de nuevos sitios de corte a la enzima, sin que la APH afecte a la misma.

Actividades y metodología

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

Los aislados de amaranto serán sometidos a un tratamiento con altas presiones y

posteriormente hidrolizados con alcalasa. Se evaluará el posible cambio en la actividad biológica específica de los péptidos liberados. Los hidrolizados se prepararán, bajo condiciones controladas, por acción de alcalasa a 37 °C y pH 1, de acuerdo a resultados previos obtenidos en el laboratorio. La acción de la enzima se detendrá por calentamiento cuando se haya alcanzado un grado de hidrólisis superior al 30%. Con el fin de estudiar la cinética de la proteólisis se determinarán los grupos aminos libres utilizando el método del reactivo o-ftalaldehído (OPA) (Nielsen y col 2014).

1). Los hidrolizados serán caracterizados mediante electroforesis en geles Tricina-SDS-PAGE y RP-HPLC.

El hidrolizado extensivo sin tratamiento previo con altas presiones ha sido caracterizado mediante electroforesis y cromatografía de exclusión molecular. La actividad biológica del mismo también fue medida sobre diferentes enzimas del sistema RAS (los resultados obtenidos han sido presentados en el informe de actividades 2014).

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

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

Los parámetros cinéticos de los péptidos sintéticos VIKP y ALEP sin digestión gastrointestinal están siendo determinados sobre la enzima renina tal como fuera indicado en el informe de actividades 2014..

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

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

La extracción de la enzima se realizará de acuerdo al protocolo de Hayakari y col (1978) con algunas modificaciones. Una vez obtenidos los pulmones, se los cortará y homogenizará en un Ultraturrax en presencia de buffer fosfato de potasio 0,1 M y sacarosa 0,25 M pH 8,3 en un baño de agua y hielo en una relación solvente: tejido de 1:5. A esta preparación se le agregará un inhibidor de proteasas, PMSF, en una concentración final de

,1 mM. La suspensión así obtenida se centrifugará durante 5 minutos a una velocidad de 174

xg a 4°C. El sobrenadante, será almacenado a - 8 °C hasta su uso. Los pulmones de conejo serán cedidos por la cátedra de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales-UNLP. Luego de la obtención y caracterización del hidrolizado antes y después de la digestión gastrointestinal simulada y de los péptidos sintéticos se medirá la posible capacidad antihipertensiva en cada una de las etapas mencionadas anteriormente. La presencia de péptidos que presenten posible actividad inhibitoria de la ECA se determinará mediante el ensayo de Hurst y Lowell (1981), donde la potencia de los péptidos será estimada utilizando curvas dosis respuesta que permitirán calcular el parámetro IC50.

3.2 Inhibición de la actividad de renina

La renina es una enzima que cataliza la conversión del angiotensinógeno secretado por el hígado en angiotensina I, por consiguiente es un paso esencial del sistema angiotensina-renina involucrado en el control de la presión arterial. La determinación de la inhibición de la actividad de renina se llevará a cabo mediante espectrofotometría de fluorescencia según el método descrito por Yuan y col. (2

6). Para ello se utilizará un kit de ensayo específico de inhibición de renina. Se analizará la actividad de distintas concentraciones de las muestras en estudio: ALEP, VIKP y los dos hidrolizados extensivos. La actividad enzimática se expresará como la velocidad de reacción, haciendo uso de una unidad de intensidad de fluorescencia arbitraria. Las longitudes de onda a utilizar serán 340 nm (excitación) y 490 nm (emisión). Los controles no contendrán muestra. Se determinará la cinética de reacción con la muestra más activa, haciendo uso de diferentes cantidades de sustrato (1 mM) y diferentes concentraciones de péptidos (0,5 - 2 mg/ml) de manera de poder estimar el IC50 de los mismos.

3.3 Actividad de quimasa

La quimasa es una enzima que cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II que juega un rol preponderante en la regulación de la presión. Se analizará la posible acción inhibitoria de esta enzima por parte de las muestras en estudio: ALEP, VIKP y los hidrolizados extensivos. Para la determinación de la actividad enzimática se hará uso de la técnica espectrofotométrica descrita por Takai y col. (2

). Como sustrato se usará SucAAPPfNA. El seguimiento de la reacción se hará a 405 nm. Como control negativo se utilizará DMSO y como control positivo quimostatina. Se calculará el porcentaje de inhibición, considerándose el mismo significativo cuando supere el 50%.

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

Bibliografía

- Condes, C., Speroni, F., Mauri, A., Añón, M.C. 2
12. Physicochemical and structural properties of amaranth protein isolates treated with high pressure. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 14, 11-17
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., Añón, M.C. 2
11. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chem.*, 126: 878-884.
- Hayakari M., Kondo Y., Izumi H. 1978 A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Anal. Biochem.*, 84: 361-369.
- Hirota, T.K., Ohki, R., Kawagishi, Y., Kajimoto, S., Mizuno, Y., Nakamura, L., Kitakaze, M. 2
7. Casein hydrolysate containing the antihypertensive tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves vascular endothelial function independent of blood pressure-lowering effects: contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. *Hypertens. Res.*, 3 : 489-496.
- Hurst, P.L., Lovell-Smith, C.J. 1981. Optimized assay for serum angiotensin-converting enzyme activity. *Clin. Chem.*, 27: 248-252.
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D. 2
2. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*, 113: 71S-88S.
- Luna-Suárez, S., Medina-Godoy, S., Cruz-Hernández, A., Paredes-López, O. 2
1 . Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory peptide of the angiotensin I converting enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 148: 241-247.
- Nielsen P., Petersen D, Dambmann C 2
1 Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Food Chem & Toxicology* 66: 642-646.
- Peñas, E., Préstamo, G., Gómez, R. 2
4. High pressure and the enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins. *Food Chem.*, 85: 641-648.
- Peñas, E., Préstamo, G., Baeza, Martínez Molero, Gómez, R. 2
6. Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. *Int. Dairy J.*, 16: 831-839.
- Quiroga, A.V., Aphalo, P., Ventureira, J.L., Martínez, E.N., Añón, M.C. 2
12. Physicochemical, functional and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) 7S globulin. *J. Sci. Food Agric.*, 92: 397-403.
- Sipola, M.P., Finckenberg, R., Korpela, H., Vapaatalo, S., Nurminen, N.L. 2
2. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J. Dairy Res.*, 69: 103-111.
- Takai S., Yuda A., Jin D., Nishimoto M., Sakagichi M., Sasaki S., Miyazaki M 2

- Inhibition of chymase reduces vascular proliferation in dog grafted veins. FEBS Letters 467 141-144
 - Udenigwe, C.C., Aluko, R.E. 2
12. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. J. Food Sci., 77: R11-R24.
 - Udenigwe, C.C. 2
14. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. Trends in Food Sci & Techn 36:137-143.
 - Vecchi, B., Añón, M.C. 2
9. ACE inhibitory tetrapeptides from Amaranthus hypochondriacus 11S globulin. Phytochemistry, 7 864-87
 :
 .
- Yuan, L., Wu, J., Aluko, R.E., Ye, X. 2
6. Kinetics of renin inhibition by sodium houltuyfonate analogs. Biosci. Biotech. Bioch., 7 2275-228
 :
 .

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
 - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: ininvest@cic.gba.gov.ar (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

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