

# ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA DE PROTEÍNAS DE AMARANTO SOMETIDAS A DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA

Ana Clara Sabbione, Adriana Scilingo, María Cristina Añón

## 1. RESUMEN

El amaranto es un pseudocereal americano que además de presentar ciertas ventajas agronómicas que lo convierten en un cultivo interesante, posee en sus semillas proteínas de muy buena calidad en cantidad apreciable. En este trabajo, con el objeto de evaluar la potencial actividad antitrombótica de las proteínas de amaranto o de los péptidos encriptados en ellas, se sometió a un aislado proteico de amaranto obtenido a partir de harina desgrasada a digestión gastrointestinal simulada (DGS). Las proteínas se hidrolizaron primero con pepsina (pH 2, 37 °C) y luego con pancreatina (pH 6, 37 °C), empleando el protocolo modificado de Roesler y Rao<sup>1</sup>. Se determinó el contenido de proteínas (Kjeldahl) en las muestras, el grado de hidrólisis (OPA), los perfiles electroforéticos de alícuotas tomadas a diferentes tiempos durante la DGS y la actividad antitrombótica *in vitro*<sup>2,3</sup>. El hidrolizado, comparado con el aislado exhibió diferentes perfiles electroforéticos (tricina-SDS-PAGE), evidenciando la presencia de diversas especies moleculares de menor masa molecular. El grado de hidrólisis alcanzado al finalizar la DGS fue  $51,1 \pm 3,8\%$ . Mediante los ensayos de inhibición de la coagulación se observó que el aislado de amaranto no presentó actividad antitrombótica a las concentraciones estudiadas, mientras que la muestra digerida sí logró inhibir la coagulación. En este caso la concentración que inhibe el 50% de la formación del coágulo ( $IC_{50}$ ) fue  $0,23 \pm 0,02$  mg/ml. Se halló una única fracción activa cuando el hidrolizado se separó mediante cromatografía de exclusión molecular como un primer paso para purificar los péptidos bioactivos. Los resultados obtenidos sugieren que en las proteínas de amaranto hay

---

CONTACTO: Ana Clara Sabbione [acsabbione@gmail.com](mailto:acsabbione@gmail.com)

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-FCE-UNLP), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

encriptados péptidos con potencial actividad antitrombótica que podrían liberarse durante el proceso de digestión gastrointestinal.

## 2. INTRODUCCIÓN

Existe una importante relación entre la alimentación y algunas enfermedades prevalentes en el mundo. Tal concepto invita a explorar propiedades biológicas de interés para la salud en diversas fuentes alimentarias. El amaranto es un pseudocereal americano. Sus pequeñas semillas contienen un porcentaje alto de proteínas que se caracterizan por presentar un completo perfil aminoacídico y mayor contenido de lisina que los cereales<sup>4</sup>, por lo cual se presenta como un ingrediente alimentario interesante. Las proteínas de las semillas de amaranto han sido el objeto de estudio de nuestro grupo de investigación como fuente potencial de compuestos con acción fisiológica benéfica y, como otras proteínas alimentarias, ellas o los péptidos encriptados pueden presentar diversas actividades biológicas. Con el objetivo de generar mayor conocimiento, es de nuestro interés explorar la existencia de proteínas y péptidos de amaranto con actividad antitrombótica que podrían generar tales efectos al consumir este pseudocereal.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

*Semillas de amaranto:* Se utilizaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (UNRC, Córdoba, Argentina).

*Obtención de la harina:* Las semillas enteras se molieron en un molino Udy, que posee un filtro de 1 mm de malla y se tamizaron a través de un cedazo de malla de 92 micrones. La harina obtenida fue desgrasada mediante extracción con n-hexano, en una relación 10 % p/v, durante 5 horas con agitación constante a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo se la dejó aproximadamente 20 horas más de contacto en reposo. Para separar el solvente se realizó una filtración a temperatura ambiente empleando una bomba de vacío y luego se dejó secar en iguales condiciones durante otras 20 horas para asegurar la evaporación completa del hexano.

*Preparación de los aislados proteicos:* Los aislados proteicos de amaranto fueron obtenidos a partir de la harina desgrasada<sup>5</sup>, la cual se resuspendió en agua, en una relación 10 % p/v. La extracción de las proteínas se realizó ajustando el pH a 9,0

con NaOH 2 N y agitando la suspensión durante 1 hora a temperatura ambiente. El siguiente paso consistió en la centrifugación a 9000 g a 10 °C durante 20 minutos (centrífuga Beckman). El sobrenadante obtenido en la centrifugación se ajustó a pH 5,0 con HCl 2 N con el fin de precipitar las proteínas presentes al alcanzar su punto isoeléctrico. Para separarlas se centrifugó la dispersión obtenida a 9000 g y a 4 °C durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante; el precipitado fue resuspendido en agua, en una relación 1:3 y se neutralizó con NaOH 2 N hasta pH 7. Luego se congeló a -80 °C y se liofilizó. El sólido obtenido fue molido y almacenado a 4 °C en recipientes herméticos hasta su uso.

*Digestión gastrointestinal simulada (DGS):* A partir del aislado proteico se preparó una suspensión de proteína 2,5 % p/v en NaCl 0,03 M y se ajustó el pH a 2 con HCl 1 N. Luego de termostatar la suspensión proteica durante 30 minutos a 37 °C, se agregó pepsina en una relación 0,1 g pepsina/g de proteína y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación (100 rpm, agitador orbital con termostato, (Orbit Environ Shaker de Lab-Line). Una vez finalizado el tiempo de reacción con pepsina, se ajustó el pH de la suspensión a 6 con NaOH 1 N y se agregó pancreatina en una relación 0,1 g pancreatina/g de proteína. Se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación (100 rpm en agitador orbital). Finalmente se detuvo la hidrólisis por calentamiento de la mezcla de reacción a 85 °C durante 10 minutos en baño de agua.

Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de proteólisis con el objetivo de estudiar la cinética de reacción y realizar un seguimiento de la misma.

· *Solución de pepsina:* Pepsina comercial MP Biomedicals 1:15000. Se prepararon 0,4 g de pepsina 1:15000 en 2,5 ml de solución de HCl 0,1 N y NaCl 0,03 M. La solución se incubó a 37 °C durante 30 minutos con agitación antes de utilizarla.

· *Solución de pancreatina:* Pancreatina comercial MP Biomedicals 4xUSPgrade. Se solubilizaron 0,1 g de pancreatina con 25 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 N y se incubó 30 minutos a 37 °C con agitación antes de utilizarla.

*Determinación de proteínas totales:* Se utilizó el método de Kjeldahl<sup>6</sup> recogiendo el amoníaco destilado en ácido bórico 4 % p/v. Para convertir el nitrógeno en proteínas se utilizó como factor de conversión 5,85 g proteína/g de nitrógeno, que es el más adecuado para las proteínas de amaranto<sup>4</sup>.

*Determinación de proteínas solubles:* para cuantificar la cantidad de proteínas en las fracciones a las que se les estudió la actividad antitrombótica, se utilizó el método de Lowry<sup>7</sup>.

**Grado de hidrólisis:** Se determinó mediante la reacción de los grupos amino libres con el ortoftaldehído (OPA) método descrito por Dinnella *et al.*<sup>8</sup>, con algunas modificaciones<sup>9</sup>. La reacción específica entre el OPA y los aminos primarios para formar isoindoles, permite cuantificar los aminos mediante la lectura espectrofotométrica a 340 nm. Se utilizó como buffer de ensayo borato de sodio 0,15 M, 0,15 % p/v SDS, pH 9,5. El reactivo OPA 5,97 mM se preparó en el mismo buffer, adicionando, DTT 5,7 mM.

La curva de calibración se construyó con leucina (Sigma). A partir de una solución de leucina 1 mg/ml, se prepararon diluciones que cubran el rango de concentraciones entre 0,025 y 0,125 mg/ml.

La reacción se llevó a cabo adicionando 100 µl de muestra a 750 µl del reactivo de OPA, agitando y dejando reposar 2 minutos. Una vez realizada la reacción, se midió la absorbancia a 340 nm en un lector de placas Biotec Sinergy HT.

Para calcular el grado de hidrólisis se utilizó la siguiente expresión:

$$\text{GH}\% = \frac{(\text{NH}_{2t} - \text{NH}_{2t=0}) \times 100}{\text{NH}_{2 \text{ totales}}}$$

donde,

$\text{NH}_{2t}$ : grupos amino libres a tiempo de hidrólisis  $t$ .

$\text{NH}_{2t=0}$ : grupos amino libres a tiempo cero de hidrólisis.

$\text{NH}_{2 \text{ totales}}$ : grupos amino totales presentes en la proteína.

$\text{NH}_{2 \text{ totales}} = \text{NH}_{2 \infty} - \text{NH}_{2t=0}$ .

$\text{NH}_{2 \infty} = (1/\text{PM}_{\text{aa promedio}}) \times (1 + f_{\text{Lys}}) \times [\text{proteína aislado}] \times [\text{aislado}] \times 1000$ .

$\text{NH}_{2t=0} = (1/\text{PM}_{\text{aa promedio}}) \times (1/L + f_{\text{Lys}}) \times [\text{proteína aislado}] \times [\text{aislado}] \times 1000$ , y se mide experimentalmente con TNBS utilizando una muestra sin hidrolizar.

$\text{PM}_{\text{aa promedio}}$ : promedio de los pesos moleculares de los aminoácidos de las proteínas de la muestra. Para amaranto se considera 130 g/mol.

$f_{\text{Lys}}$ : proporción de lisina en las muestras (1/16).

$L$ : peso promedio de los péptidos (300 g/mol).

**Electroforesis Tricina-SDS-PAGE:** Se realizaron según lo descrito por Schagger<sup>10</sup>. Respecto a la preparación de las muestras, se mezclaron 20 µl de las alícuotas tomadas a distintos tiempos de proteólisis (concentración aproximada 10 mg/ml), con 10 µl del buffer de muestra con y sin β-mercaptoetanol. Para asegurar la acción del β-mercaptoetanol presente en el buffer de muestra en condiciones reductoras,

las dispersiones fueron calentadas a 100 °C en baño maría durante 1 minuto. Antes de sembrar las muestras en los geles de poliacrilamida, fueron centrifugadas a 10000g, a 15 °C, durante 15 minutos. Posteriormente en cada calle se colocó el volumen de muestra en buffer de muestra que permitiera sembrar entre 20 y 50 µg de proteína por calle. Se usaron patrones de bajo peso molecular (LMW) marca GE Health Care, que incluye las siguientes proteínas: fosforilasa b (94 kDa), seroalbúmina bovina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α-lactoalbúmina (14,4 kDa), y patrones de muy bajo peso molecular (VLMW) marca BIO-RAD. Las proteínas incluidas en esta mezcla son: triosa-fosfato isomerasa (26,6 kDa), mioglobina (16,95 kDa), α-lactoalbúmina (14,4 kDa), aprotinina (6,51 kDa), cadena β de la insulina (3,5 kDa) y bacitracina (1,4 kDa). Una vez realizadas las electroforesis, los geles fueron fijados y teñidos con Coomassie Brilliant blue R-250. En los casos en los que la sensibilidad de esta tinción fue insuficiente para revelar las proteínas se utilizó tinción con plata. Para ello se empleó un protocolo que requiere fijación de las bandas que luego fueron reveladas mediante una coloración rápida<sup>11</sup>.

Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC): Se utilizó el equipo de FPLC Pharmacia LKB y la columna Superdex 75 HR 10/30 de exclusión molecular pre-empacada (Amersham Biosciences), la cual presenta un volumen total de 25 ml y un rango de exclusión de 3-70 kDa para proteínas globulares.

Las muestras se dispersaron en el buffer de corrida (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2, NaCl 0,12 mM) con agitación (25 °C, 1 h, 700 rpm. Thermomixer comfort Eppendorf) y luego se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 minutos y temperatura ambiente utilizando una microcentrífuga (Hermle Z 233 MK-2). Los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de nylon (0,22 µm) y se inyectaron en la columna. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y se colectaron las fracciones separadas (2 ml por fracción). La absorbancia a 280 nm fue leída de modo continuo a la salida de la columna.

Medida de la actividad antitrombótica *in vitro*: Se utilizó el método de las microplacas, descrito por Yang *et al.*<sup>2</sup> y Zhang *et al.*<sup>3</sup>. En este método la aparición de turbidez se asocia con la formación del coágulo por polimerización de la fibrina después que la trombina hidroliza el fibrinógeno a fibrina. En presencia de sustancias que inhiban la formación del coágulo, la turbidez detectada será menor o directamente no se desarrollará. Para realizar el ensayo, todas las soluciones se preincu-

baron a 37 °C. En cada pocillo de la microplaca se colocaron 140 µl de la solución de fibrinógeno y luego se adicionaron 40 µl de cada muestra, preparando un control positivo de inhibición de la coagulación (inhibición total) utilizando heparina y un control negativo (coagulación total) utilizando buffer de ensayo. La microplaca se agitó convenientemente y se realizó la primera medida de absorbancia a 405 nm en un lector de placas. Esta lectura permite obtener los valores de absorbancia de los que llamaremos blancos: muestra blanco y control blanco. A cada pocillo se le adicionó posteriormente 10 µl de la solución de trombina para iniciar la reacción de coagulación. La microplaca se incubó nuevamente a 37 °C durante 10 minutos y se realizó la medida de la absorbancia a 405 nm. Las lecturas de absorbancia obtenidas fueron las correspondientes a las muestras, al control negativo y al control positivo. Todas las medidas se realizaron al menos por duplicado.

- Buffer del ensayo: Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2, NaCl 0,12 mM
- Fibrinógeno bovino: solución 0,1 % p/v de fibrinógeno (Sigma) en el buffer del ensayo.
- Trombina 12 UI/ml: a partir de trombina sólida (Sigma, 330 UI) en el buffer del ensayo.
- Heparina: Se utilizó una solución de heparina 0,3 mg/ml preparadas con heparina sódica (Abbott, 5000 U/ml, en la que 1 mg heparina corresponde a 100 U) en el buffer del ensayo.

Las muestras se analizaron solubilizándolas en el buffer del ensayo durante 1 hora con agitación constante a 700 rpm a 25 °C empleando el Thermomixer comfort (Eppendorf) y luego centrifugando 20 minutos a 10000 rpm y temperatura ambiente utilizando una microcentrífuga Hermle Z 233 MK-2.

Los efectos inhibitorios de la coagulación se calcularon según la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inhibición} = [(C-CB) - (M-MB)] / (C-CB) \times 100$$

donde,

CB: Control blanco.

C: Control.

MB: Muestra blanco.

M: Muestra.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Concentración de proteínas:* Los aislados proteicos se prepararon a partir de harina desgrasada siguiendo el procedimiento antes mencionado en Materiales y métodos. Se determinó la concentración proteica del aislado y de su hidrolizado obtenido por acción de las enzimas digestivas. El aislado presentó  $82,4 \pm 1,6$  g de proteína/ 100 g de aislado, mientras que el hidrolizado exhibió una concentración de  $78,4 \pm 0,8$  g de proteína/ 100 g de hidrolizado.

*Hidrólisis gastrointestinal simulada del aislado:* Durante la DGS se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de proteólisis y se realizaron geles electroforéticos sembrando las alícuotas obtenidas. La Figura 1 muestra los perfiles electroforéticos obtenidos en geles de tricina con el aislado de amaranto durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal simulada. El aislado de amaranto (Figura 1, Asl1), constituido principalmente por globulinas, presenta numerosas bandas: agregados de alta masa molecular, unidades moleculares de aproximadamente 54-56 kDa, y los polipéptidos ácidos y básicos de aproximadamente 30 y 20 kDa, A y B, que se encuentran unidos por puentes disulfuro en las globulinas tipo 11S y P<sup>5</sup>. Además se observan algunas bandas de 67 kDa y de baja masa molecular que corresponden a polipéptidos de la globulina 7S, presente en menor cantidad en el amaranto, pero que se halla en los aislados, tal como describieron Quiroga *et al.*<sup>12</sup>. Cuando se somete a hidrólisis, el perfil electroforético se modifica. Se observa un gran aumento del número e intensidad de bandas de PM menor a 26 kDa aún a tiempos cortos de reacción. Cuando el tiempo de hidrólisis aumenta el perfil se vuelve más tenue, indicando que esos mismos péptidos son sustrato de las enzimas y se convierten en otros aún más pequeños. La Figura 1 muestra que tanto la pepsina como la pancreatina producen modificaciones en las proteínas de amaranto, sugiriendo que ambas etapas que corresponderían a modificaciones enzimáticas y por efecto del pH producidas en el estómago y en el intestino delgado son relevantes para generar potenciales compuestos activos (Figura 1, Asl2, Asl 3, Hdr).

El hidrolizado obtenido, Hdr, presentó un GH % de  $51,1 \pm 3,8$  determinado por el método OPA. Durante el ensayo que emula la digestión, el aislado de amaranto sufrió extensiva hidrólisis, algo mayor al informado por Orsini *et al.*<sup>13</sup>, quienes determinaron que el grado de hidrólisis alcanzado con el mismo protocolo de simulación gastrointestinal fue cercano al 40 %, utilizando semillas de *A. mantegazzianus* y el ensayo de TNBS para determinar el GH %.

*Actividad antitrombótica del aislado proteico de amaranto y sus hidrolizados:*

Las medidas de esta actividad *in vitro* se realizaron con el aislado y el aislado hidrolizado de amaranto (Hdr). El aislado no presentó inhibición de la coagulación para ninguna de las concentraciones analizadas en este trabajo (0,17-12 mg de proteína/ml). La Figura 2 muestra la curva de inhibición de la coagulación en función de la concentración de proteínas del Hdr. Se observa que la inhibición alcanzada depende de la concentración de proteínas, presentando un comportamiento tipo dosis-respuesta. El hidrolizado presentó actividad inhibitoria a partir de 0,1 mg proteína/ml. A concentraciones más altas, la inhibición aumenta con la concentración hasta que se alcanza un plateau cuando la concentración de proteínas es 0,75 mg/ml. Mediante el programa GraphPad Prism se ajustaron los puntos experimentales obtenidos a fin de obtener la concentración que produce el 50 % de la inhibición de la coagulación, IC<sub>50</sub>. Para esta muestra, dicha concentración resultó 0,23 ± 0,02 mg de proteína/ml.

Este resultado comprueba la efectividad del tratamiento de hidrólisis por medio de las enzimas digestivas para producir péptidos con actividad antitrombótica. Al comparar el aislado control con su hidrolizado se puede ver que evidentemente la hidrólisis ha liberado péptidos o polipéptidos que ejercen actividad antitrombótica y que antes se encontraban encriptados dentro de las proteínas. Es preciso destacar que el aumento de la inhibición de la coagulación de las proteínas de amaranto al ser sometidas a la digestión gastrointestinal simulada es un resultado muy promisorio, dado que los péptidos que potencialmente inhiben la coagulación se liberarían durante la digestión. Dicho comportamiento es buscado en péptidos bioactivos, donde se pretende que resistan la digestión gastrointestinal una vez consumidos o se produzcan por ella.

*Fraccionamiento del aislado sometido a digestión gastrointestinal simulada:*

El aislado que fue sometido a una digestión gastrointestinal simulada fue quien presentó la mayor inhibición de la coagulación. Con la finalidad de aproximarnos a conocer cuáles son las sustancias responsables de la bioactividad se empleó la cromatografía como paso de purificación. En esta oportunidad utilizamos cromatografía de filtración en gel (FPLC). Las condiciones de corrida y de fraccionamiento se describieron en Materiales y métodos. La muestra se solubilizó en buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,12 mM, pH 7,2 y se eluyó con el mismo solvente. Se realizaron varias corridas sucesivas, colectando 2 ml por tubo, y se analizó la actividad antitrombótica de las fracciones colectadas utilizando el ensayo de las microplacas. Se estudió la bioactividad en todos los tubos colectados, y se encontró que la fracción



correspondiente al volumen de elución entre 14 y 16 ml, (recuadro verde marcado en la Figura 3) fue la única que presentó una considerable inhibición de la formación del coágulo. El siguiente paso será caracterizar la fracción activa encontrada e identificar los péptidos bioactivos contenidos en la misma.

## 5. CONCLUSIONES

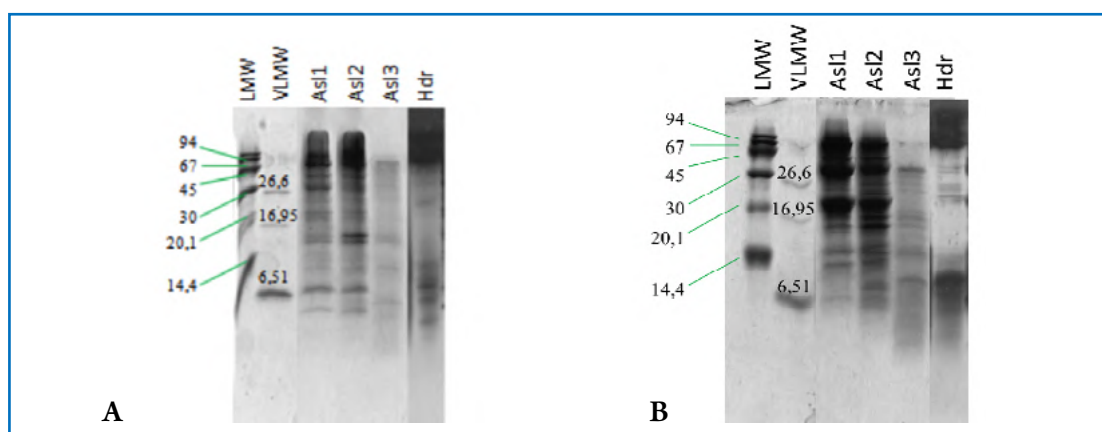
La acción de las enzimas digestivas utilizadas en condiciones adecuadas que permiten simular la digestión gastrointestinal sobre las proteínas del aislado de amaranto produce moléculas de baja e intermedia masa molecular, presentando importantes diferencias estructurales comparándolas con sus proteínas nativas. La hidrólisis generada resultó efectiva para producir péptidos con potencial actividad antitrombótica, dado que la muestra sin digerir no presentó inhibición de la formación del coágulo a las concentraciones estudiadas, mientras que el hidrolizado exhibió un  $IC_{50}$  de  $0,23 \pm 0,02$  mg de proteína/ml. Los resultados obtenidos son promisorios para seguir indagando y encontrar los péptidos activos responsables de inhibir la formación del coágulo. Con el fraccionamiento del hidrolizado, se halló una fracción activa mediante cromatografía de gel filtración. Se profundizará el estudio de esta fracción a fin de identificar los péptidos bioactivos presentes. Se pretende, a futuro, que las proteínas de amaranto como ingredientes de alimentos funcionales, aporten una vez digeridas, los péptidos bioactivos que contienen.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

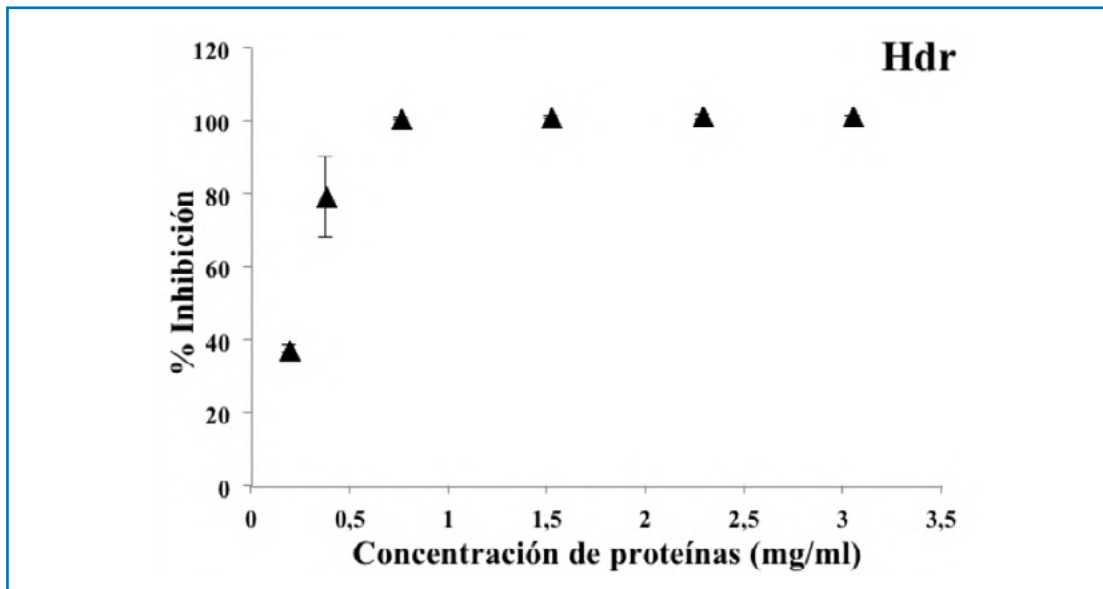
- ROESLER KR y Rao AG. Rapid Gastric Fluid Digestion and Biochemical Characterization of Engineered Proteins Enriched in Essential Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 4: 3443-3451.
- YANG WG, Wang Z, Xu SY. A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chin. Chem. Lett.* 2006; 18: 449-451.
- ZHANG SB, Wang Z, Xu SY. Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2008; 85: 521-527.
- PAREDES-LÓPEZ, O. *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology*: CRC Press; 1994.
- MARTÍNEZ NE, Añón MC. Composition and structural characterization of amaranth proteins isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 2523-2530.

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists Inc. Official Methods of Analysis, ed. 14. Ed Williams S., Arlington, VA. Método 2057, 16; 1984.
- LOWRY OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.
- DINNELLA C, Gargaro MT, Rossano R, Monteleone E. Spectrophotometric assay using o-ph-taldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein. Food Chem. 2002; 78: 363-368.
- CIAN RE, Martínez-Augustin O, Drago SR. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. Food Res. Int. 2012; 49: 364-372.
- SCHÄGGER H. Tricine-SDS-PAGE. Nat. Protoc. 2006; 1: 16-22.
- BLUM H, Beier H, Gross H. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrilamide Gels. Electrophoresis. 1987; 8: 93-99. <sup>12</sup>Quiroga AV, Martínez EN, Rogniaux H, Geairon A, Añón MC. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) vicilin subunit structure J. Agric. Food Chem. 2010; 58: 12957-12963.
- ORSINI DELGADO MC, Tironi VA, Añón MC. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. Food Sci Technol. 2011; 44: 1752-1760.

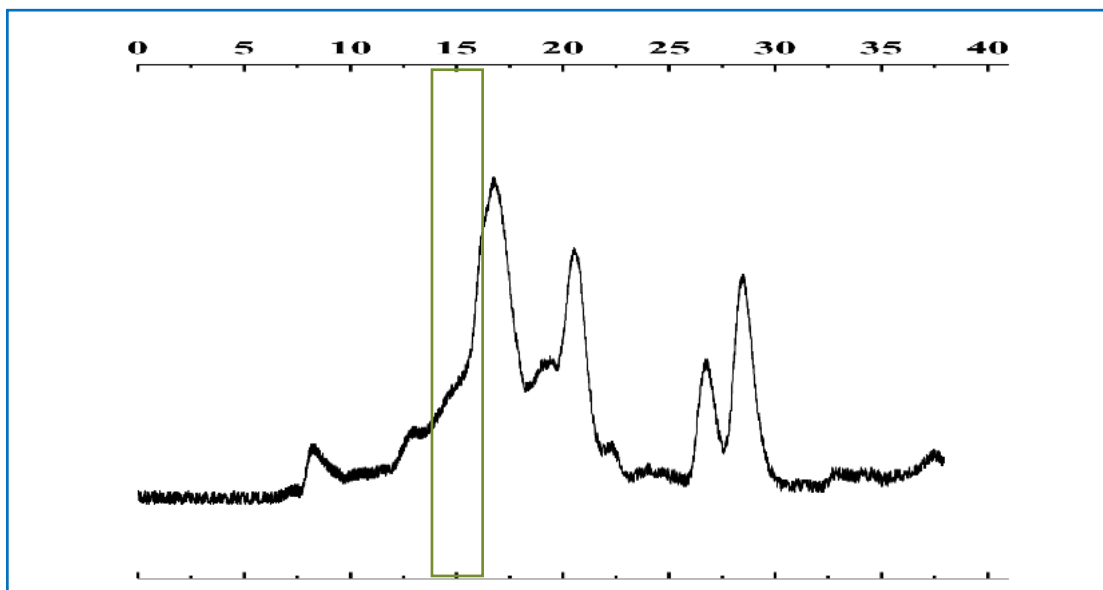
## 7. TABLAS Y FIGURAS



**FIGURA 1.** Gel electroforético Tricina-SDS-PAGE en ausencia de 2-ME (A) y con 2-ME (B). Aislado de amaranto (AsI) a distintos tiempos de reacción: tiempo 0 (AsI1), luego de 30 minutos a pH 2 (AsI2), a los 60 minutos de contacto con la pepsina (AsI3) y a los 60 minutos de contacto con la pancreatina (Hdr). LWM: patrones de bajo peso molecular. VLMW: patrones de muy bajo peso molecular.



**FIGURA 2.** Curva de inhibición de la coagulación obtenida con el aislado proteico sometido a la digestión gastrointestinal simulada (Hdr).



**FIGURA 3.** Cromatograma del hidrolizado obtenido mediante digestión gastrointestinal simulada (Hdr) eluido con buffer TRIS-HCl 0,05 M, NaCl 0,12 mM, pH 7,2. Con el recuadro verde se indica la fracción que presentó bioactividad.