

**Universidad:** Universidad Nacional de La Plata.

**Facultad/Centro/ Instituto:** CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos).

**Título del trabajo:** ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA DE FRACCIONES PROTEICAS DE AMARANTO Y SUS HIDROLIZADOS EMPLEANDO PRUEBAS GLOBALES DE HEMOSTASIA Y ENSAYOS *IN VITRO*.

**Autor:** Sabbione, Ana Clara.

**Nivel de formación del investigador principal:** Graduado.

**Orientador:** Scilingo, Adriana Alicia.

**Núcleo Disciplinario/Comité Académico/Otros Temas:** Productos Naturales Bioactivos y sus aplicaciones.

**Dirección Electrónica:** acsabbione@gmail.com

**Palabras Claves:** Hemostasia, Actividad antitrombótica, Glutelinas.

Hemostasia, Atividade antitrombotica, Glutelinas.

### **Introducción**

Una dieta saludable combinada con la ingesta de alimentos que contengan compuestos bioactivos puede contribuir a minimizar el padecimiento de enfermedades. Tal concepto invita a explorar propiedades biológicas de interés para la salud en diversas fuentes alimentarias, siendo las proteínas de amaranto una excelente opción.

### **Objetivos**

Estudiar la actividad antitrombótica de proteínas de las semillas de amaranto y sus hidrolizados.

### **Materiales y Métodos**

El aislado y las fracciones proteicas se prepararon a partir de harina desgrasada según protocolos de extracción de Martínez y col. 1996 y Martínez y col. 1997, respectivamente. Los hidrolizados se obtuvieron empleando alcalasa y tripsina. Las muestras se caracterizaron mediante determinación de proteínas, grado de hidrólisis, electroforesis Tricina-SDS-PAGE, cromatografía de exclusión molecular y calorimetría diferencial de barrido.

La actividad antitrombótica se determinó *in vitro* con el método de las microplacas (Yang y col. 2006) y con pruebas globales de hemostasia: tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) y tiempo de trombina (TT), las cuales se utilizan para detectar alteraciones en el sistema de coagulación.

### **Resultados**

Algunas fracciones proteicas y sus hidrolizados producen un aumento de TP, APTT y TT respecto del plasma control en las pruebas globales de hemostasia. Se observó el máximo retardo de TT al utilizar la fracción glutelinas sin hidrolizar, correlacionándose estos resultados con los obtenidos empleando la técnica de las microplacas, donde concentraciones del orden de los  $\mu\text{g/ml}$  inhiben el 50% de la coagulación.

### **Conclusiones**

Los resultados indican potencial actividad antitrombótica de péptidos provenientes de proteínas de amaranto.

## I. INTRODUCCIÓN

Existe una importante relación entre la alimentación y muchas de las enfermedades prevalentes en el mundo. Una dieta saludable combinada con la ingesta de alimentos funcionales, entendidos como “*aquellos que contienen algún componente que beneficia un número limitado de funcionalidades en el cuerpo, proporcionando bienestar y salud, reduciendo el riesgo a contraer enfermedades*” (Amer. Diet Assoc., 1999), puede contribuir a minimizar el padecimiento de las mismas. Tal concepto invita a explorar propiedades biológicas de interés para la salud en diversas fuentes alimentarias, siendo las proteínas provenientes de las semillas de amaranto una excelente opción, dado que cuentan con un completo perfil aminoacídico, un elevado contenido de lisina (Davis, 1992), que su cultivo presenta ciertas ventajas agronómicas y que se han encontrado bioactividades en los péptidos que las componen (Barrio y Añón, 2009; Vecchi y Añón, 2009).

El amaranto es considerado un pseudocereal que pertenece al grupo de las dicotiledóneas. Sus flores, que brotan del tallo principal, contienen los frutos, en los que se encuentran las pequeñas semillas de 2 mm de diámetro. Las proteínas provenientes de ellas pueden clasificarse, según su solubilidad (Osborne, 1924), en cuatro clases:

- Las albúminas se extraen a partir de la harina solubilizándolas en agua. Los polipéptidos de esta fracción presentan diversos tamaños, la mayoría entre 10 y 43kDa (Marcone, 2000; Segura-Nieto y col., 1992), y algunos de masa molecular de hasta 94kDa (Martínez y Añón, 1996; Barba de la Rosa y col., 1992). La mayoría son monoméricos, no dissociables por  $\beta$ -mercaptoetanol.
- Las globulinas, solubles en soluciones salinas de pH cercano a la neutralidad, representan el 56% de las proteínas del aislado (Castellani, 2000), siendo la fracción mayoritaria. En el amaranto existen tres tipos de globulinas: la globulina 7S es quien se encuentra en menor proporción, la globulina 11S está constituida por subunidades polipeptídicas formadas por un polipéptido ácido (A) y uno básico (B), unidos por enlaces disulfuro de diferentes tamaños que forman un heteroligómero (Salnikow y col., 1998), y la globulina P, que es soluble en agua y soluciones salinas de baja fuerza iónica. Contiene varios polipéptidos, entre ellos algunos de masas moleculares de 56, 36, 31, 26 y 22kDa. Las unidades moleculares presentan una masa molecular cercana a 300kDa (Castellani y col., 2000), aunque muestran un alto grado de polimerización.
- Las prolaminas, solubles en soluciones alcohólicas, se encuentran en muy baja proporción.
- Las glutelinas, solubles en soluciones ácidas o alcalinas, presentan composición polipeptídica y características estructurales similares a la globulina P (Abugoch, 2006).

Los péptidos bioactivos se definen como “*fragmentos proteicos exógenos específicos que producen un impacto positivo en las funciones del cuerpo humano, generando un efecto benéfico sobre la salud independientemente del nutricional*”. Para ser “bioactivo”, un componente dietario debe impartir efectos biológicos medibles a un nivel fisiológicamente razonable. Se han descrito numerosas bioactividades derivadas de péptidos liberados de proteínas dietarias, entre ellas se encuentran las que actúan sobre el sistema cardiovascular, actividades antihipertensiva, antioxidante, antitrombótica e hipocolesterolemica (Erdmann y col., 2007), sobre el aparato digestivo, actividades quelante y antimicrobiana, sobre el sistema inmunológico como la inmunomoduladora y la citomoduladora, y sobre el sistema nervioso, actividad opioide.

## II. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es estudiar la actividad antitrombótica de las proteínas del amaranto a fin de generar conocimientos que sirvan de base para el desarrollo de nuevos ingredientes biológicamente activos derivados de este pseudocereal. Se propone obtener fracciones proteicas y sus hidrolizados, caracterizarlos estructural y fisicoquímicamente y evaluar su actividad antitrombótica mediante el empleo de ensayos globales de la hemostasia y el ensayo *in vitro* de las microplacas.

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas de amaranto: se utilizaron semillas de *Amaranthus mantegazzianus* cosechadas en la Estación Experimental Agropecuaria del INTA, Anguil, La Pampa, Argentina.

Obtención de la harina: las semillas enteras se molieron para obtener la harina entera, la cual luego fue desgrasada con n-hexano (relación 10% p/v, 5h agitación constante, 20h de contacto en reposo).

Preparación de los aislados proteicos: la harina desgrasada de amaranto se resuspendió en agua (10% p/v, pH 9,0, agitación 1 h, temperatura ambiente), posteriormente se centrifugó (9000g, 10°C, 20 min, centrifuga Beckman). El sobrenadante obtenido se ajustó a pH 5,0 con HCl 2N para precipitar las proteínas en su punto isoeléctrico. Se centrifugó la dispersión obtenida (9000g, 4°C, 20 min) y el precipitado se resuspendió en agua (relación 1:3), se neutralizó y se liofilizó.

Preparación de las fracciones proteicas: La harina desgrasada de amaranto se resuspendió en agua bidestilada (10% p/v). Se realizaron tres ciclos de contacto (agitación con buzo magnético durante 60, 30 y 30 min respectivamente) y centrifugación (9000g, 20°C, 20 min, centrifuga Beckman), y los sobrenadantes obtenidos luego de cada ciclo se llevaron a pH 5 con HCl 2N para precipitar las proteínas en su punto isoeléctrico. Se efectuó una segunda centrifugación (9000g, 4°C, 20 min) y al precipitado se lo resuspendió en agua, se lo llevó a

neutralidad y se lo liofilizó, separando de este modo la *fracción albúminas*. El remanente de harina al que ya se le extrajeron las albúminas se utilizó para extraer la *fracción globulinas*, empleando buffer  $K_2HPO_4$  32,5mM/ $KH_2PO_4$  2,6mM, NaCl 0,4M, pH 7,5 como solvente de extracción. Seguidamente se extrajo la *fracción globulina P* con agua bidestilada como solvente y por último la *fracción glutelinas* con buffer  $Na_2B_4O_7$  0,1N, pH 10 como solvente.

Preparación de los hidrolizados proteicos: el aislado y las distintas fracciones se resuspendieron en agua (10% p/v, pH 10, agitación 1 h, 37°C). Se agregó la enzima alcalasa (0,08µl enzima/mg de aislado) y se incubó la mezcla de reacción durante 20 min a 37°C. Luego se adicionó la enzima tripsina (0,01mg enzima/mg de aislado) y 20 min más tarde se detuvo la reacción de hidrólisis por calentamiento a 85°C durante 10min. Finalmente la mezcla se congeló a -80°C y se liofilizó.

Caracterización: se determinó el *porcentaje de proteínas* de las muestras por el método de micro-Kjeldahl, donde la cuantificación del amonio liberado se efectuó por el método colorimétrico de Nkonge y Ballance (Nkonge and Ballance, 1982), usando como factor de conversión 5,85 g proteína/g de nitrógeno (Paredes-López, 1994). Para medir el *grado de hidrólisis* se dosaron los grupos amino libres mediante el método del ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) descrito por Adler-Nissen (1979).

La composición polipeptídica se determinó mediante *electroforesis desnaturalizante Tricina-SDS-PAGE* con β-mercaptoetanol siguiendo el protocolo publicado por Schägger (2006). Las muestras se prepararon mezclando soluciones de las fracciones proteicas y sus hidrolizados (10mg/ml) con el buffer de muestra (2:1). Se llevaron a 100°C durante 1 min, se centrifugaron (10000g, 15°C, 15 min) y se sembraron a razón de 20-50µg de proteína por calle.

Para separar las proteínas mediante *cromatografía rápida de gel filtración en medio líquido* (FPLC) se utilizaron las columnas Pharmacia LKB Superosa 6 N°3 (volumen total 25ml, rango de separación 5-5000kDa para proteínas globulares) ó Superdex 75 (volumen total 25ml, rango de separación 3-70kDa para proteínas globulares). Las muestras liofilizadas se solubilizaron cada una con el solvente de extracción empleado durante su fraccionamiento, excepto albúminas y globulina P en las que se utilizó buffer fosfato 35mM, pH 7,8. La concentración de las muestras fue de 15mg de proteína soluble/ml, centrifugando a 10000g, 20min, temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se filtró (filtros de nylon 0,22µm) y se inyectándose 200µl en el equipo de FPLC. La muestra se eluyó a un flujo de 0,2ml/min y el registro de los cromatogramas se realizó midiendo absorbancia a 280nm. Las cromatografías fueron realizadas por duplicado.

El análisis térmico de las muestras se realizó mediante *calorimetría diferencial de barrido* (DSC, Q10 TA Instruments). Se dispersaron al 20% p/p en agua destilada las distintas fracciones y se colocaron en cápsulas de aluminio que se sellaron herméticamente. El

programa utilizado cubrió el rango de temperaturas entre 25 y 130°C a una velocidad de 10°C/min. Una vez finalizada la corrida, el peso seco de las muestras colocadas en las cápsulas se determinó perforándolas y secándolas en estufa a 105°C hasta peso constante.

Determinación de la actividad biológica: La *actividad antitrombótica in vitro* se determinó empleando el método de las microplacas (Yang y col, 2006; Zhang y col., 2007). Se colocaron 140µl de la solución de fibrinógeno 0,1% dentro de cada pocillo junto con 40µl de cada muestra ó heparina 0,3mg/ml (control positivo de inhibición de la coagulación) ó buffer Tris-HCl 0,05M, pH 7,2, con NaCl 0,12mM (control negativo, coagulación total). La microplaca se agitó convenientemente, se adicionaron 10µl de enzima trombina 12UI/ml para iniciar la reacción de coagulación e inmediatamente se incubó durante 10 min a 37°C. Se realizaron medidas de absorbancia a 405nm (longitud de onda a la que se detecta la turbidez originada por la formación del coágulo) en un lector de ELISA (SLT Rainbow) antes y después del agregado de la enzima, obteniéndose de esta manera los porcentajes de inhibición de la coagulación. Todas las medidas se realizaron por duplicado. Las muestras se solubilizaron en buffer Tris-HCl 0,05M, pH 7,2, con NaCl 0,12mM de modo de ensayar soluciones que cubrieran un rango de concentración desde 0 a 90mg de proteína/ml buffer y su concentración se determinó utilizando el método de Lowry (Lowry y col. 1951).

*Las pruebas globales de la hemostasia* se emplean como pruebas de screening coagulométricas para localizar, de presentarse, la causa de un desorden hemostático o la presencia de sustancias inhibitoras. Para realizarlas se utilizaron los kits de Wiener lab de la siguiente manera:

- Para determinar el *tiempo de trombina* (TT) se utilizó trombina 2.3NIH/ml y plasma humano (extraer la sangre, colocarla en un tubo con anticoagulante 9:1, centrifugar y separar el plasma). En tubos de hemólisis se agregaron 0,15ml de plasma junto con 0,05ml del soluble de la muestra a estudiar ó del buffer TRIS-HCl 0,05M, pH 7,2, con NaCl 0,12mM como control; se incubaron a 37°C durante 2 minutos y rápidamente se adicionaron 0,2ml de reactivo de trombina. Se registró el tiempo de formación del coágulo por duplicado para cada muestra.
- El *tiempo de protrombina* (TP) precisa del reactivo soluplastin (tromboplastina de cerebro de conejo, cloruro de calcio para una concentración final de 0,0125mol/l, cloruro de sodio para una concentración final de 0,1mol/l) y plasma humano (extraer la sangre, colocarla en un tubo con anticoagulante 9:1, centrifugar y separar el plasma). Se colocó el plasma y el soluplastin en baño de agua a 37°C durante 2-3 minutos, luego se tomaron 0,075ml del plasma preincubado junto con 0,025ml del soluble de la muestra a estudiar ó del buffer TRIS-HCl 0,05M, pH 7,2, con NaCl 0,12mM como control y se adicionaron rápidamente al tubo conteniendo 0,2ml de soluplastin, dispa-

rando simultáneamente el cronómetro para registrar el tiempo promedio de coagulación. La determinación se realizó por duplicado para cada muestra.

- El *tiempo de tromboplastina parcial activada* (APTT) requiere del reactivo APTT (cefalina con tierra de diatomeas como activador particulado), cloruro de calcio 0,025mol/l, y de plasma humano (extraer la sangre, colocarla en un tubo con anti-coagulante 9:1, centrifugar y separar el plasma). En un tubo de hemólisis se colocaron 0,075ml del plasma junto con 0,025ml del soluble de la muestra a estudiar ó del buffer TRIS-HCl 0,05M, pH 7,2, con NaCl 0,12mM como control y 0,1ml reactivo APTT. Se mezclaron, se incubaron durante 3 min a 37°C y luego se agregaron 0,1ml de cloruro de calcio a 37°C disparando simultáneamente el cronómetro. Se agitó brevemente el tubo para homogeneizar el contenido y se registró el tiempo que se demoró en formar el coágulo. La determinación se realizó por duplicado.

Los solubles ensayados en todas las pruebas globales de la hemostasia se obtuvieron como se detalló en el ensayo de las microplacas. La concentración proteica se determinó utilizando el método de Lowry.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización: Los resultados obtenidos de la *determinación porcentual de proteínas* por el

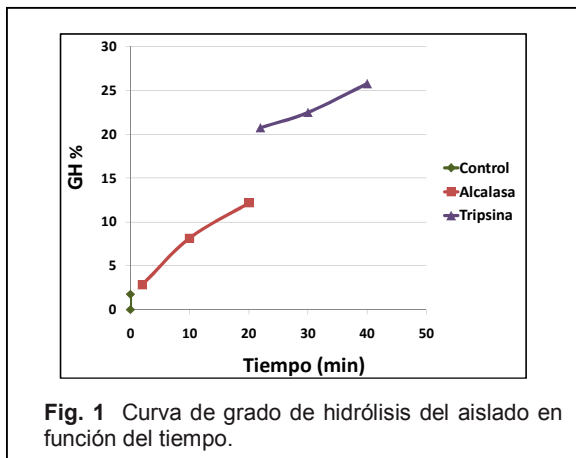
<b>Aislado</b>	74,5 ± 1,5
<b>Albúminas</b>	72,2 ± 2,4
<b>Globilinas</b>	72,7 ± 1,3
<b>Globulina P</b>	79,1 ± 1,8
<b>Glutelinas</b>	32,1 ± 1,8

**Tabla 1** Porcentaje proteico de las fracciones de amaranto (g proteína/g sólido).

método de micro-kjeldhal se muestran en la Tabla 1. Los valores observados para el aislado coinciden con los determinados por Condés y col. (2009) y por Vecchi (2007), y los correspondientes a albúminas, globulina y globulina P son valores esperables para las fracciones proteicas. Sin embargo, el contenido de proteínas en las glutelinas es significativamente menor. Podría deberse a la alta concentración de sales presente en la fracción, generada en el proceso de extracción, durante la neutralización del solvente borato de sodio (pH 10).

Para estudiar la *cinética de la proteólisis* de las fracciones se tomaron alícuotas a diferentes tiempos durante su desarrollo (0, 10 y 20 min de reacción con alcalasa y 0, 10 y 20 min de reacción con tripsina). A todas ellas se les determinó el *grado de hidrólisis* (GH%) mediante el método TNBS. Como control se realizó la medida de los grupos amino libres en el aislado y las fracciones nativas con y sin calentamiento durante 10 min a 85°C.

En la Fig. 1 se puede apreciar que, al agregar la enzima tripsina, el GH% aumenta bruscamente y luego continúa aumentando más lentamente durante el transcurso de los últimos 20 min de reacción. Este comportamiento, que se observa en casi todas las mues-



**Fig. 1** Curva de grado de hidrólisis del aislado en función del tiempo.

tras estudiadas, podría deberse a que la acción de la alcalasa sobre las proteínas estaría dejando expuestos numerosos sitios de corte sobre los que actuaría la tripsina, o simplemente a que las proteínas estudiadas son un mejor sustrato para la acción de la tripsina. Las cinéticas de proteólisis realizadas nos permitieron observar que el *GH%* aumenta significativamente con el tiempo de reacción en todas las

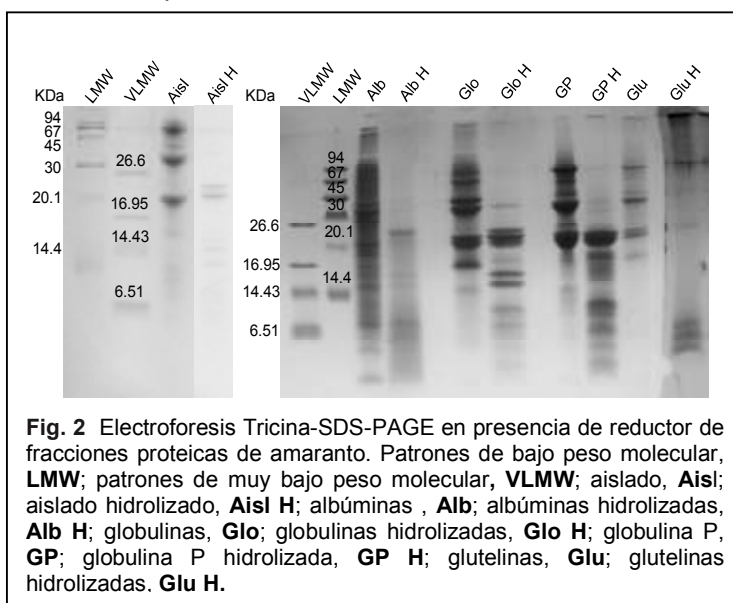
muestras estudiadas ( $\alpha=0,05$ , LSD, Fisher), siendo ambas enzimas capaces de hidrolizar al aislado de amaranto de manera efectiva y permitiéndonos conseguir productos finales con un elevado grado de hidrólisis en el término de 40 minutos (Tabla 2).

Muestra	Aislado	Albúminas	Globulinas	Globulina P	Glutelinas
GH %	25,8 ± 2,2	15,7 ± 0,5	14,2 ± 0,3	10,6 ± 0,1	25,9 ± 0,1

**Tabla 2** GH% final de aislado y fracciones de amaranto hidrolizados.

La fracción globulina P presenta un grado de hidrólisis inferior con respecto al resto de las fracciones, lo que puede deberse a su alto grado de polimerización (Castellani y col., 2000) que impide la fácil llegada de las enzimas proteolíticas a sus sitios de acción.

Los *perfiles electroforéticos* de Tricina-SDS-PAGE con agente reductor se observan

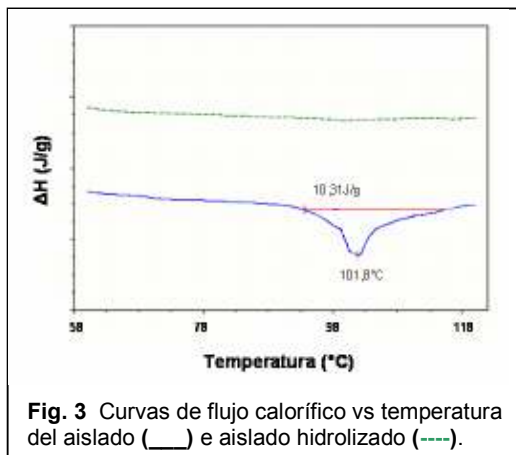


**Fig. 2** Electroforesis Tricina-SDS-PAGE en presencia de reductor de fracciones proteicas de amaranto. Patrones de bajo peso molecular, **LMW**; patrones de muy bajo peso molecular, **VLMW**; aislado, **Aisl**; aislado hidrolizado, **Aisl H**; albúminas, **Alb**; albúminas hidrolizadas, **Alb H**; globulinas, **Glo**; globulinas hidrolizadas, **Glo H**; globulina P, **GP**; globulina P hidrolizada, **GP H**; glutelinas, **Glu**; glutelinas hidrolizadas, **Glu H**.

en la Fig. 2. Tanto el aislado como las fracciones sin hidrolizar, presentaron polipéptidos ya descritos en trabajos previos (Abugoch 2006, Martínez y Añón 1996, Castellani 2000, Castellani y col. 2000), mientras que los perfiles de los hidrolizados nos permiten confirmar la proteólisis realizada ya que se observa una mayor cantidad de bandas de pesos moleculares más bajos

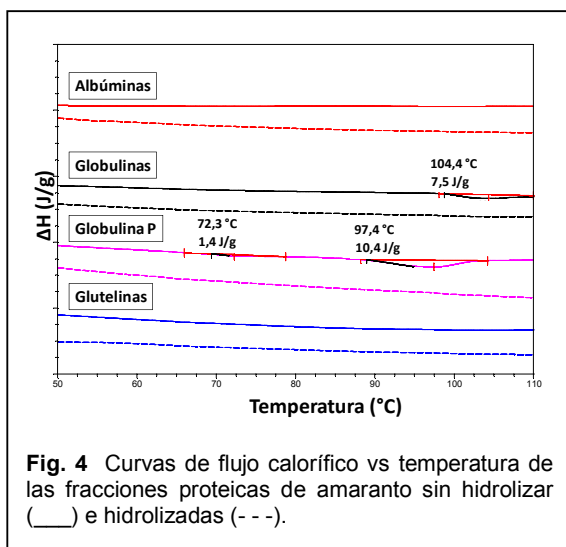
en la zona inferior del gel, junto a la disminución de bandas en la zona superior del gel.

Los *termogramas* obtenidos mediante *calorimetría diferencial de barrido* se observan en las Fig. 3 y Fig. 4. El correspondiente al aislado (Fig. 3) presenta un pico de desnaturalización a  $101,8 \pm 1,6^\circ\text{C}$ , cuya entalpía de desnaturalización ( $\Delta H$ ) resultó de  $10,3 \pm 0,9 \text{ J/g}$ . Esta endoterma correspondería, según lo informado por Martínez y Añón (1996), al pico de mayor temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) de las fracciones globulina y globulina P. En la Fig. 4 se confirma tal suposición dado que los termogramas de dichas fracciones sin hidrolizar presentan picos con  $T_d$  y  $\Delta H$  similares ( $104,4^\circ\text{C}$ ;  $7,5 \text{ J/g}$  y  $97,4^\circ\text{C}$ ;  $10,4 \text{ J/g}$ , respectivamente).



**Fig. 3** Curvas de flujo calorífico vs temperatura del aislado (—) e aislado hidrolizado (---).

A diferencia de lo informado por Martínez y Añón (1996) y Condés y col. (2009), no



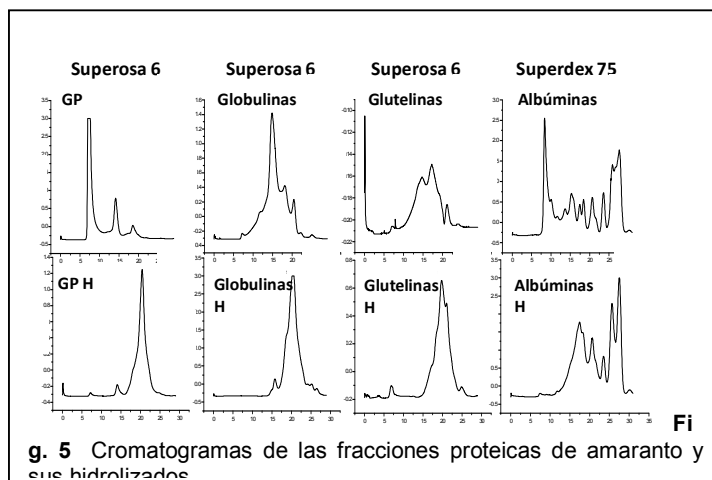
**Fig. 4** Curvas de flujo calorífico vs temperatura de las fracciones proteicas de amaranto sin hidrolizar (—) e hidrolizadas (---).

se observa en el aislado ninguna endoterma a menor temperatura,  $T_d=74^\circ\text{C}$  aproximadamente, la cual se asocia con la desnaturalización de otras fracciones acompañantes de las globulinas 11S y P, pico que puede vislumbrarse en el termograma correspondiente a globulina P sin hidrolizar,  $T_d=72,3^\circ\text{C}$ . En las Fig. 3 y 4 se puede apreciar que no hay picos de desnaturalización en los termogramas de los hidrolizados. La ausencia de ellos indicaría que durante la reacción de hidrólisis ocurren importantes

cambios en la estructura que ocasionan pérdida de la conformación nativa de las proteínas como resultado de la acción de las enzimas empleadas.

La *cromatografía rápida de gel filtración en medio líquido* permite separar fracciones proteicas en base a sus tamaños moleculares. En los cromatogramas obtenidos (Fig. 5) es posible realizar comparaciones entre las distintas fracciones proteicas y sus respectivos hidrolizados. Mientras la globulina P y las globulinas 11S contienen péptidos con elevadas masas moleculares (280-300 kDa según Martínez y col., 1997 y Scilingo y col.; 2002), las albúminas, presentan especies cuyos pesos moleculares son menores a 100 kDa (Fig. 5, línea superior). Los cromatogramas de los hidrolizados proteicos muestran un corrimiento de los picos hacia la derecha con respecto a las fracciones nativas debido a la generación de péptidos con menor tamaño durante la reacción de proteólisis (Fig. 5, línea inferior).

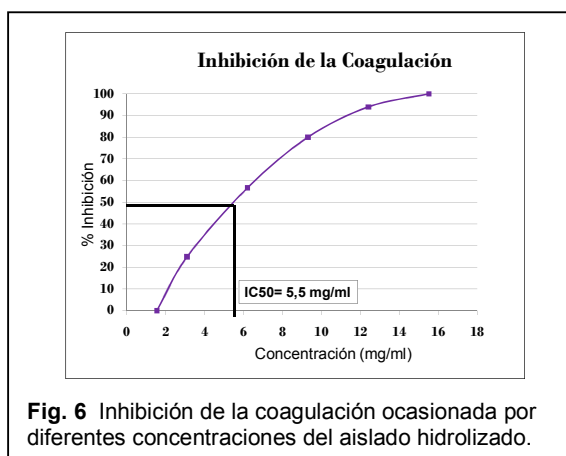




**g. 5** Cromatogramas de las fracciones proteicas de amaranto y sus hidrolizados

Determinación de las actividades biológicas: Mediante el ensayo de las microplacas se determinó la *actividad antirombótica in vitro*. Se obtuvieron las concentraciones que inhiben la formación del trombo en un 50%, IC<sub>50</sub>, (Tabla 3) a partir de las curvas del tipo dosis respuesta %Inhibición vs Concentración. En la Fig. 6 se encuentra, a modo de ejemplo, la curva obtenida del *aislado hidrolizado*.

En las muestras *aislado* y *globulinas* no se alcanzaron concentraciones suficientes como para lograr el 50% de la inhibición y, en el caso de la *globulina P*, el método utilizado demostró no ser capaz de detectar la formación del coágulo mediante medidas de absorbancia a 405nm debido a la turbidez inicial que presentaba dicha fracción.



**Fig. 6** Inhibición de la coagulación ocasionada por diferentes concentraciones del aislado hidrolizado.

Los resultados obtenidos nos indican que la fracción *glutelinas* presenta una poten-

Muestra	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	Muestra hidrolizada	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Aislado	ND*	Aislado	10,9 ± 4,1
Albúminas	10,2 ± 2,9	Albúminas	7,4 ± 2,8
Globulinas	ND*	Globulinas	9,4 ± 2,0
Globulina P	ND*	Globulina P	ND*
Glutelinas	0,1 ± 1,1	Glutelinas	0,8 ± 1,4

**Tabla 3** IC<sub>50</sub> de las fracciones proteicas de amaranto y sus hidrolizados. ND\*,: No detectable por el método de las microplacas.

cial actividad antitrombótica debido a que concentraciones del orden de los µg/ml inhiben el 50% de la coagulación. Estos valores son significativamente inferiores a los informados por Zhang y col. (2008), quienes encontraron IC<sub>50</sub> de 30mg/ml o superior para péptidos de semillas de colza, y por Yang y col. (2006), quienes informaron IC<sub>50</sub> superiores a 50mg/ml en proteínas e hidrolizados de clara de huevo.

cial actividad antitrombótica debido a que concentraciones del orden de los µg/ml inhiben el 50% de la coagulación. Estos valores son significativamente inferiores a los informados por Zhang y

Las *pruebas globales de la hemostasia* nos permitieron obtener los resultados que se muestran en la Tabla 4.

Muestra	TP (s)	Conc. mg/ml	TT (s)	Conc. mg/ml	APTT (s)	Conc. mg/ml
Plasma C	14-14	0	20-19	0	38-36	0
Aislado	15-16	1,8±0,1	21-21	2,7±0,1	59-60	1,8±0,1
Aislado H	18-19	5,4±0,1	40-39	8,1±0,1	54-50	5,4±0,1
Albúminas	18-18	3,7±0,1	25-25	5,6±0,1	84-80	3,7±0,1
Albúminas H	17-18	3,8±0,1	33-33	5,6±0,1	54-52	3,8±0,1
Globulinas	14-15	0,5±0,1	20-20	0,8±0,1	41-41	0,5±0,1
Globulinas H	17-17	2,5±0,1	28-28	3,7±0,1	40-39	2,5±0,1
Globulina P	15-15	2,3±0,1	18-19	3,5±0,1	50-54	2,3±0,1
Globulina P H	15-16	2,2±0,1	23-24	3,3±0,1	42-43	2,2±0,1
Glutelinas	20-23	0,03±0,1	75-87	0,05±0,1	48-50	0,03±0,1
Glutelinas H	15-16	0,4±0,1	30-29	0,5±0,1	40-39	0,4±0,1

**Tabla 4** Tiempo de protrombina (TP), Tiempo de Trombina (TT) y Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT) del aislado y fracciones proteicas de amaranto y sus hidrolizados.

El *tiempo de trombina* evalúa la conversión de fibrinógeno en fibrina debido a la acción de la trombina, por lo que la presencia de sustancias que interfieran en la acción de la trombina sobre el fibrinógeno o las que bloquean la polimerización de los monómeros de fibrina conducen a un prolongamiento del mismo. Si se comparan los resultados obtenidos en dicha prueba frente a aquellos observados en el ensayo de las microplacas se encuentra una importante correlación entre ambos, lo cual es esperable ya que ambos estudian la última etapa del proceso de coagulación. Así, la fracción glutelinas es la que produce el mayor retardo de la formación del coágulo (60 s) a la menor concentración (50µg/ml), seguida de la misma fracción hidrolizada, la cual a 500µg/ml genera un retraso de 10 s.

El *tiempo de protrombina* nos permite evaluar la vía extrínseca de la coagulación. En las muestras estudiadas, a las concentraciones especificadas en la Tabla 4, no se detectaron variaciones respecto del plasma control, a excepción de la fracción glutelinas, que con la menor concentración en plasma logró retrasar la aparición del coágulo por más de 6 s.

El *tiempo de tromboplastina parcial activada* es una prueba sensible a la deficiencia de factores procoagulantes del plasma así como a la presencia de ciertos inhibidores de la coagulación, detecta anomalías en la vía intrínseca. A diferencia de las pruebas TT y TP, los resultados obtenidos del APTT indican que la concentración de la fracción glutelinas no es suficiente para mostrar un efecto sobre la vía intrínseca de la coagulación, mientras que las albúminas fueron capaces de retrasar la formación del trombo por más de 40 segundos a una concentración en plasma menor a los 4mg/ml. Estos resultados no se contradicen con los obtenidos en los otros ensayos, ya que en el APTT se estudian aspectos de la coagulación diferentes de los que se analizan en el resto de las pruebas globales de la

hemostasia. De este modo, diferentes fracciones proteicas producen el máximo retraso en las diferentes pruebas de screening.

En el ensayo de APTT se encontró que las fracciones proteicas sin hidrolizar presentan mayor inhibición de la formación del coágulo que las mismas proteínas hidrolizadas, mientras que en los otros ensayos y a excepción de las glutelinas, los hidrolizados presentaban mayor actividad antitrombótica que las mismas muestras sin hidrolizar.

## V. CONCLUSIONES

- El tratamiento enzimático utilizado genera moléculas de menor masa molecular y de tamaño intermedio. Los productos de hidrólisis presentan diferencias estructurales importantes comparándolas con las proteínas de origen.
- Las proteínas de amaranto presentan potencial actividad antitrombótica que aumenta, en la mayoría de los casos, por el tratamiento enzimático realizado, aportando péptidos con mayor bioactividad.
- La fracción glutelinas y su hidrolizado presentan la máxima inhibición en la formación del trombo en los ensayos microplacas, TT y TP. El mecanismo implicado podría involucrar la inhibición de la actividad de la trombina o el bloqueo de polimerización de los monómeros de fibrina a causa de la unión de los péptidos bioactivos al fibrinógeno.
- La fracción albúminas presenta la máxima inhibición en la formación del trombo en el ensayo APTT.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abugoch L.E: Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Tesis Doctoral. UNLP (2006).
- Adler-Nissen J.: Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 12: 605-623 (1979).
- American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association. Functional foods. *J. Amer. Diet. Assoc.*, 99: 1278-1285 (1999).
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists Inc.. Official Methods of Analysis, ed. 14. Ed Williams S., Arlington, VA. Método 2057, 16 (1984).
- Barba de la Rosa A.P., Gueguen J., Paredes-López O., Viroben G.: Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 931-936 (1992).
- Barrio D.A., Añón M.C.: Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. *Eur. J. Nutr.* DOI 10.1007/s00394-009-0051-9 (2009).
- Castellani O.F.: Caracterización estructural y fisicoquímica de la Globulina-P de amaranto. Tesis doctoral. UNLP (2000).

- Castellani O.F., Martínez N.E., Añón M.C.: Globulin-P structure modifications induced by enzymatic proteolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 5624-5629 (2000).
- Condés M.C., Scilingo A., Añón M.C.: Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes. *Food Sci. Tech.*, 42: 963-970 (2009).
- Davis H. Compendium of rice diseases. University of California, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, EEUU, 62 (1992).
- Erdmann E., Dormandy J.A., Charbonnel B., Massi-Benedetti M., Moules I.K., Skene A.M.: The effect of pioglitazone on recurrent myocardial infarction in 2,445 patients with type 2 diabetes and previous myocardial infarction: results from the proactive study. *J Am Coll. Cardiol.*, 49: 1772- 1780 (2007).
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275 (1951).
- Marcone M.F.: First report of the characterization of the threatened plant species *Amaranthus pumilus* (Seabeach Amaranth). *J. Agric. Food Chem.*, 48: 378-382 (2000).
- Martínez N.E., Añón M.C.: Composition and structural characterization of amaranth proteins isolates. Electrophoretic and calorimetric study. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 2523-2530 (1996).
- Martínez N.E., Castellani O.F., Añón M.C.: Common molecular features among amaranth storage proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 3832-3839 (1997).
- Nkonge, Ch. and Ballance, M. A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-Kjeldahl digests. *J. Agric. Food. Chem.* 30:416-420 (1982).
- Osborne T. The vegetable proteins. 2da edición ed. Longans y Green, Nueva Cork (1924).
- Paredes-López O.: Amaranth: Biology, Chemistry and Technology. CRC Press (1994).
- Salnikow J., Zemser M., Gorinstein S., Friedman M., Scheler Ch., Paredes-López O.: Structure-function relationships of folded and unfolded amaranth proteins. *J. Prot. Chem.*, 17: 543-545 (1998).
- Schägger H.: Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1:16-22 (2006).
- Scilingo A., Molina Ortiz S.E., Martínez N.E., Añón M.C.: Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. *Food Res. Int.*, 35: 855-862 (2002).
- Segura-Nieto M., Vázquez-Sánchez N., Rubio-Velázquez H., Olgún-Martínez L.E., Rodríguez-Néster C.E., Herrera-Estrella L.: Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 1553-1558 (1992).
- Vecchi B.: Actividad antihipertensiva de péptidos derivados de proteínas de amaranto. Tesis de grado. UNLP (2007).
- Vecchi B., Añón M.C.: ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochem.*, 70: 864-870 (2009).
- Yang W.G., Wang Z., Xu S.Y.: A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chin. Chem. Lett.*, 18: 449-451 (2006).
- Zhang S.B., Wang Z., Xu S.Y.: Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85: 521-527 (2008).