

UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS  
EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

2018

Péptidos  
antihipertensivos  
de proteínas de  
amaranto. Estudio  
de emulsiones y  
galletitas como  
sistemas  
funcionales.

---

**TESIS DOCTORAL SANTIAGO SUÁREZ**

**DIRECTORA M. CRISTINA AÑÓN**





*UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA*

*FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS*

*DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS*

---

***Trabajo de Tesis Doctoral:***

**PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS DE  
PROTEINAS DE AMARANTO. ESTUDIO DE  
EMULSIONES Y GALLETITAS COMO  
SISTEMAS FUNCIONALES**

---

***Tesista: Lic. Santiago E. Suárez***

***Directora: Dra. María Cristina Añón***

***Año: 2018***

El presente trabajo, para optar por el grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CIC-CONICET, La Plata, Argentina) bajo la dirección de la Dra. María Cristina Añón.



**CIDCA**



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

# **AGRADECIMIENTOS**

*A la Universidad pública y gratuita que me permitió acceder a los estudios superiores y optar por el grado de Doctor.*

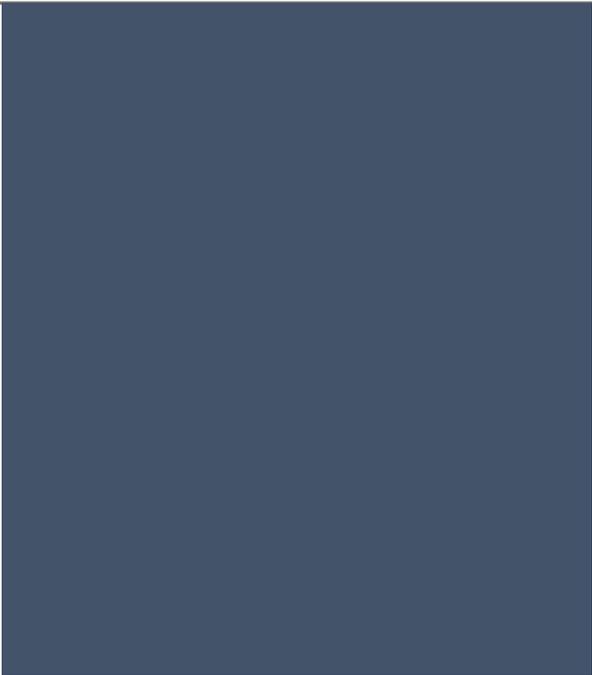
*Al CONICET por haberme otorgado una beca para poder realizar mis investigaciones.*

*A mi Directora de Tesis, Cristina, que con su garra y responsabilidad me transmitió mucho más que conocimiento disciplinar. Por las discusiones, reflexiones y por sobre todas las cosas su compromiso.*

*A todas las personas que conocí en la Facultad de Ciencias Exactas a través de la docencia y extensión, sin duda mi formación y trayectoria por la Facultad no hubieran sido las mismas.*

*A todos/as mis compañeros/as de trabajo del CIDCA por los momentos de trabajo y distensión compartidos. Fueron cinco años en los que me llevo muchas amistades.*

*A todas aquellas personas que creen y luchan por una Universidad pública y gratuita de calidad, y por producir conocimiento en el marco de proyectos soberanos de ciencia.*



# ÍNDICE

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Hipertensión	2
1.2. Regulación de la presión sanguínea	3
1.3. Alimentos funcionales	5
1.4. Péptidos bioactivos	6
1.5. El grano de amaranto	9
1.5.1. Componentes nutricionales del amaranto	10
1.5.2. Proteínas del amaranto	12
1.5.3. Péptidos antihipertensivos identificados en amaranto	14
1.6. Biodisponibilidad de péptidos bioactivos	15
1.7. Emulsiones como sistemas transportadores de péptidos bioactivos	17
1.7.1. Definición de emulsión	17
1.7.2. Formación de una emulsión	19
1.7.3. Desestabilización de una emulsión	19
1.7.3.1. Cremado/Sedimentación	20
1.7.3.2. Floculación	21
1.7.3.3. Coalescencia	22
1.7.3.4. Desproporción de Ostwald	22
1.8. Galletitas de amaranto como sistema funcional	23
<b>1.9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO 1. EMULSIONES A BASE DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS DE AMARANTO</b>	<b>36</b>
<b>I. Introducción al capítulo</b>	<b>37</b>
<b>I.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	<b>39</b>
<b>I.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
I.2.1. Materiales y muestras de amaranto	40
I.2.1.1. Obtención de la harina de amaranto	40
I.2.1.2. Preparación de los aislados proteicos de amaranto	40
I.2.1.3. Preparación de los hidrolizados proteicos	40
I.2.2. Determinación del grado de hidrólisis (%GH)	41
I.2.2.1. Método del ortoftaldehído (OPA)	41
I.2.3. Caracterización de las muestras	42
I.2.3.1. Determinación del contenido de proteína total	42
I.2.3.2. Determinación del contenido de humedad	42
I.2.3.3. Determinación del contenido de minerales	42

I.2.4. Soluciones tampones utilizadas	42
I.2.5. Solubilidad	42
I.2.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	43
I.2.6.1. Principio	43
I.2.6.2. Operación	44
I.2.7. Tensiómetro de volumen de gota pendiente	44
I.2.7.1. Principio	44
I.2.7.2. Procedimiento experimental	45
I.2.8. Tensiómetro de gota dinámico	46
I.2.8.1. ¿Cómo se determina la tensión interfacial de una gota utilizando el Tracker?	46
I.2.8.2. Ecuación de la gota en el punto M	47
I.2.8.3. Constantes de absorción y reordenamiento de proteína en la interface y tensión de equilibrio	48
I.2.8.4. Propiedades reológicas de las películas interfaciales: Parámetros viscoelásticos	48
I.2.8.5. Procedimiento experimental	50
I.2.9. Medida del Potencial Zeta	50
I.2.9.1. Fundamento teórico	51
I.2.10. Preparación de emulsiones con APA	52
I.2.11. Preparación de emulsiones con APA e HA	53
I.2.12. Distribución del tamaño de gotas	53
I.2.12.1. Principio	53
I.2.12.2. Operación	53
I.2.12.3. Tratamiento de los resultados	54
I.2.13. Estabilidad de emulsiones	55
I.2.13.1. Principio del QuickScan	55
I.2.13.2. Operación	56
I.2.14. Viscosidad de las emulsiones	57
I.2.15. Microscopia confocal láser de barrido	58
I.2.15.1. Observación microscópica	58
I.2.15.2. Preparación de las muestras	59
I.2.16. Análisis estadístico	60
<b>I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
I.3.1. Caracterización de las proteínas presentes en las dispersiones y soluciones de APA- pH 2,0 y APA- pH 6,3	61

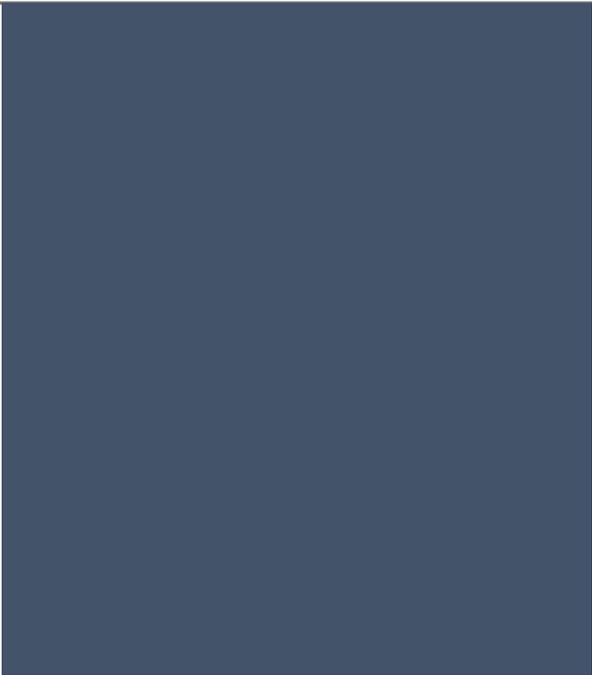
I.3.1.1 Solubilidad	61
I.3.1.2. Calorimetría diferencial de barrido	61
I.3.1.3. Potencial Zeta	63
I.3.2. Comportamiento interfacial de las soluciones proteicas en la interface aceite-agua	64
I.3.3. Emulsiones formuladas con Aislado proteico de amaranto	67
I.3.3.1. Propiedades emulsificantes	67
I.3.3.1.1. Distribución del tamaño de gotas	67
I.3.3.1.2 Viscosidad y comportamiento reológico de las emulsiones	72
I.3.3.1.3 Estabilidad global de las emulsiones	74
I.3.3.1.4 Microscopia confocal de las emulsiones	79
I.3.4. Caracterización de las proteínas presentes en las dispersiones de APA-pH 2,0 y HA-pH 2,0	82
I.3.4.1. Tensiómetro de gota	82
I.3.5. Emulsiones formuladas con aislado proteico de amaranto más hidrolizado de amaranto	84
I.3.5.1. Propiedades emulsificantes	84
I.3.5.1.1. Distribución del tamaño de gotas	84
I.3.5.1.2. Estabilidad global de las emulsiones	86
I.3.5.1.3. Microscopia confocal de las emulsiones	87
<b>I.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO</b>	<b>88</b>
<b>I.5 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>89</b>
<b>CAPÍTULO 2. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA DE EMULSIONES TRANSPORTADORAS DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS</b>	<b>93</b>
<b>II. Introducción al capítulo</b>	<b>94</b>
<b>II.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>96</b>
<b>II.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>97</b>
II.2.1. Ensayos de estabilidad gastrointestinal de las emulsiones o/w	97
II.2.2. Medición de los ácidos grasos libres	98
II.2.3. Extracción de la ECA a partir de pulmón de conejo	98
II.2.4. Actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)	99
II.2.4.1. Ajuste de las curvas de inhibición	101
II.2.5. Ensayos <i>in vivo</i>	102
II.2.5.1. Diseño experimental	102
II.2.5.2. Preparación de la emulsión en estudio	104
II.2.5.3. Medida indirecta de la presión arterial	105

II.2.5.4. Procedimiento quirúrgico	106
II.2.5.5. Medición de la contracción del músculo liso vascular aislado	108
II.2.5.6. Cuantificación de la enzima convertidora de angiotensina en plasma	109
II.2.5.6.1. Procedimiento	111
II.2.6. Análisis estadístico	112
<b>II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>113</b>
II.3.1. Digestión gastrointestinal simulada de las emulsiones con APA	113
II.3.1.1. Distribución de tamaño de partícula	113
II.3.1.2. Liberación de ácidos grasos	121
II.3.2. Digestión gastrointestinal simulada de las emulsiones con APA+HA	123
II.3.2.1. Distribución del tamaño de partícula	123
II.3.3. Ensayos de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina	125
II.3.3.1. Ensayos de inhibición utilizando hidrolizado de amaranto como inhibidor	125
II.3.3.2. Ensayos de inhibición utilizando captopril como inhibidor	128
II.3.3.3. Ensayos de inhibición utilizando emulsiones como transportadoras de péptidos inhibidores	131
II.3.4. Ensayos <i>in vivo</i>	135
II.3.4.1. Medición indirecta de la presión arterial	135
II.3.4.2. Medición de la contracción del músculo liso vascular aislado	140
II.3.4.2.1. Reactividad de anillos de aorta frente al tratamiento con Potasio y norepinefrina	140
II.3.4.3. Cuantificación de la enzima convertidora de angiotensina en plasma	142
<b>II.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO</b>	<b>146</b>
<b>II.5. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>147</b>
<b>CAPÍTULO 3. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA <i>IN VITRO</i> DE GALLETITAS ELABORADAS A BASE DE HARINA DE AMARANTO</b>	<b>155</b>
<b>III. Introducción al capítulo</b>	<b>154</b>
<b>III.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>156</b>
<b>III.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>157</b>
III.2.1. Elaboración de la masa y galletitas	157
III.2.2. Composición centesimal de la harina, masa y galletitas	158
III.2.2.1. Humedad	158
III.2.2.2. Cenizas	158
III.2.2.3. Proteínas	158

III.2.2.4. Lípidos	158
III.2.2.5. Hidratos de carbono	158
III.2.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	159
III.2.4. Caracterización de la harina	159
III.2.4.1. Ensayo de absorción de agua	159
III.2.4.2. Capacidad de retención de solventes	160
III.2.5. Caracterización de la masa	160
III.2.5.1. Ensayos dinámicos en reómetro oscilatorio	160
III.2.5.2. Microscopia confocal de la masa	163
III.2.6. Caracterización de las galletitas	163
III.2.6.1. Factor Galletita	163
III.2.6.2. Actividad acuosa	163
III.2.6.3. Ensayos de textura	164
III.2.6.4. Medición del color de las galletitas	166
III.2.7. Bioactividad de la harina y galletitas	167
III.2.7.1. Digestión gastrointestinal	167
III.2.7.2. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina	168
III.2.8. Análisis estadístico	168
<b>III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>169</b>
III.3.1. Caracterización de la harina de amaranto	169
III.3.1.1. Composición centesimal	169
III.3.1.2. Parámetros térmicos	170
III.3.1.3. Capacidad de retención de solventes	172
III.3.1.4. Capacidad de imbibición de agua (WIC)	173
III.3.2. Caracterización de la masa	175
III.3.2.1. Características reológicas	175
III.3.2.2. Composición centesimal y parámetros térmicos	177
III.3.2.3. Microscopia confocal	178
III.3.3. Caracterización de las galletitas	180
III.3.3.1. Composición centesimal y parámetros térmicos	180
III.3.3.2. Factor galletita	180
III.3.3.3. Medida del color	181
III.3.3.4. Actividad acuosa	182
III.3.3.5. Textura de galletitas	183
III.3.3.5.1. Estabilidad en el tiempo de almacenamiento	183
III.3.4. Actividad antihipertensiva de la harina y galletitas	186

III.3.4.1. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina	186
<b>III.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO</b>	<b>190</b>
<b>III.5. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>191</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>196</b>

---



# INTRODUCCIÓN

---

## 1. INTRODUCCIÓN

***A continuación se hará una descripción general del problema de la hipertensión en el mundo y en nuestra región, la utilización de compuestos bioactivos derivados de proteínas alimentarias como posible abordaje preventivo y las estrategias necesarias para poder elaborar un potencial alimento funcional a base de amaranto.***

### 1.1. Hipertensión

La hipertensión arterial (HTA), también conocida como tensión arterial alta o elevada, es un trastorno en el que los vasos sanguíneos soportan una presión persistentemente alta. Cada vez que el corazón late, bombea sangre a los vasos, que la distribuyen a todas las partes del cuerpo. La tensión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos (arterias) al ser bombeada por el corazón. Cuanto más alta es la tensión, más esfuerzo tiene que realizar el corazón para bombear. La tensión arterial se mide en milímetros de mercurio (mm Hg) y se registra en forma de dos números separados por una barra. El primero corresponde a la tensión arterial sistólica, la más alta, que se produce cuando el corazón se contrae. El segundo corresponde a la tensión arterial diastólica, la más baja, que se produce cuando el músculo cardíaco se relaja entre un latido y otro. La tensión arterial normal en un adulto se define como una tensión sistólica de 120 mm Hg y una tensión diastólica de 80 mm Hg (120/80 mm Hg) (OMS, 2013).

La hipertensión, HTA, es una preocupación a nivel mundial debido a que afecta a aproximadamente el 30% de la población adulta tanto en países desarrollados como en desarrollo. La hipertensión es el mayor factor de riesgo de las enfermedades cardiovasculares, si no se controla, la hipertensión puede provocar infarto de miocardio, hipertrofia ventricular y, finalmente, insuficiencia cardíaca. En los vasos sanguíneos, la presión alta puede provocar dilataciones (aneurismas) y zonas de debilidad en la pared vascular, lo que aumenta las probabilidades de obstrucción y rotura. La presión en los vasos sanguíneos también puede causar fugas de sangre hacia el cerebro y esto puede provocar accidentes cerebrovasculares. Además, la hipertensión puede provocar insuficiencia renal, ceguera, rotura de los vasos sanguíneos y deterioro cognitivo (Kearney y col., 2004).

A nivel global, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año, casi un tercio del total (Hernández-Ledesma y col., 2011). Entre ellas, las complicaciones de la hipertensión causan anualmente 9,4 millones de muertes (OMS, 2013).

En la Argentina la situación de la hipertensión es similar a lo mostrado por las estadísticas globales, se estima que es hipertenso alrededor de un tercio de la población urbana mayor de 15-20 años y que no ha habido modificaciones sustanciales en la prevalencia de la HTA en los últimos 25 años (Carbajal, 2013). Según el análisis llevado adelante por Carbajal, en donde reúne información de varios estudios del país metodológicamente diferentes en cuanto a la toma de la presión, la prevalencia de la hipertensión varió entre el 29% y el 39,8%, durante los últimos 25 años. Según el último estudio realizado en el año 2015 por la Sociedad Argentina de Cardiología y el Consejo Argentino de Hipertensión Arterial denominado RENATA-2 (Registro Nacional de la Presión Arterial) se observó que un tercio de la población evaluada es hipertensa y que la HTA es más frecuente en hombres. A su vez, un alto porcentaje de pacientes no conocían su enfermedad (38,8%). (Boletín de la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial, 2016).

La hipertensión esencial o primaria es el tipo más común de hipertensión y se manifiesta como un aumento en la presión arterial debido a una causa desconocida, la misma engloba el 90-95% de los casos. Esta clase de hipertensión se puede mejorar y controlar modificando factores conductuales como por ejemplo el ejercicio físico regular, una alimentación saludable, no fumando, reduciendo la ingesta de sodio y el nivel de estrés. Por estos motivos, se define como un factor de riesgo controlable de las enfermedades cardiovasculares (Norris y col., 2013).

Normalmente la hipertensión es tratada con diversos medicamentos sintéticos que afectan sitios claves de las vías metabólicas relacionadas particularmente con el sistema renina-angiotensina (SRA). Entre este tipo de medicamentos se encuentran los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), los  $\beta$ -bloqueantes, diuréticos y bloqueantes de los receptores de angiotensina-II. Si bien estos medicamentos son eficaces y bien tolerados por los pacientes, son caros y pueden producir ciertas alteraciones secundarias a corto y largo plazo como producción de tos, erupciones cutáneas, hipercalemia, pérdida del gusto, apnea del sueño, disfunción eréctil y angioedema (Houston, 2005).

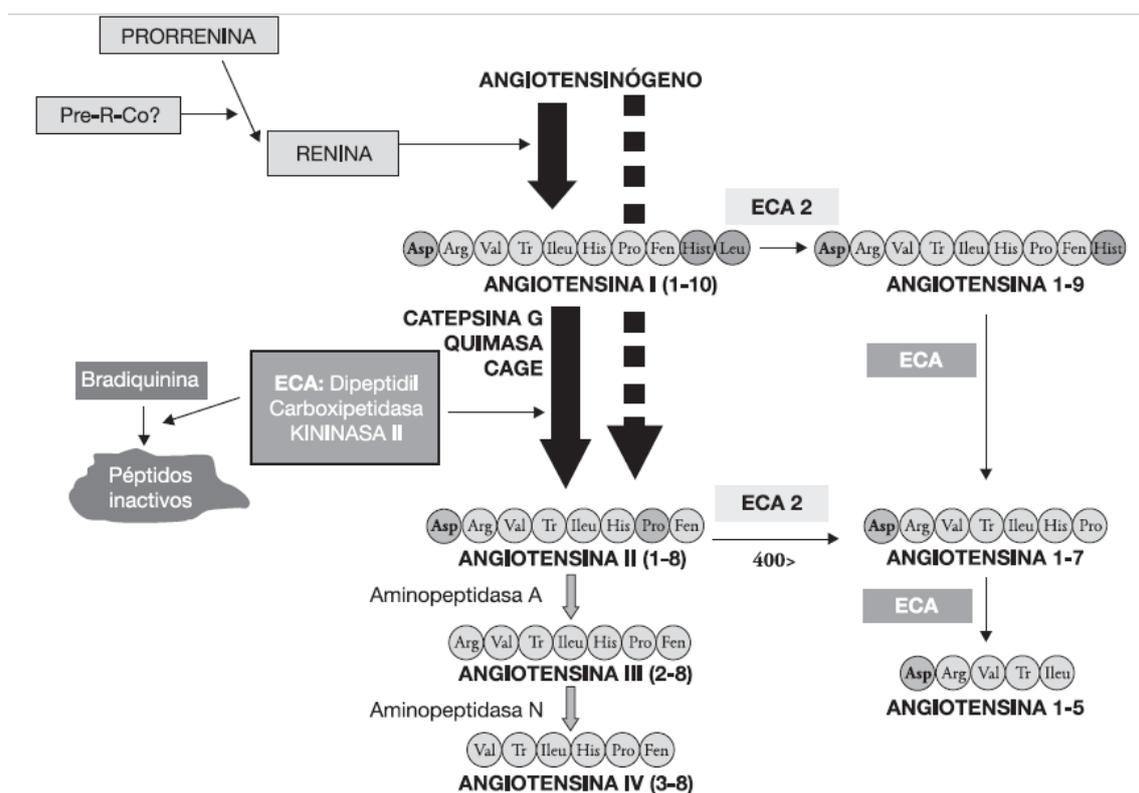
## **1.2. Regulación de la presión sanguínea**

Los mecanismos involucrados en la regulación de la presión sanguínea (PS) son complejos incluyendo varias vías metabólicas. La vía más estudiada involucra la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Esta enzima es una de las más importantes reguladoras de la presión sanguínea y se encuentra presente en dos de los principales sistemas reguladores, el sistema renina-angiotensina (SRA) y el

sistema quinina-óxido nítrico (SQNO). La inhibición de la ECA en estos sistemas conduce a la dilatación de las paredes arteriales o a la vasodilatación y posterior descenso de la PS. Sin embargo, aún no se sabe si este es el principal mecanismo seguido *in vivo* o si hay otros mecanismos de control de la PS involucrados (Martínez-Maqueda y col., 2012).

El sistema renina-angiotensina juega un rol fundamental en la regulación de la presión arterial y el balance hidroelectrolítico. En su concepción básica, el SRA es una cascada proteolítica de péptidos escalonados secuencialmente, conectada a un sistema de transducción de señales (**Fig. 1**).

El sistema está regulado por dos proteasas: la renina y la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La renina (EC 3.4.23.15) es una enzima de 37 kDa que es liberada por el riñón e hidroliza el péptido angiotensinógeno (una proteína de 55 kDa sintetizada en el hígado) para producir el decapeptido fisiológicamente inactivo angiotensina-I. La ECA (EC 3.4.15.1) convierte el decapeptido angiotensina-I en angiotensina-II (octapeptido), un potente vasoconstrictor, que se une a los receptores (AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>) de la pared vascular ubicados en los tejidos periféricos alrededor del cuerpo y el cerebro, para causar la contracción de los vasos sanguíneos (Norris y FitzGerald, 2013). La angiotensina-II ejerce acción sobre varios órganos: riñón, sistema suprarrenal, sistema vascular periférico, corazón y sistema nervioso. En el organismo (sobre todo en los glóbulos rojos) existen aminopeptidasas, que inactivan a la angiotensina-II, que tiene una corta vida de aproximadamente un minuto. Estas peptidasas la convierten en angiotensina-III (heptapeptido con el 50% de la actividad presora de la primera), y el hexapeptido angiotensina-IV, considerado inactivo. Además de la formación de angiotensina-II por la ECA en el plasma, debe tenerse en cuenta la existencia de sistemas renina-angiotensina locales o tisulares (Fritz, 2009). Durante la hipertensión la actividad enzimática de renina y ECA se encuentran aumentadas lo que genera como consecuencia niveles anormalmente altos en sangre de angiotensina-II, conduciendo a una contracción excesiva de los vasos sanguíneos. En el sistema SQNO la ECA escinde e inactiva los péptidos vasodilatadores bradiquinina y calidina. La bradiquinina se une a los β-receptores que conducen a un eventual aumento en el nivel de Ca<sup>+2</sup> intracelular. La unión de bradiquinina a β-receptores y el aumento de Ca<sup>+2</sup> estimula la óxido nítrico sintasa (NOS) para convertir a la L-arginina en óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador. La ECA puede, por lo tanto, inhibir indirectamente la producción de NO ya que hidroliza la bradiquinina en fragmentos inactivos. (Norris y FitzGerald, 2013).



**Figura 1.** Cascada enzimática del sistema renina-angiotensina mostrando prorenina y sitios de acción de la renina y las enzimas convertidoras de angiotensina ECA y ECA-2. Fuente: Sociedad Argentina de Hipertensión.

En resumen, la angiotensina-II es el componente con mayores efectos biológicos del SRA. La inhibición de ECA, por lo tanto, induce una disminución de la presión arterial al aumentar los niveles de bradiquinina y disminuir los de angiotensina II (Rice y col., 2004). Altos niveles de ECA pueden incrementar la vasoconstricción y consecuentemente el desarrollo de alta presión sanguínea con el acompañamiento de síntomas patológicos (Tovar-Pérez y col., 2009).

### 1.3. Alimentos funcionales

Una de las alternativas para disminuir la prevalencia de la hipertensión es el cambio de los hábitos dietarios y el aumento del consumo de ingredientes funcionales que ayuden a disminuir y/o regular la tensión arterial en el organismo (OMS, 2013).

El concepto de alimento funcional surge a partir de los años '80, en Japón, donde comienza a existir preocupación por el incremento de los gastos en salud, consecuencia del aumento de la expectativa de vida de sus habitantes. Por este motivo se planteó como objetivo la obtención de productos que provean los nutrientes

necesarios para evitar carencias y mejorar la calidad de vida de los adultos mayores. Existen diferentes definiciones en la bibliografía, la más ampliamente utilizada fue propuesta por el ILSI (International Life Science Institute) que los definió de la siguiente forma: *“un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas”* (Dipplock y col., 1999).

En general los beneficios para la salud están asociados con la reducción del riesgo de padecer una determinada enfermedad. El alimento aporta componentes con una determinada funcionalidad o actividad fisiológica además de sus nutrientes característicos y debe formar parte de una dieta normal o un patrón de consumo de una región geográfica y/o contexto cultural. Esto significa que lo que es considerado un alimento funcional en un país dado no necesariamente lo es en otro. Existen alimentos funcionales naturales y otros que pueden convertirse en funcionales durante su procesamiento (Roberfroid, 2000).

Desde un punto de vista práctico un alimento funcional puede ser:

- Un alimento natural
- Un alimento al cual se le añade un componente
- Un alimento al cual se le sustrae algún componente
- Un alimento en el que la naturaleza de uno o más componentes ha sido modificada
- Un alimento en donde la biodisponibilidad de uno o más componentes ha sido modificada
- O una combinación de las posibilidades anteriores

Los alimentos funcionales pueden contener componentes de diferente naturaleza con probada actividad fisiológica, denominados compuestos bioactivos. Dentro de este conjunto de sustancias se encuentran las proteínas alimentarias y los péptidos encriptados en su secuencia. En los últimos años se ha evidenciado una tendencia creciente e interés en la utilización de péptidos derivados de proteínas alimentarias debido a su variedad y remarcable multifuncionalidad (Martinez-Maqueda y col., 2012; Udenigwe y Aluko, 2012).

#### **1.4. Péptidos bioactivos**

Existen numerosos estudios publicados en la literatura que documentan la bioactividad de péptidos derivados de fuentes alimentarias proteicas. Los primeros descubrimientos

de péptidos derivados de alimentos fueron obtenidos a partir de productos lácteos (Nongonierma y FitzGerald, 2016). Las proteínas de origen animal, debido a su alta calidad, han sido ampliamente estudiadas como fuente de péptidos bioactivos (Escudero y col., 2010; Udenigwe y Howard, 2013). Subproductos conteniendo proteínas provenientes de la faena de animales, industria pesquera, agua residuales de aceitunas, suero de queso, etc. también han sido estudiados como fuentes potenciales de péptidos bioactivos (Mora y col., 2015; Ryder y col., 2016); así como hidrolizados de proteínas de huevo, soja y maní (Tanzadehpanah y col., 2012; Ji y col., 2014; De Oliveira y col., 2015).

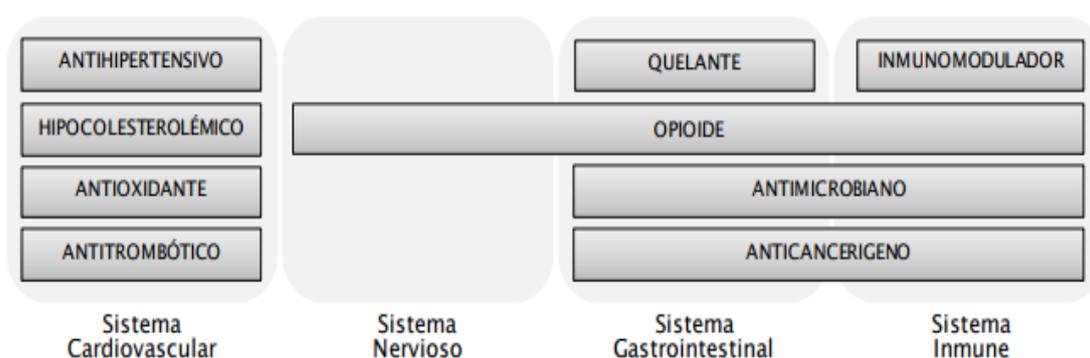
Hay dos criterios que actualmente son los más utilizados para seleccionar proteínas alimentarias como fuentes de péptidos bioactivos, por un lado se busca aumentar el valor agregado de fuentes subutilizadas o subproductos de la industria alimentaria ricos en proteínas y por otro utilizar proteínas que contengan secuencias de péptidos específicos o residuos de aminoácidos de particular interés farmacológico. La combinación de estos dos criterios puede conducir a la selección de fuentes proteicas que se utilicen para la producción de secuencias peptídicas potentes y bien definidas (Udenigwe y Aluko, 2012).

Existen diferentes metodologías para obtener péptidos bioactivos *in vitro*. Los péptidos pueden ser liberados mediante una hidrólisis enzimática durante una digestión gastrointestinal simulada utilizando la acción secuencial de pepsina y pancreatina entre otras enzimas (Hernández-Ledesma y col., 2011). También pueden ser liberados mediante fermentación de los alimentos adicionando un starter o haciendo uso de la flora nativa del alimento; las bacterias lácticas han sido ampliamente utilizadas para este fin. Una de las estrategias más empleadas a escala de laboratorio para la obtención de péptidos con actividad fisiológica es la hidrólisis enzimática. Se han utilizado con éxito enzimas de origen animal (tripsina, pepsina), vegetal (papaína, bromelina) y microbiano (alcalasa) solas o en combinación, para lograr una mayor degradación proteolítica (Morris Quevedo y col., 2001). Cada una de ellas requiere determinadas condiciones (pH, temperatura, tiempo, etc.) para generar como producto final perfiles peptídicos únicos. A su vez se pueden utilizar diferentes técnicas como las altas presiones hidrostáticas, el tratamiento térmico o el ultrasonido para modificar la estructura proteica e incrementar la hidrólisis enzimática.

El parámetro más usado para describir el resultado de un proceso de hidrólisis es el grado de hidrólisis (GH). Este parámetro se define como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos en relación a los que contiene la proteína original. Los hidrolizados proteicos que se producen en el campo de la alimentación presentan bajo

grado de hidrólisis, entre 1% y 10%, cuando se desea mejorar las propiedades tecnofuncionales, o alto grado de hidrólisis, superior al 10%, cuando se desea utilizarlos en alimentación especializada y/o como fuente de péptidos bioactivos (Benítez y col., 2008).

Se han descrito una gran variedad de actividades biológicas atribuidas a péptidos provenientes de proteínas alimentarias. Entre ellas podemos mencionar la actividad antihipertensiva, antitrombótica, hipocolesterolémica, antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena y actividad opioide. Las mismas se pueden agrupar de acuerdo al sistema fisiológico sobre el cual ejercen su efecto, tal como se muestra en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Efecto de los péptidos bioactivos en los principales sistemas del organismo

La presencia de bioactividad depende de la secuencia aminoacídica y del tamaño de los péptidos, que generalmente varía entre 2 y 20 aminoácidos, aunque en algunos casos puede consistir en más de 20 aminoácidos. Un ejemplo es la lunasina, péptido con actividad antitumoral de 43 aminoácidos (De Lumen, 2005). La bioactividad específica de los péptidos alimentarios depende además de sus propiedades estructurales y de las características fisicoquímicas de los residuos de aminoácidos constituyentes como por ejemplo: hidrofobicidad, carga molecular y del volumen de la cadena lateral (Pripp y col., 2005).

El hecho de que los biopéptidos provengan de diferentes fuentes de origen animal y vegetal, abre un campo muy interesante para revalorizar fuentes alimentarias poco explotadas. El amaranto, así como otros granos de origen andino resulta en este sentido un cultivo que reviste mucho interés, tanto por su potencial agronómico como por el alto valor nutricional de sus hojas y semillas. Por otra parte en los últimos años distintos estudios han mostrado la potencialidad de péptidos bioactivos encriptados en las proteínas presentes en el grano, lo que ha renovado y dado nuevo impulso a este

antiguo cultivo (Silva-Sánchez y col., 2008; Tiengo y col., 2009; Fritz y col., 2011; Venskutonis y Kraujalis, 2013; Orsini Delgado y col., 2016; Tang y Tsao, 2017).

### 1.5. El grano de amaranto

La globalización de la agricultura y en consecuencia su industrialización parecen inexorables, con efectos secundarios negativos en todo el mundo. Estos efectos incluyen, pero no se limitan, el desarrollo tecnológico sesgado del uso de solo algunas especies de plantas altamente fértiles, alta demanda energética con el uso intensivo de fertilizantes, la producción de monocultivos y de esta manera una reducción en la diversidad genética de la agricultura. Como consecuencia, la seguridad alimentaria mundial se ha vuelto cada vez más dependiente de solo un puñado de cultivos. La humanidad a lo largo de su historia ha utilizado más de 10,000 especies comestibles y en la actualidad solo se comercializan 150 especies de plantas a escala global de manera significativa. Sólo 12 de ellas proporcionan aproximadamente el 80% de la energía alimentaria y más del 60% del requerimiento global de proteínas siendo las calorías satisfechas solo por cuatro especies: arroz, trigo, maíz y papa (FAO, 2005). La reducción del número de cultivos de los que dependen la seguridad alimentaria mundial y el crecimiento económico ha puesto en peligro la oferta futura de alimentos y los ingresos rurales. Los hechos mencionados conllevan profundas consecuencias ambientales y la preocupación por la pérdida de variedades de cultivos. Esto ha estimulado a las organizaciones y científicos de todo el mundo a recuperar, investigar y difundir el conocimiento en la producción y utilización de especies de plantas desatendidas, subexplotadas y nuevas, o los llamados cultivos alternativos. Los cultivos alternativos son especies de plantas que se utilizan tradicionalmente para la alimentación, forraje, obtención de aceites y/o propiedades medicinales (Mlakar y col., 2010). En este sentido, el grano de amaranto ha sido revalorizado en las últimas décadas como cultivo alternativo con buena calidad nutricional y su valor ha ido creciendo en los últimos años debido a diversas investigaciones que dan cuenta de la presencia de compuestos bioactivos en su composición.

Los granos de amaranto están ampliamente distribuidos en las regiones templadas y tropicales de todo el mundo, pero, de acuerdo con Sauer (1950), las tres principales especies de amaranto se encuentran en América Central y del Sur: *Amaranthus hypochondriacus* es nativa de la zona noroeste y central de México, *Amaranthus caudatus* es nativa de los Andes, y *Amaranthus cruentus* es del sur de México y la región central de Guatemala. Con la colonización de América por los españoles, y la imposición del catolicismo, el amaranto fue prohibido de manera de limitar las

creencias paganas con lo cual cayó en desuso. En 1975 la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos (United Academy of Sciences, 1975) llevó a cabo un estudio por el cual consideró al amaranto como un cultivo poco explotado y con futuro potencial por su capacidad de crecer en zonas desfavorables y sus propiedades nutricionales. Los estudios sobre la utilización y el valor nutricional del amaranto comenzaron en la década de 1970, cuando los investigadores de ese entonces lo describieron como un cultivo con un valor económico prometedor (Sciences, 1984) y el interés creció más cuando en la década de 1980 se descubrió que era una fuente potencial de proteínas de alta calidad y con componentes nutritivos sobresalientes (Segura-Nieto y col., 1992; Tucker, 1986; Mlakar y col., 2010).

El género *Amaranthus* (L.) pertenece al orden Caryophyllales y a la familia Amaranthaceae que incluye plantas herbáceas dicotiledóneas C4 (Mlakar y col., 2010). Las dicotiledóneas son plantas con dos hojas embrionarias en sus semillas, diferentes a las monocotiledóneas gramíneas, familia a la que pertenecen los cereales como el arroz, el maíz y el trigo (Mlakar y col., 2010). Las dicotiledóneas no contienen proteínas generadoras de gluten y son fácilmente digeribles, razón por la cual su consumo, sobre todo en países europeos donde la incidencia de la enfermedad celíaca es alta, ha aumentado y se ha promovido en los últimos años. El amaranto tiene algunas ventajas agronómicas que incluyen un crecimiento rápido y cierta resistencia y tolerancia a condiciones extremas y suelos pobres. Las plantas de amaranto tienen una notable capacidad para adaptarse a condiciones de crecimiento desfavorables, como suelos con baja concentración de nutrientes, arenosos, un amplio rango de temperatura e irradiación (Orona-Tamayo y Paredes-López, 2016). Las semillas, contenidas en los frutos, son levemente lenticulares y de tamaño muy pequeño, aproximadamente 2 mm de diámetro. Se pueden encontrar semillas de diversos colores, desde el negro pasando por el rojo, hasta el marfil y el blanco. El amaranto es capaz de realizar fotosíntesis con alta eficiencia, ya que al ser una planta C4 su mecanismo de fijación de carbono supera al resto de las plantas. Las plantas tipo C4 crecen, en general, más rápidamente, responden bien a condiciones ambientales adversas y utilizan más eficientemente el agua consumida para formar biomasa en comparación con las plantas C3. Estas características hacen que las plantas C4 sean más amigables con el medio ambiente.

#### **1.5.1. Componentes nutricionales del amaranto**

El amaranto se considera un grano multipropósito con alta calidad nutricional (Venskutonis y Kraujalis 2013). La composición aproximada obtenida de la harina del

grano de amaranto de las tres principales especies se muestra en la **Tabla 1**. El grano de amaranto contiene proteínas altamente digeribles (aproximadamente 90%) con buenos niveles de aminoácidos esenciales; su equilibrio está cercano del óptimo requerido para la dieta humana (FAO, 2011). Dependiendo de la especie, el contenido total de proteína oscila entre el 13,2% y el 18,4% (Paredes-López, 1994). Las proteínas de amaranto son ricas en lisina (3,2-13,1 g/ 100 g de proteína) y en aminoácidos azufrados (cisteína y metionina en los rangos de 2,0-3,8 y 0,6-2,4 g / 100 g de proteína, respectivamente) (Paredes-López, 1994; Mlakar y col., 2010; Awasthi y col., 2011).

**Tabla 1.** Composición aproximada de las tres principales especies del grano de amaranto. Adaptación del libro *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology*. Paredes-Lopez 1994. Los porcentajes están expresados en base seca.

Compuesto	<i>A.hypochondriacus</i>	<i>A.cruentus</i>	<i>A.caudatus</i>
<b>Proteína (% p/p)</b>	17,9	13,2-18,2	17,6-18,4
<b>Lípidos (% p/p)</b>	7,7	6,3-8,1	6,9-8,1
<b>Fibra (% p/p)</b>	2,2	3,6-4,4	3,2-5,8
<b>Cenizas (% p/p)</b>	4,1	2,8-3,9	3,1-4,4

En cuanto al contenido de fibra, las semillas de amaranto tienen altos valores de fibra (2,2-5,8%) que pueden variar dependiendo de la especie (Singhal y Kulkarni, 1988; Repo-Carrasco-Valencia y col., 2009). El contenido de lípidos reportado varía entre 1,9% y 13% (Segura-Nieto y col., 1994), los principales ácidos grasos que se encuentran en las especies de granos de *Amaranthus* son los ácidos palmítico (19,1-23,4%), oleico (18,7-38,9%) y linoleico (36,7-55,9%). El ácido linoleico es el más abundante (He y col., 2002). Los carbohidratos son el principal constituyente del grano de amaranto y el almidón es el compuesto principal en esta fracción (57-62,0%) (Paredes-López y col., 1990), seguido de sacarosa como azúcar principal, rafinosa, glucosa, fructosa, estaquiosa, maltosa e inositol que están presentes en bajas concentraciones (Becker y col., 1981). Otros compuestos bioactivos valiosos en los granos de amaranto incluyen ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, taninos y fitosteroles (Repo-Carrasco-Valencia y col., 2009; Alvarez y col., 2010). Los granos de amaranto también son una buena fuente de minerales como Ca, Fe, Mg, Mn, K, P y Na, y poseen una alta concentración de vitaminas del complejo B (Alvarez y col., 2010).

El Código Alimentario Argentino ha incorporado las especificaciones relacionadas con el amaranto hace unos veinte cuatro años, en 1994. En el Capítulo XI, Alimentos vegetales, encontramos la siguiente especificación: “con el nombre de Amaranto se entienden las semillas sanas, limpias y bien conservadas de las siguientes especies de este pseudocereal: *Amaranthus cruentus* L., *Amaranthus hypochondriacus* L., *Amaranthus caudatus* L. y *Amaranthus mantegazzianus* Passer.” Además, especifica los siguientes valores:

El contenido de proteínas no debe ser menor de 12,5%

La humedad no debe ser mayor de 12,0%

El contenido de cenizas debe ser menor de 3,5%

El contenido de almidón no debe ser menor de 60%

El peso hectolítrico mínimo será de 77 kg.

Los granos de amaranto, que respondan a las especies mencionadas, serán de color blanco, ámbar pálido, amarillo o castaño muy pálido, opacos o translúcidos" (CAA, Artículo 660 - Res MSyAS 80, 13/01/94).

### **1.5.2. Proteínas del amaranto**

Las proteínas de almacenamiento de semillas pueden clasificarse utilizando el criterio de Osborne (Osborne, 1924) que se basa en la extracción de fracciones proteicas de las harinas obtenidas a partir de las semillas, según su solubilidad diferencial en diferentes medios. Así, las proteínas de semillas se pueden clasificar en cuatro fracciones. La fracción proteica que se extrae por solubilización en agua destilada se conoce como albúminas; en general corresponde a proteínas involucradas en las rutas metabólicas. Si sobre el residuo de la extracción con agua se utiliza una solución salina diluida, se extraerán las proteínas que corresponden a la fracción globulinas. Una vez separadas las globulinas y utilizando sobre el residuo una solución hidroalcohólica se obtendrá la fracción conocida como prolaminas. Por último, utilizando soluciones de pH extremo o incorporando detergentes en el solvente de extracción, obtendremos la fracción glutelinas. Las globulinas, prolaminas y glutelinas generalmente corresponden a proteínas de reserva. Estas proteínas se localizan en las semillas a fin de ser utilizadas como fuente de nitrógeno en el momento de la germinación para originar una planta. En el caso particular del amaranto, existe una fracción proteica cuantitativamente importante que se obtiene por extracción con agua destilada luego de extraer las albúminas y las globulinas, denominada globulina-P.

La fracción globulinas es cuantitativamente el grupo más importante encontrándose en el aislado en un porcentaje cercano al 56 %. La fracción albúminas se encuentra en

segundo lugar, representando aproximadamente el 26% de las proteínas totales. La fracción glutelinas representa el 18 %, y finalmente las prolaminas representan la fracción minoritaria entre el 1,5 y 11 %. Estos valores corresponden a los hallados en nuestro laboratorio (Castellani y col., 2000), no encontrándose en bibliografía un total consenso, dado que las diferentes condiciones de extracción utilizadas por distintos investigadores hace que las fracciones proteicas de la harina se distribuyan en proporciones diferentes (Segura-Nieto y col., 1994; Marcone y Yada, 1998).

Las globulinas están compuestas por cantidades semejantes de globulina 11S (Segura-Nieto y col., 1994; Paredes-López, 1994; Martínez y col., 1997) y globulina-P, una globulina tipo 11S presente en el amaranto con características particulares, entre las que se destacan su gran tendencia a polimerizarse y la menor solubilidad que presenta en soluciones salinas neutras (Martínez y col., 1997; Quiroga, 2008). En menor proporción se encuentra la globulina 7S descrita por Barba de la Rosa y col., (1992) y Martínez y col., (1997). La globulina 11S está formada por un hexámero de masa molecular entre 300 y 360 kDa (Marcone y Yada 1998). El mismo está formado por subunidades de masa molecular entre 50 y 70 kDa unidas por interacciones covalentes, cada una de ellas formada por un polipéptido ácido de masa molecular 32-34 kDa (péptido tipo A) y un polipéptido básico de masa molecular 20-22 kDa (péptido tipo B) unidos por un enlace disulfuro. En la globulina-P se observa la presencia de un polipéptido de 56 kDa (P56) el cual podría ser precursor de las subunidades A-B previo a la proteólisis postraducciona que conduce a la síntesis de las subunidades maduras (Martínez y col., 1997; Castellani y col., 2000).

La fracción albúminas es la que se extrae de la harina en una primera instancia con agua. Está constituida por polipéptidos de diversos tamaños, la mayoría entre 10 y 43 kDa (Segura-Nieto y col., 1992; Marcone, 2000), aunque también han sido detectados otros polipéptidos de mayor masa molecular, hasta 94 kDa (Konishi y col., 1991). En general se destacan algunos polipéptidos con masas moleculares de 12 kDa y 35 kDa. La mayoría de los polipéptidos son monoméricos, no dissociables por mecaptopetanol. Se conoce también que la estabilidad térmica de esta fracción proteica es muy baja siendo su temperatura de desnaturalización de 64 °C (Martínez y Añón, 1996).

La fracción glutelinas, si bien se diferencia de las globulinas por ser soluble sólo a pHs extremos, presenta una composición polipeptídica y características estructurales similares a la globulina-P (Abugoch, 2006).

Las prolaminas constituyen una fracción formada por polipéptidos de baja masa molecular. Existen algunas discrepancias acerca de los componentes mayoritarios que la constituyen. (Gorinstein y col., 1991) informan que los péptidos mayoritarios tienen

pesos moleculares entre 10 y 14 kDa, mientras que (Segura-Nieto y col., 1992) encuentran algunos péptidos de masa molecular algo más alta, entre 16 y 22 kDa.

### 1.5.3. Péptidos antihipertensivos identificados en amaranto

Las semillas de amaranto pueden ser una fuente potencial de varios péptidos bioactivos con diferentes funciones biológicas relevantes en algunos trastornos importantes de la salud humana como el cáncer, la hipertensión, las funciones antioxidantes, la diabetes mellitus, entre otras (Caselato-Sousa y col., 2012).

En este sentido, los péptidos bioactivos se han evaluado como una nueva alternativa contra la hipertensión (Martinez-Maqueda y col., 2012). Como se mencionó previamente, la hipertensión es tratada con diversos medicamentos sintéticos que afectan sitios claves de las vías metabólicas relacionadas particularmente con el sistema renina-angiotensina. Entre este tipo de medicamentos se encuentran, los inhibidores de la ECA, los  $\beta$ -bloqueantes, diuréticos y bloqueantes de los receptores de angiotensina-II. Una alternativa a este tipo de medicamentos la ofrecen los péptidos bioactivos los cuales se sabe pueden ejercer diferentes acciones fisiológicas. Los más estudiados, hasta el presente, son aquellos inhibidores de la ECA. En la mayoría de los casos estos péptidos han sido identificados y caracterizados haciendo uso de ensayos *in vitro* y, en menor medida, se han realizado ensayos *in vivo*, tanto en sistemas animales modelo como estudios clínicos en humanos (Fritz y col., 2011; Quiroga y col., 2012; Martinez-Maqueda y col., 2012). La actividad antihipertensiva potencial de proteínas y péptidos de amaranto fue mayormente estudiada *in vitro* como la capacidad inhibitoria de ECA. Así se demostró esta actividad en un hidrolizado trípico de glutelinas con un  $EC_{50}$  de 0,20 mg/ml (Barba de la Rosa y col., 2010) y en fracciones peptídicas aisladas por HPLC en fase reversa (RP-HPLC) de hidrolizados de albúminas y globulinas obtenidos por acción de alcalasa, con  $EC_{50}$  de 0,35 y 0,15 mg/ml respectivamente (Tovar-Pérez y col., 2009). En nuestro laboratorio se ha demostrado que hidrolizados de aislado proteico de *A. mantegazzianus* de diferente grado de hidrólisis, obtenidos por acción de alcalasa, son potencialmente más activos que los aislados sin hidrolizar, alcanzando un  $EC_{50}$  de  $0,12 \pm 0,02$  mg/ml (Fritz y col., 2011). Por otra parte, también hemos encontrado que las fracciones proteicas de globulinas 7S y 11S presentan actividad antihipertensiva luego de ser sometidas a digestión gastrointestinal simulada presentando un  $EC_{50}$  de 0,22 mg/ml (Quiroga y col., 2012). Por su parte, Tiengo y col., (2009) analizaron la capacidad inhibitoria de ECA de un concentrado proteico de amaranto sometido a varios tratamientos, digestión gastrointestinal *in vitro*, hidrólisis con alcalasa y calentamiento. Los resultados

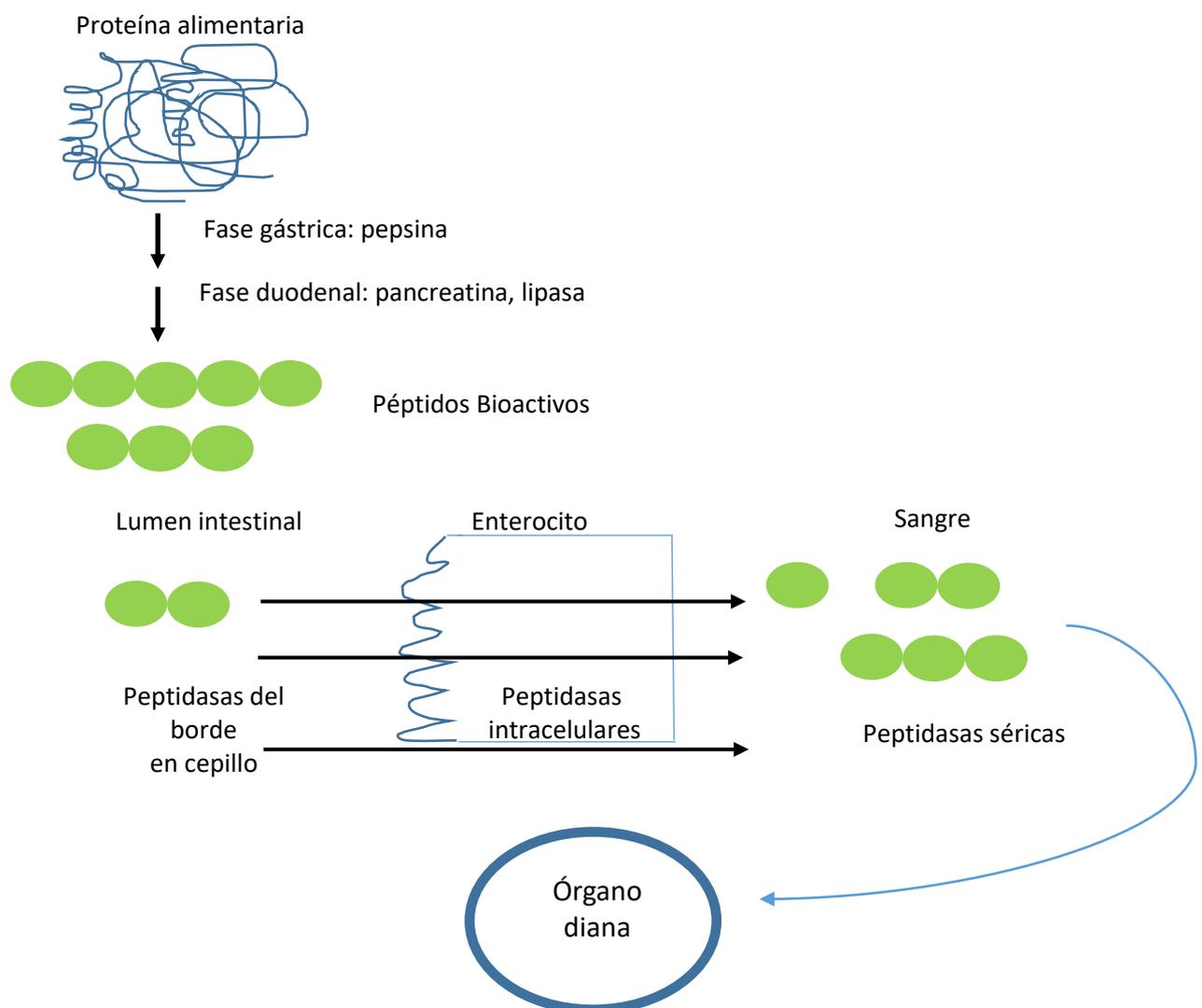
obtenidos por estos autores indican que la mayor actividad corresponde al hidrolizado con alcalasa ( $EC_{50} = 0,118$  mg/ml), la cual no se modificó significativamente luego del tratamiento térmico y la digestión gastrointestinal simulada. Fracciones peptídicas provenientes de estas muestras presentaron valores de  $EC_{50}$  levemente superiores a los correspondientes a las muestras originales (Tiengo y col., 2009). Luna-Suárez y col., (2010) insertaron en la subunidad ácida de la globulina 11S cuatro copias en tándem de un dipéptido de probada actividad antihipertensiva (VY) con el objetivo de incrementar la capacidad inhibitoria de ECA de las proteínas de amaranto. Esta modificación de la secuencia aminoacídica de 11S mostró una actividad superior a la presentada por los hidrolizados ( $EC_{50} = 0,064$  mg/ml).

En relación a la actividad inhibitoria de ECA se realizaron también estudios *in silico* a partir de secuencias conocidas de proteínas de amaranto que mostraron poseer secuencias bioactivas encriptadas (Vecchi y Añón, 2009; Barba de la Rosa y col., 2010). Vecchi y Añón (2009), a partir de un estudio *in silico* sobre la secuencia de la globulina 11S, predijeron la actividad inhibitoria de dos tetrapéptidos, VIKP y ALEP, ubicados en la superficie molecular; actividad que fue confirmada mediante experiencias *in vitro*. Unas pocas experiencias *ex vivo* permitieron proponer posibles mecanismos de acción. Mediante experiencias con músculo papilar de corazón y músculo liso de aorta, aislados de ratas hipertensas, se propuso que los hidrolizados de amaranto estarían actuando a nivel local o autocrino del SRA (Fritz y col., 2011). Por otro lado, Barba de la Rosa y col., (2010) estudiaron el efecto de un hidrolizado tríptico de glutelina sobre la producción de NO de un cultivo de células endoteliales coronarias; los resultados obtenidos les permitieron proponer que el hidrolizado induce la producción endotelial de NO y la consecuente vasodilatación a través de su actividad inhibitoria de ECA. Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio por Quiroga y col., (2017) han demostrado por primera vez, la existencia de péptidos encriptados en las proteínas de almacenamiento de amaranto capaces de inhibir a la enzima renina. Dichos péptidos actúan como inhibidores competitivos, estando su potencia inhibitoria relacionada con la hidrofobicidad de los mismos. Sólo se ha publicado, hasta el presente, una experiencia *in vivo* mostrando la capacidad antihipertensiva de péptidos de amaranto (Fritz y col., 2011) mediante la administración intragástrica de hidrolizado a ratas hipertensas.

### **1.6. Biodisponibilidad de péptidos bioactivos**

Los efectos fisiológicos de los péptidos bioactivos dependen de la capacidad de alcanzar en forma activa sus órganos diana. Esto implica la resistencia a enzimas

gastrointestinales y peptidasas de la membrana del borde en cepillo del intestino delgado y absorción a través del epitelio intestinal. La resistencia de los péptidos a estos procesos generalmente se realiza por hidrólisis secuencial con pepsina y extractos pancreáticos, imitando las condiciones gastrointestinales, y con estudios *in vitro* con células epiteliales intestinales. Aunque se pensó que los péptidos se metabolizaban rápidamente a sus aminoácidos constituyentes, estos estudios han demostrado que varios péptidos son resistentes a estos procesos fisiológicos y pueden alcanzar la circulación (Hernández-Ledesma y col., 2011). En la **Figura 3** se puede observar un esquema de las diferentes etapas que tienen que atravesar los péptidos bioactivos hasta llegar a su órgano diana.



**Figura 3.** Esquema de la digestión de proteínas y del transporte transepitelial de los péptidos hasta llegar a circulación.

El concepto de que cantidades significativas de pequeños péptidos pueden escapar de la digestión total a aminoácidos e ingresar a la circulación intactos es relativamente nuevo. Para eso se ponen en juego varios transportadores que están involucrados en este paso, todos ellos mediante el aporte de energía, es decir, transporte activo. Para lograr la absorción, los dipéptidos y tripéptidos se transportan a través del epitelio intestinal a través del transporte mediado por PepT1 de baja afinidad y alta capacidad, y algunos otros son probablemente absorbidos por el transporte transcelular, la difusión pasiva paracelular o por endocitosis (Vermeirssen y col., 2004; Udenigwe y Fogliano, 2017).

En particular, los tripéptidos antihipertensivos derivados de proteínas lácteas Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, ya disponibles comercialmente para el consumo a través de alimentos funcionales, se encuentran entre los muy pocos péptidos que se informa que son estables después de la digestión gastrointestinal (Hirota y Nonaka, 2011).

La protección de los péptidos bioactivos frente a las posibles modificaciones fisiológicas es esencial para traducir la actividad demostrada *in vitro* hacia modelos animales y humanos. Por este motivo, la encapsulación se ha convertido en una tecnología relevante para mejorar la utilización y biodisponibilidad de péptidos bioactivos derivados de las proteínas alimentarias (Mohan y col., 2015a). A su vez, la encapsulación de los péptidos bioactivos dentro de partículas coloidales puede ser uno de los medios para protegerlos de la degradación y para mejorar su bioactividad (McClements, 2010).

## **1.7. Emulsiones como sistemas transportadores de péptidos bioactivos**

### **1.7.1. Definición de emulsión**

Las emulsiones líquidas consisten en gotas de un líquido dispersas en otro líquido que constituye la fase continua (Robins y col., 2002). Las emulsiones se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de las fases que la conforman. Así, un sistema que consiste en gotas de aceite distribuidas en un medio acuoso continuo se denomina emulsión aceite en agua (o/w), como es el caso de la leche, las cremas, algunas bebidas, mayonesas y salsas. Por otra parte, si la emulsión consiste en gotas de agua distribuidas en un medio oleoso continuo recibe el nombre de emulsión agua en aceite (w/o), como son por ejemplo, la margarina o la manteca (McClements, 2015). Además de las emulsiones o/w y w/o tradicionales, existe otro grupo de emulsiones algo más complejas, denominadas emulsiones múltiples, como las emulsiones o/w/o (es decir, aceite-agua-aceite) o bien las w/o/w (agua-aceite-agua). Esta última emulsión,

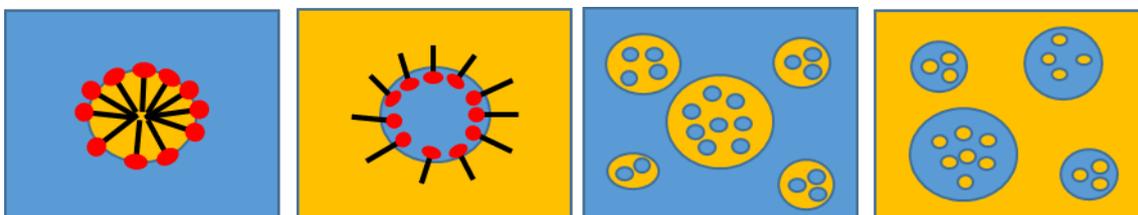
consiste en gotas de agua dispersas en gotas de aceite mayores, que a su vez están dispersas en un medio acuoso continuo (**Fig. 4**) (McClements y Li , 2010).

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido a que poseen una gran cantidad de área interfacial, acompañada por una alta tensión interfacial, lo que genera un aumento de la energía libre del sistema.

La variación de la energía libre para crear una emulsión está dada por la expresión:

$$\Delta G = \gamma \Delta A_{em} - T\Delta S_{em} \quad \text{ec.1}$$

Siendo  $\Delta G$  la energía libre requerida para aumentar el área  $A_{em}$  (m) de contacto entre dos líquidos inmiscibles (a temperatura y presión constante),  $\gamma$  (mN/m) la tensión interfacial y  $S$  es la entropía, haciéndose el último término ( $T\Delta S_{em}$ ) despreciable en el caso de emulsiones alimentarias que tienen tamaños entre los 100 nm y 100  $\mu$ m, por lo tanto estas van a ser termodinámicamente inestables. En los últimos años se ha mostrado un interés creciente en la obtención de emulsiones con diámetros de gotas inferiores a los 200 nm (nanoemulsiones), debido a sus novedosas propiedades fisicoquímicas, como su estabilidad y apariencia (Teo y col., 2016; Alzorqi y col., 2016).



**Figura 4.** Diferente tipo de emulsiones según la naturaleza de sus fases. De izquierda a derecha emulsión: o/w, w/o, w/o/w, o/w/o. Fase oleosa (●), fase acuosa (●), emulsionante (●).

Muchas proteínas son moléculas con actividad superficial que pueden ser usadas como emulsificantes por su capacidad de facilitar la formación, mejorar la estabilidad y producir propiedades físicoquímicas deseables en las emulsiones o/w. Las proteínas se adsorben en las superficies de las gotas de aceite recién formadas mediante la homogeneización de mezclas aceite-agua-proteína, en donde las proteínas facilitan la ruptura de gotas por producir un descenso en la tensión interfacial y un retardo de la coalescencia de las gotas al formar membranas interfaciales que las rodean (Walstra,

2003) La capacidad de las proteínas de generar interacciones repulsivas (estéricas, electrostáticas) entre las gotitas de aceite y de formar una membrana interfacial que sea resistente a la ruptura juega un papel importante en la estabilización de las gotas contra la floculación y la colaescencia durante el almacenamiento a largo plazo (Wilde y col., 2004).

### **1.7.2. Formación de una emulsión**

Para producir una emulsión o/w se necesita aceite, agua, un agente emulsificante y energía. Fabricar las gotas es un procedimiento simple, romperlas en otras más pequeñas es más complejo. Las gotas, a medida que se hacen más pequeñas van volviéndose más resistentes a las deformaciones debido a que se oponen a la presión de Laplace que se incrementa al disminuir el tamaño de la gota. La energía necesaria se reduce si se reduce la tensión superficial y esta es una de las funciones del agente emulsificante. La energía necesaria para formar y romper las gotas se suministra generalmente por agitación intensa con la cual se producen fluctuaciones de presión debido al flujo turbulento (Ventureira, 2010). Los equipos que pueden utilizarse son:

- Agitadores rotatorios de alta velocidad
- Molinos coloidales
- Homogenizadores de válvulas
- Homogeneizadores por ultrasonido
- Microfluidizadores

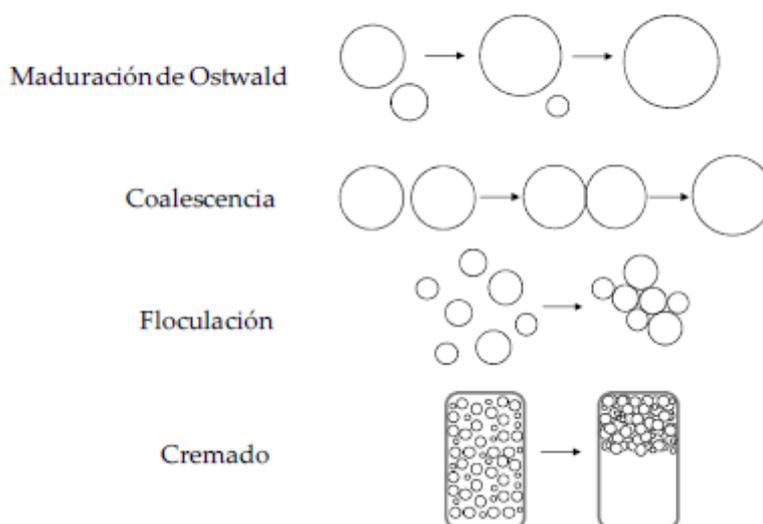
### **1.7.3. Desestabilización de una emulsión**

El cambio de energía libre asociado con la formación de una emulsión determina si el proceso es o no termodinámicamente desfavorable, pero no da ninguna indicación sobre la velocidad a la cual las propiedades de la emulsión cambian con el tiempo, ni del (los) mecanismo(s) responsables de estos cambios. Si la velocidad a la cual se produce el cambio es lenta y la emulsión no presenta cambios significativos dentro de la escala de tiempo de interés, se podría decir que el coloide es estable, desde el punto de vista cinético, a pesar de no serlo desde el punto de vista termodinámico. El hecho de que las emulsiones permanezcan en un estado cinéticamente estable (o metaestable) puede atribuirse a la existencia de una energía de activación ( $\Delta G^*$ ), la cual debe superarse para alcanzar la separación total de las fases, que sería el estado termodinámico más estable, donde el área interfacial es mínima (McClements, 2015).

La estabilidad cinética de las emulsiones se atribuye a la naturaleza dinámica de estos sistemas. Las gotas de una emulsión, lejos de permanecer estáticas, están en

continuo movimiento y colisionan unas con otras debido al movimiento browniano, la gravedad o fuerzas externas aplicadas. El que las gotas se alejen o se fusionen después de una colisión va a depender de la naturaleza de las interacciones coloidales que se produzcan entre ellas. Por lo tanto, la estabilidad cinética de las emulsiones está determinada por la dinámica y las interacciones de las gotas que contienen (McClements, 2015).

Las emulsiones pueden desestabilizarse de diferentes maneras ya sea por cambio de tamaño de las gotas (maduración de Ostwald, coalescencia) o por variación de su posición o distribución en el espacio (cremado-sedimentación, floculación) **Figura 5**. Estos procesos pueden verse mutuamente afectados. Por ejemplo, la floculación facilita considerablemente el cremado, y si esto ocurre, facilita la floculación, además si la emulsión concentrada de la crema es muy compacta, más rápida será la coalescencia (Ventureira, 2010).



**Figura 5.** Distintas desestabilizaciones que pueden ocurrir en las emulsiones o/w.

### 1.7.3.1. Cremado/Sedimentación

El cremado (en emulsiones o/w) o la sedimentación (en emulsiones w/o) se produce por la diferencia de densidad ( $\delta$ ) ( $\text{Kg/m}^3$ ) entre los dos líquidos que forman la emulsión lo que producirá en los objetos una fuerza de empuje. Las gotas cremarán o sedimentarán a cierta velocidad ( $v_s$ ) (m/s) que se puede aproximar con algunas limitaciones por la ley de Stokes:

$$V_s = g (\delta_d - \delta_c) d^2 / 18 \eta_c \quad \text{ec.2}$$

Donde: los subíndices  $d$  y  $c$  corresponden a la fase dispersa y continua respectivamente,  $d$  (m) es el diámetro de la partícula,  $g$  ( $m/s^2$ ) es la aceleración de la gravedad y  $\eta$  (Pa.s) la viscosidad. Como se puede ver el cremado depende notablemente del tamaño de la partícula, las más pequeñas lo harán más lentamente que las más grandes. Igualmente en el comportamiento real de las emulsiones en los alimentos existen muchas desviaciones de la ley de Stokes, debido a la concentración y distribución de tamaños de las gotas presentes y a la viscosidad de la fase continua. Para evitar o tratar de impedir el cremado se puede disminuir el tamaño de gota, aumentar la viscosidad o minimizar la diferencia de densidad de las fases por agregado de sustancias que la modifiquen.

### **1.7.3.2. Floculación**

La floculación es el proceso por el cual dos o más gotas se asocian unas con otras, pero mantienen su integridad individual. La floculación de gotas puede ser favorable o perjudicial para la calidad de la emulsión en función de la naturaleza del sistema que se desee. La floculación acelera la velocidad de cremado en emulsiones diluidas, situación que suele no ser deseable ya que reduce su vida útil (Dickinson y col., 1994; Tan y col., 2004). También puede causar un aumento pronunciado de la viscosidad de la emulsión e incluso puede dar lugar a la formación de un gel (Demetriades y col., 1997). En ciertos productos se espera tener una baja viscosidad y por lo tanto la floculación juega en contra de lo deseado. En otros productos, una floculación controlada puede ser ventajosa, ya que conduce a la creación de una textura más deseable.

Para que ocurra floculación lo primero que tiene que suceder es que las gotas se aproximen. Esto puede producirse por diversos mecanismos como el movimiento browniano, la acción de la gravedad o la aplicación de esfuerzos mecánicos al sistema como ocurre durante la homogeneización. Los métodos para controlar la floculación se basan en controlar la frecuencia de las colisiones (por ejemplo aumentando la viscosidad de la fase continua o evitando las agitaciones durante el almacenamiento) o disminuyendo la eficacia de las mismas (disminuyendo las interacciones coloidales atractivas).

Los flóculos pueden adoptar dos tipos de geometrías, abiertos y cerrados. Se genera uno u otro dependiendo de las interacciones coloidales que se ocurren entre las superficies de las gotas siendo más específicas en el caso de los abiertos. Cuando los flóculos son abiertos se puede producir una red tridimensional a lo largo de toda la

emulsión que puede hacer que esta tome un comportamiento de gel (Bijsterbosch y col., 1995). La presencia de flóculos aumenta la viscosidad de la emulsión por aumento del radio hidrodinámico de las partículas.

#### **1.7.3.3. Coalescencia**

La coalescencia es el proceso por el cual dos gotas diferentes de una emulsión se unen para formar una gota de mayor tamaño. Este proceso se ve favorecido por diferentes situaciones:

- Pérdida de la forma esférica: esto sucede cuando las gotas se empaquetan demasiado y adoptan formas poliédricas.
- Ruptura del film interfacial: Puede deberse a diferentes causas. Se puede producir un hueco espontáneamente en el film por movimientos vibratorios térmicos de las moléculas del emulsificante, dicho hueco puede interactuar con la superficie sin cubrir de otra gota y causar la coalescencia. La cantidad insuficiente de emulsificante puede hacer que queden huecos en la membrana interfacial sin cubrir y si estos entran en contacto se puede producir la coalescencia de las gotas (principalmente durante la homogeneización). Si se estira el film por acción de fuerzas paralelas puede disminuir la concentración del tensioactivo en esa zona del film y abrir huecos en la superficie susceptibles de producir coalescencia. Cuando las membranas son más cohesivas o viscoelásticas (como las formadas por proteínas globulares) se pueden producir desgarramiento de la membrana por acción de las fuerzas paralelas que pueden exponer la superficie de la gota (Ventureira, 2010).

#### **1.7.3.4. Desproporción de Ostwald**

La desproporción de Ostwald es causada por el transporte difusivo de la fase dispersa desde las gotas más pequeñas a las más grandes. El efecto que tiene lugar es el crecimiento de las gotas más grandes a expensas de las más pequeñas. Sin embargo, la insolubilidad del aceite en la fase acuosa impide el transporte difusional, por lo que este mecanismo es más importante en otros sistemas dispersos, como las espumas, donde el gas de las burbujas puede difundir a través de la fase acuosa (Friberg, 1997).

### **1.8. Galletitas de amaranto como sistema funcional**

Los granos de amaranto tienen altos contenidos de varios nutrientes y atributos no solo para el consumo directo, sino también para el procesamiento y conversión en varios ingredientes alimenticios. Su alto contenido proteico lo convierte en un complemento notable para algunos alimentos procesados, como por ejemplo, los alimentos cárnicos (Dodok y col., 1997). Las proteínas se usan comúnmente como un ingrediente alimentario debido a su alto contenido, valor nutricional y su versatilidad funcional. Es bien sabido que el alto costo de las proteínas animales para la población humana y para la propia industria alimentaria lleva a la producción de proteínas vegetales como una alternativa más viable para la elaboración de algunos productos alimenticios (Martínez-Cruz y col., 2014).

El amaranto puede ser utilizado en muchas aplicaciones alimentarias que involucren la cocción, popeado, extrusión, fermentación y la producción de pan o pasta. Las semillas enteras se pueden consumir directamente después de cocinar en agua o se pueden popear con calor seco y a tiempos cortos (sin adición de grasa). Estos dos procesos presentan las formas de consumo más antiguas que se han aplicado tradicionalmente. La utilización de amaranto en estos productos resulta de interés debido a que durante el proceso de popeado desarrolla un sabor a nuez y por lo tanto, puede mejorar la palatabilidad de los productos alimenticios (Santra y Schoenlechner, 2016).

Las galletitas tienen un lugar importante dentro de los “snacks” debido a su sabor, crocancia y facilidad para comer. Son populares en todos los grupos etarios, especialmente en los niños. En general, las galletitas se preparan con harina de trigo, la cual es deficiente en algunos aminoácidos esenciales como la lisina y el triptófano (Kent, 1975) mientras que los granos de amaranto son ricos en estos aminoácidos (Mlakar y col., 2010). Para aumentar su valor nutritivo, las galletitas se pueden preparar con harina fortificada o compuesta. Varios estudios han demostrado el aumento del valor nutricional de galletitas incorporando diferentes fuentes vegetales como por ejemplo: frijol blanco, semilla de sésamo (Hoojjat y Zabik, 1984), fibra de maíz (Artz y col., 1990), proteína de soja y fibra (Shrestha y Noomhorm, 2002), garbanzo, lenteja (Zucco y col., 2011), soja, maíz (Mishra y col., 2012) y cebada (Sharma y Gujral 2014; Gupta y col., 2011). El amaranto también ha sido utilizado para reemplazar parcial o totalmente a la harina de trigo en la preparación de galletitas (Sindhuja y col., 2005; Calderón de la Barca y col., 2010; Chauhan y col., 2015; 2016). Las propiedades de los principales componentes presentes en amaranto y trigo son

diferentes, particularmente las proteínas y polisacáridos. Por lo tanto, la utilización de harina de amaranto en las recetas a base de trigo afecta diversos parámetros tecnológicos de la masa y de las características de calidad de los productos finales. Los efectos dependen de muchos factores, principalmente de la proporción del reemplazo (parcial o total) y de la tecnología utilizada para su producción. Existen numerosos estudios en la literatura que han tratado de determinar la cantidad óptima de amaranto que podría usarse para la sustitución de trigo, sin embargo, no es una tarea fácil debido a los diferentes y complejos procesos de fabricación que se utilizan (Venskutonis y Kraujalis, 2013).

A su vez, la ausencia de gluten hace que el amaranto sea adecuado para la producción de productos sin gluten. La producción de pan y productos de panadería o pasta con harina de amaranto ha suscitado un gran interés en los últimos tiempos debido a la necesidad de productos sin gluten como consecuencia del aumento de la prevalencia de la enfermedad celíaca y la sensibilidad al gluten. Resumiendo a todas las personas afectadas, el mercado puede estimarse en alrededor del 8-10% de la población mundial. Además de ser libre de gluten, el desafío de los alimentos sin gluten es ofrecer un equilibrio nutricional adecuado (Santra y Schoenlechner, 2016).

La producción de productos sin gluten en general, e incluyendo el amaranto en particular, es un gran desafío y no se puede llevar a cabo sin la adición de otros ingredientes o sin una adaptación específica de los pasos de procesamiento relevantes.

Hay solo dos trabajos publicados en la literatura en los que además de estudiar los atributos fisicoquímicos, sensoriales y de calidad de masas y galletitas incorporando harina de amaranto en su formulación y analizar el aumento del valor nutricional también evaluaron la presencia de compuestos bioactivos en el producto. Chauhan y col., (2015) determinaron el contenido de fibra total y la capacidad antioxidante de galletitas elaboradas con harina de amaranto integral y germinada y recientemente Antoniewska y col., (2018) reemplazaron harina de trigo por mezclas de amaranto/trigo sarraceno en la formulación de muffins y evaluaron la capacidad antioxidante de dichos panificados. Los resultados obtenidos en estos trabajos serán discutidos posteriormente en el capítulo 3.

## 1.9. BIBLIOGRAFÍA

- Abugoch, L. (2006). Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2010). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, *21*(2), 106–113.
- Alzorqi, I., Ketabchi, M. R., Sudheer, S., & Manickam, S. (2016). Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant  $\beta$ -D-glucan polysaccharides. *Ultrasonics Sonochemistry*, *31*, 71–84.
- Antoniewska, A., Rutkowska, J., Pineda, M. M., & Adamska, A. (2018). Antioxidative, nutritional and sensory properties of muffins with buckwheat flakes and amaranth flour blend partially substituting for wheat flour. *LWT - Food Science and Technology*, *89*, 217–223.
- Artz, W. E., Mohring, A. E., & Villota, R. (1990). Incorporation of corn fiber into sugar snap cookies. *Cereal Chemistry*, *67*(3), 303–305.
- Awasthi, C. P., Kumar, A., Singh, N., & Thakur., R. (2011). Biochemical composition of grain amaranth genotypes of himachal pradesh. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, *24*(2), 141–144.
- Barba de la Rosa, A. P., Paredes-López, O., Gueguen, J., & Viroben, G. (1992). Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(6), 931–936.
- Barba de la Rosa, A. P., Barba Montoya, A., Martínez-Cuevas, P., Hernández-Ledesma, B., León-Galván, M. F., De León-Rodríguez, A., & González, C. (2010). Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: Antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, *23*(2), 106–111.
- Becker, R., Wheeler, E. L., Lorenz, K., Stafford, A. E., Grosjean, O. K., Betschart, A., & Saunders, R. M. (1981). A compositional study of amaranth grain. *Journal of Food Science*, *46*(4), 1175–1180.
- Benítez, R., Ibarz, A., Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, *42*, 227–236.

- Bijsterbosch, B. H., Bos, M. T. A., Dickinson, E., Van Opheusden, J. H. J., & Walstra, P. (1995). Brownian dynamics simulation of particle gel formation: from argon to yoghurt. *Faraday Discussions*, 101, 51.
- Boletín de la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial. (2016). *Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial*. Edición: Octubre-Noviembre. Buenos Aires.
- Calderon de la Barca, A. M., Rojas-Martínez, M. E., Islas-Rubio, A. R., & Cabrera-Chávez, F. (2010). Gluten-free breads and cookies of raw and popped amaranth flours with attractive technological and nutritional qualities. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 241–246.
- Carbajal, H. A. (2013). Situación de la hipertensión arterial en Argentina. *Hipertensión y riesgo vascular*, 30(3), 101-106.
- Caselato-Sousa, M., & Amaya-Farfan, J. (2012). State of knowledge on amaranth grain: A comprehensive review, 77(4), 93–104.
- Castellani, O. F., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (2000). Amaranth globulin structure modifications induced by enzymatic proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5624–5629.
- Chauhan, A., Saxena, D. C., & Singh, S. (2015). Total dietary fibre and antioxidant activity of gluten free cookies made from raw and germinated amaranth (*Amaranthus* spp.) flour. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 939–945.
- Chauhan, A., Saxena, D. C., & Singh Sukhcharm. (2016). Physical, textural, and sensory characteristics of wheat and amaranth flour blend cookies. *Food Science and Technology*, 2(1), 1-8.
- De Lumen, B. O. (2005). Lunasin: A cancer-preventive soy peptide. *Nutrition Reviews*, 63(1), 16–21.
- De Oliveira, C. F., Corrêa, A. P. F., Coletto, D., Daroit, D. J., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2015). Soy protein hydrolysis with microbial protease to improve antioxidant and functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2668–2678.
- Demetriades, K., Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1997). Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *Journal of Food Science*, 62(2), 342–347.
- Dickinson, E., Ma, J., & Povey, M. J. W. (1994). Creaming of concentrated oil-in-water emulsions containing xanthan. *Topics in Catalysis*, 8(5), 481–497.

- Diplock, A., Agget, P., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E., & Robertfroid, M. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe - consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81(1), 1–27.
- Dodok, L., Modhir, A. A., Buchtová, V., Halásová, G., & Poláček, I. (1997). Importance and utilization of amaranth in food industry. Part 2. Composition of amino acids and fatty acids. *Food / Nahrung*, 41(2), 108–110.
- Escudero, E., Sentandreu, M. A., Arihara, K., & Toldrá, F. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides generated from in vitro gastrointestinal digestion of pork meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2895–2901.
- FAO. (2005). The state of food insecurity in the world. Rome: FAO.
- FAO. (2011). Food and nutrition paper. Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO expert consultation. Auckland: FAO.
- Friberg, S. E. (1997). Emulsion stability. In Decker, E. A. (Ed), *Food Emulsions*. New York.
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., & Añón, M. C. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have *in vivo* and *in vitro* antihypertensive activity. *Food Chemistry*, 126(3), 878–884.
- Fritz, M. (2009). Desarrollo de un sistema de adquisición de datos para la medición de la presión arterial en la rata. Su uso para el estudio de los efectos de los hidrolizados de amaranto sobre el sistema vascular. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- Gorinstein, S., Moshe, R., Greene, L. J., & Arruda, P. (1991). Evaluation of four amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(5), 851–854.
- Gupta, M., Bawa, A. S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Effect of barley flour and freeze-thaw cycles on textural nutritional and functional properties of cookies. *Food and Bioprocess Processing*, 89(4), 520–527.
- He, H. P., Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2002). Extraction and purification of squalene from Amaranthus grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2), 368–372.
- Hernández-Ledesma, B., Del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 23–35.
- Hirota, T., & Nonaka, A. (2011). Milk casein-derived tripeptides , VPP and IPP induced NO production in cultured endothelial cells and endothelium-dependent relaxation of isolated aortic rings, 26, 549–556.

- Hoojjat, P., & Zabik, M. E. (1984). Sugar-snap cookies prepared with wheat-navy bean-sesame seed flour blends. *Cereal Chemistry*, *61*, 41–44.
- Houston, M. (2005). Nutraceuticals, vitamins, antioxidants, and minerals in the prevention and treatment of hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*, *47*(6), 396–449.
- Ji, N., Sun, C., Zhao, Y., Xiong, L., & Sun, Q. (2014). Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR-Q-TOF mass spectrometer. *Food Chemistry*, *161*, 148–154.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Whelton, P. K., & He, J. (2004). Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *Journal of Hypertension*, *22*(1), 11–19.
- Kent, N. L. (1975). *Technology of cereals*. Oxford: Pergamon Press
- Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, Y., Azumaya, J., & Nakatani, N. (1991). Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: Comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains. *Agricultural and Biological Chemistry*, *55*(11), 2745–2750.
- Luna-Suárez, S., Medina-Godoy, S., Cruz-Hernández, A., & Paredes-López, O. (2010). 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*. *Journal of Biotechnology*, *148*(4), 240–247.
- Marcone, M. F. (2000). First report of the characterization of the threatened plant species *Amaranthus pumilus* (seabeach amaranth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(2), 378–382.
- Marcone, M. F., & Yada, R. Y. (1998). Structural analysis of globulins isolated from genetically different *Amaranthus* hybrid lines. *Food Chemistry*, *61*(3), 319–326.
- Martínez-Cruz, O., Cabrera-Chávez, F., Paredes-López, O. (2014). Biochemical characteristics, and nutraceutical and technological uses of amaranth globulins. In Milford, S.D (Ed.), *Globulins: biochemistry, production and role in immunity* (pp. 41–70). New York: Nova Science Publishers.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., & Hernández, L. B. (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food & Function*, *3*, 350–361.
- Martínez, E. N., & Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(9), 2523–2530.

- Martínez, E. N., Castellani, O. F., & Añón, M. C. (1997). Common molecular features among amaranth storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3832–3839.
- McClements, D. J. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual Reviews in Food Science and Technology*, 1, 241–69.
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010). Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*, 1(1), 32–59.
- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: Principles, Practices and Techniques*. New York: CRC Press.
- Mishra, V., Puranik, V., Akhtar, N., & Rai, G. K. (2012). Development and compositional analysis of protein rich soybean-maize flour blended cookies. *Journal of Food Processing and Technology*, 3(9), 1–5.
- Mlakar, S. G., Turinek, M., Jakop, M., Bavec, M., & Bavec, F. (2010). Grain amaranth as an alternative and perspective crop in temperate climate. *Journal for Geography*, 5(1), 135–145.
- Mohan, A., Rajendran, S. R. C. K., He, Q. S., Bazinet, L., & Udenigwe, C. C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *RSC Advance.*, 5(97), 79270–79278.
- Mora, L., Escudero, E., Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2015). A peptidomic approach to study the contribution of added casein proteins to the peptide profile in Spanish dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 41–48.
- Morris Quevedo, H. J., Arceo, A. A., Farnés, O. C., Díaz Abdala, R. T. (2001). Combinaciones enzimáticas en la obtención de hidrolizados proteicos a partir de *Chorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 15(2), 85–89.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2016). Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 26–43.
- Norris, R., & FitzGerald R. (2013). Antihypertensive peptides from food proteins. In Hernandez-Ledesma, B., Hsieh, C. (Ed), *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*, 45–65: InTechOpen.
- OMS. (2013). Información general sobre la hipertensión en el mundo, 1–39. Zurich: OMS.

- Orona-Tamayo, D., & Paredes-López, O. (2016). Amaranth part 1—sustainable crop for the 21st century: food properties and nutraceuticals for improving human health. In Sudarshan, N., Janitha, P. D., Wanasundara, & Laurie, S. *Sustainable protein sources*, 257-264. London: Academic Press.
- Orsini Delgado, M. C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, 197, 1160–1167. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.092>
- Osborne, T. B. (1924). The vegetable proteins. *Journal of the Society of Chemical Industry*. London: John Wiley & Sons.
- Paredes-López, O. (1994). Amaranth: Biology, Chemistry and Technology. New York: CRC Press.
- Paredes- López, O., Barba de la Rosa, A. P., & Carabez- Trejo, A. (1990). Enzymatic production of high- protein amaranth flour and carbohydrate rich fraction. *Journal of Food Science*, 55(4), 1157–1161.
- Pripp, A. H., Isaksson, T., Stepaniak, L., Sorhaug, T., & Ardo, Y. (2005). Quantitative structure activity relationship modelling of peptides and proteins as a tool in food science. *Trends in Food Science & Technology*, 16(11), 484–494.
- Quiroga, A. V. (2008). Globulina-P de amaranto. Análisis de estructura y homología con otras proteínas de reserva. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Quiroga, A. V., Aphalo, P., Ventureira, J. L., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (2012). Physicochemical, functional and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) 7S globulin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(2), 397–403.
- Repo-Carrasco-Valencia, R., Peña, J., Kallio, H., & Salminen, S. (2009). Dietary fiber and other functional components in two varieties of crude and extruded kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Journal of Cereal Science*, 49(2), 219–224.
- Rice, G. I., Thomas, D. A., Grant, P. J., Turner, A. J., & Hooper, N. M. (2004). Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochemistry Journal*, 383, 45–51.
- Roberfroid, M. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1682–1687.

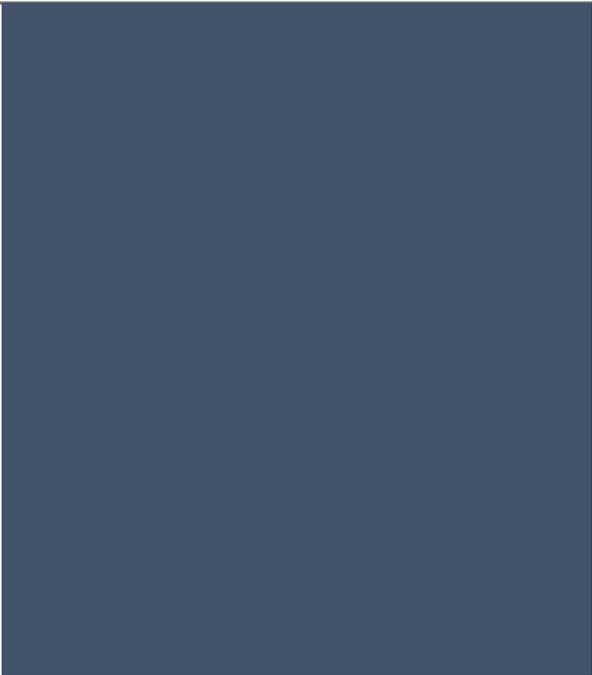
- Robins, M. M., Watson, A. D., & Wilde, P. J. (2002). Emulsions creaming and rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5–6), 419–425.
- Ryder, K., Bekhit, A. E. D., McConnell, M., & Carne, A. (2016). Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. *Food Chemistry*, 208, 42–50.
- Santra, D. K., & Schoenlechner, R. (2016). Amaranth part 2-sustainability, processing, and applications of amaranth. In Sudarshan, N., Janitha, P. D., Wanasundara, & Laurie, S. *Sustainable protein sources*, 257-264. London: Academic Press.
- Sauer, J. D. (1950). The grain amaranths: A survey of their history and classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 37, 561–632.
- Sciences, N. A. (1984). Amaranth: Modern prospects for an ancient crop, 55-85. Washington, DC: National. Academic Science Press.
- Segura-Nieto, M., Vázquez-Sánchez, N., Rubio-Velázquez, H., Olguin-Martínez, L. E., Rodríguez-Nester, C. E., & Herrera-Estrella, L. (1992). Characterization of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) Seed Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1553–1558.
- Segura-Nieto, M., Barba de La Rosa, A., & Paredes-López O. (1994). Biochemistry of amaranth proteins. In Paredes-López (Ed.), *Amaranth: Biology, chemistry and technology*, 75–106. New York: CRC Press.
- Sharma, P., & Gujral, H. S. (2014). Cookie making behavior of wheat-barley flour blends and effects on antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 301–307.
- Shrestha, A. K., & Noomhorm, A. (2002). Comparison of physico-chemical properties of biscuits supplemented with soy and kinema flours. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(4), 361–368.
- Silva-Sánchez, C., Barba De La Rosa, A. P., León-Galván, M. F., De Lumen, B. O., De León-Rodríguez, A., & González De Mejía, E. (2008). Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1233–1240.
- Sindhuja, A., Sudha, M. L., & Rahim, A. (2005). Effect of incorporation of amaranth flour on the quality of cookies. *European Food Research and Technology*, 221(5), 597–601.
- Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (1988). Composition of the seeds of some *Amaranthus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 42(4), 325–331.

- Tang, Y., & Tsao, R. (2017). Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a review. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(7), 1–16.
- Tanzadehpanah, H., Asoodeh, A., & Chamani, J. (2012). An antioxidant peptide derived from Ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysates. *Food Research International*, 49(1), 105–111.
- Teo, A., Goh, K. K. T., Wen, J., Oey, I., Ko, S., Kwak, H. S., & Lee, S. J. (2016). Physicochemical properties of whey protein, lactoferrin and Tween 20 stabilised nanoemulsions: Effect of temperature, pH and salt. *Food Chemistry*, 197, 297–306.
- Tiengo, A., Faria, M., & Netto, F. M. (2009). Characterization and ACE-inhibitory activity of Amaranth proteins. *Journal of Food Science*, 74(5), 121-126.
- Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A., & Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of Amaranth grain. *Food Chemistry*, 116(2), 437–444.
- Tucker, J. B. (1986). Amaranth: The once and future crop. *American Institute of Biological Sciences*, 36, 9–13.
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), 11-24.
- Udenigwe, C. C., & Fogliano, V. (2017). Food matrix interaction and bioavailability of bioactive peptides: Two faces of the same coin? *Journal of Functional Foods*, 35, 9–12.
- Udenigwe, C. C., & Howard, A. (2013). Meat proteome as source of functional biopeptides. *Food Research International*, 54(1), 1021–1032.
- Vecchi, B., & Añón, M. C. (2009). ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*, 70(7), 864–870.
- Venskutonis, P. R., & Kraujalis, P. (2013). Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: A review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(4), 381–412.
- Ventureira J. L. (2010). Propiedades estructurales y funcionales de preparados proteicos de amaranto modificados y soja-amaranto. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- Vermeirssen, V., Camp, J. Van, & Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92(3), 357.

Walstra, P. (2003). Surface phenomena. In Walstra, P. (Ed.), *Physical chemistry of foods*. New York: Marcel Dekker.

Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., & Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, 63–71.

Zucco, F., Borsuk, Y., & Arntfield, S. D. (2011). Physical and nutritional evaluation of wheat cookies supplemented with pulse flours of different particle sizes. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2070–2076.



**OBJETIVO  
GENERAL**

---

En base a:

- La información disponible sobre la baja biodisponibilidad de la mayoría de los péptidos en condiciones fisiológicas debido a su reducida absorción y rápida eliminación, consecuencia de los procesos de ingestión, digestión y absorción.
- La relevancia que tendría disponer de conocimientos relacionados con la estabilidad de péptidos bioactivos durante el transporte gastrointestinal para el desarrollo de ingredientes y/o alimentos funcionales con efectos en la salud del consumidor

Se propone como **objetivo general** del presente trabajo de tesis:

- Desarrollar sistemas transportadores de péptidos bioactivos que mejoren su biodisponibilidad sin afectar su actividad fisiológica y desarrollar una matriz alimentaria formulada a base de amaranto con actividad funcional.

# *Capítulo 1*

## **Emulsiones a base de proteínas y péptidos de amaranto**

---

## I. Introducción al capítulo

Las emulsiones aceite en agua son utilizadas como sistemas transportadores en muchas industrias, incluidas las farmacéuticas, petroquímicas, en productos para el cuidado de la salud, cosméticos, agroquímicos y alimentos. Estos sistemas tienen una serie de ventajas potenciales como sistemas de suministro de componentes alimenticios nutraceuticos y funcionales. En primer lugar, las emulsiones contienen una región no polar (la fase oleosa), una región polar (la fase acuosa) y una región anfifílica (la capa interfacial). Por lo tanto, es posible incorporar agentes funcionales polares, no polares y anfifílicos dentro de una emulsión. Por ejemplo, un componente lipofílico puede ser incorporado dentro de la fase oleosa antes de la homogeneización mientras que algún compuesto hidrofílico puede ser incorporado en la fase acuosa antes o luego de la homogeneización. En segundo lugar la estructura heterogénea de una emulsión permite la posibilidad de generar nuevas estrategias para controlar la estabilidad química de los componentes encapsulados por ejemplo, mediante modificaciones en la interface o controlando la localización física de las sustancias de interés (Coupland y McClements, 1996; McClements y Decker, 2000). En tercer lugar, controlando la composición y la microestructura es posible formular una emulsión con diferentes características reológicas, (desde un líquido viscoso, pastas plásticas hasta sólidos elásticos), y de ese manera pueden prepararse de la forma más conveniente para la aplicación específica que se le quiera dar. En cuarto lugar, las emulsiones pueden utilizarse en estado “fresco” o pueden secarse por diversas tecnologías (secado spray, liofilización) convirtiéndolas en polvo permitiendo su transporte e utilización en diversas aplicaciones. Finalmente, las emulsiones pueden crearse enteramente con ingredientes alimentarios (agua, aceite, surfactantes, fosfolípidos, proteínas y polisacáridos) utilizando condiciones de operación simples como el mezclado y la homogeneización.

Las emulsiones convencionales suelen ser el primer sistema de estudio para el transporte de sustancias debido a su fácil preparación y bajos costos comparado con sistemas de transporte más sofisticados. Sin embargo, tienen ciertas limitaciones si se comparan con sistema de transporte más sofisticados, como por ejemplo, su inestabilidad física cuando son expuestas a calentamiento, enfriamiento, congelación, secado, pHs extremos y altas concentraciones de sales (McClements y col., 2009).

Las emulsiones simples aceite en agua han sido utilizadas como sistemas de transporte para una amplia variedad de componentes de diferentes alimentos funcionales y es probablemente el sistema más común de transporte de sustancias lipofílicas utilizado en la industria de los alimentos. Por ejemplo, emulsiones o/w han

sido utilizadas para encapsular flavors lipofilicos e hidrofílicos (Tan, 2004), ácido graso  $\omega$ -3 (McClements y Decker, 2000; Klinkesorn y col., 2005; Gumus y col., 2017); ácido graso  $\omega$ -6 (Fernandez-Avila y col., 2016), y la vitamina liposoluble licopeno (Ribeiro y col., 2003; 2006).

En base a lo previamente expuesto y con el propósito de desarrollar emulsiones que puedan ser utilizadas como sistemas de transporte de péptidos bioactivos, se proponen los siguientes objetivos:

#### **I.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- Caracterizar desde el punto de vista fisicoquímico, dispersiones y soluciones de aislado proteico de amaranto a pH 2,0 y pH 6,3.
- Estudiar las propiedades funcionales del aislado proteico y el hidrolizado de amaranto.
- Estudiar la formación y estabilidad de emulsiones utilizando aislado proteico e hidrolizado de amaranto como agentes tensioactivos y estabilizantes.
- Obtener un sistema de transporte de péptidos de amaranto que pueda utilizarse para posteriores estudios de biodisponibilidad.

## **I.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **I.2.1. Materiales y muestras de amaranto**

#### **I.2.1.1. Obtención de la harina de amaranto**

La harina se preparó en el laboratorio a partir de la molienda de las semillas enteras de *Amaranthus Hypochondriacus* provistas por el Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR), Argentina. Las semillas fueron molidas en un molino ciclónico UDY (UDY Corporation, USA) de 1 mm de malla. Posteriormente la harina se desgrasó mediante un proceso de extracción con n-hexano en una relación de 10 g de harina por cada 100 ml de solvente. Este proceso se realizó a temperatura ambiente con agitación continua en agitador magnético durante 5 h y en reposo durante 19 h completándose todo el proceso en 24 h de contacto de la harina con el solvente. Luego se separó la harina del hexano por filtración y se la dejó a temperatura ambiente bajo campana durante 12 h esparcida sobre una superficie plana para eliminar los restos de solvente. La harina se almacenó en frascos de vidrio herméticos hasta su utilización.

#### **I.2.1.2. Preparación de los aislados proteicos de amaranto**

El aislado proteico de amaranto (APA) se preparó de acuerdo al método descrito por Martínez y Añón (Martínez y Añón, 1996). La harina desgrasada se suspendió en agua, en una concentración 10% p/v, se llevó a pH 9,0 con NaOH 2 N, se agitó durante 1 h a temperatura ambiente, se centrifugó a 4°C por 20 min a 9000g y el sobrenadante se ajustó a pH 5,0 con HCl 2 N precipitando isoelectricamente las proteínas presentes. Las mismas fueron separadas por centrifugación durante 20 min a 9000g a 4°C, el precipitado se suspendió en agua y se neutralizó con NaOH 0,1 N. Finalmente, la dispersión se congeló a -80°C y se liofilizó. El sólido obtenido fue molido y almacenado a 4°C en recipientes herméticos hasta su uso. La preparación del aislado se realizó en dos tandas durante el desarrollo de los ensayos.

#### **I.2.1.3. Preparación de los hidrolizados proteicos**

Para preparar el hidrolizado de amaranto (HA) se utilizó APA como sustrato y alcalasa (Proteasa de *Bacillus licheniformis*; Sigma, cat. #P4860, 2,4 Unidades Anson/g) en una concentración de 0,16 µl de enzima/g de APA. El APA se dispersó a una concentración final de 1% p/v en un buffer fosfato 35 mM (pH 7,8) y se agitó durante 1 h a 37°C, antes de adicionar la enzima. El tiempo total de hidrólisis fue de 4 h y se detuvo por calentamiento a 85°C en un baño de agua caliente durante 10 min. Una vez transcurrido el tiempo necesario para detener la reacción, el recipiente se enfrió con

agua de la canilla, la mezcla se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$ , liofilizó y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. El grado de hidrólisis se determinó utilizando el método del ortoftaldehído (OPA) descrito por Nielsen (2001). La preparación del hidrolizado se realizó al menos en dos ocasiones para utilizarse en los posteriores ensayos.

## I.2.2. Determinación del grado de hidrólisis (%GH)

### I.2.2.1. Método del ortoftaldehído (OPA)

El grado de hidrólisis se determinó, como se indicó previamente, dosando los grupos aminos libres mediante el método del ortoftaldehído (OPA) descrito por Nielsen (2001) con algunas modificaciones como describió Cian y col., (2012).

La curva de calibración se construyó a partir de una solución de Leucina (Sigma-Aldrich, USA) 1mg/ml. Para llevar a cabo la reacción se adicionó 750  $\mu\text{l}$  del reactivo de OPA sobre 100  $\mu\text{l}$  de la muestra, se agitó 5 s, se dejó reposar 2 min y finalmente se midió la absorbancia a 340 nm, para lo cual se utilizó un lector de placas (BioTek Synergy HT, USA).

#### Reactivos

Buffer de ensayo: Borato de sodio 0,15 M, 0,15 % p/v SDS, pH 9,5.

Reactivo color: OPA 5,97 mM en 1 ml de etanol, DTT (ditiotreitól) 5,7 mM disuelto en 100  $\mu\text{l}$  de metanol, buffer borato pH 9,5 y agua destilada.

#### Cálculos

El grado de hidrólisis se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{GH \%} = [(\text{NH}_{2t} - \text{NH}_{2\ t=0}) / \text{NH}_{2\ \text{totales}}] \times 100 \quad \text{ec. I.1}$$

Donde:  $\text{NH}_{2t}$ : grupos aminos libres de la muestra, a tiempo de hidrólisis  $t$ ;  $\text{NH}_{2\ t=0}$  grupos aminos libres de una muestra sin hidrolizar, a tiempo cero de hidrólisis;  $\text{NH}_{2\ \text{totales}}$ : grupos aminos totales presentes en la proteína;  $\text{NH}_{2\ \text{totales}} = \text{NH}_{2\infty} - \text{NH}_{2\ t=0}$ , donde,  $\text{NH}_{2\infty} = (1 / \text{PM}_{\text{aa promedio}}) \times (1 + f_{\text{LYS}}) \times C_{\text{prot}}$ .  $\text{NH}_{2\infty}$ : corresponde a los grupos aminos libres de una muestra completamente hidrolizada.  $\text{PM}_{\text{aa}}$ : promedio de los pesos moleculares de los aminoácidos de la proteína de la muestra. Para las proteínas de amaranto se considera 130 g/mol;  $f_{\text{LYS}}$ : proporción de lisina en las muestras (1/20) (Bressani y García-Vela, 1990);  $C_{\text{prot}}$ : concentración de la muestra utilizada en el ensayo (g/l).

### **I.2.3. Caracterización de las muestras**

#### **I.2.3.1. Determinación del contenido de proteína total**

Luego de su obtención, el aislado y el hidrolizado se caracterizaron químicamente. El contenido total de proteína se determinó mediante el método de Kjeldahl utilizando el valor 5,85 como factor para relacionar el contenido de nitrógeno determinado con el de proteína (Scilingo y col., 2002). El contenido de proteína en base seca del APA y del HA fue  $84,7 \pm 0,1$  % p/p y  $48,6 \pm 3,0$  % p/p respectivamente. El hidrolizado, durante la etapa de la hidrólisis se enriqueció en minerales aportados por el buffer utilizado, disminuyendo así el contenido relativo del resto de los componentes.

#### **I.2.3.2. Determinación del contenido de humedad**

El contenido de agua se determinó indirectamente, luego de conocer la contribución de la sustancia seca a la masa total, por secado en estufa a  $105 \pm 1^\circ\text{C}$  y presión atmosférica hasta peso constante (AOAC, 1990). El contenido de agua del APA fue  $7,7 \pm 0,3$  % p/p y del HA  $9,4 \pm 0,3$  % p/p.

#### **I.2.3.3. Determinación del contenido de minerales**

La determinación de cenizas se realizó gravimétricamente luego de calcinar la muestra a  $550 \pm 5^\circ\text{C}$  y presión atmosférica hasta cenizas blancas (AOAC, 1990). La cantidad de cenizas fue  $3,3 \pm 0,3$  % p/p para el APA y  $44 \pm 1,0$  % p/p para el HA, sobre base seca. Como ya se detalló previamente el HA se enriqueció en minerales aumentando el contenido de cenizas considerablemente.

#### **I.2.4. Soluciones buffer utilizadas**

Para la preparación de las dispersiones y soluciones de APA y HA se utilizaron las siguientes soluciones buffers

Buffer pH 2,0: 0,052 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,048 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,052 M NaCl,  $\mu = 0,1$ .

Buffer pH 6,3: 0,047 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,013 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\mu = 0,1$ .

A todas las soluciones se les adicionó 0,01% p/v de azida de sodio para evitar la proliferación bacteriana.

#### **I.2.5. Solubilidad**

La cantidad de proteína soluble fue determinada por el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Este método se basa en el dosaje colorimétrico de productos provenientes de la reducción, a pH alcalino, del reactivo fosfotungtomolibdénico por los aminoácidos aromáticos de las proteínas. Los productos de reacción toman un color azulado y la

absorbancia se mide a una longitud de onda de 750 nm. Para realizar las medidas de solubilidad las muestras fueron dispersadas en el buffer pH 2,0 y el buffer pH 6,3, descritos en el ítem anterior, en una concentración de 1 mg/ml y se agitaron en agitador magnético durante 1h a 20°C. Todas las muestras se centrifugaron a 15000g durante 15 min a 20°C. Inmediatamente de finalizada la centrifugación se tomó una alícuota del sobrenadante para conocer su contenido de proteína. Para la realización de la curva de calibración se utilizó como proteína patrón albúmina de suero bovino (Sigma Chemical Co., nro. de cat. A-33350, USA) disuelta en el mismo buffer de la muestra. Las lecturas de absorbancia de las distintas fracciones proteicas se realizaron en un espectrofotometro Beckman DU 650 (Beckman Co, USA), a una longitud de onda de 750 nm. La solubilidad se expresó matemáticamente de la siguiente manera:

$$S\% = P_s \times 100/P_{in} \quad \text{ec. I.2}$$

Siendo  $P_s$  la concentración de proteína en el sobrenadante y  $P_{in}$  la concentración de proteína inicial. Las concentraciones se expresaron en mg/ml de proteína.

## **I.2.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

### **I.2.6.1. Principio**

La calorimetría diferencial de barrido o DSC (differential scanning calorimetry) es una técnica que permite abordar el estudio de la conformación de las proteínas desde un ángulo diferente al de las técnicas ópticas. La misma se basa en el análisis del proceso de desnaturalización o desplegamiento de la molécula de proteína inducido térmicamente. Para ello la muestra y un material de referencia inerte, son sometidos a un programa de temperatura controlada, midiéndose la diferencia de energía entregada a la muestra y a la referencia en función de la temperatura y/o el tiempo. Cualquier cambio térmico inducido (en el caso de la proteínas el cambio es la “fusión estructural” o desnaturalización) es detectado como un flujo diferencial de calor y registrado como un pico en el termograma. La transición de una proteína desde una conformación nativa a una desnaturalizada está acompañada por la ruptura de enlaces intra e intermoleculares y el proceso debe ocurrir de manera cooperativa para ser discernido por DSC. El análisis de un termograma de DSC nos permite la determinación de dos parámetros importantes: la temperatura de desnaturalización ( $T_d$ , °C) y la entalpía de desnaturalización ( $\Delta H_d$ , J/g).

### I.2.6.2. Operación

Las medidas de DSC se realizaron en un calorímetro TA Q100 (TA Instruments, USA). El equipo fue calibrado previamente a una velocidad de calentamiento de 10°C/min con indio, ácido láurico y ácido esteárico pro análisis.

El aislado nativo de amaranto (APA) se suspendió en agua bidestilada pH 5,5 en una concentración de 20% p/v. A su vez, para poder analizar el efecto del pH sobre las características estructurales del aislado proteico, se prepararon dispersiones en buffer fosfato pH 2,0 y 6,3 a una concentración de 2% p/v. Dichas dispersiones se agitaron durante 1 h, se congelaron primero a -20°C y luego a -80°C y posteriormente se liofilizaron. Una vez obtenido el polvo del aislado tratado, se preparó una suspensión al 20% p/v para poder analizarla calorimétricamente. Las cápsulas fueron calentadas desde 40 a 120°C a una velocidad de 10°C/min. Luego de cada ensayo las cápsulas fueron pinchadas para permitir la salida de vapor y colocadas en una estufa a 105°C hasta el día siguiente determinándose el peso seco de las muestras analizadas. La temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) y la entalpía de desnaturalización ( $\Delta H_d$ ) se obtuvieron analizando los termogramas con el software Universal Analysis 2000 relacionándolas con el contenido de proteínas de las muestras obtenido a partir del peso seco. Cada análisis se realizó por triplicado. La  $T_d$  se obtuvo como la temperatura de máxima deflexión de la transición endotérmica, mientras que  $\Delta H$  se calculó a partir del área correspondiente a dicha transición, que queda definida entre la línea de base y el pico del termograma.

### I.2.7. Tensiómetro de volumen de gota pendiente

#### I.2.7.1. Principio

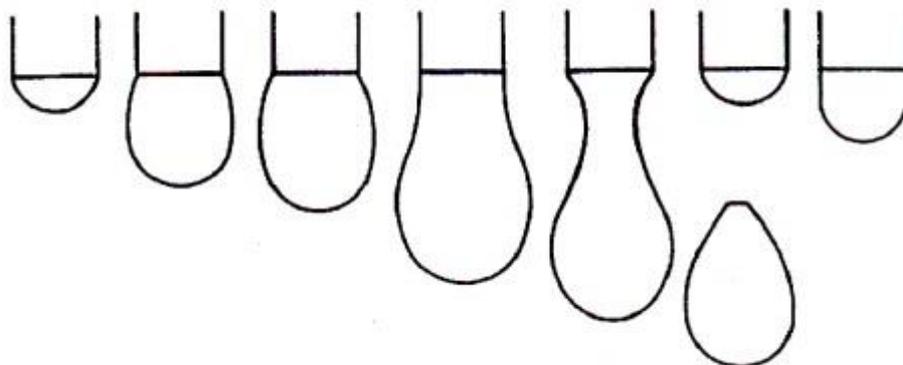
Esta técnica se basa en la determinación exacta del volumen de una gota de líquido cuando se separa de un capilar. Incrementando el volumen de una gota pendiente de manera controlada, el peso de la gota aumentará hasta llegar a un valor crítico que no puede ser contrarrestado por la tensión superficial del líquido ( $\gamma$ , mN/m) (**Fig. I.1**).

El balance de fuerzas en la gota se representa por la siguiente ecuación:

$$\gamma = V \times g \times \Delta\delta \times F / 2 \times \pi \times r_{cap} \quad \text{ec. I.3}$$

Donde: V, volumen de la gota ( $\mu\text{l}$ ), g, aceleración de la gravedad ( $\text{m/s}^2$ ),  $\Delta\delta$  (g/ml), diferencia de densidad entre el fluido de la gota y el que la rodea, F, factor de corrección,  $r_{cap}$ , radio del capilar ( $\mu\text{m}$ ). El factor de corrección F es una función de  $\gamma$ ,  $\Delta\delta$

y  $r_{cap}$  determinado experimentalmente y teóricamente. Se encuentra disponible en tablas.



**Figura I.1.** Esquema de las etapas en la formación de la gota y su desprendimiento.

### I.2.7.2. Procedimiento experimental

Se utilizó un tensiómetro LAUDA TVT2 (Lauda DR. R. Wobser GmbH y Co., Alemania) en modo dinámico (DYN). En este modo la gota pendiente es formada a diferentes velocidades y la tensión superficial se calcula a cada velocidad por el volumen de la gota cuando se desprende del capilar. Esta situación es advertida por un sensor óptico que se encuentra analizando un punto de la trayectoria de la gota cuando se desprende. La variación de la velocidad de creación de la gota tiene como objetivo controlar la maduración de la interface, dando distintos tiempos al tensioactivo para descender la tensión superficial y alcanzar la compensación de las fuerzas.

Para descartar la presencia de tensioactivos contaminantes el material de trabajo se lavó con detergente y se enjuagó en una primera etapa con agua destilada y en una segunda etapa con agua mili-Q.

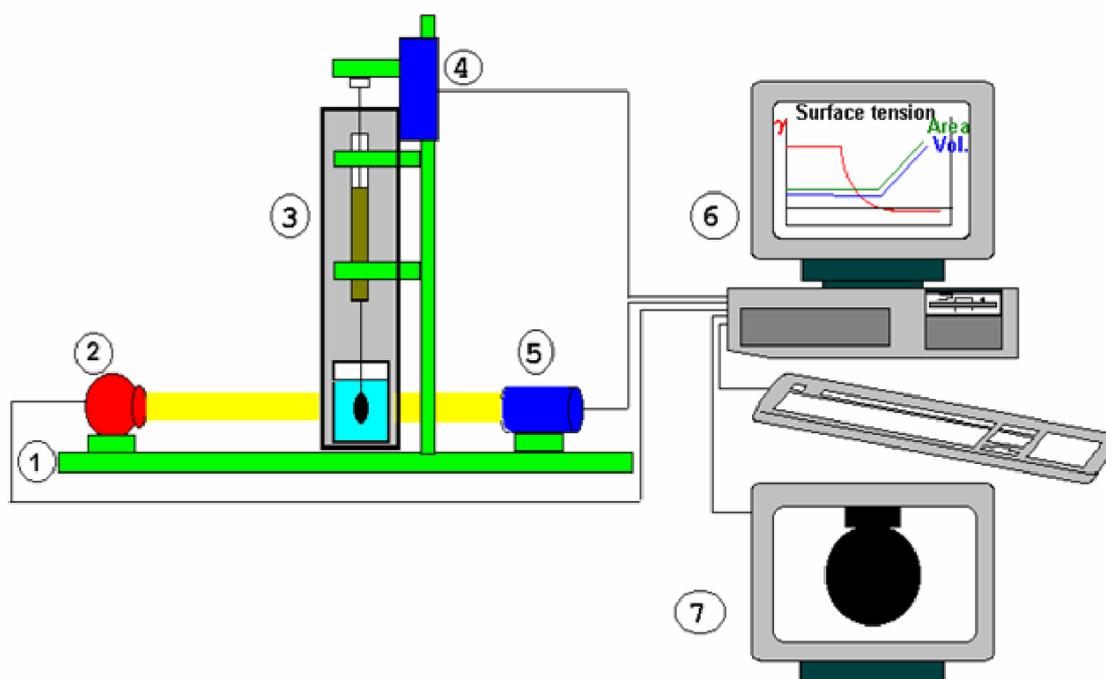
Las soluciones buffer se midieron para controlar la ausencia de impurezas con efecto tensioactivo. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Las medidas se llevaron a cabo con muestras de aislado proteico de amaranto e hidrolizado de amaranto suspendidas en buffer fosfato pH 2,0, 0,1% p/v, agitadas durante 1 h a temperatura ambiente y luego centrifugadas a 20°C por 15 min a 5000g. Se trabajó con un programa de velocidad en el rango de tiempos de formación de gota de 0,07-3,00 s/ $\mu$ l.

### I.2.8. Tensiómetro de gota dinámico

El tensiómetro de gota dinámico (Tracker, IT-Concept. Saint-Clement, Francia) permite conocer la tensión interfacial/superficial de una gota/burbuja a un tiempo dado de la formación de la misma. En nuestro trabajo se formó una gota de aceite en una solución conteniendo el surfactante (proteína), con lo cual se determinó la tensión de la interface aceite/agua, denominada tensión interfacial.

En la **Figura I.2** se puede observar una representación esquemática del Tensiómetro de gota dinámico.



**Figura I.2.** Representación esquemática y fotografía del tensiómetro dinámico de gota (Tracker). 1: base de fibra óptica; 2: fuente luminosa; 3: jeringa; 4: motor; 5: cámara; 6: computadora; 7: monitor de vídeo. (Tomado de Alain CAGNA, IT-Concept, Saint-Clementes Places, France, 2008).

#### I.2.8.1. ¿Cómo se determina la tensión interfacial de una gota utilizando el Tracker?

El software del Tracker utiliza dos ecuaciones para obtener la tensión interfacial:

- 1) Ecuación de Young-Laplace

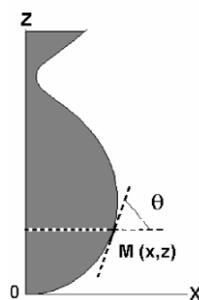
$$\Delta P = \gamma (1/R + 1/R') \quad \text{ec. I.4}$$

Donde  $\Delta P$  (mN/m<sup>2</sup>): es la diferencia de presión dentro y fuera de la gota en un punto M de la interface (**Fig. I.3**),  $\gamma$  (mN/m), es la tensión interfacial, R y R' son los radios de curvatura en el punto M de la interface. Siendo R y R' ortogonales.

2) Ecuación de equilibrio hidrostático en un plano que pasa por el punto M

$$2\pi x \gamma \sin\theta = V (\delta_h + \delta_l) g + \pi x^2 \Delta P \quad \text{ec. I.5}$$

Donde  $\Delta P$  (mN/m<sup>2</sup>): es la diferencia de presión entre el interior y el exterior de la gota en el punto M en la interface,  $g$  (m/s<sup>2</sup>): es la aceleración de la gravedad,  $\gamma$  (mN/m), es la tensión interfacial,  $V$  (m<sup>3</sup>): es el volumen por debajo de un plano que pasa por el punto M, y  $\delta_h$  y  $\delta_l$  (Kg/m<sup>3</sup>), son las densidades de las fases.



**Figura I.3.** Perfil de la gota formada

### I.2.8.2. Ecuación de la gota en el punto M

No es posible sustituir simplemente la expresión de  $\Delta P$  de la ecuación de Young-Laplace en la **ecuación I.5**, ya que la primera ecuación se encuentra en coordenadas de superficie y la ecuación I.5 en coordenadas cartesianas. Ambas ecuaciones deben expresarse en el mismo sistema de coordenadas con el fin de combinarlas y obtener una solución para la tensión interfacial ( $\gamma$ ). Dicha solución se obtiene por sucesivas aproximaciones. La ecuación se puede simplificar de manera que la forma sólo dependa de un parámetro denominado número de enlace ( $\omega$ ) (**ecuación I.6**)

$$\omega = g \Delta\delta / \gamma b^2 \quad \text{ec. I.6}$$

Donde  $\Delta\delta$  ( $\text{Kg/m}^3$ ), es la diferencia de densidad entre las dos fases,  $g$  ( $\text{m/s}^2$ ), es la aceleración de la gravedad;  $b$ , es  $1/r$ , donde  $r$  (m) es el radio de caída en su ápice. Se debe tener en cuenta que los radios de curvatura en el vértice de caída son iguales,  $R=R'$ .

### **I.2.8.3. Constantes de absorción y reordenamiento de proteína en la interface y tensión de equilibrio**

Para seguir el proceso de modificación de la tensión interfacial en el tiempo y dado que los procesos de adsorción, desplegamiento y reordenamiento de las moléculas de proteínas en la interface ocurren en forma simultánea, se utilizó como modelo cinético una ecuación de primer orden con dos componentes exponenciales propuesta por Panizzolo (2005).

$$\gamma_t = A_a e^{-k_a t} + A_r e^{-k_r t} + \gamma_e \quad \text{ec. I.7}$$

Donde  $k_a$  ( $\text{s}^{-1}$ ) y  $k_r$  ( $\text{s}^{-1}$ ) son constantes de velocidad de primer orden para los procesos de adsorción y reordenamiento de las proteínas en la interface aceite-agua respectivamente y  $A_a$  ( $\text{mN/m}$ ),  $A_r$  ( $\text{mN/m}$ ), y  $\gamma_e$  ( $\text{mN/m}$ ), son los parámetros de amplitud de la tensión interfacial en los distintos estados conformacionales de adsorción, reordenamiento y equilibrio de la proteína en la interface.

### **I.2.8.4. Propiedades reológicas de las películas interfaciales: Parámetros viscoelásticos**

Las propiedades reológicas describen el comportamiento dinámico de las interfaces fluido-fluido. Así, dichas propiedades son, en parte, responsables de la estabilidad y la textura de las emulsiones y espumas alimentarias, y son consecuencia de las interacciones existentes entre las moléculas que hay en la interface y entre las moléculas de la interface y las de la subface (Murray, 1997). La reología interfacial estudia las propiedades mecánicas y de flujo de las películas situadas en una interface fluida. Las propiedades reológicas que se pueden determinar de una película, dependiendo de la deformación a que se ha sometido, son de corte o dilatacionales. Las primeras se obtienen al someter la película a esfuerzos que originan distorsiones de la forma, manteniendo el tamaño, en cambio, las propiedades dilatacionales manifiestan la respuesta de la interface a compresiones y expansiones que modifican el tamaño, pero no la forma.

Los parámetros viscoelásticos, módulo dilatacional interfacial,  $E$ , y sus componentes elástica,  $E_d$ , y viscosa,  $E_v$ , se midieron una vez alcanzada la tensión de equilibrio, manteniendo constante la amplitud de la deformación ( $\Delta A/A$ ) en 3% y la frecuencia de la oscilación ( $\omega$ ) en 0,2 Hz. En el método empleado la gota se somete a una compresión-expansión sinusoidal controlada automáticamente, a la frecuencia y amplitud deseadas. El módulo dilatacional interfacial se determina a través del cambio de tensión interfacial,  $\gamma$ , (**ecuación I.8**), que resulta de un pequeño cambio de la superficie de la gota,  $A$ , (**ecuación I.9**), según la **ecuación I.10** (Lucassen-Reynders y col., 2004).

$$\gamma = \gamma_0 \times \text{sen}(\omega t + \varphi) \quad \text{ec. I.8}$$

$$A = A_0 \times \text{sen}(\omega t) \quad \text{ec. I.9}$$

$$E = d\gamma / (dA/A) = d\pi / d \ln A \quad \text{ec. I.10}$$

Donde  $\gamma_0$  ( $\text{mN m}^{-1}$ ) y  $A_0$  ( $\text{m}^2$ ) son las amplitudes del esfuerzo y de la deformación, respectivamente,  $\varphi$  es el ángulo de fase entre el esfuerzo y la deformación,  $\pi = \gamma_0 - \gamma$ : es la presión interfacial, y  $\gamma_0$  ( $\text{mN m}^{-1}$ ), es la tensión interfacial del solvente en ausencia de proteína.

El módulo dilatacional interfacial es una cantidad compleja que se compone de una parte real y otra imaginaria (**ecuación I.11**). La parte real del módulo, o componente de almacenamiento, es la elasticidad dilatacional interfacial,  $E_d = |E|\cos \varphi$ . La parte imaginaria del módulo, o componente de pérdida, es la viscosidad dilatacional interfacial,  $E_v = |E|\text{sen} \varphi$ . La relación ( $\gamma_0 / A_0$ ) es el valor absoluto del módulo  $|E|$ , una medida de la resistencia del material a una deformación dilatacional (elástica + viscosa). Para un material perfectamente elástico el esfuerzo y la deformación están en fase ( $\varphi = 0$ ) y el término imaginario del módulo es cero. En el caso de un material perfectamente viscoso,  $\varphi$  es igual a 90 y la parte real del módulo es cero. La tangente del ángulo de desfase se define mediante la **ecuación I.12**. Si la película es puramente elástica, la tangente del ángulo de pérdida es cero.

$$E = (\gamma_0/A_0) \times (\cos \varphi + i \text{sen} \varphi) = E_d + iE_v \quad \text{ec. I.11}$$

$$\tan \varphi = E_v/E_d \quad \text{ec. I.12}$$

La determinación experimental del módulo requiere el monitoreo de la respuesta de la tensión interfacial a fluctuaciones de baja amplitud en el área interfacial. Los cambios correspondientes en el área producen cambios en la tensión que son evaluados por la ecuación de Young-Laplace a partir de las medidas en la fluctuación de la forma de la gota. Un aumento en el valor de  $E$  está relacionado con una mayor resistencia de la interface lo que implica, por ejemplo, que en una emulsión las gotas serían más resistentes a la coalescencia. La técnica de la gota oscilante permite medir los módulos viscoelásticos interfaciales de una gota de aceite formada en una fase acuosa. Las oscilaciones pueden hacerse mientras se va formando la película o cuando la película ha llegado al equilibrio.

#### **1.2.8.5. Procedimiento experimental**

La tensión interfacial de equilibrio y las propiedades reológicas interfaciales de las películas proteicas adsorbidas sobre la interface (aceite/agua) se determinaron una vez alcanzado el equilibrio.

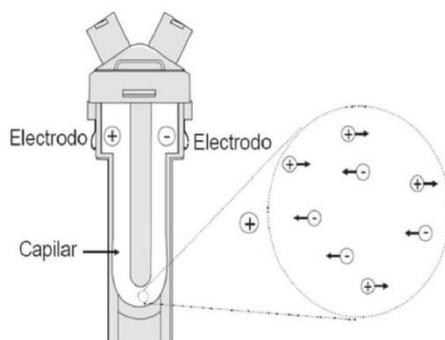
El APA fue solubilizado en los buffers pH 2,0 y pH 6,3, indicados previamente, por agitación durante 1h a temperatura ambiente y posterior centrifugación (15 min, 5000 g,  $T_{amb}$ ). Para los ensayos se utilizó el sobrenadante a una concentración de 1 mg/ml de proteína, determinada por el ensayo de Lowry.

Se colocaron aproximadamente 6 ml de la solución proteica en una cubeta de cuarzo termostaticada a 20°C. Se crearon gotas con un volumen de 8  $\mu$ l que tenían, al inicio de las experiencias, una superficie aproximada de 18 mm<sup>2</sup>. Se midió la tensión interfacial dinámica a lo largo de 7200 s. Luego de registrar la tensión durante el tiempo indicado se realizaron expansiones y compresiones periódicas sinusoidales del volumen de gota. Para ello se utilizó una frecuencia de 0,2 Hz y una amplitud de deformación del 3% del valor inicial del área de la gota. Este valor de amplitud se encontraba dentro del rango de viscoelasticidad lineal. Las medidas se hicieron pasados los 7200 s, tiempo en el cual la película viscoelástica llegó al equilibrio, en series de 5 oscilaciones. En estas condiciones se obtuvieron los valores de  $E$  y del ángulo de  $\varphi$ .

#### **1.2.9. Medida del Potencial Zeta**

Los valores del potencial zeta del APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3 suspendidos en agua se midieron mediante dispersión de luz láser dinámica utilizando un analizador de partículas nano SZ-100 (Horiba Scientific Inc., Reino Unido) a 25°C. El potencial zeta se determinó midiendo la dirección y la velocidad del movimiento de las partículas en un campo eléctrico bien definido. Para realizar la determinación se preparó una

dispersión proteica 1% p/v en agua miliQ, se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y se ajustó el pH con HCl 2N y/o NaOH 2N. Luego de ajustar el pH se agitó 30 min más y se realizó una dilución 1/20 para obtener una solución 0,05% p/v. 500  $\mu$ l de muestra diluida se utilizaron para la realización de la medida (**Fig. I.4**).



**Figura I.4.** Celda capilar con electrodos a cada lado (Malvern Instruments Ltd. 2013)

### I.2.9.1. Fundamento teórico

Cuando se aplica un campo eléctrico a la muestra diluida contenida en la celda de medida, las partículas cargadas migrarán hacia el electrodo con carga opuesta. Durante este movimiento, la resistencia viscosa del medio, se opone a la fuerza del campo eléctrico que actúa sobre las partículas cargadas. Cuando se alcanza el equilibrio entre estas fuerzas opuestas, las partículas se mueven a una velocidad constante. Esta velocidad se denomina movilidad electroforética ( $U_E$ ), la que está relacionada con el potencial zeta, mediante la ecuación de Henry:

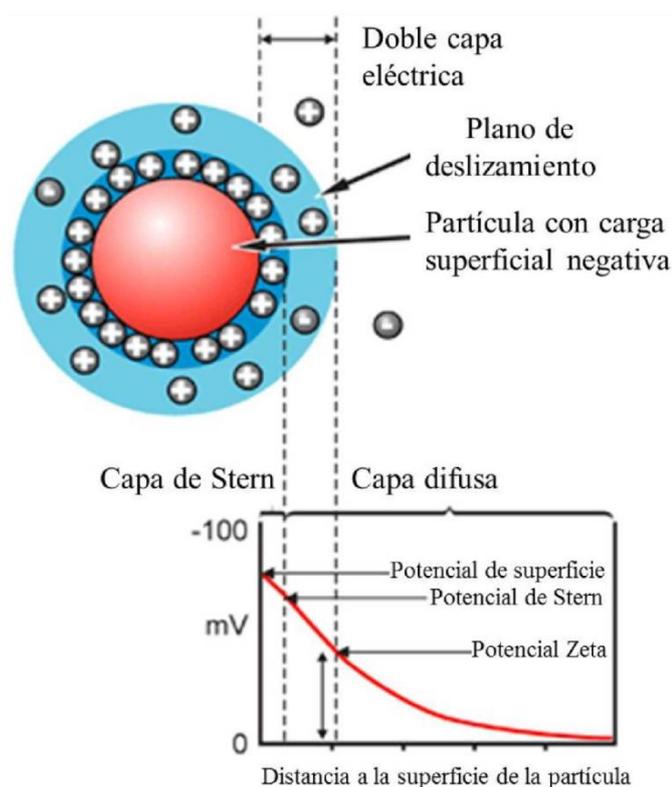
$$U_E = \frac{2}{3} \frac{\epsilon \zeta f(Ka)}{\eta} \quad \text{ec. I.13}$$

Donde  $\epsilon$  ( $C^2/Nm$ ) es la constante dieléctrica,  $\zeta$  es el potencial zeta (mV),  $f(Ka)$  es la función de Henry y  $\eta$  (Pa.s) es la viscosidad. En medio acuoso y con baja concentración de electrolitos, se usa una aproximación de  $f(Ka) = 1,5$  (aproximación de Smoluchowsky).

El desarrollo de una carga neta en la superficie de una partícula afecta la distribución de iones de la región interfacial circundante. Esto resulta en un aumento de la concentración de iones de carga opuesta a la partícula que están cercanos a la superficie con la subsecuente generación de una doble capa eléctrica (**Fig. I.5**). La capa de líquido que rodea a la partícula está compuesta por dos partes: una región interna - capa de Stern- donde los iones están fuertemente ligados, y una región

externa - capa difusa - donde los iones están ligados más débilmente. Existe un límite imaginario que termina en la capa difusa, los iones que se encuentran más allá de ese límite no se mueven con la partícula. El potencial correspondiente a este límite - superficie de cizallamiento hidrodinámico - se conoce como potencial zeta (Malvern Instruments Ltd 2013).

La magnitud del potencial zeta es un indicador de la estabilidad del sistema coloidal en estudio. Las partículas con potencial zeta más positivo que +30 mV o más negativo que -30 mV se consideran estables.



**Figura I.5.** Esquema de una partícula cargada y de la doble capa que la rodea

### I.2.10. Preparación de emulsiones con APA

Las emulsiones fueron preparadas utilizando dispersiones o soluciones de aislado proteico de amaranto (APA) como agente emulsificante. Las diferentes emulsiones se formularon con proteína total (dispersiones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3) y con la fracción soluble del APA (soluciones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3). En el caso de las dispersiones las concentraciones de proteína utilizadas fueron 0,1, 0,4, 0,8 y 1,7% p/v y para las soluciones se ensayaron dos concentraciones de proteína total 0,8 y 1,7 % p/v, las cuales corresponden a una concentración de 0,7 y 1,4 % p/v de proteína

soluble para el APA-pH 2,0 y 0,2 y 0,5 % p/v para el APA-pH 6,3. Las muestras fueron dispersadas en los buffers descritos en el ítem **I.2.4**, agitadas durante 1h a 20°C y luego centrifugadas a 7000g por 15 min a 20°C. Las emulsiones se prepararon prehomogeneizando 4 ml de aceite de girasol comercial con 16 ml de las dispersiones o soluciones proteicas (20% v/v) con un homogeneizador ULTRATURRAX T25 (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Germany) utilizando una herramienta de dispersión S 25 N-10 G (diámetro del rotor 7,5 mm) a una velocidad de 20.000 rpm durante 1 min. Luego, se realizó una segunda homogeneización con un homogeneizador ultrasónico (SONICS Vibra Cell VCX750, USA) a una potencia de 50% aplicando pulsos de 30 s durante 5 min con una punta standard (13 mm de diámetro) inmersa 2/3 en un vaso de precipitado de 28 mm de diámetro (30 ml de volumen). El vaso se mantuvo sobre un baño de hielo para reducir el calentamiento durante el proceso de homogeneización final. La preparación de cada emulsión se realizó al menos, por duplicado.

### **I.2.11. Preparación de emulsiones con APA e HA**

Se prepararon dispersiones de APA-pH 2,0 y HA-pH 2,0 combinándolas en partes iguales (50:50) a una concentración proteica total de 1% p/v y 2% p/v, las mismas se agitaron durante 1h a temperatura ambiente. Las emulsiones se prepararon como se indicó previamente.

### **I.2.12. Distribución del tamaño de gotas**

#### **I.2.12.1. Principio**

Este método se basa en el análisis de los espectros de difracción y de difusión de luz láser producidos por partículas que en este caso son las gotas de aceite de una emulsión aceite en agua (o/w). La técnica se basa en la teoría de Fraunhofer y de Mie. Según Fraunhofer el ángulo de difracción de la luz es mayor cuando el radio de las partículas es menor. Cuando el tamaño de las partículas se acerca al de la longitud de onda de la luz incidente (menos de 50  $\mu\text{m}$ ) se debe aplicar la teoría de Mie, similar a la de Fraunhofer, pero tiene en cuenta los índices de refracción complejos de la partícula y del medio dispersante. En la práctica el análisis se hace sobre todas las partículas que circulan en el camino de un rayo láser. Se analizan las intensidades a los diferentes ángulos y los espectros de difusión (McClements, 2015).

#### **I.2.12.2. Operación**

Las distribuciones de tamaño de gota se determinaron en un analizador Malvern Mastersizer 2S (Malvern Instrument Ltd, UK) que permite medir en un rango de 0,1 a 360  $\mu\text{m}$ . Las medidas se hicieron en presencia y en ausencia de dodecilsulfato de

sodio (SDS). El SDS es utilizado para evitar la floculación de las partículas ya que carga negativamente a las moléculas de proteína o, con el tiempo, reemplaza a las mismas de la interface y produce repulsión electrostática entre las gotas. Para permitir la acción del SDS se colocaron 125  $\mu\text{l}$  de las emulsiones a ensayar en un tubo que contenía 2875  $\mu\text{l}$  de solución de SDS 1% p/v y se las mezcló suavemente. Primero se midió la emulsión sin SDS y luego de 15 min de estabilización la emulsión que contenía SDS. La diferencia en el tamaño de gota entre las emulsiones con y sin SDS permitió conocer el grado de floculación. Aproximadamente 500  $\mu\text{l}$  de muestra se diluyeron en 600 ml de agua contenida en un vaso de precipitado con agitación constante, la velocidad de la bomba en la unidad de dispersión se ajustó a 2000 rpm (Hydro 2000MU, Malvern Instruments, UK). El agregado de la muestra fue suficiente para llegar a un nivel de obscuración entre el 10 y 15% necesario para realizar la medida. Los parámetros utilizados que se establecieron para los cálculos fueron de 1,458 para el índice de refracción del aceite de girasol, 0,942  $\text{g}/\text{cm}^3$  para la densidad y 0,001 para el parámetro de absorción.

Para determinar el tamaño de partícula luego de 24 h, en el caso de las dispersiones y luego de 7 días para las soluciones, las emulsiones se almacenaron en heladera a 4°C.

### 1.2.12.3. Tratamiento de los resultados

A partir de la distribución de tamaño de partícula se obtuvieron los diámetros promedio:  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$ , siendo  $D_{3,2}$  el diámetro promedio de volumen-superficie o diámetro de Sauter ( $D_{3,2} = \frac{\sum ni d_i^3}{\sum ni d_i^2}$ ), donde  $ni$  es el número de partículas de diámetro  $di$ . Por otra parte, el  $D_{4,3}$  se define como el diámetro promedio de volumen equivalente o diámetro de Broucker ( $D_{4,3} = \frac{\sum ni d_i^4}{\sum ni d_i^3}$ ), donde  $ni$  es el número de partículas de diámetro  $di$ .

El  $D_{3,2}$  da una idea de la superficie creada durante la emulsificación y la distribución de los  $D_{3,2}$  muestra que porcentaje de la superficie total creada está compuesta por gotas de los distintos rangos de tamaño. La distribución de  $D_{4,3}$  representa el porcentaje de volumen total de aceite utilizado que forma parte de cada uno de los rangos de tamaño de gota de la distribución.

La variación de los valores del  $D_{4,3}$  a diferentes tiempos, en presencia y ausencia de SDS se utilizaron para calcular el índice de floculación (IF) y el índice de coalescencia (IC) descrito por Palazolo y col., (2005).

$$IF = (D_{4,3,t-} - D_{4,3,t+ SDS}) / D_{4,3,t+ SDS} \quad \text{ec. 1.14}$$

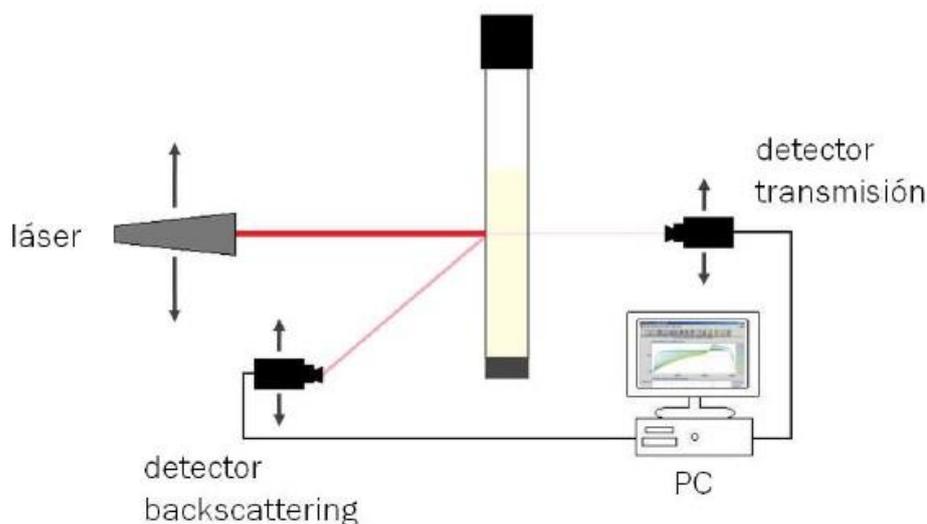
$$IC = (D_{4,3 t + SDS} - D_{4,3 in + SDS}) / D_{4,3 in + SDS} \quad \text{ec. I.15}$$

Donde:  $D_{4,3 t}$  ( $\mu\text{m}$ ) es el valor de  $D_{4,3}$  a un cierto tiempo  $t$ ,  $D_{4,3 t + SDS}$  ( $\mu\text{m}$ ) es el valor de  $D_{4,3}$  a un cierto tiempo  $t$  medido en presencia de SDS,  $D_{4,3 in + SDS}$  ( $\mu\text{m}$ ) es el valor inicial de  $D_{4,3}$  medido en presencia de SDS.

### I.2.13. Estabilidad de emulsiones

#### I.2.13.1. Principio del QuickScan

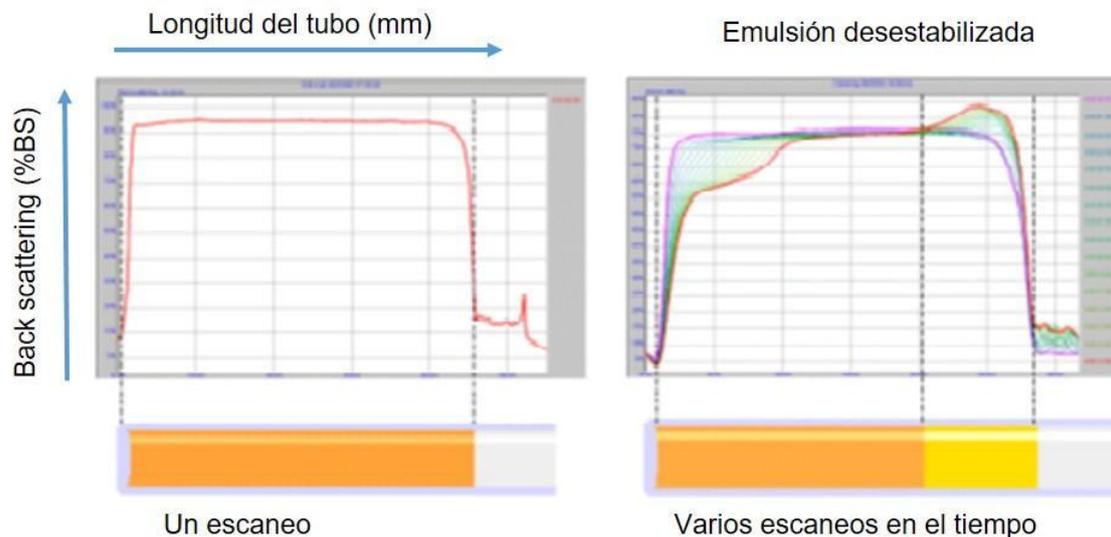
Las emulsiones fueron analizadas utilizando un analizador óptico vertical de barrido modelo QuickScan (Beckman-Coulter inc., USA). La medida se basa en la aplicación de una fuente lumínica laser en el infrarrojo cercano (850 nm) a la celda de medida que contiene la emulsión. Dos sensores ópticos sincronizados reciben respectivamente la luz transmitida a través de la muestra ( $180^\circ$  desde la luz incidente, sensor de transmisión), y la dispersada por la muestra ( $45^\circ$  desde la radiación incidente, detector de backscattering) (**Fig. I.6**).



**Figura I.6.** Esquema simplificado del sistema óptico y de adquisición de datos del analizador óptico vertical.

Tanto la fuente de luz como los dos detectores se mueven a lo largo de la celda de medida periódicamente para analizar la emulsión cada  $40 \mu\text{m}$  y poder representar el estado de la misma en toda su extensión. Las curvas obtenidas proveen el flujo de luz transmitida o dispersada estándar respecto a un estándar (suspensión de esferas monodispersas y aceite de silicona) como función de la longitud de la muestra. Se

determinaron las cinéticas del % de luz dispersada (%BS) de la muestra en función de la altura de la celda de medida (**Fig. I.7**). El análisis completo de datos permite determinar el fenómeno de migración de las partículas.



**Figura I.7.** Cinética de variación de %BS en función de la longitud del tubo para una emulsión típica. Figura tomada de la guía de instrucciones del equipo.

### I.2.13.2. Operación

Inmediatamente de finalizada la homogenización se colocó aproximadamente 6 ml de emulsión en la celda de medida y se procedió a ubicar la celda en el equipo. Las emulsiones preparadas con 0,1% p/v de APA se monitorearon cada 3 min durante 1h y el resto de las emulsiones todos los días durante 10 días.

Las celdas se almacenaron a 4°C hasta el tiempo de medida y se retiraron de la heladera media hora antes de la medida para la estabilización de su temperatura con la ambiental. Se obtuvieron cinéticas de cremado-floculación y coalescencia-floculación registrando la variación del %BS en función del tiempo en la parte inferior del tubo (10-15 mm desde la base) y en la parte superior (40-50 mm desde la base) del mismo. Se determinó la constante de cremado-floculación ( $K_{0,1}$ ) y el porcentaje de desestabilización de la fase crema (%CD) de acuerdo a lo propuesto por Ventureira (2010).

La constante de cremado-floculación se calculó a partir de los valores promedios de %BS en la parte baja del tubo:

$$K_{0,1} = (\%BS_{in} \times t_{0,1})^{-1} \quad \text{ec. I.16}$$

Donde:  $t_{0,1}$  ( $d^{-1}$ ) es igual al tiempo en que se produjo una disminución del 10% del  $\%BS_{in}$  ( $\%BS$  inicial). El incremento de  $K_{0,1}$  da cuenta de una disminución en la estabilización de la emulsión. El valor del  $\% CD$  se calculó de los valores promedios de  $\%BS$  en la parte superior del tubo (40-50 mm) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% CD = 100 \times (\%BS_{max} - \%BS_{24h}) / \%BS_{max} \quad \text{ec. I.17}$$

Siendo el  $\%BS_{max}$  el valor máximo de  $\%BS$  alcanzado durante el ensayo en esa parte del tubo y  $\%BS_{24h}$  es el valor del  $\%BS$  a las 24 h después de la primera medida.

#### I.2.14. Viscosidad de las emulsiones

La viscosidad de las emulsiones se determinó utilizando un Reómetro Stress Haake RS 600 (Thermoelectron, Karlsruhe, Germany) utilizando un sensor plato-plato rugoso (35 mm) con un gap de 1,0 mm entre los platos y una velocidad de corte desde 1,0 hasta 500  $s^{-1}$  (**Fig. I.8**). La viscosidad aparente de las emulsiones preparadas con las dispersiones o soluciones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3 y con el APA+HA-pH 2,0 fue determinada a 25°C a una velocidad de corte de 100  $s^{-1}$ . Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de flujo experimentales se ajustaron a la ecuación de la potencia (**ecuación I.18**), modelo típico para ajustar las curvas de flujo de fluidos pseudoplásticos.

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad \text{ec. I.18}$$

Donde:  $\tau$  es el esfuerzo de corte (Pa),  $K$  es el índice de consistencia (Pa. s),  $\dot{\gamma}$  es la velocidad de corte ( $s^{-1}$ ),  $n$  es el índice de flujo.



**Figura I.8.** Esquema de un sistema de platos paralelos (Fuente: Adaptado de Steffe, 1996).

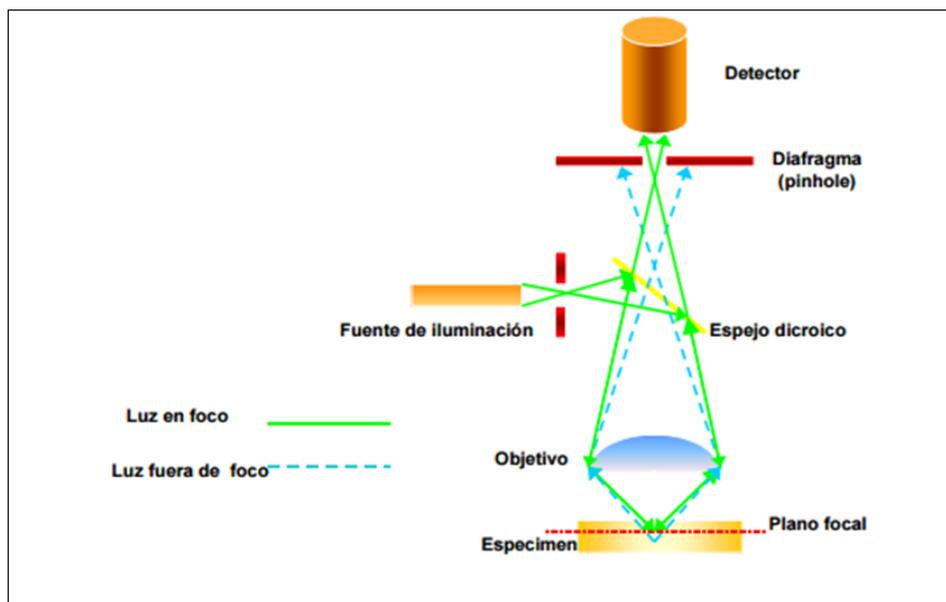
### **I.2.15. Microscopia confocal láser de barrido**

La microscopía confocal láser de barrido (CSLM) es una técnica de observación que ofrece múltiples ventajas frente a la microscopía óptica tradicional, ya que permite obtener imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal y secciones ópticas de la muestra a partir de las cuales se puede obtener una reconstrucción tridimensional de la misma. Esto básicamente se logra a través de 1) la eliminación de la luz fluorescente procedente de los planos fuera de foco, 2) la utilización de un rayo láser como fuente de luz lográndose de este modo que una pequeña región de la muestra sea iluminada con gran intensidad y 3) la presencia de dos diafragmas (pinhole), uno entre la fuente de luz y el objetivo y otro entre el objetivo y el detector. En la **Figura I.9** se muestra un esquema del microscopio (Martínez Nistal, 2003).

#### **I.2.15.1 Observación microscópica**

Se empleó un microscopio confocal invertido (LEICA TCS SP5, Mannheim, Alemania) equipado con láseres de Argón y HeNe. Los parámetros de captura utilizados fueron:

- Resolución: 1024 X 1024 pixeles
- Modo de adquisición: xyz
- Formato: lif
- Objetivos utilizados: HCX PL APO CS 20,0X (inmersión con agua) y HCX PL APO CS 63,0X (inmersión con aceite)
- Apertura numérica: 0,70 para el objetivo de 20 X y 1,40 para el objetivo de 63X
- Velocidad de escaneo: 200Hz
- Láser de Argón: 20%



**Figura I.9:** Camino óptico en un microscopio confocal (Fuente: Martínez, Servicio de Procesamiento de Imágenes, Universidad de Oviedo, España).

#### I.2.15.2. Preparación de las muestras

Se estudiaron las emulsiones preparadas a partir de las dispersiones de proteína total APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3 0,4 y 1,7% p/v y APA-HA pH 2,0 al 2% p/v. Se realizó un marcado no covalente con rodamina B (Biopack). Se preparó una solución acuosa a una concentración de 0,01% p/v. Las emulsiones se prepararon como se describió en los ítems **1.2.10** y **1.2.11**. Se pipeteó 20  $\mu$ l de emulsión y se extendió sobre un portaobjetos, se cubrió con la solución de rodamina para realizar la tinción y se dejó 30 min en reposo en la oscuridad. Para realizar la observación microscópica, la emulsión se cubrió con un portaobjetos.

Se utilizó como longitud de onda de excitación 568 nm (para rodamina B) y como longitud de onda de emisión 625 nm. Se realizaron observaciones de varios campos con diferentes aumentos: 20 X, 63 X, 63 X + zoom óptico.

El análisis de las imágenes se realizó con el empleo del programa provisto por el fabricante del microscopio: LAS AF versión 2.2.1. build 4842.

**I.2.16. Análisis estadístico**

Para los ensayos estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Prism Inc., USA). Los datos experimentales se promediaron a partir de al menos dos ensayos independientes y los resultados se presentan como la media +/- la desviación estándar. Los análisis de varianza significativa de medias (ANAVA) se realizaron haciendo uso de la prueba de Tuckey con un  $\alpha = 0,05$  (95% de confianza).

### I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### I.3.1. Caracterización de las proteínas presentes en las dispersiones y soluciones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3

##### I.3.1.1 Solubilidad

En general, las proteínas utilizadas como componentes funcionales en los alimentos deben poseer una adecuada solubilidad lo que suele reflejarse en buenas propiedades espumantes, emulsionantes y/o gelificantes. La solubilidad provee un buen índice de las aplicaciones potenciales o bien de las limitaciones de una dada proteína (Pilosof, 2000).

En base a resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, se eligieron dos condiciones experimentales para obtener proteínas de amaranto con diferencias estructurales marcadas. Las muestras de APA fueron disueltas en buffer fosfato a pH 2,0 y pH 6,3 a baja fuerza iónica y de esta manera se obtuvieron las dispersiones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3 constituidas por las fracciones soluble e insoluble del aislado. Luego de una centrifugación a 7000g por 15 min a 20°C se obtuvieron las respectivas fracciones solubles, obteniéndose las soluciones APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que a baja fuerza iónica ( $\mu = 0,1$ ), las proteínas de almacenamiento de amaranto son mucho más solubles a pH 2,0 que a pH 6,3. Los valores de % PS fueron  $84,0 \pm 5,8$  y  $28,9 \pm 1,4$  % p/v, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio donde Bolontrade y col., (2013) hallaron a  $\mu = 0,06$ , valores de solubilidad de  $87,0 \pm 3,0$  y  $28,0 \pm 1,0$  a pH 2,0 y 6,3, respectivamente.

##### I.3.1.2. Calorimetría diferencial de barrido

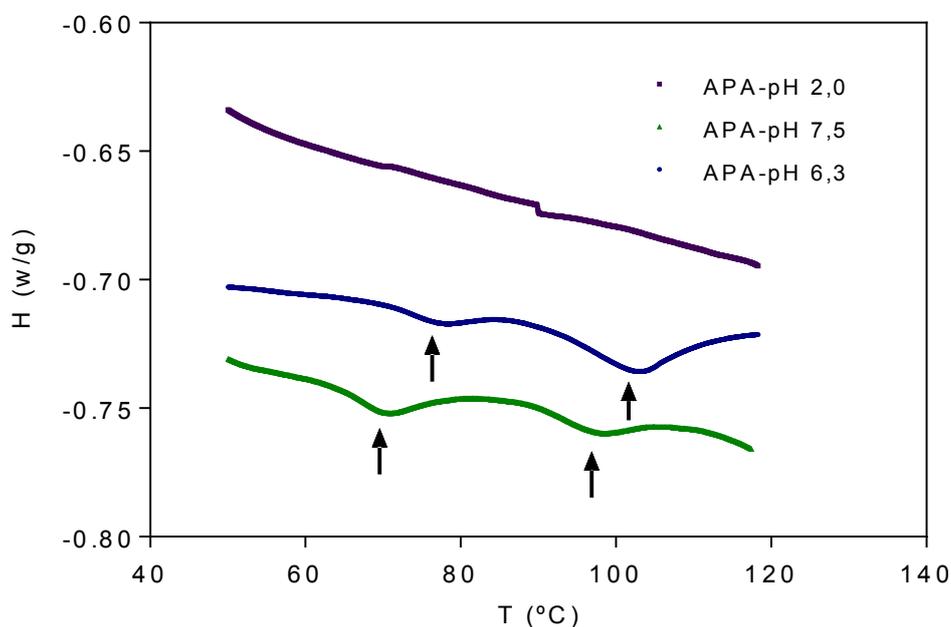
La **Figura I.10** muestra los termogramas obtenidos para los diferentes aislados ensayados. Los resultados indican que las proteínas que fueron dispersadas a pH 2,0 se encuentran completamente desnaturalizadas, mientras que las dispersadas a pH 6,3 están parcialmente desnaturalizadas. El valor de  $\Delta H_d$  calculado para la dispersión de APA-pH 6,3 fue de  $6,0 \pm 0,3$  J/g de proteína en base seca mientras que el  $\Delta H_d$  obtenido para una dispersión de APA a pH 7,5 fue de  $7,6 \pm 0,9$  J/g de proteína en base seca. Teniendo en cuenta que a pH 7,5 las proteínas de amaranto se encuentran en estado próximo al nativo se puede deducir que el % de desnaturalización alcanzado por las proteínas a pH 6,3 fue del 22% (**Tabla I.1**).

En el caso del aislado nativo (APA a pH = 7,5) el primer pico endotérmico se detectó a  $70,6 \pm 0,1^\circ\text{C}$  el cual corresponde a la desnaturalización de la fracción albúminas y el

segundo pico a  $97,9 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  el cual es atribuido al desplegamiento de la fracción globulinas (Martínez y Añón, 1996). Estas autoras analizaron mediante DSC diversos aislados de amaranto nativos obtenidos a diferentes pHs; en todos ellos encontraron que la temperatura del primer pico del termograma variaba entre  $70\text{-}73^{\circ}\text{C}$  y el segundo pico entre  $94\text{-}100^{\circ}\text{C}$ , resultados que coinciden con lo hallado para el aislado nativo correspondiente a este trabajo.

La  $T_d$ , temperatura de transición del pico, es una medida de la estabilidad térmica de una proteína dada, mientras que el  $\Delta H$ , calculado a partir del área debajo del pico de transición, se correlaciona con la extensión de la estructura secundaria ordenada de una proteína (Martínez y Añón, 1996).

Para el APA dispersado a pH 6,3 se encontró que los dos picos endotérmicos correspondientes a las fracciones antes detalladas presentaron un leve aumento en la  $T_{d1}$  y  $T_{d2}$  (**Tabla I.1, Fig. I.10**). La  $T_{d2}$  se encontró dentro de los valores informados por Martínez y Añón (1996) pero la  $T_{d1}$  fue superior al rango reportado para este pico, probablemente la desnaturalización parcial de esta fracción genere la formación de agregados que son estabilizados por fuerzas hidrofóbicas, con el consiguiente aumento de la temperatura de transición.



**Figura I.10.** Termogramas de DSC correspondientes a las muestras analizadas.

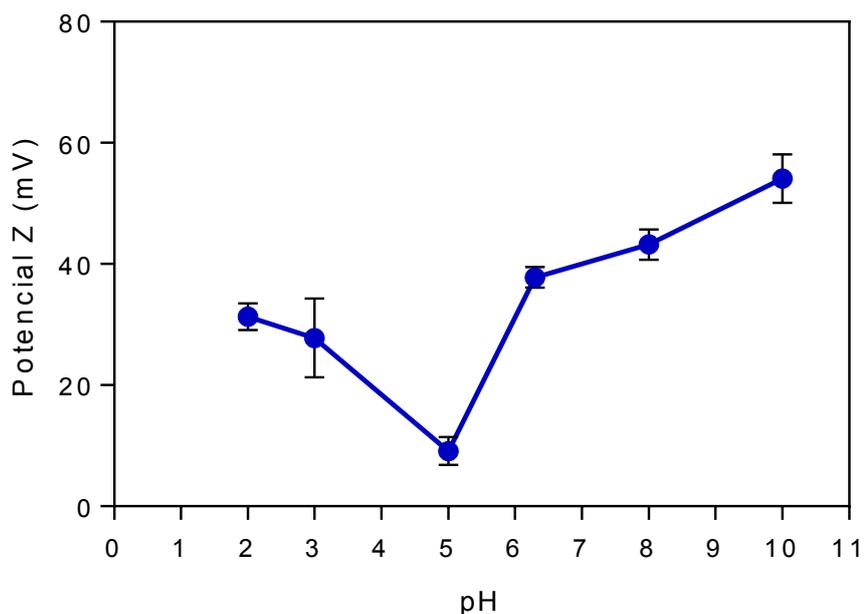
**Tabla I.1.** Entalpías y temperaturas de desnaturalización de las diferentes muestras.

Muestra	$\Delta H$ (J/g)	$T_{d1}$ (°C)	$T_{d2}$ (°C)
<b>APA</b>	$7,6 \pm 0,9^a$	$70,6 \pm 0,1^a$	$97,9 \pm 0,1^a$
<b>APA pH 2,0</b>	-	-	-
<b>APA pH 6,3</b>	$6,0 \pm 0,3^b$	$77,2 \pm 0,1^b$	$102,5 \pm 0,1^b$

### I.3.1.3 Potencial Zeta

En la **Figura I.11** se muestra la variación del potencial zeta en función del pH. De acuerdo a esta determinación, la carga eléctrica promedio de las proteínas en el APA-pH 2,0 fue positiva ( $31,3 \pm 2,2$  mV), mientras que la correspondiente al APA-pH 6,3 fue negativa ( $-37,8 \pm 1,7$  mV). Estos resultados fueron los esperados considerando el punto isoeléctrico de las proteínas de amaranto reportado por Konishi y col., (1991) y a los valores de carga neta informados por Ventureira y col. (2012a), 25 mV a pH 2,0, y por Shevkani y col., (2014),  $-40,6/-42,8$  mV, para diferentes cultivares de amaranto a pH 6,5/7.

Los resultados muestran que a pH 6,3, el valor de pH más cercano de los analizados en este trabajo al punto isoeléctrico de las proteínas de amaranto, hay una drástica reducción de la solubilidad. Estas proteínas tanto en la fracción soluble como en la insoluble presentan un bajo grado de desplegamiento, y una carga superficial marcadamente negativa. A pH 2,0 los resultados fisicoquímicos y estructurales mostrados están de acuerdo con los obtenidos en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Bolontrade y col., 2013; Ventureira y col., 2012a). El medio ácido causa la completa desnaturalización y disociación de la estructura cuaternaria de las proteínas. A su vez, las proteínas se encuentran parcialmente hidrolizadas por una proteasa endógena presente en los granos de amaranto, que se activa únicamente a pH ácido (Sabbione y col., 2016), generando una reducción de la masa molecular de algunas cadenas polipeptídicas. En suma, estas condiciones contribuyen a mejorar la solubilidad, revirtiendo uno de las desventajas de las proteínas de reserva del amaranto: su relativa baja solubilidad. Sin lugar a dudas, la disminución de la masa molecular que ocurre en las proteínas de amaranto expuestas a pH 2,0 – debido a la disociación e hidrólisis parcial de las moléculas proteicas- es más importante que la carga eléctrica promedio la cual, aunque de diferente signo, es similar a pH 6,3 y pH 2,0.



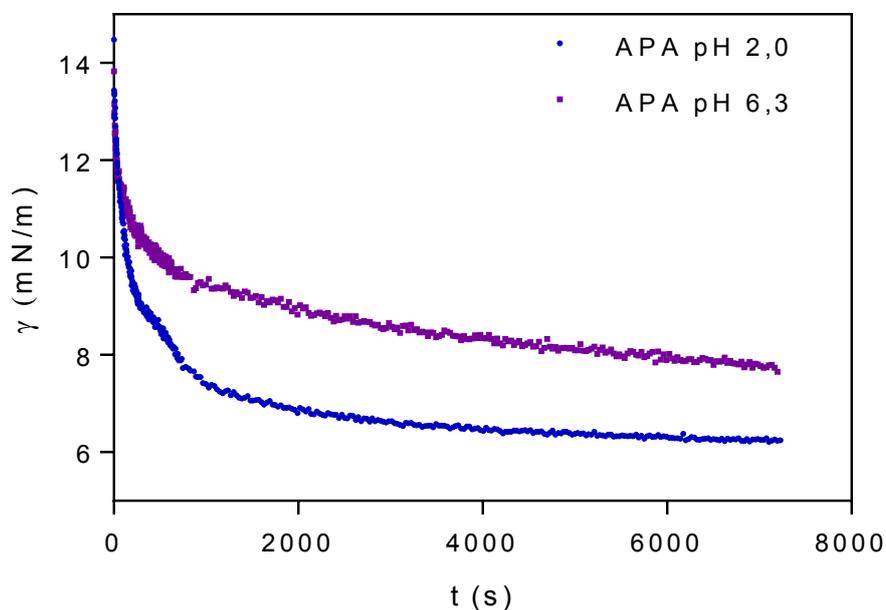
**Figura I.11.** Potencial Z (mV) absoluto del APA dispersado en agua a diferentes condiciones de pH. Valores de pH por encima del pI (aprox 4,5-6-5) presentan un potencial Z negativo mientras que los valores por debajo del pI presentan potencial Z positivo.

### I.3.2. Comportamiento interfacial de las soluciones proteicas en la interface aceite-agua

El conocimiento de las propiedades interfaciales que posee una molécula es de gran utilidad en el estudio de las propiedades funcionales de superficie. Estas propiedades van a determinar la capacidad y velocidad de la molécula, en este caso la proteína, para disminuir la tensión interfacial entre dos fluidos inmiscibles, condición necesaria para la formación de espumas y emulsiones. Una menor tensión interfacial reduce el trabajo mecánico necesario para hacer una espuma o una emulsión (Bos y Van Vliet, 2001). Las cinéticas de adsorción y reordenamiento de la proteína a la interface solo pueden ser evaluadas midiendo el descenso de la tensión interfacial cuando las concentraciones de proteína son lo suficientemente altas como para que la difusión no limite el proceso. En nuestras condiciones experimentales estos dos procesos se estudiaron a concentraciones de proteína en solución de 0,1 % p/v.

Se determinó la reducción de la tensión interfacial en la interface aceite-agua causada por el APA-pH 2,0 y el APA-pH 6,3 (**Fig. I.12**). Dicha reducción en la tensión puede ser correlacionada con a) la difusión de las cadenas polipéptidicas hacia la interface, b) la adsorción en la interface y c) la desnaturalización de las proteínas adsorbidas. Se

conoce por estudios previos que estos pasos ocurren simultáneamente (Tornberg y col., 1982). Para poder estudiar estos tres pasos se utilizó la **ecuación I.7** de primer orden utilizada por Panizzolo (2005) descripta en el ítem **I.2.8.3**.



**Figura I.12.** Tensión interfacial en la interface aceite/solución proteica en función del tiempo.

La **Tabla I.2** muestra las constantes de velocidad correspondientes a la adsorción y reacomodamiento de las proteínas en la interface ( $K_a$  y  $K_r$ ), como así también la tensión interfacial en el equilibrio ( $\gamma_e$ ) y las amplitudes de los procesos de adsorción y reacomodamiento ( $A_a$ ,  $A_r$ ).

**Tabla I.2.** Comportamiento interfacial de las soluciones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3 al 0,1% p/v en la interface aceite/agua.

	APA pH 2,0	APA pH 6,3
$K_a$ ( $s^{-1}$ )	$8 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-4}^a$	$4 \cdot 10^{-4} \pm 0^b$
$K_r$ ( $s^{-1}$ )	$8,4 \cdot 10^{-3} \pm 2,8 \cdot 10^{-3}^a$	$7,6 \cdot 10^{-3} \pm 1,2 \cdot 10^{-3}^a$
$A_a$ (mN/m)	$2,33 \pm 0,54^a$	$4,18 \pm 1,16^b$
$A_r$ (mN/m)	$3,71 \pm 0,93^a$	$2,77 \pm 0,64^a$
$\gamma_e$ (mN/m)	$5,96 \pm 0,27^a$	$6,6 \pm 1,1^a$
$E_d$ (mN/m)	$30,6 \pm 0,6^a$	$23,9 \pm 1,9^b$
$E_v$ (mN/m)	$0,9 \pm 0,9^a$	$0,3 \pm 0,0^a$
$E$ (mN/m)	$30,6 \pm 0,7^a$	$23,9 \pm 1,8^b$

Los péptidos y proteínas presentes en el APA-pH 2,0 y el APA-pH 6,3 causaron el descenso en la  $\gamma_e$  hasta alcanzar valores de  $5,9 \pm 0,3$  y  $6,6 \pm 1,1$  mNm<sup>-1</sup>, respectivamente. Es evidente que la principal diferencia entre las proteínas solubles del APA-pH 2,0 y el APA-pH 6,3, en cuanto a la modificación de la tensión interfacial no se encuentra en el estado de equilibrio, ya que no se evidenciaron diferencias significativas entre las dos condiciones de pH, pero si en la velocidad en la que estos cambios ocurren. Las proteínas presentes en el APA-pH 2,0 se absorben dos veces más rápido que las presentes en el APA-pH 6,3 de acuerdo a los valores de  $K_a$  obtenidos (**Tabla I.2**). No se encontraron diferencias en las velocidades de reacomodamiento en la interface, siendo los valores de  $K_r$  obtenidos más grandes que los correspondientes a  $K_a$ . De acuerdo con las diferencias estructurales entre las proteínas presentes en ambas muestras previamente descritas, se esperaría que las proteínas en el APA-pH 2,0 requieran un bajo grado de reacomodamiento comparado con las proteínas presentes en el APA-pH 6,3. Tal vez la desnaturalización parcial alcanzada (del orden del 20%) al último pH sea suficiente para lograr un buen anclaje en la interface. No debe descartarse la contribución del menor tamaño molecular de las proteínas presentes en el APA-pH 2,0, las cuales podrían tener una mayor velocidad de desorción de la interface.

El descenso de la energía libre en la interface causada por los fenómenos de adsorción y reacomodamiento fue estimada por la amplitud de los parámetros  $A_a$  y  $A_r$ , respectivamente. Solo se encontraron diferencias significativas en la energía libre de la interface causada por la adsorción de las proteínas, siendo la más chica la correspondiente a las proteínas presentes en el APA-pH 2,0.

La composición y la estructura de las proteínas adsorbidas en la interface se refleja en el comportamiento viscoelástico, siendo el factor que determina la estabilidad de la emulsión (Maldonado-Valderrama y col., 2008). Los resultados mostrados en la **Tabla I.2** indican que el comportamiento correspondiente a la interface resultante del APA-pH 2,0 y del APA-pH 6,3 es básicamente elástico, siendo los valores de  $E_d$  y  $E$  34 y 79 veces más grandes que los correspondientes a  $E_v$  en el APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3, respectivamente. La tangente del ángulo de desfase fue de 0,03 y 0,01, respectivamente. Un comportamiento reológico similar fue descrito por Ventureira y col., (2012a) para aislados proteicos de amaranto a pH 2,0 y pH 8,0; sin embargo el valor alcanzado por el módulo complejo dilatacional a pH 2,0 fue seis veces más grande que el informado en este trabajo. El comportamiento a pH 6,3 reportado por estos autores fue similar al descrito en este trabajo.

Las diferencias en los valores informados por Ventureira y col., (2012a) y los presentados en esta tesis a pH 2,0 podrían deberse a las diferentes condiciones

experimentales utilizadas en ambos trabajos, particularmente las referidas a la frecuencia de oscilación (0,02 y 0,2 Hz, respectivamente) y la concentración proteica (0,01 y 0,1 % p/v). Los resultados analizados anteriormente están de acuerdo con las observaciones que indican que la elasticidad interfacial es más baja para proteínas flexibles que para las globulares (Lucassen-Reynders y col., 2004) dado que en APA-pH 2,0, las proteínas se encuentran completamente desnaturalizadas mientras que a pH 6,3 el grado de desnaturalización es significativamente más bajo, siendo la conformación de las proteínas principalmente globular.

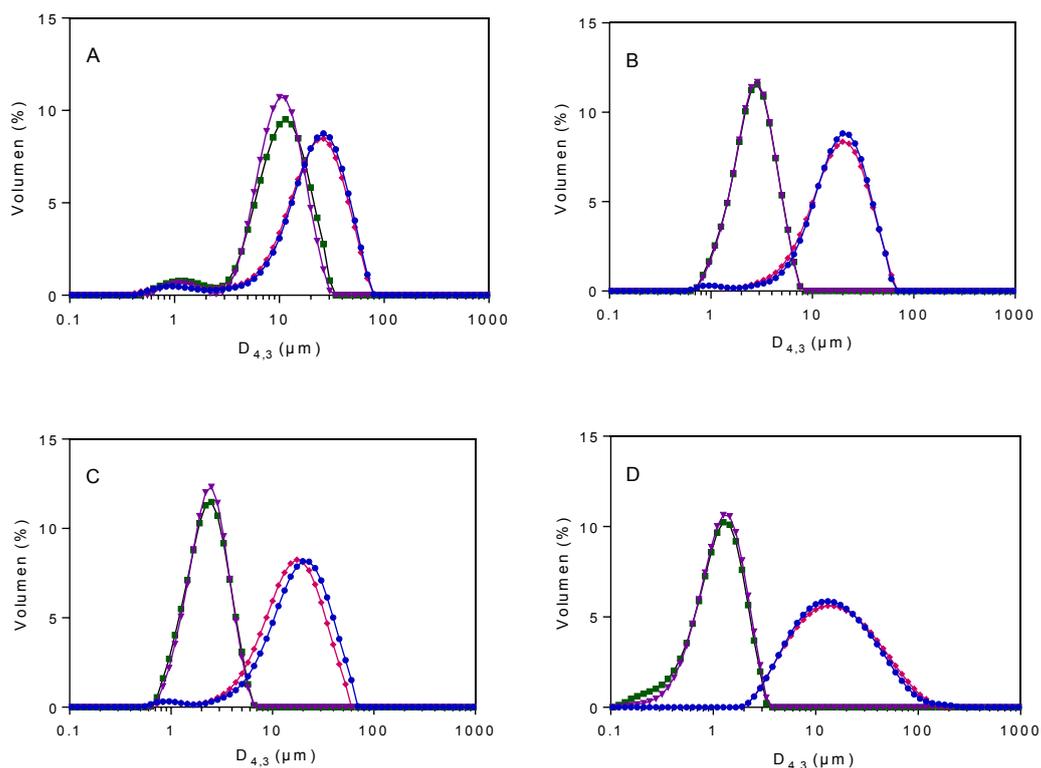
Teniendo esto en cuenta las emulsiones a pH 2,0 deberían ser más estables frente a la coalescencia que aquellas a pH 6,3, fenómeno que será discutido más adelante.

### **I.3.3. Emulsiones formuladas con Aislado proteico de amaranto**

#### **I.3.3.1. Propiedades emulsificantes**

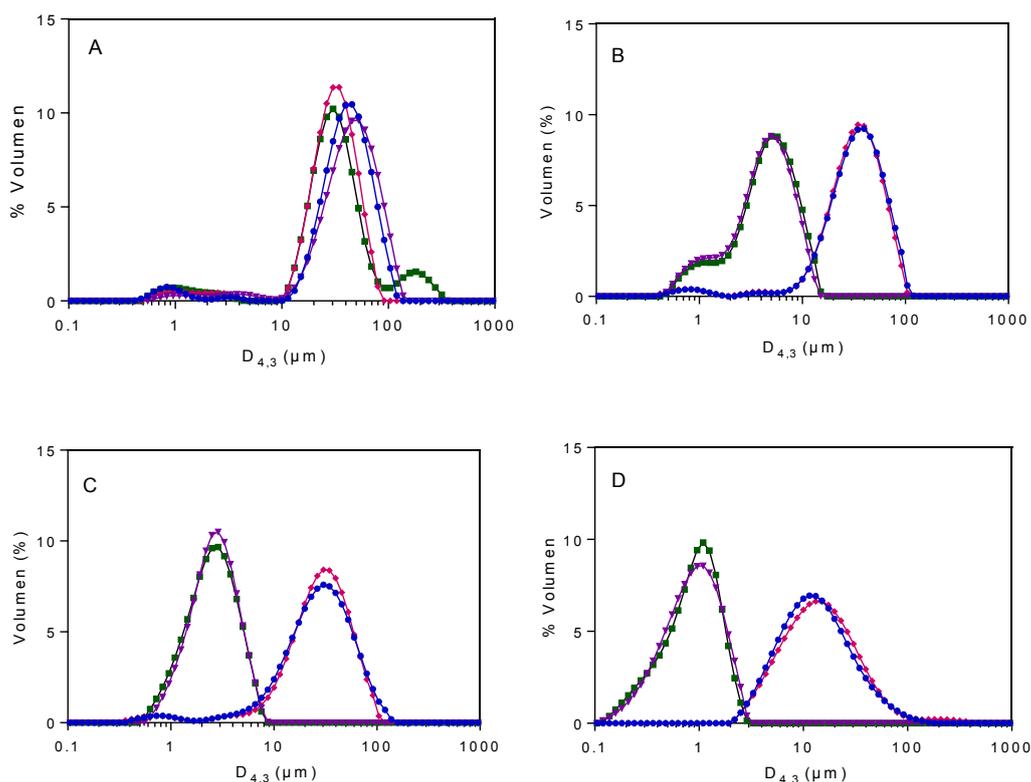
##### **I.3.3.1.1. Distribución del tamaño de gotas**

Para evaluar la influencia de la calidad y de la proporción de las fracciones solubles e insolubles como agentes tensioactivos, se prepararon emulsiones aceite-agua con las dispersiones y soluciones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3 y se analizaron diferentes propiedades. En el caso de las dispersiones (proteínas solubles + insolubles) se ensayaron cuatro concentraciones (0,1; 0,4; 0,8; y 1,7 % p/v) y se determinó el tamaño de partícula luego de formar la emulsión y a las 24 h de formadas. En las **Figuras I.13 y I.14** se muestran las distribuciones de tamaño de partícula en % de volumen tanto en ausencia como en presencia de SDS. En ausencia de SDS, para la concentración más alta ensayada (1,7% p/v) las distribuciones fueron monomodales tanto a pH 2,0 como a pH 6,3. Para las demás concentraciones a ambos pHs se evidencia una distribución un poco más amplia, que en lugar de ser monomodal, se caracterizó por presentar un pico predominante y un pequeño hombro a tamaños cercanos al micrón (1  $\mu\text{m}$ ). En presencia de SDS, mayoritariamente las distribuciones fueron monomodales desplazándose a menores tamaños de partículas.



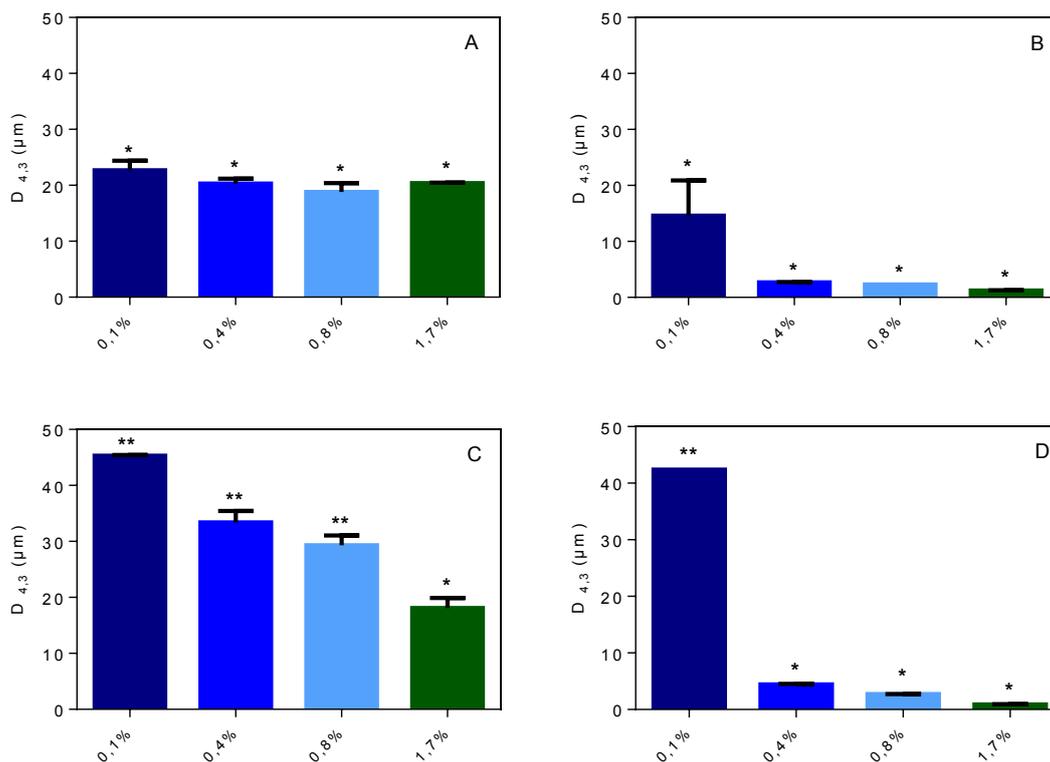
**Figura I.13.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones aceite/agua preparadas con las dispersiones de APA-pH 2,0 al 0,1% p/v (panel A), 0,4% p/v (panel B), 0,8% p/v (panel C) y 1,7% p/v (panel D), sin (-●-), con SDS (-▼-) y sin SDS a las 24 h (-◆-), con SDS a las 24 h (-■-). Los gráficos son representativos de al menos 3 determinaciones de emulsiones formuladas por duplicado.

En la **Figura I.15 (panel A y C)** se pueden visualizar la distribución del diámetro de Broucker para las emulsiones formuladas con la dispersión de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3. A pH 6,3 al aumentar la concentración de tensioactivo se produce una disminución del tamaño de partícula, situación que no se observa a pH ácido en donde a todas las concentraciones ensayadas el tamaño de partícula fue similar. A su vez, a pH ácido los valores de  $D_{4,3}$  fueron menores a excepción de la concentración más alta en donde no se encontraron diferencias significativas. Evidentemente las proteínas presentes en el APA-pH 2,0 debido a su alta solubilidad y a su mayor capacidad de adsorción a la interface ( $K_a$  mayor), migran rápidamente hacia la misma y logran estabilizar gotitas de aceite más chicas durante el proceso de homogeneización.



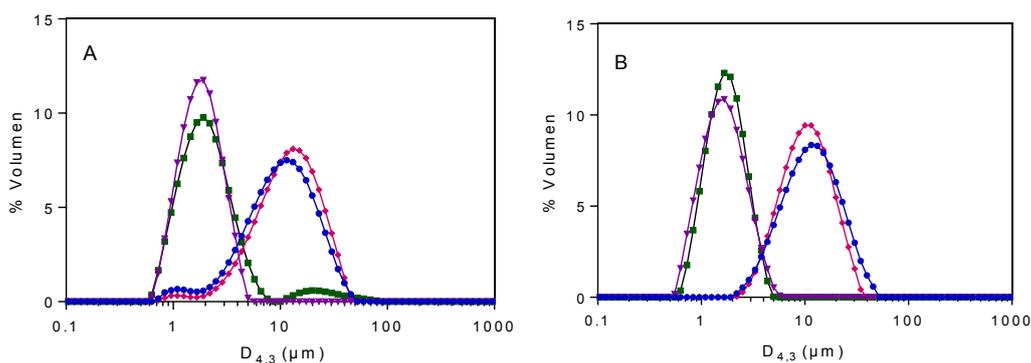
**Figura I.14.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones aceite/agua preparadas con las dispersiones de APA-pH 6,3 al 0,1% p/v (panel A), 0,4% p/v (panel B), 0,8% p/v (panel C) y 1,7% p/v (panel D), sin (-●-), con SDS (-▼-) y sin SDS a las 24hs (-◆-), con SDS a las 24 hs (-■-). Los gráficos son representativos de al menos 3 determinaciones de emulsiones formuladas por duplicado.

La presencia de SDS causó una disminución en el tamaño de partícula y su efecto fue más marcado a medida que aumentó la concentración proteica (**Fig. I.15, panel C y D**), evidenciándose un alto grado de floculación. En el caso de la mayor concentración proteica, el valor de  $D_{4,3}$  encontrado con y sin SDS fue equivalente para el APA-pH 2,0 y el APA-pH 6,3 (los valores de  $D_{4,3}$  fueron para pH 2,0:  $20,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ , sin SDS y  $1,2 \pm 0,0 \mu\text{m}$ , con SDS; pH 6,3:  $18,1 \pm 1,8 \mu\text{m}$ , sin SDS y  $0,9 \pm 0,0 \mu\text{m}$ , con SDS) (**Fig. I.15, panel A,B,C y D**). Los valores del índice de floculación (IF) calculados según la **ecuación I.14** para las diferentes concentraciones ensayadas en las emulsiones iniciales fueron 1,2, 6,6, 7,1 y 16 para el APA-pH 2,0 y 0,07, 6,5, 10 y 18,9 para el APA-pH 6,3 a 0,1, 0,4, 0,8 y 1,7 % p/v de proteína total. La menor concentración de proteína utilizada (0,1% p/v) fue insuficiente para cubrir el área interfacial creada, en estas emulsiones durante el proceso de emulsificación se evidenció coalescencia lo que originó la formación de gotas de aceite de gran tamaño.

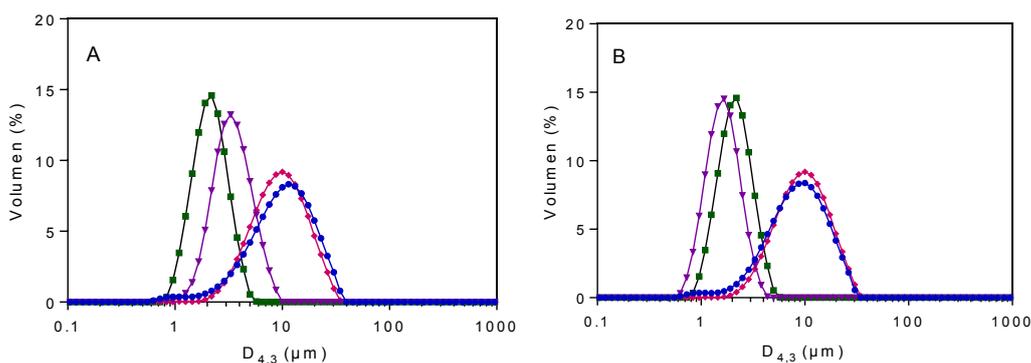


**Figura I.15.** Valores promedios del diámetro de Broucker ( $D_{4,3}$ ) correspondientes a las dispersiones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3 a las diferentes concentraciones ensayadas: APA-pH 2,0 sin SDS (panel A) y en presencia de SDS (panel B); APA-pH 6,3 sin SDS (panel C) y en presencia de SDS (panel D). El \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los  $D_{4,3}$  comparando una misma concentración a diferente pH.

En las **Figura I.16 y I.17** se puede observar la distribución del tamaño de partícula expresado en % de volumen para las emulsiones formuladas con la fracción soluble del APA-pH 2,0 y el APA-pH 6,3.



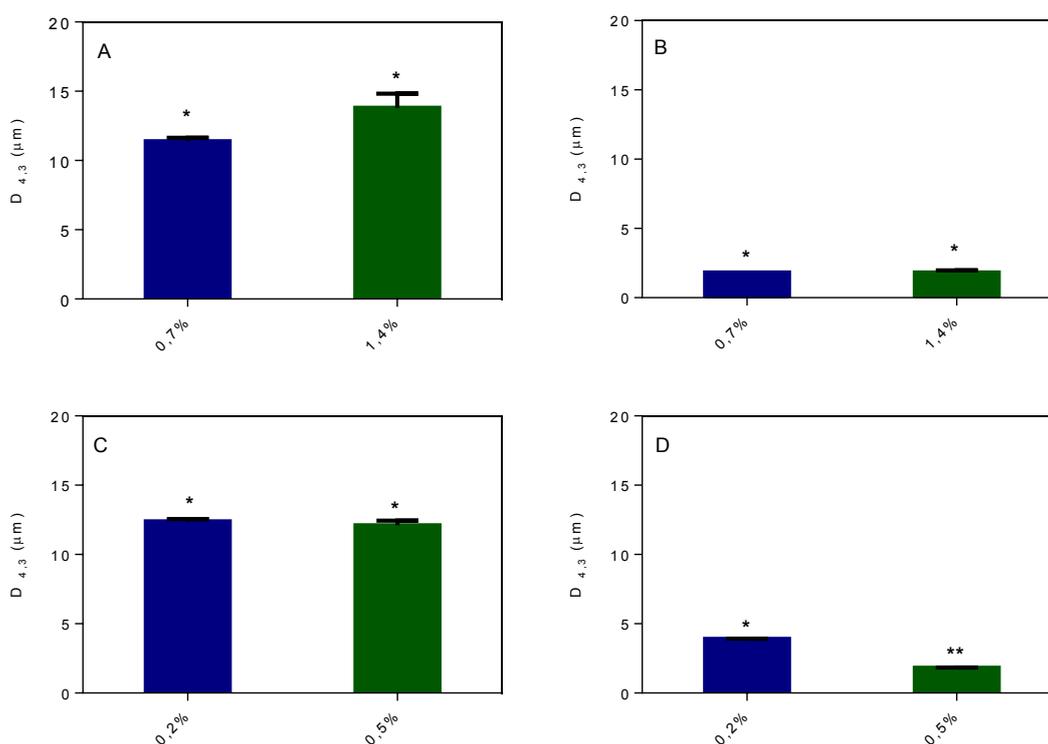
**Figura I.16.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones aceite/agua preparadas con las soluciones de APA-pH 2,0 al 0,7% p/v (panel A) y 1,4% p/v (panel B, sin SDS (-●-), con SDS (-▼-) y sin SDS a los 7 días (-◆-), con SDS a los 7 días (-■-)). Los gráficos son representativos de al menos 3 determinaciones de emulsiones formuladas por duplicado.



**Figura I.17.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones aceite/agua preparadas con las soluciones de APA-pH 6,3 al 0,2% p/v (panel A) y 0,5% p/v (panel B, sin SDS (-●-), con SDS (-▼-) y sin SDS a los 7 días (-◆-), con SDS a los 7 días (-■-)). Los gráficos son representativos de al menos 3 determinaciones de emulsiones formuladas por duplicado.

Las emulsiones que fueron preparadas con la fracción soluble del APA-pH 2,0 y el APA-pH 6,3 presentaron un bajo grado de floculación (**Fig. I.18, Tabla I.4**) comparadas con las correspondientes a las dispersiones (**Fig. I.18, Tabla I.4**). En este caso, se ensayaron dos concentraciones proteicas. El IF determinado para las emulsiones iniciales fue de 5,2 y 6,5 para 0,7% y 1,4% p/v de proteína soluble de APA-pH 2,0 y de 0,2 y 5,6 para 0,2% y 0,5% p/v de proteína soluble de APA-pH 6,3. Los valores de proteína soluble se corresponden a los presentes en 0,8 y 1,7 % p/v de proteína total.

Debe tenerse en cuenta que el tamaño de partícula obtenido en presencia de SDS fue equivalente al obtenido para las dispersiones que contienen ambas fracciones proteicas (soluble e insoluble) lo cual puede indicar que al menos algunas de las proteínas que permanecen en la fracción insoluble tiene propiedades tensioactivas, contribuyendo a reducir el tamaño de partícula o que la presencia de la fracción insoluble no afecta la capacidad tensioactiva y consecuentemente el tamaño de partícula en las emulsiones.



**Figura I.18.** Valores promedios del diámetro de Broucker ( $D_{4,3}$ ) correspondientes a las soluciones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3 a las diferentes concentraciones ensayadas: APA-pH 2,0 sin SDS (panel A) y en presencia de SDS (panel B); APA-pH 6,3 sin SDS (panel C) y en presencia de SDS (panel D).

### I.3.3.1.2. Viscosidad y comportamiento reológico de las emulsiones

Para investigar la capacidad de asociación de las proteínas de amaranto se determinó la viscosidad aparente y las propiedades reológicas de las emulsiones preparadas con las dispersiones y soluciones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3. Los ensayos se realizaron utilizando los dos niveles de concentraciones proteicas más grandes. Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla I.3**.

Los resultados muestran que todas las emulsiones presentaron un comportamiento pseudoplástico ( $n < 1$ ). Las emulsiones formuladas con la dispersión de APA-pH 6,3 presentaron valores de viscosidad aparente significativamente mayores que las emulsiones con APA-pH 2,0. La presencia de mayor cantidad de proteína insoluble junto con la alta capacidad de asociación de las proteínas a este pH determinó la mayor resistencia a fluir que presentaron estas emulsiones.

En los dos pHs ensayados al aumentar la concentración de macromoléculas aumentó la viscosidad. La emulsión preparada con la dispersión de APA-pH 6,3 1,7% p/v presentó el valor más alto de viscosidad e índice de consistencia ( $\eta_{app} = 111 \pm 4,8$  Pa.s,  $k = 0,6 \pm 0,02$  Pa.s). A bajos gradientes de velocidad presentó un “overshoot”, indicando la presencia de estructuras en la muestra. El índice de floculación calculado para esta emulsión fue de 18,9, el mayor en comparación con las demás emulsiones formuladas con la dispersión del APA. La presencia de una alta concentración de flóculos genera un aumento del radio hidrodinámico de las partículas con el consiguiente aumento de la viscosidad.

**Tabla I.3.** Comportamiento reológico de las emulsiones preparadas con APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3 al 1,7% p/v. Los valores del índice consistencia ( $k$ ) y el índice de flujo ( $n$ ) se calcularon a partir de la ley de la potencia:  $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$ . La  $\eta_{app}$  se determinó a  $\dot{\gamma} = 100$  s<sup>-1</sup>. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) comparando una misma concentración a diferente pH.

	APA-pH 2,0		APA-pH 6,3	
	dispersiones			
	0,8%	1,7%	0,8%	1,7%
$\eta_{app}$ (Pa.s)	8,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	20,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	56,8 ± 1,6 <sup>b</sup>	111 ± 4,8 <sup>b</sup>
$n$	0,45 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,02 <sup>a</sup>
$K$ (Pa.s)	0,21 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,05 <sup>b</sup>
	soluciones			
	0,7%	1,4%	0,2%	0,5%
	$\eta_{app}$ (Pa.s)	12,7 ± 1,4	18,6 ± 1,8	6,8 ± 3,4
$n$	0,45 ± 0,11	0,63 ± 0,02	0,89 ± 0,07	0,96 ± 0,13
$K$ (Pa.s)	0,25 ± 0,13	0,09 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,01

En el caso de las soluciones de APA-pH 2,0 los valores de viscosidad encontrados fueron similares a los correspondientes a las dispersiones y su comportamiento también fue pseudoplástico. Las soluciones de APA-pH 6,3 registraron un gran descenso de la viscosidad aparente, debido a la menor concentración proteica

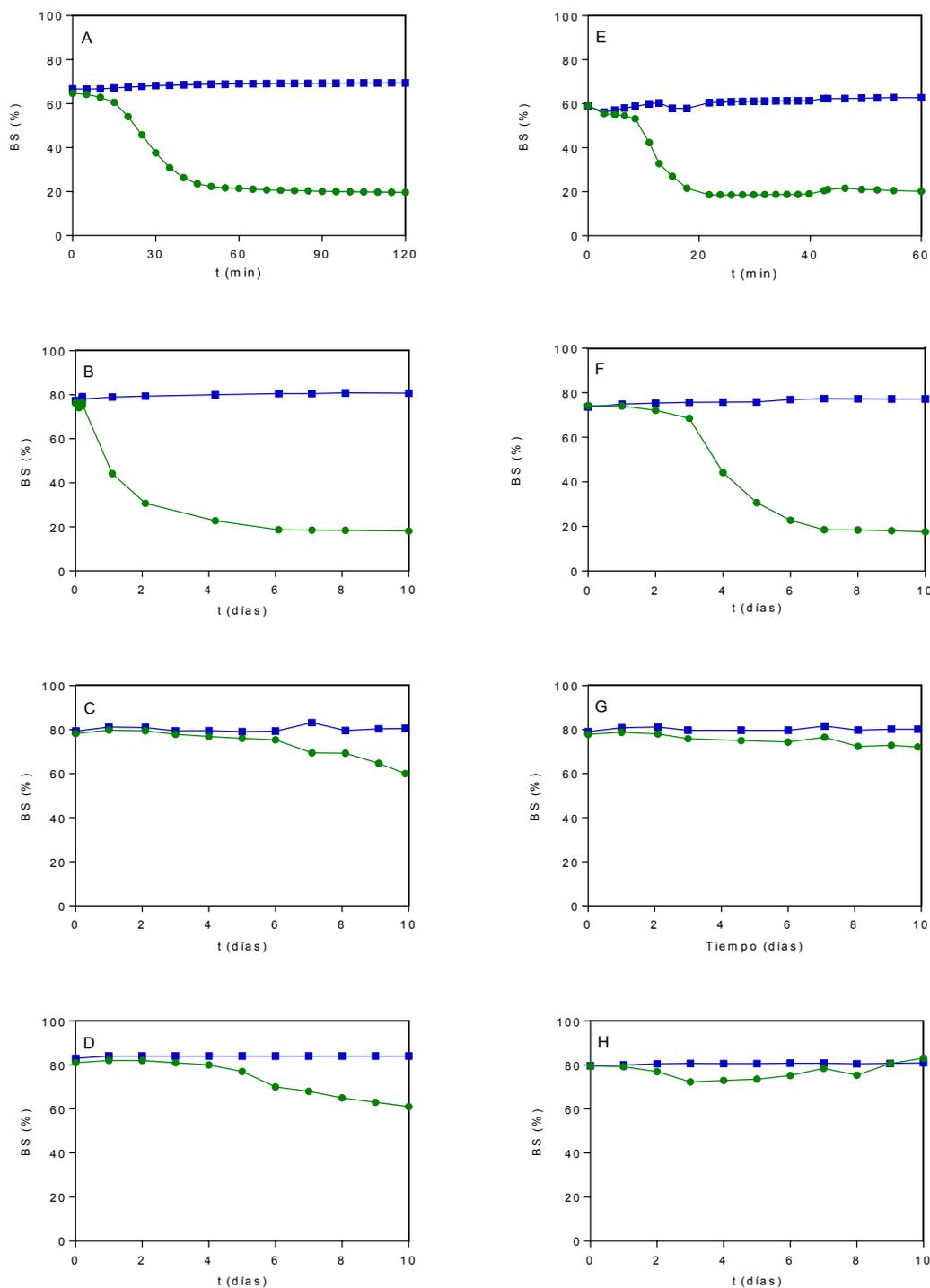
presente en la fracción soluble. A las dos concentraciones ensayadas se observó un comportamiento próximo a un fluido newtoniano ( $n = 0,89 \pm 0,07$  para 0,2% p/v;  $n = 0,96 \pm 0,13$  para 0,5% p/v).

#### **I.3.3.1.3. Estabilidad global de las emulsiones**

Se analizó la estabilidad de las emulsiones preparadas con las cuatro concentraciones proteicas indicadas previamente (0,1; 0,4; 0,8; 1,7% p/v). En la **Figura I.19** se muestran las cinéticas de cremado-floculación y floculación-coalescencia correspondientes a las emulsiones obtenidas con las dispersiones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3.

Todas las emulsiones preparadas con APA-pH 2,0 presentaron una gran estabilidad frente al cremado y a la coalescencia, excepto la emulsión preparada con la menor concentración de proteínas (0,1% p/v) (**Fig. I.19, panel A**). Como se remarcó previamente es evidente que esta concentración proteica es insuficiente para cubrir el área formada de la gota en las condiciones experimentales ensayadas, debido a esto, el fenómeno de coalescencia ocurre durante la formación de la emulsión. Este fenómeno da lugar a la formación de gotas grandes tanto en presencia como en ausencia de SDS. A concentraciones proteicas mayores: 0,4; 0,8 y 1,7% p/v (fracción soluble más insoluble) (**Fig. I.19, panel B, C y D**) se detectó una disminución del %BS en el fondo del tubo, este fenómeno ocurre por la migración de las gotas hacia la parte superior de la celda de medida. Sin embargo, esta migración no se encuentra acompañada, en principio en el tiempo evaluado, por un cremado evidente; tal como lo indica la constancia de los valores del %BS obtenidos en la parte alta de la celda de medida durante el tiempo de estudio. Este fenómeno puede estar asociado a una insuficiente migración de las gotas como para incrementar el %BS en la parte alta del tubo; probablemente debido a una baja velocidad de migración o a la simultánea presencia de cremado y coalescencia de las gotas. También es probable que la alta concentración proteica presente en la fase continua y la red de flóculos formada retarden el proceso de cremado.

Al 0,4% p/v, la disminución del %BS comienza a las 2 h luego de la preparación de la emulsión, llegando a un descenso del 60% con respecto al valor inicial, luego de 10 días de almacenamiento a 4°C. En el caso de las concentraciones proteicas más altas, el descenso del %BS fue detectado luego de 5 días de la preparación de la emulsión y luego de 10 días de almacenamiento ocurrió una disminución del 30 y 20% respectivamente.



**Figura I.19.** Variación de los valores de Back Scattering (%BS) en función del tiempo para la emulsión formulada con la dispersión de APA-pH 2,0: 0,1% (A), 0,4% (B), 0,8% (C) y 1,7% (D) y con el APA-pH 6,3: 0,1% (E), 0,4% (F), 0,8% (G) y 1,7% (H). Las zonas seleccionadas para el análisis fueron: 10-15 mm (cinética de cremado-floculación (-●-)) y 40-50 mm (cinética de floculación-coalescencia (-■-)).

Se calculó la constante de cremado-floculación  $K_{0,1}$  para todas las muestras analizadas. Para las emulsiones preparadas con las dispersiones de APA-pH 2,0, el  $K_{0,1}$  decrece al aumentar el contenido total de proteína (soluble + insoluble) siendo los valores calculados  $1,3 \pm 0,1$ ;  $0,7 \pm 0,1$ ;  $0,002 \pm 0,000$  y  $0,002 \pm 0,002$   $d^{-1}$  para 0,1; 0,4; 0,8 y 1,7% p/v.

Las emulsiones preparadas con las dispersiones de APA-pH 6,3 mostraron un comportamiento similar al descrito previamente. A la menor concentración ensayada (0,1% p/v de proteína total), se detectó una disminución en el valor del %BS en la parte baja del tubo a los 10 min, alcanzando una disminución del 20% luego de 20 min. Cuando se utilizó la concentración proteica más elevada algunos cambios empezaron a ocurrir luego de 1,5-2 días de preparada la emulsión y se evidenció el comienzo del cremado en la parte alta del tubo luego de 5-6 días. Para estas emulsiones, el valor del  $K_{0,1}$  fue  $3,2 \pm 0,0$ ,  $1,4 \pm 0,1$ ,  $0,012 \pm 0,002$  y  $0,005 \pm 0,002$   $d^{-1}$ ; para el mismo rango de concentración proteica total (0,1; 0,4; 0,8 y 1,7% p/v). Los valores de  $K_{0,1}$  calculados demostraron la existencia de una relación directa entre la concentración proteica y la estabilidad de la emulsión, mientras que dicha estabilidad demostró tener una relación inversa con el pH.

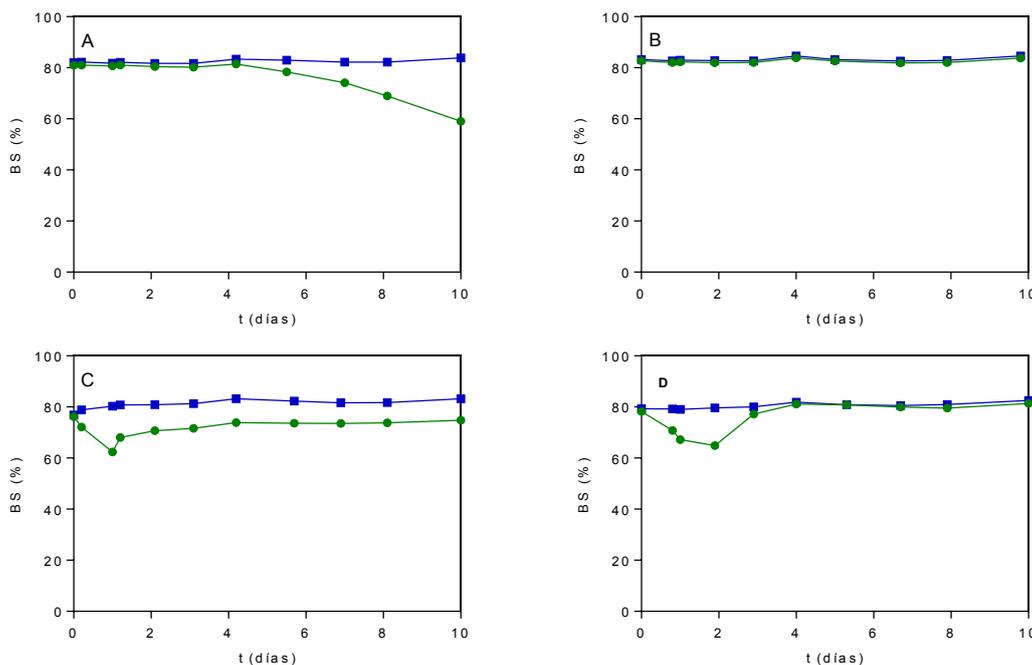
La **Tabla I.4** muestra los valores del IF y el IC calculados a partir de los  $D_{4,3}$  (**Fig. I.13 y I.14**), transcurrido 1 día desde la preparación de la emulsión con las dispersiones de APA-pH 6,3 y APA-pH 2,0.

Los resultados obtenidos muestran un incremento en el IF con el aumento de la concentración proteica en la emulsión, particularmente para las dos concentraciones más altas de APA-pH 6,3. El IC fue cercano a cero para todas las emulsiones testeadas. El incremento de la estabilidad al cremado-coalescencia de las emulsiones estaría asociado con la formación de una red de flóculos que puede retrasar tanto el cremado como la coalescencia de las gotas.

**Tabla I.4.** Valores promedios del diámetro de Broucker ( $D_{4,3}$ ) en presencia de SDS, índice de floculación (IF) e índice de coalescencia (IC) para las emulsiones preparadas con APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3, dispersiones y soluciones con diferentes concentraciones proteicas. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) comparando una misma concentración a diferente pH.

Parámetro		$D_{4,3}$ (SDS) ( $\mu\text{m}$ )		IF ( $\mu\text{m}$ )		IC ( $\mu\text{m}$ )	
		dispersión	inicial	1 día	inicial	1 día	inicial
% p proteína/v	pH						
0,1	pH 2,0	10,1 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>	10,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	-	0,04 <sup>a</sup>
0,1	pH 6,3	42,4 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	30,3 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,1 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>	-	0 <sup>a</sup>
0,4	pH 2,0	2,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,7 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,0 <sup>a</sup>	-	0,02 <sup>a</sup>
0,4	pH 6,3	4,5 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	4,7 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	6,5 <sup>a</sup>	6,4 <sup>b</sup>	-	0 <sup>a</sup>
0,8	pH 2,0	2,3 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	7,1 <sup>a</sup>	6,1 <sup>a</sup>	-	0 <sup>a</sup>
0,8	pH 6,3	2,7 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	2,7 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	9,9 <sup>b</sup>	-	0 <sup>a</sup>
1,7	pH 2,0	1,2 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	18,3 <sup>a</sup>	-	0 <sup>a</sup>
1,7	pH 6,3	0,9 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	18,9 <sup>a</sup>	24,8 <sup>b</sup>	-	0 <sup>a</sup>
	<b>solución</b>	<b>inicial</b>	<b>7 días</b>	<b>inicial</b>	<b>7 días</b>	<b>inicial</b>	<b>7 días</b>
% p proteína/v	pH						
0,7	pH 2,0	1,8 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	3,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	5,2 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>	-	0,8 <sup>a</sup>
0,2	pH 6,3	3,9 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	4,3 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	2,1 <sup>b</sup>	1,8 <sup>b</sup>	-	0,1 <sup>b</sup>
1,4	pH 2,0	1,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,7 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>	5,5 <sup>a</sup>	-	0 <sup>a</sup>
0,5	pH 6,3	1,8 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	5,6 <sup>b</sup>	4,0 <sup>b</sup>	-	0,1 <sup>a</sup>

Cuando se analizó la estabilidad de las emulsiones preparadas con la fracción soluble del APA-pH 2,0 y el APA-pH 6,3 (**Fig. I.20**), el comportamiento fue equivalente al de las emulsiones preparadas con las dispersiones (fracción soluble e insoluble de proteína).



**Figura I.20.** Variación de los valores de Back Scattering (%BS) en función del tiempo para: A) solución de APA-pH 2,0 0,7% p/v; B) solución de APA-pH 2,0 1,4% p/v; C) solución de APA-pH 6,3 0,2% p/v; D) solución de APA-pH 6,3 0,5% p/v. Las zonas seleccionadas para el análisis fueron: 10-15 mm (cinética de cremado-floculación (-●-)) y 40-50 mm (cinética de floculación-coalescencia (-■-)).

La mayor estabilidad para estas emulsiones se obtuvo para la concentración proteica más alta del APA-pH 2,0 (1,4% p/v de fracción soluble que corresponde al 1,7% p/v de proteína total). Las emulsiones preparadas bajo estas condiciones fueron estables hasta los 25 días de almacenamiento. En este caso, no fue posible calcular el  $K_{0,1}$  debido a que no se llegó a un descenso del 10% en el %BS al final del experimento. En el caso de las emulsiones preparadas con la fracción soluble del APA-pH 6,3 al 0,5% p/v (equivalente a la concentración proteica total del 1,7% p/v), los resultados fueron similares a los indicados anteriormente. Bajo estas condiciones experimentales, el valor del  $K_{0,1}$  fue  $0,014 \pm 0,001 \text{ d}^{-1}$  que es un valor más alto que el obtenido con la dispersión proteica total, indicando que las emulsiones preparadas con la fracción soluble + insoluble fue más estable. Las emulsiones preparadas con la fracción soluble del APA-pH 2,0 y el APA-pH 6,3 presentaron, luego de 7 días de almacenamiento, un valor de IF más bajo que los correspondientes a las dispersiones, luego de 1 día de almacenamiento (**Tabla I.4**). Los valores del IC luego de 7 días de almacenamiento

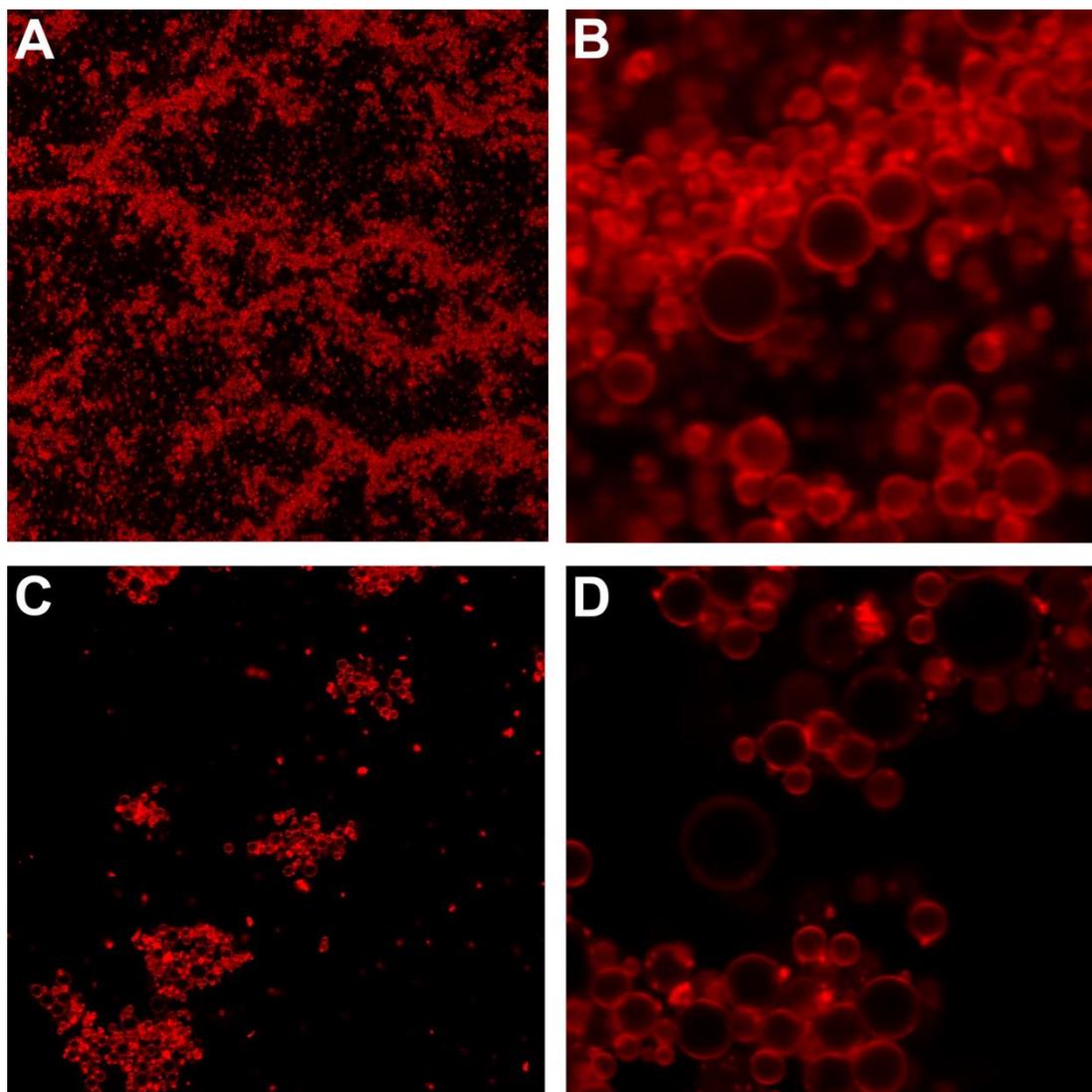
variaron entre 0 y 0,8, indicando una muy baja o nula coalescencia en el tiempo ensayado (**Tabla I.4**).

La baja capacidad de las proteínas en la fracción soluble para formar una red de flóculos permite una mayor movilidad de las gotas a través de la emulsión afectando la velocidad del cremado y coalescencia. Para las emulsiones preparadas con el APA-pH 6,3, los gráficos de variación de %BS en función de la longitud del tubo de medida evidencian que ocurre una pérdida de agua desde la emulsión. Este fenómeno fue observado tanto para bajas concentraciones de proteína total como para las dos concentraciones de proteína soluble (**Fig. I.19 y I.20**). Este comportamiento sugiere que la matriz proteica de la emulsión no es capaz de retener completamente la fase acuosa dentro de la red de flóculos. Para las emulsiones preparadas con el APA-pH 2,0, este efecto no fue detectado a ninguna concentración, inclusive para las emulsiones preparadas con la fracción soluble o total.

#### **I.3.3.1.4. Microscopia confocal de las emulsiones**

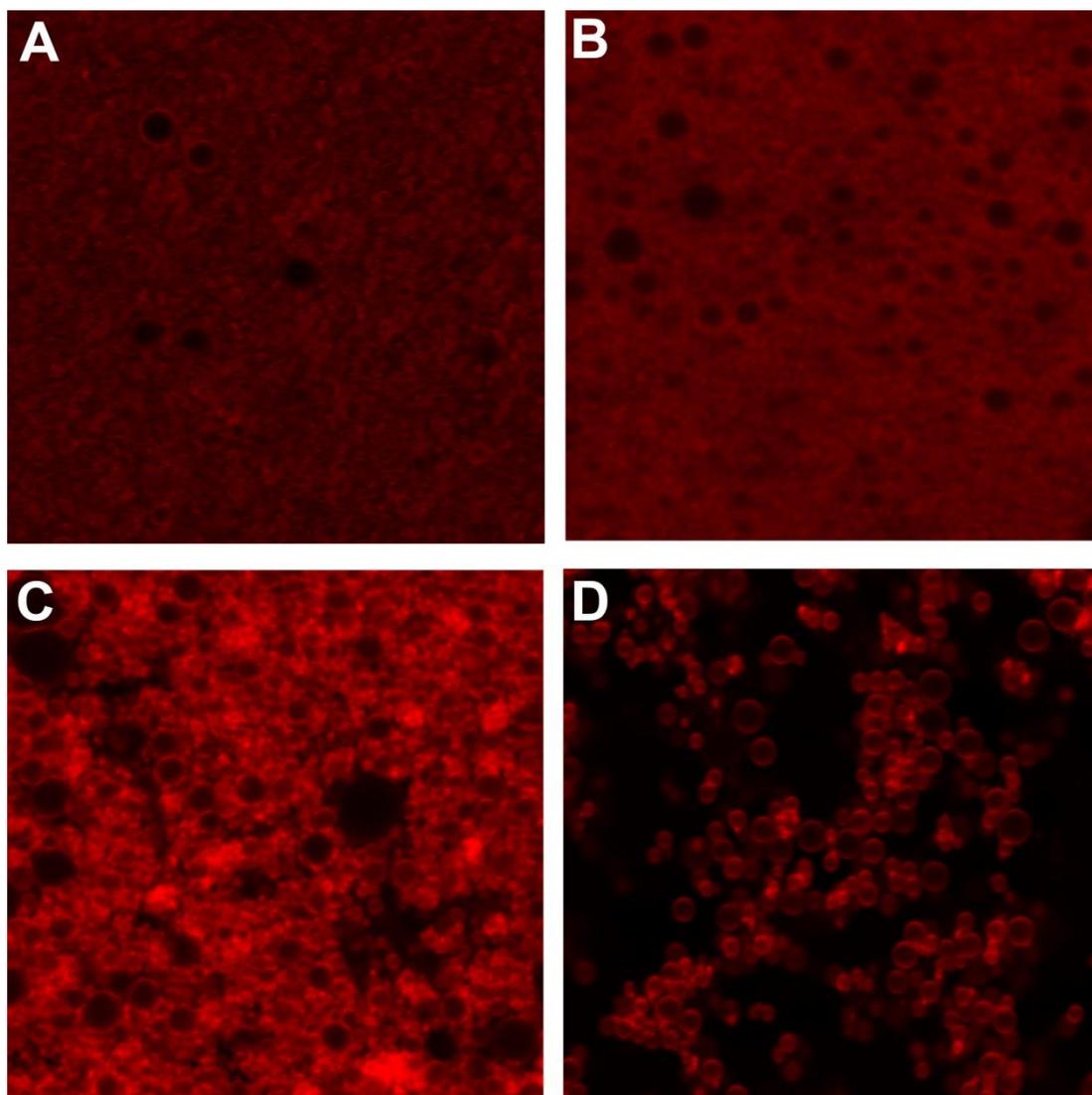
Las características microestructurales de las emulsiones elaboradas con las dispersiones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3 a la concentración de 0,4% p/v se pueden observar en la **Figura I.21**. En todas las fotografías las gotas de aceite se ven de color negro (de manera indirecta) recubiertas por el film proteico teñido con rodamina B (color rojo). En la **Fig. I.21 (panel A)** se puede observar una distribución homogénea de las moléculas de proteínas en toda la emulsión, mientras que en la **panel B** que posee una mayor magnificación, se observa la presencia de gotas de diferentes tamaños dando lugar a la formación de los flóculos que atraviesan la estructura de la emulsión confiriéndole la estabilidad mencionada previamente. Es probable que a pH ácido las interacciones que se producen entre las moléculas de proteína sean de tipo hidrofóbicas y de esa manera se produzca la floculación, el pH ácido despliega y expone estos grupos hacia la superficie generando mayor probabilidad de formación de dichas interacciones. A su vez a pH 6,3 las interacciones que posiblemente predominen entre los flóculos sean principalmente de tipo electrostáticas y puentes hidrógeno.

Las fotos tomadas a las emulsiones de APA-pH 6,3 permiten visualizar cúmulos de flóculos bien delimitados (**panel C**) y la ubicación de la proteína principalmente en la interface de las gotas y sus alrededores (**panel C y D**).



**Figura I.21.** Fotografías de las emulsiones teñidas con Rodamina B y formuladas con las dispersiones 0,4% p/v de APA-pH 2,0 (A y B con zoom óptico de 12X) y de APA-pH 6,3 (C y D con zoom óptico de 6,4X). Todas las fotos se tomaron utilizando el objetivo HCX PL APO CS 63,0X con inmersión en aceite.

En la **figura I.22** se pueden observar fotografías de emulsiones formuladas con las dispersiones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3 (**panel A y C**) a la concentración de 1,7% p/v y de las soluciones de APA-pH 2,0 1,4% p/v y APA-pH 6,3 0,5% p/v (**panel B y D**). En comparación con las fotos mostradas previamente (**Fig. I.21**), las dispersiones de APA-pH 2,0 y APA-pH 6,3 (**Fig. I.22, panel A y C**) presentaron gotas de menor tamaño, formando una red de flóculos que se extendió a través de la emulsión. La presencia de proteína tanto soluble como insoluble no anclada a la interface se puede inferir por la extensión de la tinción con Rodamina B que se visualiza de manera más uniforme en toda la emulsión.



**Figura I.22.** Fotografías de las emulsiones formuladas con las dispersiones 1,7% p/v de APA-pH 2,0 (A) y de APA-pH 6,3 (C) y con las soluciones de APA-pH 2,0 (B) y de APA-pH 6,3 (D). Todas las fotos se tomaron utilizando el objetivo HCX PL APO CS 63,0X con inmersión en aceite y un zoom óptico de 6,4X.

La emulsión formulada con la solución de APA-pH 2,0 (**Fig. I.22, panel B**) no presentó grandes diferencias con la elaborada con la dispersión de APA (**Fig. I.22, panel A**). Se pueden visualizar más cantidad de gotas de tamaños mayores. En la emulsión elaborada con la solución de APA-pH 6,3 (**Fig. I.22, panel D**) se observaron las gotas de aceite con mayor claridad, debido a la menor concentración de proteína presente, principalmente proteína insoluble. Nuevamente se visualizan las gotas formando flóculos. Los flóculos presentes se encuentran formando cúmulos de gotas.

### **I.3.4. Caracterización de las proteínas presentes en las dispersiones de APA-pH 2,0 y HA- pH 2,0**

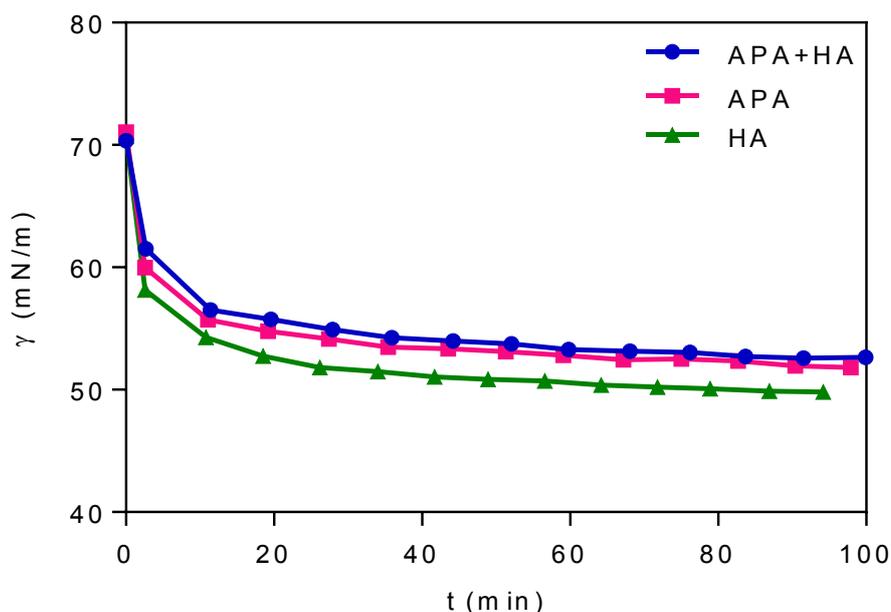
Luego del estudio de las emulsiones elaboradas con el aislado proteico de amaranto nos propusimos incorporar en la formulación de dichas emulsiones hidrolizado enzimático de amaranto. El hidrolizado de amaranto se utilizó con una doble finalidad. Por un lado como tensioactivo en la formación de la emulsión y por otro como fuente de péptidos bioactivos. La hidrólisis enzimática puede mejorar la propiedades funcionales de las proteínas e incluso aportar alguna actividad biológica como puede ser la actividad antioxidante, opioide o antihipertensiva mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (Clemente, 2000; Puchalska y col., 2013; Wouters y col., 2016;). Previo a la formulación de la emulsión se corroboró la presencia de péptidos bioactivos en el hidrolizado, mediante el estudio de la capacidad antihipertensiva, utilizando el ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina. Los resultados de estos ensayos se presentarán en el capítulo 2 de la presente tesis.

Se escogió el pH ácido como pH de trabajo debido a las mejores propiedades funcionales desarrolladas por las proteínas en este medio como por ejemplo su solubilidad y la capacidad que presentaron para formar y estabilizar las emulsiones analizadas previamente. La incorporación de hidrolizado como fuente de péptidos bioactivos a la formulación de las emulsiones se estudió en estas condiciones.

La caracterización de las proteínas se realizó sobre las dispersiones de APA-pH 2,0 y de HA-pH 2,0. El hidrolizado de amaranto se obtuvo mediante una hidrólisis con alcalasa del aislado proteico presentó un grado de hidrólisis igual a  $18,9 \pm 0,2\%$  y un contenido proteico de  $48,6 \pm 3,0\%$  p/p. El valor de solubilidad del HA en el buffer fosfato pH 2,0 fue de  $77 \pm 2\%$  p/p, similar al valor obtenido para el APA en las mismas condiciones de pH y fuerza iónica.

#### **I.3.4.1. Tensiómetro de gota**

Para poder conocer las características superficiales del aislado y del hidrolizado utilizado para formular la emulsión deseada se estudió la tensión superficial de una solución proteica 0,07 % p/v de cada uno de estos componentes y de una combinación de ambos. Las cinéticas de disminución de la tensión superficial en el tiempo se muestran en la **Figura I.23**. La solución conteniendo el APA más el HA en una proporción 50:50 disminuyó la tensión superficial alcanzando un valor de  $52,7 \pm 0,08$  mN/m ( $\gamma_{\text{buffer}} = 71,0$  mN/m). No se encontraron diferencias en la tensión superficial ( $52,0 \pm 0,33$  mN/m) con la solución preparada a partir del APA.



**Figura I.23.** Cinéticas de descenso de la tensión superficial en el tiempo para las diferentes muestras a una concentración del 0,07% p/v. Cada punto es un promedio de tres gotas formadas y las curvas graficadas corresponden al promedio de dos determinaciones.

La solución de hidrolizado ensayada arrojó un valor de tensión significativamente menor  $\gamma = 49,8 \pm 0,04$  mN/m. Valores similares de tensión superficial fueron encontrados por Ventureira y col., (2012b) quienes determinaron la tensión superficial de proteínas de amaranto en su estado nativo y sometidas a diferentes modificaciones. De acuerdo a estos autores, el aislado nativo luego de los 100 min alcanzó un valor de tensión de 53 mN/m y el aislado sometido a un tratamiento ácido con HCl 2 N durante 3 h alcanzó un valor de tensión de 48 mN/m.

El menor valor de tensión alcanzado por el hidrolizado probablemente sea debido al menor tamaño de los polipéptidos presentes en la solución de HA debido a la hidrólisis. La reducción del tamaño molecular tiene como consecuencia un cambio en la movilidad de los polipéptidos lo que les permite difundir más rápidamente en el medio acuoso para alcanzar la interface (Ward y Tordai, 1946; Ruíz-Henestrosa y col., 2009). Las curvas de APA y de APA+HA están casi solapadas, podría pensarse que los polipéptidos de mayor tamaño dominan el comportamiento de la mezcla sobre los polipéptidos y péptidos presentes en el hidrolizado.

La mayor velocidad de migración de los péptidos provenientes del hidrolizado probablemente tenga un papel preponderante en la formación de la emulsión mientras

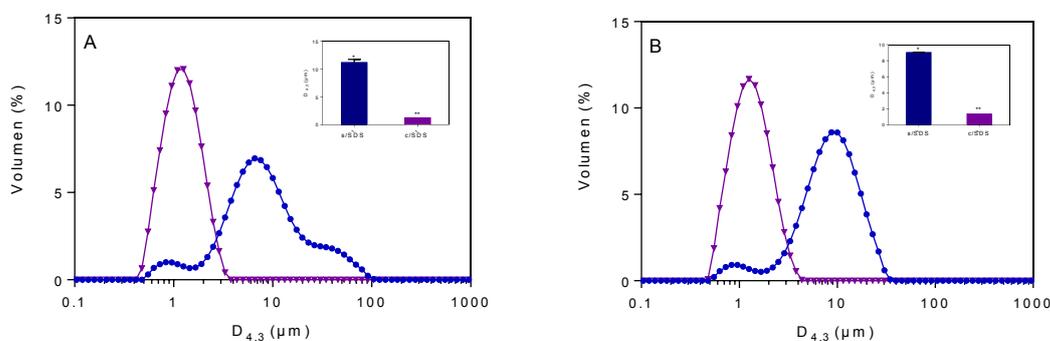
que las cadenas polipeptídicas aportadas por el APA se anclan en la interface y permiten la formación del film viscoelástico que estabiliza la emulsión.

### I.3.5. Emulsiones formuladas con aislado proteico de amaranto e hidrolizado de amaranto

#### I.3.5.1. Propiedades emulsificantes

##### I.3.5.1.1. Distribución del tamaño de gotas

El análisis del tamaño de partícula para las concentraciones de proteína 1% p/v y 2% p/v utilizadas en las emulsiones arrojaron un tamaño de gota de  $11,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$  y  $9,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$  demostrando un pequeño descenso de su tamaño con el aumento de la concentración proteica. Cuando este tamaño se estudió en presencia de SDS 1% p/v no se observaron diferencias entre las dos concentraciones ensayadas pero si una significativa reducción del  $D_{4.3}$  ( $1,3 \pm 0,0 \mu\text{m}$ ), evidenciando la presencia de flóculos proteicos. En la **Figura I.24** se muestra la distribución del tamaño de partículas, en ellas se distinguen poblaciones de gotas de diferentes tamaños. La emulsión formulada con 2% p/v de proteína (**Fig. I.24, panel B**) presentó una distribución bimodal al igual que la correspondiente a 1% p/v de proteína (**Fig. I.26, panel A**), aunque en esta última el segundo pico, más polidisperso, presentó un hombro en la zona de mayores tamaños de partícula.



**Figura I.24.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones aceite/agua preparadas con las dispersiones de APA-pH 2,0 y HA-pH 2,0 al 1,0% p/v (panel A) y al 2,0 % p/v (panel B) con SDS (-■-) y sin (-▲-).

En la **Tabla I.5** se presentan los valores de  $D_{4.3}$  para las emulsiones analizadas en esta sección conteniendo APA + HA y los valores de  $D_{4.3}$  de emulsiones formuladas con APA.

**Tabla I.5.** Diámetro promedio de Broucker e índice de floculación (IF) para las emulsiones formuladas con APA (0,4, 0,8 y 2% p/v) y con APA+HA (1 y 2% p/v). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) comparando las emulsiones con APA vs APA+HA (ver texto).

% p/v	D <sub>4,3</sub> ( $\mu\text{m}$ )	D <sub>4,3+SDS</sub> ( $\mu\text{m}$ )	IF
<b>APA</b>			
0,4%	20,3 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	2,67 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	6,6
0,8%	18,8 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	2,33 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	7,1
2%	11,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,83 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	12,4
<b>APA+HA</b>			
1%	11,2 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	1,22 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	8,2
2%	9,0 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1,3 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	5,9

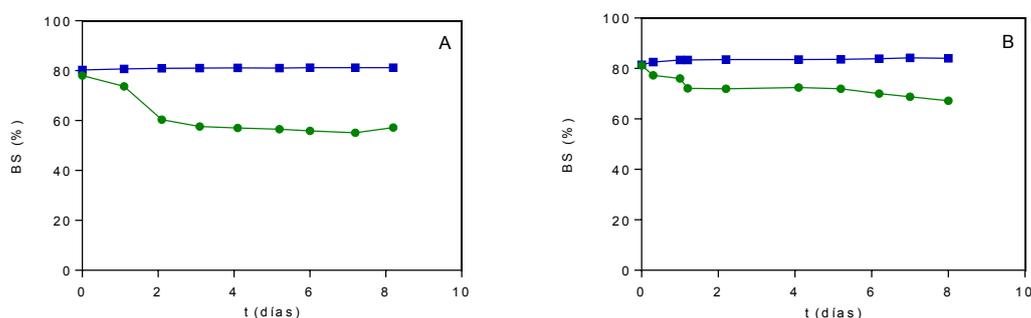
Si se comparan los tamaños de partículas de las emulsiones conteniendo HA en su formulación con las preparadas solo con APA podemos ver que el hidrolizado contribuyó a la disminución del D<sub>4,3</sub>. Por ejemplo, la emulsión formulada con 0,4% p/v de APA presentó un D<sub>4,3</sub> = 20,3  $\pm$  0,9  $\mu\text{m}$  y la emulsión 1% APA+HA, es decir, 0,5% p/v de APA presentó un D<sub>4,3</sub> = 11,2  $\pm$  0,6  $\mu\text{m}$  (**Tabla I.5**), el cual es significativamente más chico. Lo mismo puede corroborarse para la emulsión más concentrada conteniendo 2% p/v de APA+HA, con el aporte de 1% p/v del APA, está emulsión arrojó un valor de D<sub>4,3</sub> = 9,0  $\pm$  0,1  $\mu\text{m}$  significativamente más chico que la preparada con 0,8% p/v de APA (D<sub>4,3</sub> = 18,8  $\pm$  1,6  $\mu\text{m}$ ) (**Tabla I.5**). Si bien, las comparaciones no están realizadas sobre la misma concentración proteica son indicativas del rol del HA en la formación de la emulsión.

Si la comparación se hace sobre la base del mismo contenido proteico la emulsión con 2% p/v de APA presentó un D<sub>4,3</sub> = 11,1  $\pm$  0,3  $\mu\text{m}$  contra un D<sub>4,3</sub> = 9,0  $\pm$  0,1  $\mu\text{m}$  para la emulsión con 2% p/v de APA+HA (**Tabla I.5**). Nuevamente se puede observar que el hidrolizado contribuyó a la disminución del tamaño de partícula inicial e inclusive lo mejoró. Estos datos corroboran que es posible la utilización de hidrolizado como tensioactivo para la formación de las emulsiones.

Las dos concentraciones de emulsiones con APA+HA presentaron floculación, siendo menor a la mayor concentración proteica. Los péptidos aportados por el hidrolizado no estarían aportando a la formación de flóculos, el menor tamaño de estos y su movilidad influyó sobre la capacidad de formar interacciones que estabilicen dichos flóculos. La emulsión 2% p/v de APA presentó un IF = 12,4 contra un IF = 5,9 para la emulsión con 2% p/v de APA+HA (**Tabla I.5**).

### I.3.5.12. Estabilidad global de las emulsiones

Se analizó la estabilidad de las emulsiones formuladas en las condiciones antes descritas. La **Figura I.25** muestra las cinéticas de desestabilización obtenidas en la parte baja (10-15 mm) de la celda de medida y en la parte alta (40-50 mm). Las emulsiones se mantuvieron a 4°C durante una semana para poder realizar el estudio pudiéndose constatar una buena estabilidad frente al cremado y la coalescencia. Para las dos concentraciones proteicas utilizadas el %BS se mantuvo constante en la parte superior del tubo. En la parte inferior se observó una disminución del 20% del %BS para la emulsión 1% p/v (**Fig. I.25, panel A**) y del 12,5% en la emulsión 2% p/v (**Fig. I.25, panel B**). La disminución del %BS en la parte inferior del tubo da cuenta de la migración de las gotas de aceite hacia la parte superior del mismo. Sin embargo en la parte superior como lo demuestra la variación del %BS en el tiempo no hay cambios en la dispersión de la luz, esto puede deberse a la relativa baja velocidad de las gotas que migran, pudiendo quedar atrapadas en la red de flóculos propuesta previamente, sumado al cremado y coalescencia de las gotas en simultaneo, dando como resultado en el proceso de desestabilización un cambio nulo en el %BS.



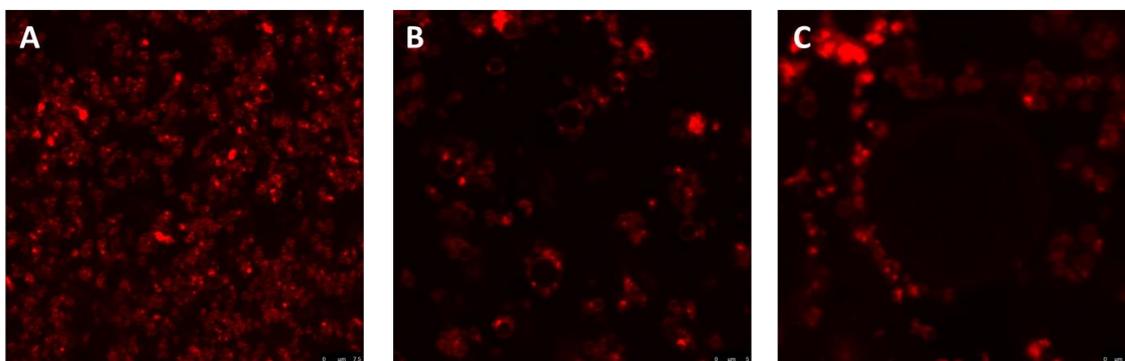
**Figura I.25.** Variación de los valores de Back Scattering (%BS) en función del tiempo para: A) dispersión de APA-HA pH 2,0 1,0% p/v; B) dispersión de APA-HA pH 2,0 2,0% p/v. Las zonas del tubo de medida seleccionadas para el análisis fueron: 10-15 mm (cinética de cremado-floculación (-●-)) y 40-50 mm (cinética de floculación-coalescencia (-■-)).

El comportamiento cinético de las emulsiones con hidrolizado en su formulación fue similar al de las emulsiones preparadas solamente con APA. La emulsión 1% p/v APA+HA llegó a un %BS final (8 días) de 57,24 y la preparada con 2% p/v a un %BS 67,20, mejorando su estabilidad con el aumento de tensioactivo. Las emulsiones con APA alcanzaron un %BS a los 8 días de 69,07 y 65,0 para la concentración 0,8 y 1,7% p/v, respectivamente. La emulsión formulada con APA+HA a la mayor concentración

proteica presentó una estabilidad similar a la preparada solo con APA y a la menor concentración proteica dicha estabilidad se vio disminuida levemente. Si bien, las comparaciones no están realizadas a la misma concentración en base proteica, sirven para tener una orientación sobre el rol del hidrolizado como agente estabilizante de una emulsión.

### I.3.5.13. Microscopia confocal de las emulsiones

Las emulsiones preparadas con 2% p/v de APA+HA fueron estudiadas en el microscopio confocal para poder conocer sus características microestructurales. En la **Figura I.26 (panel A)** se puede observar la distribución de las gotas de aceite rodeadas por las proteínas teñidas con Rodamina B. Las moléculas de proteína se encuentran principalmente ancladas a la interface. A una mayor magnificación (**panel B y C**) se visualizan las gotas de aceites conformando flóculos de diferentes tamaños. En la formación de estos flóculos participan gotas de aceite de diferentes tamaños. En estas emulsiones las gotas de aceite se pueden visualizar más nítidamente que las mostradas en la **Figura I.21 (panel A y B)** debido al menor contenido de cadenas polipeptídicas de gran tamaño teñidas con Rodamina B.



**Figura I.26.** Microscopia confocal de la emulsión formulada con APA+HA al 2% p/v teñidas con rodamina B. Todas las fotos se tomaron utilizando el objetivo HCX PL APO CS 63,0X con inmersión en aceite. Las tres fotos presentan diferentes zoom óptico, A (3,7X), B (5,0X) y C (8,7X).

#### I.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

En base a los resultados discutidos se puede concluir lo siguiente:

- Fue posible formular emulsiones estables a base de aislado proteico de amaranto tanto a pH ácido como cercano a la neutralidad. Se encontró una dependencia de la estabilidad con la concentración de proteína utilizada siendo la concentración más alta utilizada (1,7% p/v) la que generó emulsiones más estables.
- El pH ácido demostró ser el más adecuado para la formulación de emulsiones con APA, debido a la mayor concentración de proteína soluble que puede unirse a la interface. La desnaturalización de las proteínas a este pH junto con la hidrólisis parcial experimentada, genera la exposición de grupos hidrofóbicos permitiéndole anclarse e interaccionar en la interface de manera efectiva formando un film viscoelástico más resistente a los procesos de desestabilización.
- Al pH cercano a la neutralidad, si bien las proteínas presentaron baja solubilidad, fue posible obtener emulsiones estables a alta concentración proteica debido a la formación de flóculos que aumentaron considerablemente la viscosidad de la fase continua.
- Los resultados obtenidos muestran que la presencia de proteína insoluble en la fase continua, dependiendo de su cantidad y características no siempre resulta en detrimento de la estabilidad de la emulsión.
- La incorporación de hidrolizado enzimático como tensioactivo en la formulación de las emulsiones a pH ácido permitió obtener emulsiones con características fisicoquímicas similares a las obtenidas solo en presencia de aislado proteico de amaranto.
- Las emulsiones formuladas con APA+HA presentaron menores tamaños de partículas y una estabilidad global determinada por dispersión de luz láser similar a las emulsiones preparadas solo con el aislado.
- Las características descritas de estas emulsiones permitirían pensar en ellas como una alternativa posible para el transporte de péptidos bioactivos en formulaciones alimentarias.

## I.5. BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. (1990). Association of Official Analytical Chemists Inc. Official Methods of Analysis (15th edition). Washington DC.
- Bolontrade, A. J., Scilingo, A. A., & Añón, M. C. (2013). Amaranth proteins foaming properties: Adsorption kinetics and foam formation-Part 1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 319-327.
- Bos, M. A., & Vliet, T. Van. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants : A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91(3), 437–471.
- Bressani, R., & García-Vela, L. A. (1990). Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5), 1205–1209.
- Cian, R. E., Martínez-Augustin, O., & Drago, S. R. (2012). Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein by products of *Porphyra columbina*. *Food Research International*, 49(1), 364–372.
- Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1996). Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science and Technology*, 7(3), 83–91.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 11(7), 254–262.
- Gumus, C. E., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2017). Gastrointestinal fate of emulsion-based  $\omega$ -3 oil delivery systems stabilized by plant proteins: Lentil, pea, and faba bean proteins. *Journal of Food Engineering*, 207, 90–98.
- Fernandez-Avila, C., Arranz, E., Guri, A., Trujillo, A. J., & Corredig, M. (2016). Vegetable protein isolate-stabilized emulsions for enhanced delivery of conjugated linoleic acid in Caco-2 cells. *Food Hydrocolloids*, 55, 144–154.
- Izmailova, V. N., Yampolskaya, G. P., & Tulovskaya, Z. D. (1999). Development of the Reh binder's concept on structure-mechanical barrier in stability of dispersions stabilized with proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 160(2), 89–106.

- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2005). Encapsulation of emulsified tuna oil in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 1044–1053.
- Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, Y., Azumaya, J., & Nakatani, N. (1991). Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: Comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(11), 2745–2750.
- Langevin, D. (2000). Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 88(1–2), 209–222.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–75.
- Lucassen-Reynders, E. H., Fainerman, V. B., & Miller, R. (2004). Surface dilational modulus or gibbs' elasticity of protein adsorption layers. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(26), 9173–9176.
- Maldonado-Valderrama, J., Woodward, N. C., Patrick Gunning, A., Ridout, M. J., Husband, F. A., Mackie, A. R., & Wilde, P. J. (2008). Interfacial characterization of  $\beta$ -lactoglobulin networks: Displacement by bile salts. *Langmuir*, 24(13), 6759–6767.
- Martínez, E. N., & Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523–2530.
- Martínez Nistal, Á. (2003). Microscopía láser confocal. Servicio de Proceso de Imágenes. Universidad de Oviedo, España.
- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270–1282.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., & Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(6), 577-606.

- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: Principles, Practices and Techniques*. New York: CRC Press.
- Murray, B. S. (1997). Equilibrium and dynamic surface pressure-area measurements on protein films at air-water and oil-water interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 125(1), 73–83.
- Nielsen, P. M. (2001). Improved method for determining protein hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642–646.
- Palazolo, G. G., Sorgentini, D. A., & Wagner, J. R. (2005). Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 595–604.
- Panizzolo, L. A. (2005). Modificación de proteínas por vía enzimática. Análisis de la relación estructura-funcionalidad de los productos de hidrólisis. Tesis Doctoral. Universidad de la Republica, Uruguay.
- Pilosof, A. M. R. (2000). Solubilidad. In Pilosof Ana M. R. y Bartholomai G. B. (Ed.), *Caracterización funcional y estructural de proteínas*, 31–40. Buenos Aires: Eudeba.
- Puchalska, P., Esteve, C., Marina, M. L., & García, M. C. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta* 106, 328–349.
- Ribeiro, H. S., Ax, K., & Schubert, H. (2003). Stability of Lycopene Emulsions in Food Systems. *Journal of Food Science*, 68(9), 2730–2734.
- Ribeiro, H. S., Guerrero, J. M. M., Briviba, K., Rechkemmer, G., Schuchmann, H. P., & Schubert, H. (2006). Cellular uptake of carotenoid-loaded oil-in-water emulsions in colon carcinoma cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9366–9369.
- Ruíz-Henestrosa, V. P., Sánchez, C. C., Pedroche, J. J., Millán, F., & Rodríguez Patino, J. M. (2009). Improving the functional properties of soy glycinin by enzymatic treatment. Adsorption and foaming characteristics. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 377–386.
- Sabbione, A. C., Ibañez, S. M., Martínez, E. N., Añón, M. C., & Scilingo, A. A. (2016). Antithrombotic and antioxidant activity of amaranth hydrolysate obtained by activation of an endogenous protease. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(2), 174-182.

- Scilingo, A. A., Molina Ortiz, S. E., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (2002). Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. *Food Research International*, 35(9), 855–862.
- Tan, C. T. (2004). Beverage emulsiones. In Sjöblom, S., Friberg, K., Larsson, J. (Ed.), *Food Emulsions*. New York: Marcel Decker.
- Tornberg, E., Granfeldt, Y., & Håkansson, C. (1982). A comparison of the interfacial behaviour of three food proteins adsorbed at air—water and oil—water interfaces. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(9), 904–917.
- Ventureira, J. L., Bolontrade, A. J., Speroni, F., David-Briand, E., Scilingo, A. A., Ropers, M. H., & Anton, M. (2012a). Interfacial and emulsifying properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates under different conditions of pH. *LWT - Food Science and Technology*.
- Ventureira, J. L., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (2012b). Effect of acid treatment on structural and foaming properties of soy amaranth protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 272–279.
- Ventureira, J. L. (2010). Propiedades estructurales y funcionales de preparados proteicos de amaranto modificados y soja-amaranto. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- Ward, A. F. H., & Tordai, L. (1946). Time-dependence of boundary tensions of solutions I. The role of diffusion in time-effects. *The Journal of Chemical Physics*, 14(7), 453–461.
- Wouters, A. G. B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2016). Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 786–800.

# *Capítulo 2*

**Actividad  
antihipertensiva de  
emulsiones  
transportadoras de  
péptidos bioactivos**

---

## II. Introducción al capítulo

En la mayoría de los casos, la causante exacta de la hipertensión en humanos no se conoce pero la enfermedad se caracteriza por una actividad incrementada de las enzimas que forman parte del sistema renina-angiotensina (SRA), que conduce a niveles altos y anormales de angiotensina II en plasma. El alto nivel plasmático de angiotensina II provoca una constricción excesiva de los vasos sanguíneos con reducción de la vasorelajación y aumento de la producción de radicales superóxido, lo que conduce a un aumento en la degradación del NO (vasorelajante). Como consecuencia se produce un aumento de la presión arterial y la condición patológica de la hipertensión (Aluko, 2015). De acuerdo con los lineamientos europeos para el manejo de la hipertensión arterial la utilización de alimentos funcionales podría ser una buena alternativa para pacientes con valores de presión sanguínea cercana a la hipertensión o como una combinación auxiliar con las drogas antihipertensivas en el tratamiento de la presión arterial moderada (Borghgi y Cicero, 2017). La utilización de alimentos funcionales en el tratamiento o prevención de la hipertensión resultaría en una reducción de los efectos secundarios típicos de las drogas convencionales (tos, erupciones cutáneas, hipercalcemia, pérdida del gusto, apnea del sueño, disfunción eréctil, angioedema) y un ahorro potencial en gastos de salud pública ocasionados por las patologías cardiovasculares (Houston, 2013). Los péptidos bioactivos, posibles ingredientes de los alimentos funcionales, pueden ser aplicados como una nueva terapia para la prevención o tratamiento de enfermedades crónicas mediante la modulación y la mejora en las funciones fisiológicas. Los péptidos bioactivos han demostrado producir efectos antihipertensivos principalmente como resultado de acciones que implican la inhibición de las actividades de las enzimas del sistema renina angiotensina (ECA y renina); y el aumento en la producción de NO (Hernández-Ledesma y col., 2011; Martínez-Maqueda y col., 2012; He y col., 2014; Aluko, 2015; Saleh y col., 2016; Borghgi y Cicero, 2017). El estudio de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), haciendo uso de ensayos *in vitro*, ha resultado ser la metodología más difundida para detectar y cuantificar el poder antihipertensivo de péptidos.

La ECA es el blanco por excelencia en el tratamiento de la hipertensión arterial debido a que se encuentra involucrada en dos vías de regulación. Como se detalló en la introducción general, por un lado, interviene en la producción de angiotensinógeno-II, un potente vasoconstrictor, y por otro en la inactivación del péptido vasodilatador bradikinina (Guang y col., 2012). La eficacia clínica de los péptidos antihipertensivos

depende sustancialmente de dos factores: su resistencia a la degradación en el sistema gastrointestinal y su absorción dentro del torrente sanguíneo. Se han descrito diferentes mecanismos de absorción de péptidos en seres humanos. La misma puede estar mediada por transportadores peptídicos (PEPT1) para péptidos con un máximo de tres aminoácidos, ocurrir por pinocitosis en el caso de péptidos muy solubles, en forma paracelular a través del transporte acuoso o mediante rutas transcelulares (Aluko, 2015). Los péptidos bioactivos o hidrolizados proteicos con actividad antihipertensiva, administrados de forma oral, pueden sufrir hidrólisis mediada por las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal con la consiguiente pérdida de su actividad. Una de las estrategias para evitar la hidrólisis de estos compuestos es su protección o encapsulación en una matriz emulsionada y de esa manera las enzimas digestivas, no tendrán contacto con los compuestos proteicos hasta la liberación de los mismos desde la emulsión (Wouters y col., 2016).

En base a lo previamente expuesto y con el propósito de avanzar en el conocimiento de las propiedades antihipertensivas del amaranto se proponen los siguientes objetivos.

### II.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Estudiar la estabilidad de las emulsiones durante un proceso simulado de digestión gastrointestinal.
- Evaluar la acción inhibidora de proteínas y péptidos presentes en hidrolizados y emulsiones sobre la actividad de ECA, haciendo uso de un ensayo *in vitro*.
- Estudiar la biodisponibilidad de los péptidos en un modelo animal de ratas espontáneamente hipertensas mediante el registro de la presión arterial.
- Determinar mediante ensayos *ex vivo* un posible mecanismo de acción de los péptidos presentes en el hidrolizado y las emulsiones conteniendo proteínas y péptidos de amaranto.

## II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.2.1. Ensayos de estabilidad gastrointestinal de las emulsiones o/w

Las emulsiones formuladas con 0,8% p/v de APA-pH 2,0 y 1% p/v APA+HA-pH 2,0 según la descripción de los ítems **I.2.10** y **I.2.11** se sometieron a un proceso simulado de digestión gastrointestinal empleando el método descrito por Gawlik-Dziki y col., (2009) modificado por Minekus y col., (2014).

A efectos de acondicionar la emulsión previo al ensayo de digestión, un volumen de 5 ml de emulsión se mantuvo a 37°C durante 5 min. Luego se adicionaron 12 ml de fluido símil jugo gástrico (termostatizado a 37°C), se ajustó el pH a 2 con HCl y se dejó en agitación durante 60 min. Finalmente se agregaron 12 ml de fluido símil jugo duodenal, 6 ml de bilis y 875 µl de CaCl<sub>2</sub> 5 mM, se ajustó el pH a 7 y se incubó durante 60 min a 37°C con una agitación de 100 rpm en un agitador orbital (Fbr, Decolab SRL, Argentina). La hidrólisis se detuvo por calentamiento de la mezcla de reacción a 85°C durante 10 min en baño de agua. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de reacción con el objetivo de estudiar el cambio en el tamaño de partícula de las gotas de aceite. Finalizada la digestión, los tubos se centrifugaron a 4000g durante 20 min y 20°C, el sobrenadante obtenido se congeló a -80°C y liofilizó. El polvo obtenido se guardó en heladera hasta el momento de su utilización.

#### **Reactivos:**

**Fluido símil jugo gástrico:** Pepsina comercial MP Biomedicals 1:15000. Se prepararon 2,5 g/l pepsina en 0,03 M de NaCl con HCl 0,1 N. La solución se incubó a 37°C durante 30 min con agitación antes de ser utilizada.

**Fluido símil jugo duodenal:** Pancreatina comercial MP Biomedicals 4x USPgrade. 3 g/l pancreatina en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M pH 8,1 y lipasa comercial de páncreas porcino tipo II (Sigma-Aldrich) 1,5 g/l. El fluido se incubó 30 min a 37°C con agitación antes de utilizarlo.

**Bilis:** Se preparó una solución de bilis (Sigma-Aldrich) 14,5 g/l en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M pH 8,1. La concentración final de bilis en la digestión fue de 2,5 g/l.

Las determinaciones que involucran la medida del tamaño de partícula de las emulsiones a lo largo del tiempo de la digestión se realizaron en presencia de SDS 2% p/v luego de 24 h de incubación, según la metodología descrita en el capítulo 1, inciso **I.2.12**. El tamaño de partícula inicial no fue determinado debido a que el equipo utilizado para tal fin se encontraba en la ciudad de Quilmes y los ensayos de formulación y digestión de las emulsiones demoraban alrededor de 8 h sin la

posibilidad de poder hacer la determinación en el momento. Por este motivo, para conocer la estabilidad de las emulsiones durante la simulación gastrointestinal se decidió trabajar en presencia de SDS luego de 24 h.

### **II.2.2. Medición de los ácidos grasos libres**

El grado de lipólisis se determinó a partir de la cuantificación de ácidos grasos (AG) liberados (% AGL), durante la etapa duodenal, por acción de la lipasa pancreática. Para tal fin se procedió a la neutralización de los AG producidos durante el proceso, utilizando una solución de NaOH 0,1 N siguiendo el protocolo propuesto por la AOAC, (1990) desarrollado para aceites crudos y refinados. Para tal fin se tomaron 10 ml de las emulsiones digeridas y se titularon con NaOH 0,1 N utilizando una solución hidroalcohólica de fenolftaleína 1% p/v. Se realizó un blanco para conocer la acidez propia del medio de reacción. La actividad de la lipasa se determinó como el porcentaje de ácidos grasos liberados (%AGL) en el tiempo de digestión de la siguiente manera:

$$\%AGL = \text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times 28,2 / \text{m aceite (g)} \quad \text{ec. II.1}$$

Donde: m aceite corresponde a la masa de aceite presente al momento de incorporar la lipasa pancreática y 28,2 es un factor que se utiliza para expresar el %AGL relativo al ácido oleico.

### **II.2.3. Extracción de la ECA a partir de pulmón de conejo**

Los pulmones de conejos fueron provistos por la Facultad de Agronomía de la UNLP. Una vez faenados los animales, se extrajeron los pulmones y se transportaron en nitrógeno líquido hacia el laboratorio donde se almacenaron a -80°C hasta el momento de la extracción de la enzima. Los pulmones se descongelaron en hielo, se cortaron en pequeños trozos diseccionando solo el tejido pulmonar, evitando la presencia de cartílago y tejido muscular. Para realizar la extracción se utilizó un buffer borato de sodio 0,2 M, sacarosa 0,25 M, glicerol 20% p/v pH 8,3 en una relación 1:3 pulmones: buffer manteniendo el sistema en frío. Para inhibir la actividad de las proteasas tisulares que inactivarían la enzima se agregó fluoruro de fenilmetilsulfónilo 0,2 M en isopropanol en una relación de 1 µl por cada ml de buffer de extracción utilizado. Se empleó un homogeneizador ULTRATURRAX T25 (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Germany) a una velocidad de 20.000 rpm durante 1 min para producir la disgregación del tejido y la suspensión resultante se centrifugó a 5000 g durante 5 min a 4°C en una centrifuga Avanti J-25 (Beckman-Coulter, USA). El sobrenadante obtenido de la

centrifugación se fraccionó y almacenó a 4°C hasta el momento de su utilización en los ensayos de inhibición enzimática.

#### **II.2.4. Actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)**

La actividad inhibitoria de ECA fue medida utilizando el método de Cushman y Cheung (1971) modificado por Kim y col., (1999).

##### **Reactivos**

**Buffer A:** Borato de sodio 0,2 M pH 8,3; NaCl 2 M

**Buffer B:** Borato de sodio 0,2 M pH 8,3

**Buffer C:** Borato de sodio 0,2 M pH 8,3; NaCl 0,2 M; glicerol 20% p/v.

**Muestra:** Suspensión del hidrolizado, emulsión fresca y emulsión digerida liofilizada en buffer B. La suspensión se agitó durante 1 h a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 5000g durante 5 min a temperatura ambiente y se tomó el sobrenadante. Inicialmente se preparó una suspensión con 5 mg/ml de proteína soluble y se testeó el % de inhibición, una vez conocido este valor se definió el rango de concentración a ensayar para determinar el EC<sub>50</sub>.

**Captopril** (inhibidor comercial): se preparó una solución stock de 3 mg/mL (13,8 mM) en agua bidestilada, de 1 semana de vida útil a 4°C. Al momento de utilizar se diluyó 1:800 en tres diluciones seriadas de 1:2, 1:20 y 1:20. Esta solución se utilizó como control positivo de la reacción corroborando una inhibición sobre ECA del 90-100%.

**Hipuril-Histidil-Leucina** (HHL, sustrato): solución 5 mM en buffer B.

**ECA comercial** (EC 3.4.15.1, 1,0 U/ml, Sigma): La proteína purificada sólida se llevó a 1 U/mL en buffer C y se diluyó en una proporción de manera de obtener siempre la misma actividad máxima ( $DO_{382nm} = 0,9$ ). Esta dilución varió entre 1:5 a 1:2 dependiendo del lote utilizado o del tiempo de almacenamiento, ya que estas dos variables alteraban la actividad enzimática inicial.

**ECA de pulmón de conejo:** se utilizaron 25 µl del extracto obtenido en el II.2.3 y se ajustó la actividad máxima para obtener una  $DO_{382nm} = 0,9$ .

Tanto la enzima comercial como la enzima de pulmón se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización. La descongelación y las diluciones se realizaron manteniendo los tubos sobre hielo.

**Reactivo de color:** Se preparó una solución 3% p/v de cloruro de cianurilo (C<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>) en dioxano.

### Desarrollo

Se incubaron 25 µl de enzima con 100 µl de sustrato sintético y 25 µl de muestra a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo por calentamiento en baño de agua durante 15 min. Luego del enfriamiento de los tubos se agregó 600 µl de fosfato de sodio pH 8,3 y 515 µl de reactivo de color que reacciona con el ácido hipúrico producido por la reacción enzimática, se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó durante 10 min a 5000g a 20°C. Luego se leyó la absorbancia a 382nm con un espectrofotómetro Beckman DU 650 (Beckman Co., USA). El blanco se obtuvo incubando el sustrato sintético con la muestra y reemplazando la enzima ECA por su equivalente en volumen de buffer A.

Para determinar la actividad máxima se siguió el mismo procedimiento reemplazando la muestra por 25 µl de buffer A. Para las determinaciones de EC<sub>50</sub> se variaron las concentraciones de muestra, haciendo diluciones seriadas de muestra preparada como se describió anteriormente.

En la **Tabla II.1** se esquematiza el protocolo de trabajo seguido para determinar la actividad máxima (AM), el blanco de actividad máxima (BAM), la inhibición utilizando captopril como control positivo (C), el blanco de captopril (BC), y la potencial inhibición de las muestras a ensayar (M) con su respectivo blanco (BM).

El porcentaje de inhibición se calculó como:

$$\%Inh = 100 \cdot \left( 1 - \frac{A_m - A_{0m}}{A_{MAX} - A_{0MAX}} \right) \quad \text{ec. II.2}$$

Donde:  $A_m$  y  $A_{0m}$  son las absorbancias de los tubos con muestra en presencia y ausencia de ECA, respectivamente.  $A_{MAX}$  y  $A_{0MAX}$  son las absorbancias en ausencia de muestra y en ausencia de muestra y ECA, respectivamente. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

**Tabla II.1** Protocolo de trabajo utilizado para la determinación de la actividad máxima de ECA y la inhibición producida por captopril y las muestras en estudio.

REACTIVO	AM	BAM	C	BC	M	BM
Buffer A (μl)	50	50	50	50	50	50
H <sub>2</sub> O bidestilada (μl)	25	50		25		25
Captopril (μl)			25	25		
HHL (μl)	100	100	100	100	100	100
Muestra (potencial inhibidor) (μl)					25	25
Incubar 5 min a 37°C (μl)						
ECA (μl)	25		25		25	
Incubar 30 min a 37°C						
Incubar 15 min a 90°C						
Fosfato pH 8,3 (μl)	600	600	600	600	600	600
Reactivo Color (μl)	515	515	515	515	515	515
Vortex velocidad máxima 30 seg						
5 min de reposo						
Centrifugar a 3000g 10 min						
Leer Abs a 382 nm						

#### II.2.4.1. Ajuste de las curvas de inhibición

Las curvas de inhibición se ajustaron a un comportamiento alostérico del tipo sigmoidal mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición} = V_{\max} \times C^h / (K_h^h + C^h) \quad \text{ec. II.3}$$

Donde:  $V_{\max}$  es la máxima velocidad alcanzada por la enzima. Corresponde a la velocidad de la enzima extrapolada a concentraciones muy altas de sustrato y, por lo tanto, casi siempre es más alta que cualquier velocidad medida experimentalmente. En nuestro caso sería el % de inhibición máximo alcanzado.  $C$  es la concentración del sustrato utilizado en el experimento o la concentración de inhibidor empleada. La concentración de los diferentes inhibidores utilizados se expresó en mg/ml de proteína en el medio de reacción. La concentración de captopril está expresada en nM.  $K_h$  es la concentración de sustrato que produce una velocidad equivalente a la mitad de la velocidad máxima de la enzima. En nuestro caso al utilizar muestras que inhiben la enzima, la  $K_h$  es sinónimo del  $EC_{50}$ , es decir, la concentración que genera un 50% de inhibición enzimática.  $h$  es la pendiente de la curva. Cuando  $h$  es igual a 1, la ecuación es idéntica a la ecuación de Michaelis-Menten. Cuando es mayor que 1, la curva es sigmoidal.

### **II.2.5. Ensayos *in vivo***

Los estudios *in vivo* y *ex vivo* se realizaron con la colaboración del Profesor Dr. Gustavo Rinaldi (Centro de Investigaciones Cardiovasculares, FCM-UNLP) y formaron parte de un estudio en conjunto realizado con la Dra. Aphalo Paula y la Dra. Quiroga Alejandra investigadoras integrantes del grupo de proteínas vegetales.

Los ensayos se llevaron a cabo con animales en el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

El protocolo para la utilización de animales de laboratorio fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL). Facultad de Ciencias Médicas – UNLP.

#### **II.2.5.1. Diseño experimental**

El ensayo se llevó a cabo utilizando 41 ratas machos espontáneamente hipertensas (cepa SHR) adquiridas en el bioterio del laboratorio de animales de experimentación (LAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales pesaron entre 210-290 g y tenían aproximadamente 10 semanas de edad al inicio del estudio.

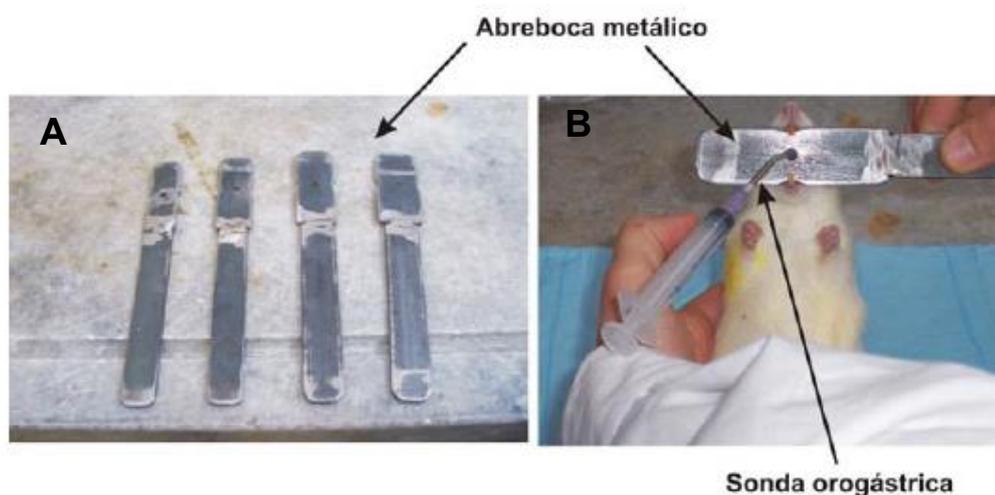
El hábitculo en el cual se mantuvieron las ratas durante el estudio fue una jaula de 50 cm x 25 cm x 20 cm con un lecho de viruta de pino y una densidad animal de 4 animales por jaula. La alimentación y el agua de bebida se administraron *ad libitum* (sin restricción). El alimento utilizado fue de una marca comercial (alimento balanceado COOPERACIÓN, rata-ratón) en forma de extrusado. La temperatura de la habitación en la que se encontraban los animales fue aproximadamente de 25°C y se mantuvo un ciclo de iluminación 12 h luz- 12 h oscuridad. La ventilación de la habitación se realizó con un extractor de aire. La humedad se mantuvo entre los valores deseados para el desarrollo óptimo de la experiencia y el bienestar animal.

Al inicio del ensayo las ratas que compartieron una determinada jaula se marcaron en su oreja para poder identificarlas y se registró su peso semanalmente. También, se registró la presión de cada rata, al menos tres veces en días diferentes, para conocer y chequear el registro inicial de presión, previo a la administración de las muestras en estudio. A su vez, estas medidas sirvieron para acostumbrar a los animales al procedimiento experimental. El último día de registro de la presión inicial, los animales fueron administrados con una suspensión acuosa de las muestras en estudio, se mantuvieron durante 3 h en las condiciones antes descritas, se les registró la presión (post administración de muestra), se anestesiaron y se procedió a realizar el

procedimiento quirúrgico. Previo a este procedimiento se observaron las siguientes características para verificar el correcto funcionamiento de la anestesia: la inconsciencia del animal con ausencia de movimiento ante estímulos dolorosos como así también la ausencia del reflejo flexor ante el pellizco de una pata, y ausencia de reflejo corneano.

Para poder identificar el punto final humanitario se definieron los siguientes signos vitales de sufrimiento: aumento de la frecuencia cardíaca, comportamiento errático, heridas cutáneas y la pérdida significativa de peso. Durante el transcurso del experimento no se observaron tales situaciones por lo que no fue necesario el sacrificio de animales previo a la administración de la muestra de interés. La eutanasia del animal se realizó por exsanguinación bajo anestesia.

El trabajo se realizó utilizando 6 grupos diferentes de animales conformados por 7-8 ratas. El grupo al cual se le administró captopril estuvo constituido por 4 ratas. Después de las tres mediciones de control de la presión arterial como se indicó previamente, las diferentes muestras a estudiar se administraron a través de una sonda siliconada pequeña (pediátrica K 33) utilizando para tal fin un abreboca que se ajustó al tamaño del animal, permitiendo rápidamente la administración de la muestra como se indica en la **Figura II.1**.



**Figura II.1.** En la foto A se muestran los abrebocas metálicos que se insertan entre los incisivos de la rata para mantener la boca abierta y poder introducir la sonda por el orificio central. En la foto B se muestra una sonda colocada para efectuar la administración intragástrica de la suspensión en estudio. Fuente: Tesis doctoral de Mariana Fritz, 2009.

La distribución de los grupos de trabajo se realizó de la siguiente manera:

1. **Grupo control negativo (agua):** animales a los que no se les administró proteína de amaranto.
2. **Grupo Captopril:** animales que recibieron captopril, inhibidor comercial de la ECA.
3. **Grupo Aliskireno:** animales que recibieron aliskireno, inhibidor comercial de la renina.
4. **Grupo Aislado (APA):** animales a los que se les administró una dispersión de APA.
5. **Grupo Hidrolizado (HA):** animales a los que se les administró una dispersión de hidrolizado de amaranto.
6. **Grupo VIKP (VIKP):** animales que recibieron este péptido sintético con probada actividad antihipertensiva *in vitro*.
7. **Grupo Emulsión (E):** animales a los que se les administró una emulsión como vehículo de liberación conteniendo péptidos de amaranto.
8. **Grupo Emulsión + VIKP:** animales que recibieron una suspensión de la emulsión en estudio adicionada con el péptido sintético.

A todos los animales se les administró por vía orogástrica 2 ml de la suspensión en estudio dispersada en agua destilada en una proporción de 1,875 g proteína/kg rata. El grupo control recibió 2 ml de agua destilada, el grupo del inhibidor comercial 10 mg captopril/kg rata y el grupo VIKP 50 mg péptido/kg rata.

#### II.2.5.2. Preparación de la emulsión en estudio

Se preparó una dispersión de APA-pH 2,0 y HA-pH 2,0 a una concentración proteica de 2% p/v, en donde el APA aportó un 50% del contenido proteico y el hidrolizado el 50% restante. Las dispersiones se agitaron durante 1h a temperatura ambiente. Las emulsiones se prepararon homogeneizando 40 ml de aceite de girasol comercial con 160 ml de las dispersiones proteicas (20 % v/v) con un homogeneizador ULTRATURRAX T25 (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Germany) a una velocidad de 10.000 rpm durante 1 min para producir una emulsión gruesa. Luego, las muestras se homogeneizaron con un homogeneizador ultrasónico (SONICS Vibra Cell VCX750, USA) a una potencia de 50% aplicando pulsos de 30 s cada uno durante 5 min con una punta standard inmersa 2/3 en un vaso de precipitado de 300 ml de volumen. El

ciclo de sonicación se repitió dos veces. El vaso se mantuvo sobre un baño de hielo para reducir el calentamiento durante el proceso de homogeneización final.

Luego de la preparación la emulsión se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$ , liofilizó y se re-suspendió en una proporción de 1,875 g proteína/kg rata en agua destilada. Previo a la administración la emulsión re-suspendida se agitó durante 1 h con buzo magnético para lograr su completa homogeneización.

La emulsión con el péptido sintético (VIKP) se preparó siguiendo los pasos detallados previamente, con la diferencia que inicialmente se agregó a las dispersiones el péptido VIKP en una concentración suficiente para que cada rata consuma 50 mg/kg de péptido. Se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , liofilizaron y se re-suspendieron en la proporción antes mencionada.

### II.2.5.3. Medida indirecta de la presión arterial

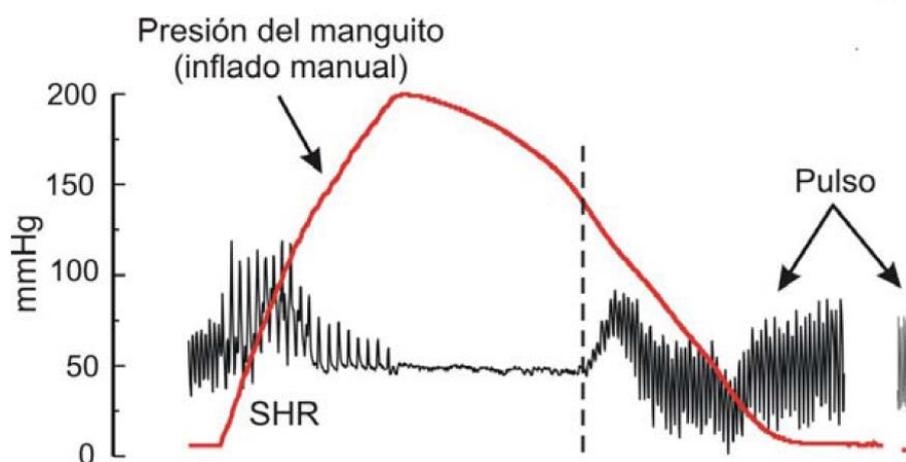
Los animales fueron ubicados por el lapso de 5 min en una cámara incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente transferidos a un inmovilizador, diseñado para la medida indirecta de la presión arterial. Este dispositivo se ubicó sobre una manta térmica de manera de evitar la pérdida de calor en los animales. El inmovilizador utilizado esta hecho de acrílico con una puerta deslizable y un orificio para que la cola quede expuesta (**Fig. II.2**).



**Figura II.2.** Equipo utilizado para la toma de la presión y sus diferentes componentes.

Los animales rápidamente se acostumbraron a esta maniobra manteniéndose calmos en el interior del dispositivo, ante cualquier señal de nerviosismo el método fue

inmediatamente interrumpido. La toma de la presión arterial se realizó con un manguito de medida colocado en la cola del animal y conectado a un cilindro de aire comprimido a través de una disposición de válvulas de entrada y salida que permitieron el inflado y desinflado del mismo a una velocidad constante. La presión del manguito colocado en la cola se registró continuamente con un sensor de presión de estado sólido (Sensym, All Sensors, Inc., San José, CA, EE.UU.). Las señales procedentes de los sensores de pulso y presión se amplificaron y luego se digitalizaron con un panel analógico-digital (DT16EZ, Data Translation, Inc., Marlboro, MA) montado en una PC de mesa (**Fig. II.3**). La visualización en línea para controlar el procedimiento y el procesamiento posterior de los datos se obtuvieron haciendo uso de un software apropiado (Labtech Notebook Pro, Laboratorio Technology Corp., Wilmington, MA).



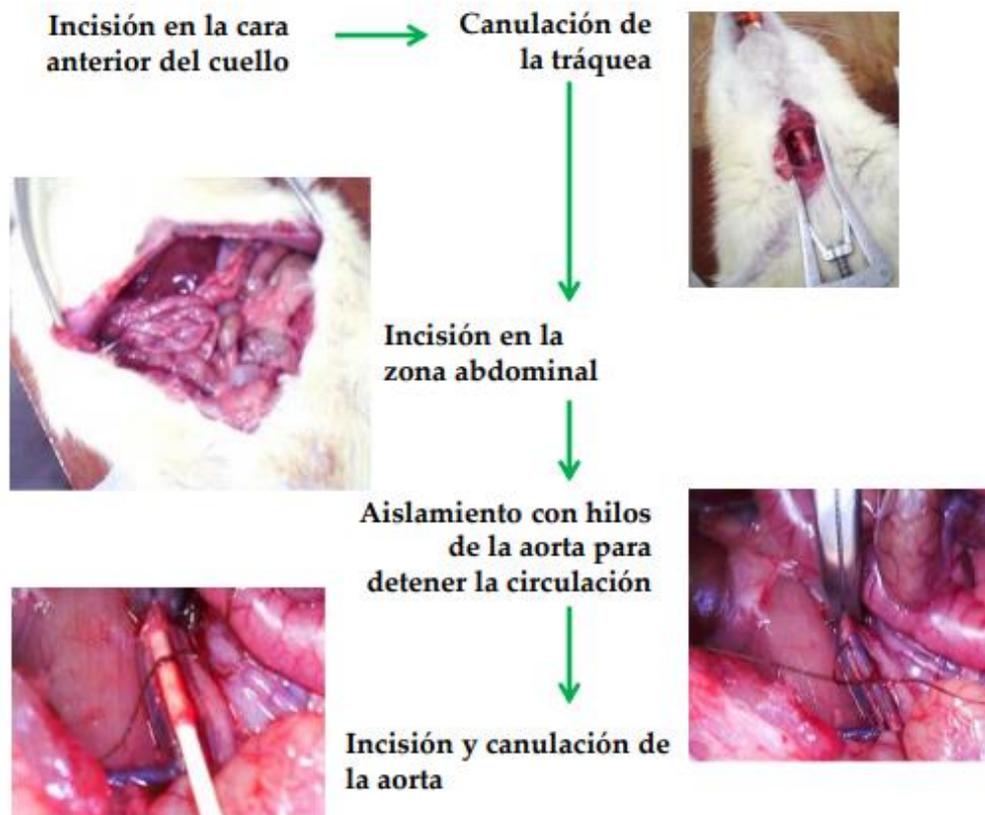
**Figura II.3.** Toma de la presión arterial por el método indirecto. Cuando la línea roja, que corresponde a la presión del manguito insuflado manualmente, coincide con la recuperación del pulso se realiza el registro de la presión.

#### II.2.5.4. Procedimiento quirúrgico

Los animales se anestesiaron mediante inyecciones intraperitoneales (agujas calibre 23) de pentobarbital sódico 25 mg/ml (0,15 ml cada 100 g de peso del animal) y diazepam 0,25 mg/ml (0,1 ml cada 100 g de peso de la rata).

Una vez que los animales estuvieron dormidos se inmovilizaron sobre una superficie rígida. A continuación se les colocó una cánula en la tráquea, habiendo realizado

previamente una incisión en la cara anterior del cuello con el objeto de tener una mejor visualización del procedimiento (**Fig. II.4**).

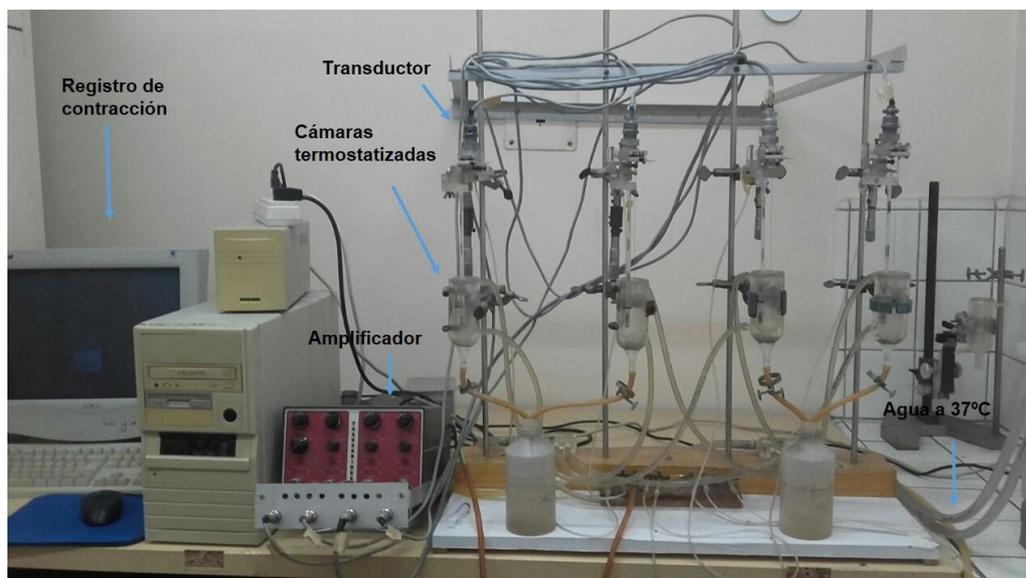


**Figura II.4.** Procedimiento quirúrgico utilizado para los ensayos *in vivo* y *ex vivo*. Fuente: Tesis doctoral de Ana Clara Sabbione, 2015.

Esta cánula permitió conectar a los animales a un ventilador para roedores a ser utilizado en los casos en los que la rata presentara fallas en la respiración durante la operación. Inmediatamente se realizó un corte en la zona abdominal, se localizó la aorta abdominal detrás del intestino y se aisló con hilos para finalmente colocarle un *clamp* que permitió detener la circulación de la sangre. Una vez bloqueada la circulación se realizó una pequeña incisión en la arteria a través de la cual se introdujo una cánula. La canulación de la aorta permitió coleccionar la sangre del animal (aproximadamente 10 ml). Una vez recolectada la sangre, inmediatamente se centrifugó a 4°C durante 15 min y 1000g. El sobrenadante obtenido (plasma) se trasvasó a tubos plásticos para su posterior congelación a -80°C hasta el momento de su utilización para la realización de los ensayos *ex vivo* que se describirán a continuación.

### II.2.5.5. Medición de la contracción del músculo liso vascular aislado

Como último paso de la intervención quirúrgica, se retiró la aorta torácica y se la colocó en una solución fisiológica salina, la cual se burbujeó con una mezcla de gases, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub>. Se retiró el tejido conectivo adyacente y se cortaron anillos aórticos de 2 mm de largo. Los anillos se colocaron entre dos alambres de acero inoxidable en un baño a 37°C con solución fisiológica salina Ringer Normal (composición expresada en mM: NaCl 130, KCl 4,7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,17, MgSO<sub>4</sub> 1,16, NaHCO<sub>3</sub> 24,0, CaCl<sub>2</sub> 1,6 y glucosa 11,0) la cual se burbujeó con la mezcla de carbógeno (CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>) mencionada anteriormente de manera de alcanzar un pH 7,4 manteniendo la oxigenación. El alambre inferior se encuentra conectado a una varilla plástica inmersa en el baño termostatzado y el alambre superior está conectado a un transductor de fuerza (Grass FT.03D, Grass Telefactor, West Warwick, CT, USA). El equipo utilizado se muestra en la **Figura II.5**.



**Figura II.5.** Equipo utilizado para registrar la contracción del músculo liso esquelético.

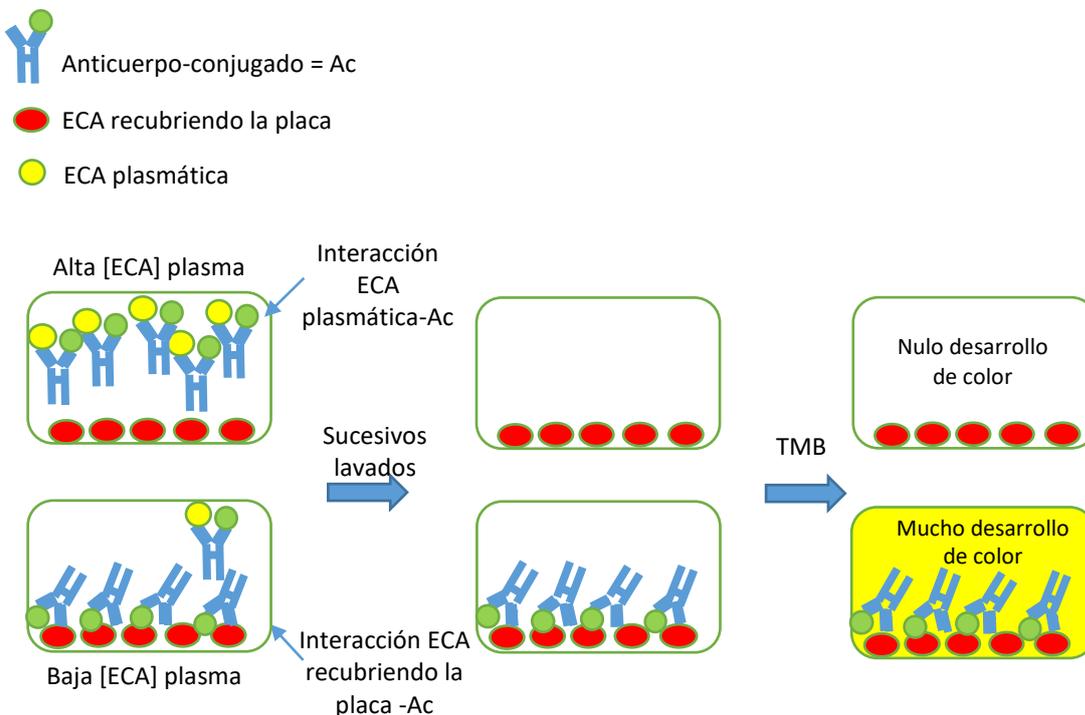
Consta básicamente de: 4 cámaras de 20 ml aproximadamente y 4 transductores de fuerza sostenidos por un micrómetro que permite desplazamientos variables, con circulación de carbógeno y manutención de la temperatura. El músculo liso se estabilizó durante 1 h, con una tensión de reposo de 2 a 3 g para la aorta. Estos valores de tensión se lograron estirando los anillos vasculares con el micrómetro. La señal de los transductores de fuerza fue amplificada y posteriormente adquirida mediante la plaqueta DT01 EZ y un programa de adquisición de datos Labtech NOTEBOOK PRO (Rinaldi, 2005). De esta manera fue posible estudiar el efecto de

cada una de las muestras sobre la reactividad/contractabilidad de los anillos de aorta obteniéndose la respuesta frente a diferentes estímulos. Se emplearon como estímulos una alta concentración de potasio para actuar sobre los canales voltaje-operados y norepinefrina como agonista fisiológico que actúa sobre canales receptor-operados. El efecto final tanto del potasio como de la norepinefrina fue aumentar el tono vascular del músculo liso vascular aislado, en este caso, el preparado de aorta torácica.

### II.2.5.6. Cuantificación de la enzima convertidora de angiotensina en plasma

Para la determinación de la concentración de ECA en plasma se utilizó un Kit ELISA (Rat angiotensin converting enzyme MBS703086, MyBioSource, USA). El kit emplea una técnica de inmunoensayo enzimático de inhibición competitiva. La base de la placa de ELISA provista por el kit se encuentra recubierta con ECA. Los estándares o muestras son adicionados en los pocillos de la placa junto con un anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRP) específico para ECA. De esta manera se genera una reacción competitiva por el anticuerpo entre la ECA que recubre la placa y la ECA presente en las muestras.

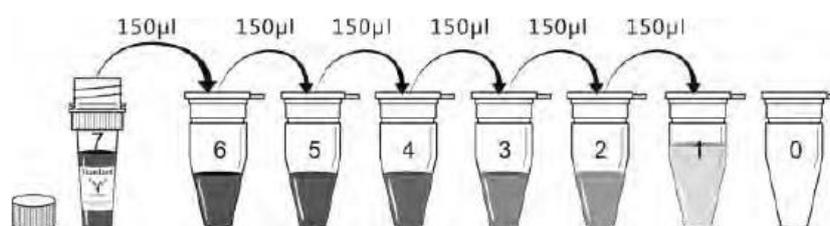
#### Esquema de reacción:



Luego de un período de incubación para que se lleve a cabo la reacción, la placa se lavó exhaustivamente y se adicionó la solución de sustrato (TMB). El desarrollo de color es inversamente proporcional a la cantidad de ECA en la muestra, es decir, cuanto más ECA posean las muestras, mayor será la interacción con el anticuerpo conjugado que va a quitarse de la placa luego de los sucesivos lavados, por lo tanto menos anticuerpo interaccionará con la ECA que recubre la placa y se desarrollará menos color. Luego de un período de reacción y desarrollo de color se detiene la reacción y se mide la intensidad de color.

### Reactivos:

- HRP-Conjugado (1x). El vial conteniendo el reactivo se centrifugó y se diluyó 100 veces con el diluyente para HPR.
- Buffer de lavado (25x). Se diluyeron 20 ml de buffer de lavado concentrado (25 x) en agua destilada para preparar 500 ml de buffer de lavado (1 x).
- Sustrato TMB
- Solución para detener la reacción
- Estándar. Se centrifugó el vial con el estándar a 1000g durante 30 s a temperatura ambiente para que el sólido se deposite en el fondo del tubo. Se reconstituyó con 1 ml de diluyente de muestra obteniendo una solución madre conteniendo 5000 pg/ml a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas. El diluyente de muestra sirve como el estándar cero (0 pg / ml):



Tubo	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
pg/ml	50000	2500	1250	625	312	156	78	0

- Muestra. Las muestras utilizadas para realizar el ensayo fueron el plasma de las ratas correspondiente a cada grupo descrito previamente, obtenido luego

del sacrificio y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Previo a la realización del inmunoensayo los sueros se descongelaron y centrifugaron a 5000g durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se tomó el sobrenadante de cada uno. Todas las muestras se diluyeron 500 veces para poder realizar el ensayo.

#### **II.2.5.6.1. Procedimiento**

Los reactivos se llevaron a temperatura ambiente antes de su utilización. Previo al pipeteo de los reactivos se estableció un pocillo blanco sin ninguna solución. Inicialmente se adicionó 50  $\mu\text{l}$  de estándar o de plasma (correspondiente a cada muestra en estudio) por pocillo y a continuación, se agregó a cada pocillo 50  $\mu\text{l}$  del anticuerpo conjugado HRP (1x) (sin agregarlo en el pocillo que se usó como blanco/control). Se cubrió la placa de microtitulación con una tira adhesiva y se incubó durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego de transcurrido el tiempo de reacción se aspiró cada pocillo y lavó, repitiendo el procedimiento cuatro veces hasta llegar a un total de cinco lavados. El lavado se hizo llenando cada pocillo con buffer de lavado (200  $\mu\text{l}$ ) y se dejó reposar durante 2 min. Después del último lavado, se retiró el exceso de buffer por aspiración y por último se invirtió la placa sobre toallas de papel limpias. Para completar la reacción colorimétrica se añadió 90  $\mu\text{l}$  de Sustrato TMB a cada pocillo y se incubó durante 20 min a  $37^{\circ}\text{C}$  utilizando papel de aluminio para proteger la placa de la luz. Transcurrido el tiempo de reacción se añadió a cada pocillo 50  $\mu\text{l}$  de solución de frenado y se golpeó suavemente la placa para asegurar una mezcla completa. Luego de los 5 min se determinó la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm, usando un lector de microplacas (BioTek Instrumets, Synergy HT, USA). Los valores de DO obtenidos con las soluciones patrones se utilizaron para graficar una curva de calibración a partir de la cual se obtuvieron las concentraciones correspondientes de ECA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$  de plasma) de cada muestra.

### II.2.6. Análisis estadístico

Los ensayos estadísticos se llevaron a cabo por medio del programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Prism Inc., USA). Los datos experimentales se promediaron a partir de al menos dos ensayos independientes y los resultados se presentan como media +/- desviación estándar. Los resultados de los ensayos *in vivo* se expresaron como media +/- error (SEM). Los análisis de varianza significativa de medias (ANAVA) se realizaron por la prueba de LSD con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$  (95% de confianza). En el presente capítulo, se utilizó un test de análisis de medias menos exigente (LSD) que el test de Tuckey utilizado en el capítulo 1 debido a la variabilidad de las muestras biológicas provenientes de los ensayos *in vivo*.

## II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### II.3.1. Digestión gastrointestinal simulada de las emulsiones con APA

#### II.3.1.1. Distribución de tamaño de partícula

A efectos de contar con conocimientos que nos permitan evaluar la estabilidad de emulsiones elaboradas a base de proteínas de amaranto luego de su ingestión, se trabajó con una emulsión 0,8% p/v de APA-pH 2,0, que fue sometida a un proceso simulado de digestión gastrointestinal. En las diferentes etapas de simulación de este proceso se tomaron alícuotas y se estudió el cambio en el tamaño de partículas en presencia de SDS. Durante la etapa duodenal se realizaron ensayos en ausencia de las enzimas pancreatina y lipasa como así también en ausencia de bilis. Estos ensayos permitieron caracterizar el sistema en estudio y evaluar la función de los reactivos involucrados en el proceso simulado de digestión. Se evaluó el cambio en el tamaño de partícula producido en la emulsión inicial ( $E_i$ ) luego de la etapa gástrica ( $E_g$ ) y al inicio ( $E_{d5}$ ) y final ( $E_{d60}$ ) de la etapa duodenal. En la **Tabla II.2** se pueden visualizar los valores de  $D_{4,3}$  y  $D_{3,2}$  en las diferentes etapas del proceso simulado de digestión gastrointestinal.

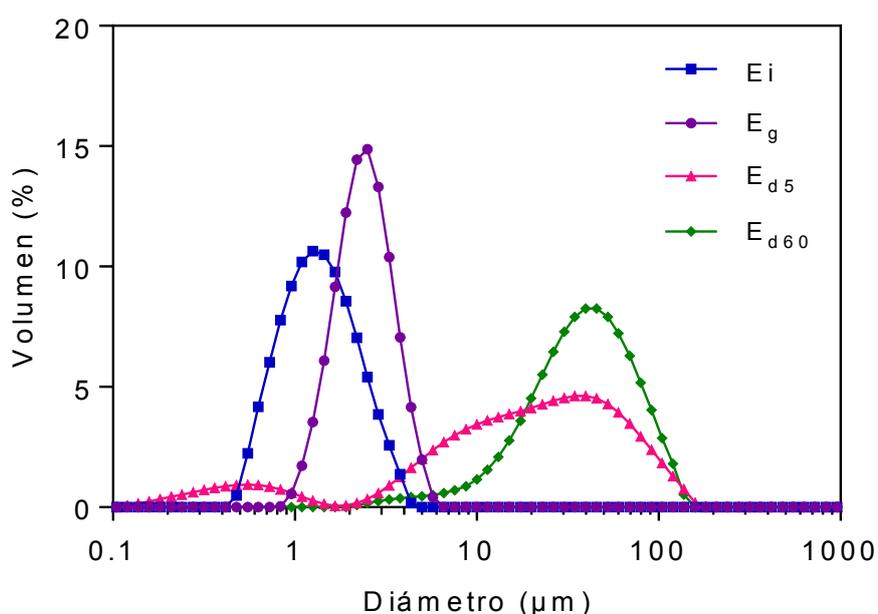
**Tabla II.2.** Tamaño de partícula de la emulsión 0,8% p/v APA-pH 2,0 en presencia de SDS 2% durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal. La comparación de medias se realizó entre la digestión completa y las digestiones en ausencia de alguno de los componentes a un mismo tiempo ( $\alpha = 0,05$ ).

Muestra	$D_{4,3}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{3,2}$ ( $\mu\text{m}$ )
$E_i$	$1,6 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,1$
$E_g$	$2,1 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$
$E_{d5}$	$16,6 \pm 9,0^a$	$3,8 \pm 0,6^a$
$E_{d60}$	$50,6 \pm 8,7^a$	$12,9 \pm 11,8^a$
$E_{d5}$ s/pancreatina	$45,5 \pm 8,4^b$	$3,3 \pm 0,6^a$
$E_{d5}$ s/lipasa	$3,41 \pm 0,01^a$	$2,9 \pm 0,0^a$
$E_{d5}$ s/bilis	$27,9 \pm 2,0^a$	$9,9 \pm 0,8^c$
$E_{d60}$ s/pancreatina	$62,5 \pm 28,4^a$	$6,2 \pm 1,3^a$
$E_{d60}$ s/lipasa	$7,6 \pm 2,3^b$	$4,7 \pm 0,4^a$
$E_{d60}$ s/bilis	$53,7 \pm 2,4^a$	$24,7 \pm 1,7^a$

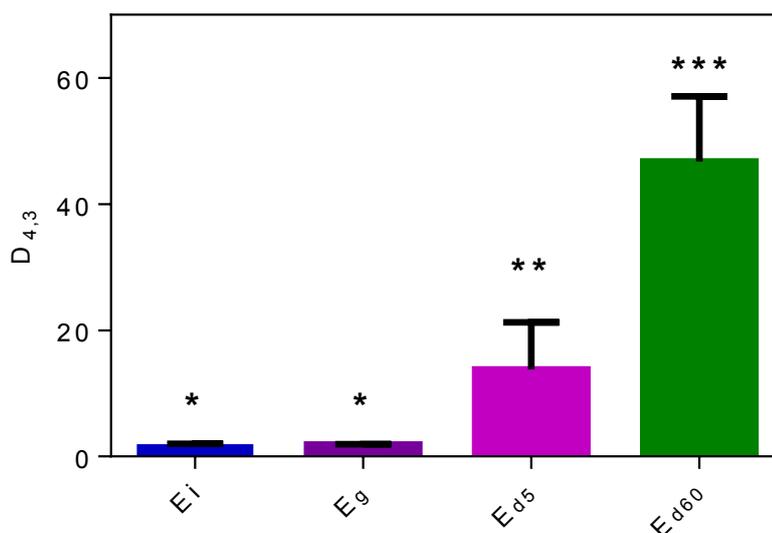
El análisis de la distribución y los tamaños de partícula se realizaron teniendo en cuenta la distribución en % de volumen y los  $D_{4,3}$  debido a que este último parámetro es más sensible a la presencia de partículas de mayor tamaño y por ello más representativo de los procesos de desestabilización de las gotas presentes en la emulsión (McClements, 2005; Bellesi y col., 2016).

Las distribuciones de tamaño de partícula resultaron monomodales para la  $E_i$  y  $E_g$ , mientras que la  $E_{d5}$  presentó una distribución bimodal con una población predominante polidispersa con un máximo de  $30 \mu\text{m}$  y otra de menor % en volumen a valores menores al micrón. La  $E_{d60}$  presentó una población de partículas con un tamaño medio de  $50 \mu\text{m}$  y un pequeño hombro que se extendió por debajo de los  $10 \mu\text{m}$  (**Fig. II.6**).

A medida que fue avanzando el proceso digestivo, el tamaño de partícula aumentó de un  $D_{4,3}$  de  $1,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$  para la  $E_i$  a un  $D_{4,3}$  de  $50,6 \pm 8,7 \mu\text{m}$  en la emulsión digerida completamente (**Fig. II.7, Tabla II.2**).



**Figura II.6.** Distribución del tamaño de gota en porcentaje de volumen para la emulsión 0,8% p/v APA-pH 2,0 durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal.  $E_i$  = emulsión inicial sin digerir,  $E_g$  = emulsión digerida luego de la etapa gástrica,  $E_{d5}$  = emulsión a los 5 min del inicio de la etapa duodenal,  $E_{d60}$  = emulsión digerida completamente luego de la etapa duodenal.



**Figura II.7.** Cambio en el tamaño de partícula ( $D_{4,3}$ ) en las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal. Las medidas se realizaron utilizando SDS 2% p/v.

Luego de la etapa gástrica ( $D_{4,3}$   $2,1 \pm 0,2$   $\mu\text{m}$ ) el tamaño de partícula promedio se mantuvo constante con respecto a la emulsión sin digerir ( $D_{4,3}$   $1,6 \pm 0,3$   $\mu\text{m}$ ). Evidentemente, las proteínas de amaranto no son muy sensibles al ataque de la pepsina en las condiciones ensayadas, resultado concordante con el obtenido para otras proteínas en solución como por ejemplo  $\beta$ -lactoglobulina que en su estado nativo no es susceptible a la hidrólisis con pepsina (Singh y Sarkar, 2011). No puede descartarse el hecho que la proteína no adsorbida a la interface actúe de barrera para la pepsina y de esa forma evite o reduzca la acción enzimática evitando la desestabilización de la emulsión. Debemos recordar lo discutido en el Capítulo 1, en el que se indicó la formación de una red de flóculos en las emulsiones formadas, red que podría estar contribuyendo en este sentido (Mun y col., 2006; Suarez y Añón, 2017). Malaki Nik y col., (2010, 2011) estudiaron la digestión gastrointestinal de emulsiones o/w formuladas con aislado de proteína de suero de leche (WPI), 1,5% p/v, estos autores encontraron que, luego de la etapa gástrica, la proteína adsorbida a la interface junto con los péptidos formados por la hidrólisis parcial lograron mantener una capa interfacial estable la cual previno la agregación de las gotas de aceite. De acuerdo a los resultados obtenidos por estos autores la concentración inicial de proteína utilizada para estabilizar la emulsión está vinculada con la estabilidad de la misma durante la etapa gástrica, ya que las emulsiones con 0,5% p/v de WPI si

presentaron hidrólisis y agregación de las gotas de aceite con el consiguiente aumento del tamaño de partícula. En el presente estudio la concentración proteica de APA 0,8% p/v utilizada como tensioactivo en las emulsiones fue suficiente para no evidenciar cambios significativos en el  $D_{4,3}$ .

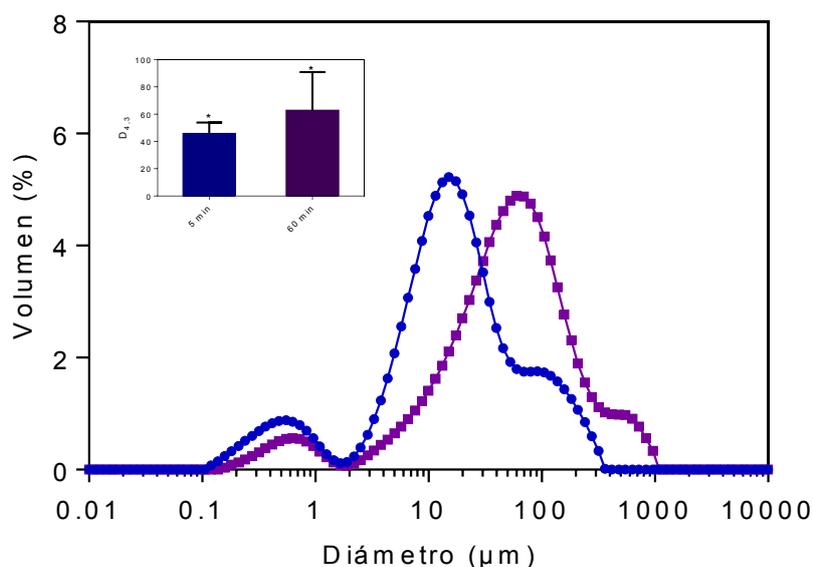
Al inicio de la etapa duodenal (**Fig. II.6**) se observó, tal como se indicó previamente, un comportamiento bimodal con una población de partículas inferior al micrón y otra población polidispersa de mayor tamaño promedio cercano a los 30  $\mu\text{m}$ . Antes del agregado del fluido duodenal las moléculas de proteínas ubicadas en la interface o en la fase continua se encuentran cargadas positivamente, repeliéndose entre sí ( $\xi = 31,3 \pm 2,2$  mV). Al agregar el fluido duodenal y establecer el pH en 7,0 la carga de las proteínas de amaranto se modifica pero sigue siendo alta (**Fig. I.11**, capítulo 1) por lo que el incremento del tamaño de gota detectado no podría atribuirse a modificaciones en las fuerzas de repulsión entre ellas. Por consiguiente, la coalescencia detectada podría verse favorecida por la presencia de bilis en el fluido duodenal. Las características anfifílicas de las moléculas presentes en la bilis generan interacciones con las moléculas proteicas de la interface desplazándolas de la misma y de esa manera desestabilizan las gotas de aceite con la consiguiente agregación y/o coalescencia de las partículas. La adsorción de bilis facilita la emulsificación de los lípidos, ya que afecta a la capa interfacial de las gotas de la emulsión y las prepara para la hidrólisis enzimática (Mun y col., 2006). La población de partículas que se observó por debajo del micrón podría atribuirse a gotas de aceite residuales formadas luego de la digestión lipídica que se emulsifican, debido a la presencia de diferentes moléculas superficialmente activas en el medio de reacción (Malaki Nik y col., 2011). Si bien es menos probable, no puede descartarse la formación de micelas biliares formadas entre los componentes de la bilis y los triglicéridos presentes en la emulsión. Varios componentes provenientes de las emulsiones o de los fluidos gástricos y duodenales están presentes en la digestión, incluidos los ácidos grasos libres, monoglicéridos, péptidos, sales biliares, fosfolípidos, enzimas, iones minerales, lípidos y proteínas no digeridas. Estos constituyentes pueden ensamblarse en diferentes tipos de partículas coloidales con diferentes dimensiones, morfologías y estados de agregación, incluyendo micelas, vesículas, agregados de proteínas, sales de calcio insoluble y gotitas de lípidos no digeridos.

Hacia el final de la etapa duodenal se observó un incremento significativo del tamaño de partícula ( $D_{4,3} = 50,6 \pm 8,7$   $\mu\text{m}$ ) y una distribución monomodal con un pequeño hombro a menores tamaños de partículas. El aumento del tamaño de gota podría

indicar que la proteólisis de la capa interfacial, provocada por la acción de las enzimas pancreáticas, promueve la formación de agregados de gotas de aceite ya que causa una pérdida gradual en la carga superficial de las mismas y reduce el espesor de la capa interfacial. Por lo tanto, la reducción de la repulsión electrostática entre las gotas de aceite y el grosor de la capa interfacial promoverían el proceso de agregación y coalescencia (Singh y Sarkar, 2011; Bellesi y col., 2016). En resumen, el gran aumento en el diámetro de las gotas de aceite se puede atribuir al cambio de ambiente: pH, fuerza iónica y a la presencia de componentes biológicos con actividad interfacial (sales biliares, enzimas, etc) (Sarkar y col., 2009; Singh y Sarkar, 2011).

Bellesi y col., (2016) formularon emulsiones o/w utilizando  $\beta$ -lactoglobulina y aislado proteico de soja (SPI) como agentes emulsificantes a una concentración del 2% p/p y las sometieron a una proceso simulado de digestión gastrointestinal. Las emulsiones con SPI presentaron un  $D_{4,3}$  inicial de  $0,531 \pm 0,002 \mu\text{m}$  y al cabo de la digestión gástrica y duodenal un  $D_{4,3}$  de  $9,7 \pm 0,8 \mu\text{m}$ . La  $\beta$ -lactoglobulina arrojó un  $D_{4,3}$  inicial de  $0,3895 \pm 0,0003 \mu\text{m}$  y al final de la digestión de  $36,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$ . Si bien resulta complejo poder comparar estos resultados directamente con los obtenidos en este trabajo de Tesis debido a las diferencias existentes en la fuente proteica, concentración, diferentes condiciones de emulsificación, fluidos gástricos y duodenales con composición variable, etc; utilizados; en términos generales en ambos trabajos la digestión generó un aumento del tamaño de las gotas atribuido a la acción conjunta del desplazamiento de las proteínas de la interface por medio de las sustancias superficialmente activas presentes en el fluido y a la acción proteolítica de las enzimas.

A modo de conocer el efecto de cada uno de los principales componentes del fluido duodenal en esta etapa del proceso de digestión gastrointestinal simulado se determinaron las distribuciones de tamaño de partícula en ausencia de las enzimas pancreatina y lipasa y de bilis. Las distribuciones en ausencia de pancreatina se muestran en la **Figura II.8**. La distribución de tamaño de partículas correspondiente a los 5 min fue bimodal caracterizada por una población mayoritaria de partículas de aproximadamente  $10 \mu\text{m}$  con un hombro a diámetros superiores ( $100 \mu\text{m}$ ) y una segunda población a valores menores al micrón. Luego de finalizada la digestión (60 min de reacción) la distribución de las gotas fue similar a la correspondiente a los 5 min pero con un corrimiento hacia mayores tamaños de partículas. El  $D_{4,3}$  correspondiente a los 5 min de reacción fue de  $45,5 \pm 8,4 \mu\text{m}$  y hacia el final del proceso de digestión el tamaño se incrementó a  $62,5 \pm 28,4 \mu\text{m}$  (**Fig. II.8, Tabla II.2**).



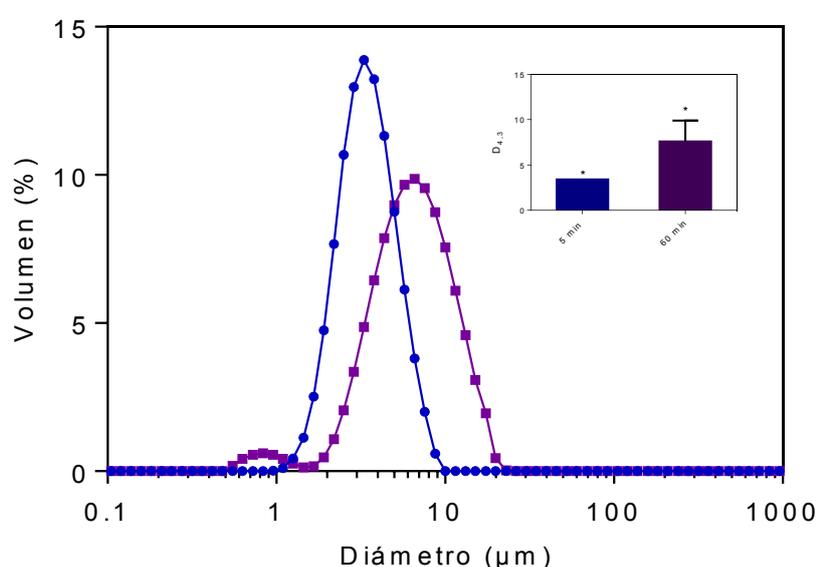
**Figura II.8.** Distribución del tamaño de gota en porcentaje de volumen para la emulsión 0,8% p/v APA-pH 2,0 durante la digestión en ausencia de pancreatina. 5 min (-●-), 60 min (-■-).

Si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas en el tamaño correspondiente a estos dos tiempos, debido a las grandes dispersiones obtenidas en los resultados, se corroboró un aumento sustancial del  $D_{4,3}$  con respecto a la etapa gástrica ( $D_{4,3}$   $2,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ), evidenciando la acción de la lipasa y de la bilis sobre las gotitas de aceite. Mun y col., (2007) analizaron el cambio en el  $D_{4,3}$  de emulsiones formuladas con caseinato de sodio y aislado proteico de suero de leche (WPI) luego del agregado de lipasa pancreática (1,6 mg/ml) y bilis (5 mg/ml). En los dos casos encontraron un aumento del tamaño de partícula con respecto a la emulsión inicial, similar a los resultados presentados en este trabajo de Tesis y atribuyeron ese aumento a la floculación y/o coalescencia de las gotas, utilizando la microscopia como técnica complementaria. La extensión del aumento encontrado fue de 15,7 para el caseinato y de 9 veces mayor para el WPI, siendo la proporción del aumento hallado en este trabajo de 21 veces.

Si los valores discutidos anteriormente se comparan con los obtenidos durante la digestión completa de la emulsión en presencia de lipasa, bilis y pancreatina, se observa que a los 5 min de reacción el  $D_{4,3}$  para la digestión sin pancreatina fue mayor ( $45,5 \pm 8,4 \mu\text{m}$ ) que en la digestión completa  $D_{4,3}$   $16,6 \pm 9,0$  (**Tabla II.2**). Luego de los

60 min de reacción no hubo diferencias significativas entre los  $D_{4,3}$ . Lo que sugiere una rápida acción de las sales biliares y/o de la existencia de mecanismos de acción diferentes.

Las distribuciones en ausencia de lipasa se muestran en la **Figura II.9**. La distribución de partículas al inicio de la etapa duodenal fue monomodal con un  $D_{4,3}$   $3,41 \pm 0,01 \mu\text{m}$ , mientras que a los 60 min de reacción se observó una distribución bimodal con la aparición de una incipiente población de partículas menores a  $1 \mu\text{m}$  y una segunda población por debajo de los  $10 \mu\text{m}$ . El  $D_{4,3}$  hallado a los 60 min de reacción fue de  $7,6 \pm 2,3 \mu\text{m}$  (**Fig. II.9, Tabla II.2**).

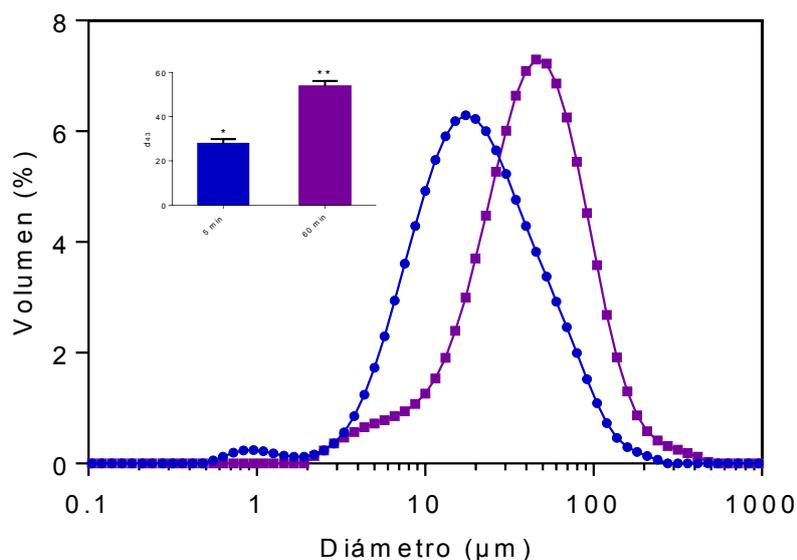


**Figura II.9.** Distribución del tamaño de gota en porcentaje de volumen para la emulsión 0,8% p/v APA-pH 2,0 durante la digestión en ausencia de lipasa, 5 min (-●-), 60 min (-■-).

Si se compara el valor del  $D_{4,3}$  de la etapa gástrica,  $2,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$ , con el del inicio de la digestión en la fase duodenal sin lipasa ( $3,41 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ) se puede corroborar un ligero aumento en el tamaño de las gotas. Luego de los 60 min de reacción el tamaño aumentó conservándose por debajo de los  $10 \mu\text{m}$ , evidentemente la lipasa juega un rol fundamental en la estabilidad de la emulsión durante la digestión simulada, obteniéndose los tamaños de partículas más chicos en su ausencia. La acción conjunta de la bilis, desestructurante de la interface, junto con la proteólisis producida por la pancreatina lograron un aumento del tamaño de gota, pero que si se compara

con los valores de  $D_{4,3}$  correspondientes en las demás condiciones de digestión, fueron los más pequeños.

Si se comparan los valores de tamaño de partícula obtenidos en ausencia y presencia de lipasa se puede observar que a los 5 min de comenzada la etapa duodenal no hubo diferencias significativas entre la digestión completa,  $D_{4,3} 16,6 \pm 9,0 \mu\text{m}$ , y la realizada en ausencia de lipasa,  $D_{4,3} 3,41 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (**Tabla II.2**). Si se evidenció un cambio luego de transcurridos los 60 min de digestión duodenal, siendo el tamaño hallado en la digestión completa,  $D_{4,3} 50,6 \pm 8,7 \mu\text{m}$ , significativamente mayor que el encontrado en la digestión sin lipasa,  $D_{4,3} 7,6 \pm 2,3 \mu\text{m}$ . Como se comentó previamente, la lipasa tiene un rol preponderante en la desestabilización de la interface con la consiguiente digestión, agregación y coalescencia de las gotas de aceite presentes en la emulsión. Las distribuciones en ausencia de bilis se muestran en la **Figura II.10**. Cuando se llevó adelante la digestión en ausencia de estos componentes la distribución de partículas a los 5 min fue bimodal, con una población preponderante entre los 10 y 20  $\mu\text{m}$  y una segunda población ubicada a menores tamaños de partícula (1  $\mu\text{m}$ ). Luego de transcurridos los 60 min de simulación de la etapa duodenal la población que representaba el mayor % de volumen se corrió hacia tamaños de partícula mayores, aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , y presentó un hombro ubicado hacia menores tamaños de gotas, entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ , posiblemente derivado de la digestión de las gotitas cercanas al micrón descritas previamente. El  $D_{4,3}$  a los 5 min fue de  $27,9 \pm 2,0 \mu\text{m}$  y a los 60 min de reacción de  $53,7 \pm 2,4 \mu\text{m}$  (**Tabla II.2**), siendo estos valores significativamente diferentes entre sí. La ausencia de bilis con su función desestructurante de la interface de la emulsión no fue un impedimento para que la lipasa y la pancreatina pudieran desplegar su actividad enzimática con el consiguiente aumento en el  $D_{4,3}$  con respecto a la etapa gástrica. Los valores encontrados durante esta etapa fueron similares a los que se obtuvieron cuando se realizó la digestión completa de la emulsión.



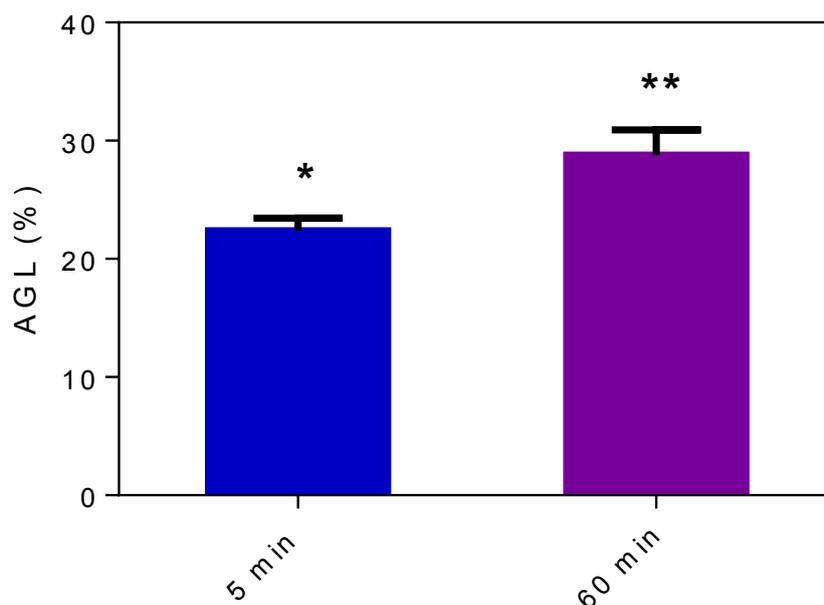
**Figura II.10.** Distribución del tamaño de gota en porcentaje de volumen para la emulsión 0,8% p/v APA-pH 2,0 durante la digestión en ausencia de bilis, 5 min (-●-), 60 min (-■-).

### II.3.1.2. Liberación de ácidos grasos

La cuantificación de los ácidos grasos liberados se realizó en la emulsión sometida al proceso simulado de digestión gastrointestinal completo, es decir, luego de la hidrólisis secuencial de pepsina, pancreatina y lipasa, y de la bilis. El seguimiento de la lipólisis durante la etapa simulada de digestión duodenal, determinado mediante la cuantificación de los ácidos grasos liberados, mostró un rápido aumento durante los primeros 5 min de reacción (%AGL  $22,4 \pm 1,0$ ) y luego de transcurrido el tiempo para completar esta etapa, 60 min, sólo se detectó un pequeño aumento (%AGL  $28,8 \pm 2,0$ )

#### Figura II.11.

Para corroborar la extensión de la lipólisis se realizó una medida a las 2 h de iniciada la simulación de la digestión duodenal, tiempo en el que no se evidenció un aumento en la liberación de los ácidos grasos (%AGL  $29,5 \pm 2,3$ ) respecto al obtenido a los 5 min. Es decir, se produjo una rápida liberación de ácidos grasos al inicio de la reacción y luego se alcanzó un valor constante de aproximadamente 30 % de hidrólisis. El proceso de lipólisis comenzó de manera inmediata una vez incorporada la lipasa, sin evidenciarse un periodo de inducción.



**Figura II.11.** Ácidos grasos liberados (%) durante el inicio de la etapa duodenal y a los 60 min de transcurrida la digestión simulada.

Algunos investigadores han comprobado que al trabajar con suficiente concentración de lipasa, su adsorción a la interface o/w es casi inmediata luego de su incorporación al medio de reacción, ocasionando una rápida lipólisis (Mun y col., 2007; McClements y Li, 2010). La concentración final de lipasa utilizada en el ensayo de simulación de la digestión duodenal fue de 0,5 mg/ml y la cantidad de aceite en el medio de reacción de 25 mg/ml, lo que implica una relación enzima sustrato de 1:50, lo suficiente para no detectar un periodo de inducción con la consiguiente absorción inmediata de la enzima a la interface.

Bellesi y col., (2016) obtuvieron un %AGL de aproximadamente 30% al cabo de 10 min de un proceso simulado de digestión duodenal y de 40% a los 20 min, valor que se mantuvo constante hasta los 60 min de reacción, tiempo en que finaliza el ensayo. Estos valores los obtuvieron trabajando con emulsiones o/w y una relación de fases 10:90; las emulsiones preparadas fueron en este caso estabilizadas con proteínas de soja al 2% p/p, provenientes de un aislado. Gumus y col., (2017) estudiaron, por su parte, la digestión de emulsiones en las que se utilizó 2% p/v de concentrado de lenteja, arveja y habas y aislado de suero de leche como agentes emulsificantes y aceite de pescado como fase dispersa. Para todas las emulsiones estos autores encontraron un %AGL del 20% a los 5 min de comenzada la etapa de simulación

duodenal y de 95% al cabo de 60 min de reacción, generando la lipólisis completa de los triglicéridos presentes. Las condiciones de digestión simulada en este trabajo se fijaron de manera tal de producir la digestión completa de los triglicéridos.

La velocidad más lenta de liberación de AGL después de 5 min de digestión duodenal simulada podría estar asociada con la acumulación de los productos de la lipólisis en la superficie de las gotitas, lo que podría reducir la actividad de la lipasa. Se ha demostrado que las moléculas de AGL liberadas tienen actividad interfacial por lo que podrían competir con las moléculas de lipasa para adsorberse en la interface (Li y col., 2011).

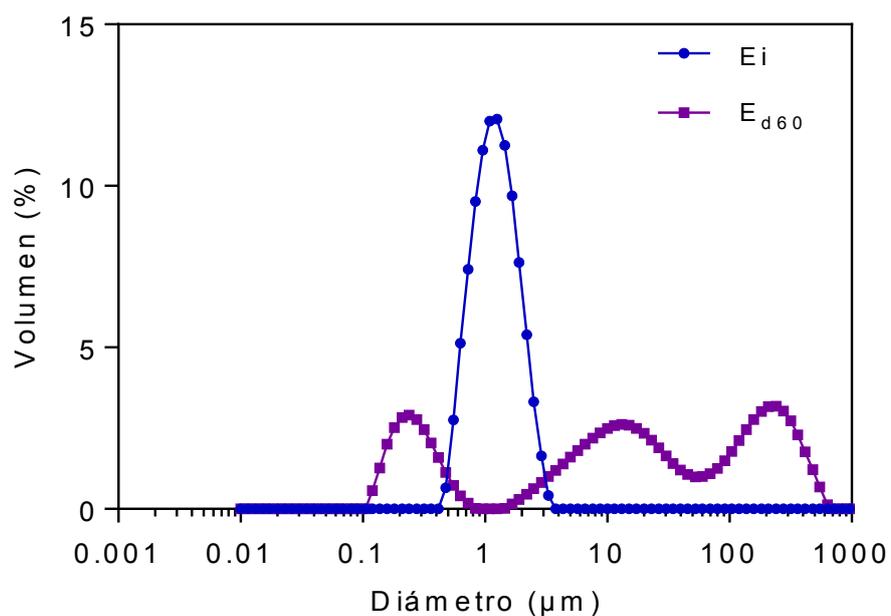
### **II.3.2. Digestión gastrointestinal simulada de las emulsiones con APA+HA**

#### **II.3.2.1. Distribución del tamaño de partícula**

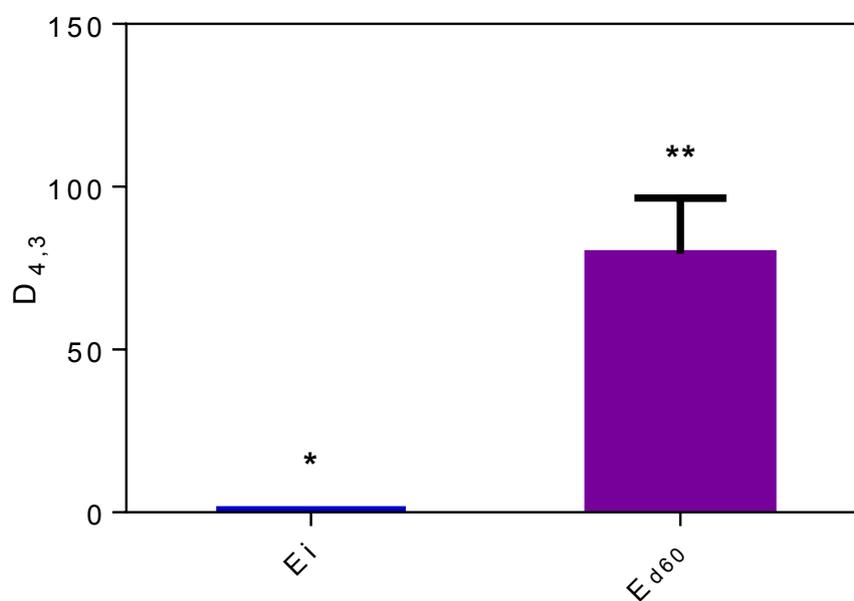
La estabilidad frente a las enzimas del tracto digestivo de la emulsión formulada con 1 % p/v APA+HA pH 2,0 fue evaluada al inicio y al final del proceso de digestión simulada. Las distribuciones se muestran en la **Figura II.12**.

La distribución de partículas inicial fue monomodal caracterizada por un valor de  $D_{4,3}$  de  $1,22 \pm 0,01 \mu\text{m}$ , luego de los 60 min de reacción, las gotas de aceite se distribuyeron en tres poblaciones de tamaños ampliamente definidos y el digerido final presentó un  $D_{4,3}$  promedio igual a  $79,5 \pm 17,1 \mu\text{m}$  (**Fig. II.13**).

La población de partículas más chica de la distribución se ubicó entre 0,1 y 1  $\mu\text{m}$ , la formación de estas pequeñas gotitas podría atribuirse a la hidrólisis de las gotas de aceite por acción de la lipasa y la liberación de un número pequeño de gotas residuales que pueden mantenerse dispersas por la presencia de moléculas con actividad superficial presentes en el jugo duodenal, como por ejemplo la bilis y moléculas superficialmente activas residuales liberadas durante la hidrólisis (Malaki Nik y col., 2011). También podrían deberse, como se detalló más arriba, a la formación de otros sistemas coloidales consecuencia del gran número de moléculas superficialmente activas capaces de dispersar la luz láser utilizada en la medición (Gumus y col., 2017). Una segunda población de partículas se ubicó a tamaños intermedios de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  y la tercera población se corrió hacia tamaños muy grandes por encima de los 100  $\mu\text{m}$ . Evidentemente durante la digestión de las gotas de aceite se producen diferentes mecanismos de desestabilización que conllevan a la formación de partículas de diferentes tamaños.



**Figura II.12.** Distribución del tamaño de gota en porcentaje de volumen para la emulsión formulada con 1 % p/v APA+HA pH 2,0 al inicio y final de la digestión gastrointestinal.



**Figura II.13.** Tamaño de partícula ( $D_{4,3}$ ) para la emulsión formulada con 1 % p/v APA+HA pH 2,0 al inicio y final de la digestión gastrointestinal.

Parte de las gotitas de aceite, con una nueva interface formada por diferentes sustancias superficialmente activas, quedan intactas (población < 1  $\mu\text{m}$ ), otra porción de las gotas son parcialmente digeridas con cambios en la interface y agregación de las mismas pero sin ruptura completa del film interfacial (población de 10  $\mu\text{m}$ ) y una última porción de las gotas que son digeridas en gran extensión, con ruptura completa de la capa proteica que las recubre (proteólisis) y se agregan y coalescen para formas grandes cúmulos de gotas que se visualizan por encima de los 100  $\mu\text{m}$ .

El  $D_{4,3}$  luego a los 60 min de digestión simulada para la emulsión con APA+HA,  $79,5 \pm 17,1 \mu\text{m}$ , fue superior al encontrado para la emulsión con APA,  $D_{4,3} 50,6 \pm 8,7 \mu\text{m}$ . Las emulsiones formuladas con APA+HA fueron más susceptibles a la hidrólisis generada por las enzimas digestivas. Luego de la digestión la distribución de partículas también fue diferente, mientras que la emulsión formulada con APA presentó un solo pico en la distribución, la emulsión conteniendo APA+HA mostró una distribución trimodal. La presencia de polipéptidos de menor tamaño molecular en la interface y en la fase continua determinó que parte de las gotas de aceite fueran digeridas extensivamente, población por encima de los 100  $\mu\text{m}$ . A su vez una población remanente por debajo del micrón, experimentó poca o nula hidrólisis, conservando su integridad. Y la tercera y última población se comportó en forma similar a la encontrada en las emulsiones con APA digeridas, desestabilizándose mediante agregación y coalescencia.

### **II.3.3. Ensayos de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina**

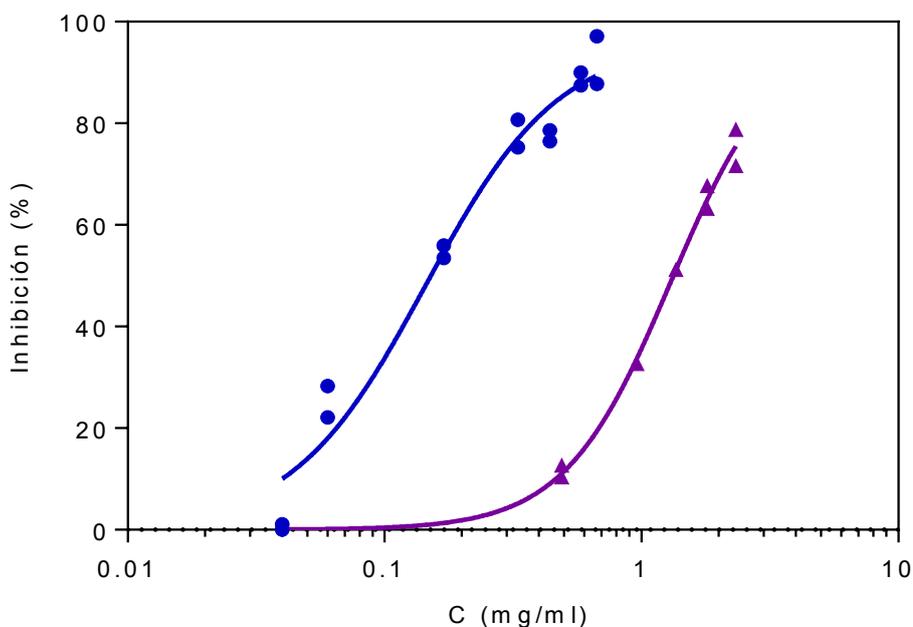
#### **II.3.3.1. Ensayos de inhibición utilizando hidrolizado de amaranto como inhibidor**

La enzima convertidora de angiotensina-1 (ECA) es una dipeptidil carboxipeptidasa dependiente de zinc clave en la fisiología cardiovascular. La ECA es un componente central del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAS), siendo su función la conversión de la angiotensina I en la hormona peptídica vasoactiva angiotensina II. Estructuralmente consta de dos dominios catalíticamente activos (denominados dominios N y C) que son muy similares en secuencia y topología estructural pero muestran diferencias en las capacidades de procesamiento de los sustratos (Masuyer y col., 2015).

Para llevar adelante los ensayos de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina inicialmente se utilizaron dos fuentes de procedencia de la misma. Por un lado se utilizó una ECA proveniente de un extracto crudo de pulmón de conejo y por otro una ECA comercial. La posibilidad de producir la ECA obtenida a partir de pulmones de conejos es una alternativa económica a la utilización de la enzima

comercial. La actividad de la ECA comercial según el lote de procedencia puede variar y de esa manera los rendimientos de la enzima deben ajustarse con la consiguiente disminución de muestras a ensayar. Si bien el proveedor certifica la actividad enzimática, en muchas oportunidades nos vimos limitados por la menor actividad de la enzima comercial, probablemente debido a alguna falla en la refrigeración desde el lugar de fabricación hasta la llegada a nuestro laboratorio. Por tal motivo, llevamos adelante un estudio comparativo entre las dos fuentes de procedencia de la enzima. Como inhibidor se utilizó el hidrolizado de amaranto (HA) y captopril como control positivo (inhibidor comercial). Una vez conocido el comportamiento de cada fuente enzimática fue posible utilizar la enzima obtenida a partir de pulmón en los estudios de puesta a punto o exploratorios y luego extrapolar los resultados obtenidos, bajo estas condiciones de ensayo, a la enzima comercial.

Las curvas de inhibición obtenidas se presentan en la **Figura II.14**.



**Figura II.14.** Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina utilizando enzima comercial (-●-) y obtenida de pulmón de conejo (-▲-) en función de la concentración proteica de hidrolizado de amaranto (mg/ml).

En los dos casos se observó un comportamiento dosis-respuesta de la inhibición enzimática en función de la concentración del hidrolizado utilizado, confirmando la presencia de péptidos activos capaces de inhibir a la ECA. La curva obtenida con la enzima comercial se ubicó hacia menores concentraciones de hidrolizado, indicando

su mayor sensibilidad frente al aumento creciente de la concentración de inhibidor. Las curvas se ajustaron a un comportamiento del tipo sigmoideo que es el comportamiento cinético esperable para enzimas alostéricas. Las enzimas alostéricas son complejos enzimáticos generalmente constituidos por una subunidad catalítica y una fracción regulatoria, la actividad catalítica del complejo se establece por la cooperación entre esas subunidades enzimáticas.

Los parámetros obtenidos a partir del ajuste realizado se muestran en la **Tabla II.3**, el  $EC_{50}$ , también denominado  $K_h$  y de esa manera presentado en la tabla, fue menor para la inhibición de la enzima comercial  $0,14 \pm 0,02$  mg/ml que para la enzima de pulmón  $1,3 \pm 0,2$  mg/ml. La diferencia en el desarrollo de las curvas y valores de  $EC_{50}$  encontrado entre las dos fuentes enzimáticas utilizadas puede atribuirse al hecho que en el extracto crudo de la enzima de pulmón se hallan presentes metabolitos, derivados de la extracción, que pueden estar dificultando la llegada del sustrato al sitio activo u obstruyendo el sitio activo dificultando la unión enzima-sustrato. Debe además recordarse que la inhibición de ECA puede incluir interacciones con inhibidores en sub-sitios de la enzima que se encuentran ubicados por fuera del sitio catalítico (Norris y FitzGerald, 2013).

**Tabla II.3.** Parámetros de ajuste obtenidos de las curvas de inhibición utilizando hidrolizado como inhibidor y dos fuentes enzimáticas: pulmón y comercial.

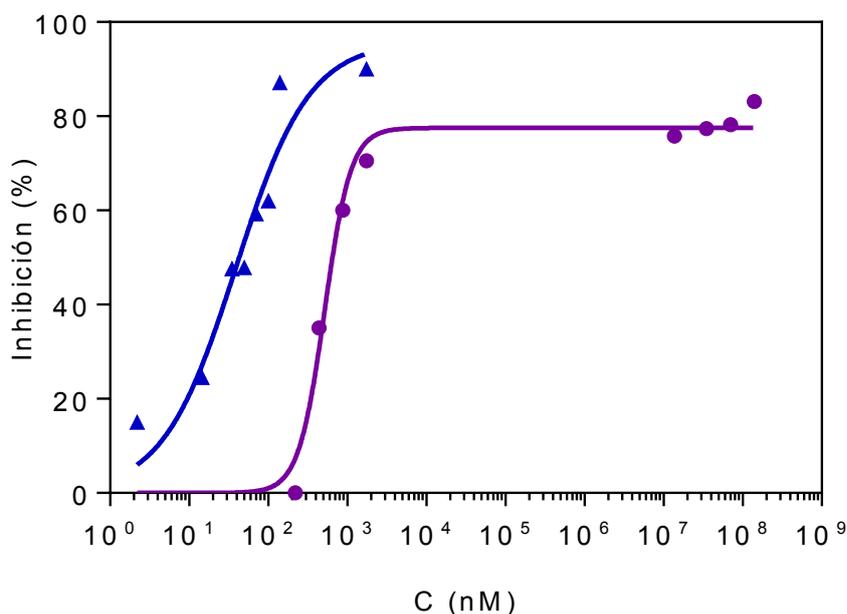
Parámetros	Comercial	Pulmón
$V_{max}$ (%inhibición)	$96,2 \pm 6,4^a$	$97,8 \pm 10,6^a$
h	$1,7 \pm 0,3^a$	$2,1 \pm 0,3^a$
$K_h$ (mg/ml)	$0,14 \pm 0,02^a$	$1,3 \pm 0,2^b$
R	0,9779	0,9944

Los parámetros de ajuste de las curvas se muestran en la **Tabla II.3**. La  $V_{m\acute{a}x}$  o en nuestro caso, el máximo valor de inhibición alcanzado por las enzimas a concentraciones altas de inhibidor fue similar para las dos fuentes utilizadas. En los dos casos, el valor obtenido fue cercano al 100%, indicando que es posible lograr la inhibición completa de las enzimas utilizando concentraciones grandes de inhibidor. El índice de cooperatividad obtenido (h) presentó un comportamiento alostérico positivo para las dos fuentes de enzima: pulmón ( $2,1 \pm 0,3$ ) y comercial ( $1,7 \pm 0,3$ ), indicando cooperatividad en la inhibición de la ECA. Esto puede ser el resultado fenomenológico de la presencia de diversos péptidos con diversos comportamiento cinéticos. Como los

sitios catalíticos de ECA tienen diferentes requerimientos conformacionales, para lograr una completa inhibición de la enzima podría ser necesario la utilización de una variedad de péptidos inhibidores cada uno con diferentes características conformacionales (Norris y FitzGerald, 2013; Aluko, 2015). El valor de  $h$  se puede vincular con el número de sitios activos de la enzima, algunos autores lo relacionan directamente con el número de sitios activos, aunque esto no sea del todo correcto, lo que sí puede afirmarse es que el valor de  $h$  no puede superar al número de sitios activos presentes en la enzima. Los valores presentados están de acuerdo con lo esperable según la estructura determinada para la ECA (Masuyer y col., 2015).

### II.3.3.2. Ensayos de inhibición utilizando captopril como inhibidor

Para continuar con la caracterización de las dos fuentes enzimáticas utilizadas en los ensayos de inhibición, el siguiente paso fue estudiar el comportamiento de la ECA frente a concentraciones crecientes de captopril, el inhibidor comercial más ampliamente utilizado para el tratamiento de la hipertensión. Las curvas de inhibición obtenidas se muestran en la **Figura II.15**.



**Figura II.15.** Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina utilizando enzima comercial (-▲-) y obtenida de pulmón de conejo (-●-) en función de la concentración de captopril (nM).

Las dos fuentes enzimáticas utilizadas presentaron un comportamiento dosis-respuesta frente a la concentración de captopril. Similar a lo hallado en las curvas de

inhibición utilizando hidrolizado, se requieren mayores concentraciones de captopril para generar la misma inhibición en la enzima de pulmón que en la enzima comercial. Por ejemplo, para una concentración de  $10^2$  nM de captopril la enzima de pulmón no ha sido inhibida mientras que en la enzima comercial se logra una inhibición aproximadamente del 70%. Gráficamente, la curva obtenida con la enzima comercial se ubica del lado izquierdo del gráfico, hacia menores concentraciones de captopril. De manera similar a lo que ocurrió con el hidrolizado, la presencia de sustratos inhibidores en el extracto de obtención de la enzima de pulmón o la presencia de diferentes metabolitos que podrían actuar de barrera para el captopril hasta llegar al sitio activo son condicionantes al momento de desarrollarse la reacción enzimática. Una posible vía para solucionar esta problemática podría ser someter al extracto de enzima de pulmón a una purificación secuenciada prestando atención a la conservación de la actividad.

Los parámetros de ajuste de las curvas se muestran en la **Tabla II.4**. La enzima comercial presentó un valor de  $EC_{50}$  ( $K_h$ ) significativamente menor  $39,2 \pm 11,2$  nM con respecto al obtenido para la enzima de pulmón  $517 \pm 46$  nM. Las concentraciones de captopril se expresan generalmente en nanomoles/l (nM) a diferencia de las concentraciones de los inhibidores derivados de la hidrólisis de proteínas alimentarias que usualmente se expresan en mg/ml o en micromoles/l ( $\mu$ M).

**Tabla II.4.** Parámetros de ajuste obtenidos de las curvas de inhibición utilizando captopril como inhibidor y dos fuentes enzimáticas: pulmón y comercial.

Parámetros	Comercial	Pulmón
$V_{max}$ (%inhibición)	$95,9 \pm 9,4^a$	$77,5 \pm 2,4^b$
h	$0,9 \pm 0,2^a$	$2,6 \pm 0,5^b$
$K_h$ (nM)	$39,2 \pm 11,2^a$	$517 \pm 46^b$
R	0,9536	0,9776

Las concentración de captopril necesaria para generar la inhibición del 50% de la ECA es mucho más chica que la conseguida con hidrolizados proteicos, debido a la mayor efectividad que posee el captopril para bloquear el sitio activo de la enzima. La  $V_{m\acute{a}x}$  de la enzima comercial alcanzó valores cercanos al 100% y durante la inhibición, solo un sitio activo se encontró involucrado en la reacción ( $h$   $0,9 \pm 0,1$ ). Extrapolando la

concentración de captopril a valores muy grandes de concentración, no es posible lograr la inhibición completa de la enzima de pulmón ( $V_{\text{máx}} 77,5 \pm 2,4$ ). Si fue posible detectar en esta enzima una cooperatividad positiva en donde el valor de  $h$  fue de  $2,6 \pm 0,5$ , superior al de la enzima comercial. Durante la inhibición del captopril sobre la enzima comercial, solo un sitio activo se pone en juego, esto es congruente con los estudios que indican que los dos dominios activos de ECA son sutilmente diferentes en especificidad de sustrato, conduciendo a una hidrólisis diferencial. De hecho, se ha demostrado que el sitio activo del dominio C puede hidrolizar angiotensina-I y HHL de manera más eficiente, mientras que el dominio N del sitio activo preferentemente hidroliza otros sustratos tales como captopril, lisinopril y fosinoprilat (Guang y col., 2012). Que el captopril, en el rango de concentraciones utilizado, no haya logrado inhibir a la enzima de pulmón totalmente, da cuenta de la posible presencia de metabolitos en el extracto, como se comentó previamente, los cuales pueden interferir con el sitio activo de la enzima y/o a la existencia de diferentes mecanismos de inhibición. La cooperatividad positiva, no hallada con la enzima comercial, evidencia el involucramiento de la fracción reguladora de la enzima durante la inhibición de la enzima de pulmón. Mientras que la interacción captopril-ECA comercial se da en condiciones de idealidad, es decir, en ausencia de otros compuestos en el medio de reacción, la inhibición de la ECA derivada de pulmón se da en presencia de diferentes metabolitos, que podrían estar interaccionando con la enzima generando la cooperatividad positiva que se observó. Esta reacción se da en condiciones similares a cuando se utilizó hidrolizado como inhibidor, formando parte del medio de reacción diferentes péptidos de diferentes tamaños y longitudes que modifican las condiciones de hidrólisis.

Como se comentó más arriba el  $EC_{50}$  obtenido para la enzima comercial fue de  $39,2 \pm 11,2$  nM. Vecchi y Añón (2009) obtuvieron un  $EC_{50}$  de  $10,6 \pm 1,0$  nM, utilizando similares condiciones de ensayo, Sentandreu y Toldrá (2006) publicaron un  $EC_{50}$  de 10 nM, dosando los productos de la hidrólisis por fluorescencia. Henda y col., (2013) estudiaron la inhibición de la ECA y obtuvieron un  $EC_{50}$  de  $15,1 \pm 0,5$  nM, utilizando una técnica cromatográfica para la separación y cuantificación de los productos de hidrólisis. Los valores de  $EC_{50}$  reportados en la literatura fueron levemente inferiores al hallado en este trabajo, probablemente esta diferencia pueda atribuirse al hecho que el  $EC_{50}$  depende de diversos parámetros de reacción, como la naturaleza y la concentración de sustrato, volumen, cantidad de enzima, el modo de inhibición del inhibidor utilizado, y de los métodos de detección de los productos de reacción (Henda

y col., 2013). Parámetros que no son coincidentes en todos los estudios previamente mencionados; obviamente también es dependiente de las condiciones y características de la enzima utilizada.

Cabe señalar que los estudios preliminares o exploratorios se llevaron adelante con la ECA de pulmón mientras que en los ensayos incluidos en la presente Tesis se utilizó la enzima comercial, a efectos de poder comparar los resultados con aquellos obtenidos por otros investigadores.

### **II.3.3.3. Ensayos de inhibición utilizando emulsiones como transportadoras de péptidos inhibidores**

Con el objetivo de determinar la posibilidad de emplear emulsiones como medio de transporte de péptidos bioactivos se analizó la potencial acción inhibitoria de la emulsión inicial ( $E_i$ ) y la emulsión digerida ( $E_{d60}$ ) de la enzima convertora de angiotensina. Las curvas de inhibición obtenidas se compararon con la del hidrolizado (HA) discutido previamente, a partir del cual se elaboraron las emulsiones. La emulsión utilizada se formuló con 0,5 % p/v APA-pH 2,0 y 0,5% p/v HA-pH 2,0.

El HA utilizado en la formulación de la emulsión, tal como se discutió previamente, mostró una clara acción inhibitoria de ECA, siendo el  $EC_{50}$  calculado igual a  $0,14 \pm 0,02$  mg/ml (**Tabla II.3**). Este resultado está de acuerdo con estudios previos realizados en nuestro laboratorio. Fritz y col., (2011) estudiaron la inhibición de ECA provocada por hidrolizados de amaranto obtenidos a partir de la hidrólisis de aislado con diferentes proteasas. Los hidrolizados obtenidos con alcalasa presentaron grados de hidrólisis del orden de 45% y 65 %; el peso molecular promedio ( $PM_p$ ) de los péptidos presentes en estos hidrolizados fue igual a 289 g/mol y 200 g/mol, respectivamente. Estos hidrolizados mostraron acción antihipertensiva siendo el  $EC_{50}$  calculado de  $0,12 \pm 0,02$  mg/ml de proteína soluble para ambos, a pesar de la diferencia en el grado de hidrólisis. Este  $EC_{50}$  es similar al hallado en el presente trabajo de Tesis. El grado de hidrólisis del hidrolizado utilizado en este estudio,  $18,9 \pm 0,2$  %, fue sustancialmente menor que los obtenidos por Fritz y col., (2011) siendo el peso molecular promedio de los péptidos presentes el mismo de 650 g/mol. El cálculo del  $PM_p$  se determinó según lo propuesto por Adler-Nissen (1979). Estos resultados sugieren que en la producción de hidrolizados con un 20% o más de grado de hidrólisis se encuentran presentes péptidos con capacidad de inhibir a la ECA. En general estos péptidos son de pequeña longitud, de 2 a 12 aminoácidos, siendo los más potentes los que presentan secuencias de 2 a 4 aminoácidos (**Tabla II.5**). Según el peso molecular promedio del

hidrolizado en estudio, el péptido molecular promedio posee una longitud de 5 aminoácidos.

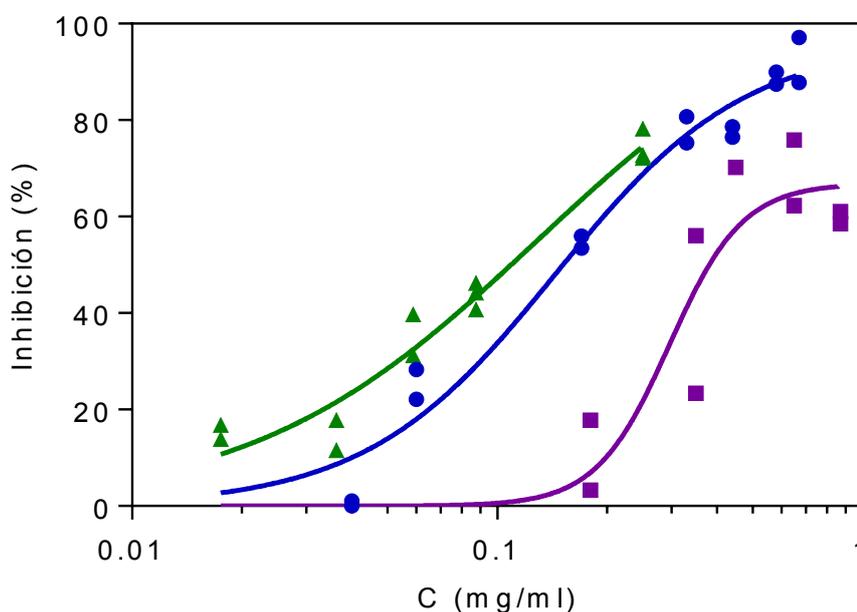
**Tabla II.5.** Algunas características estructurales de péptidos potentes inhibidores de ECA. Fuente: Aluko y col., (2015).

N-terminal-----C-terminal	
Residuos hidrofóbicos	2-12 aminoácidos de largo
	C-terminal tripéptido:
	Residuos hidrofóbicos voluminosos
	Cadenas laterales aromáticas
	Prolina en una o más posiciones
	Residuos cargados positivamente en posición 2, Arg, Lys, Tyr, Phe, Trp, Leu
	Residuos en posición 3 configuración-L

El valor de  $EC_{50}$  del hidrolizado de amaranto es, además, del mismo orden de magnitud que los encontrados habitualmente para hidrolizados de proteínas alimentarias (0,08-1,08 mg de proteína/ml) (Hernández-Ledesma y col., 2011). Li y col., (2007) estudiaron la inhibición de ECA por hidrolizados de proteínas de arroz obtenidos con alcalasa; el  $EC_{50}$  reportado en este caso fue también de 0,14 mg/ml. Por su parte, Barba de la Rosa y col., (2010) estudiaron hidrolizados de glutelinas de amaranto obtenidos por acción de tripsina sobre la inhibición de ECA encontrando un  $EC_{50} = 0,2$  mg/ml.

Girgih y col., (2011) obtuvieron hidrolizados (%GH =  $39,1 \pm 0,44$ ) proteicos provenientes de la semilla de cáñamo (*Cannabis sativa* L.) por acción secuencial de pepsina y pancreatina, simulando la digestión gastrointestinal (HPH) y analizaron su capacidad de inhibición de ECA obteniendo un  $EC_{50}$  de 0,67 mg/ml. El HPH fue fraccionado mediante membranas de filtración en dos fracciones: una conteniendo péptidos < 1 kDa con los que se obtuvo un  $EC_{50}$  de 1,05 mg/ml y la segunda fracción conteniendo péptidos con tamaños entre 1-3 kDa y un  $EC_{50} = 1,17$  mg/ml. Estos autores concluyen que el efecto sinérgico de los péptidos en el hidrolizado se pierde luego de su fraccionamiento, hecho evidenciado por el aumento del  $EC_{50}$ . Girgih y col., (2015) prepararon hidrolizado de músculo de salmón por acción secuencial de pepsina, tripsina y quimotripsina. El  $EC_{50}$  que reportaron en su trabajo fue de 0,13 mg/ml y luego de un fraccionamiento del hidrolizado por RP-HPLC obtuvieron un  $EC_{50} = 0,12$  mg/ml en la fracción más activa.

Las curvas de inhibición obtenidas para la emulsión inicial,  $E_i$ , y la emulsión sometida a un proceso simulado de digestión,  $E_{d60}$ , se muestran en las **Figura II.16**.



**Figura II.16.** Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina utilizando como inhibidores: hidrolizado (-●-), la emulsión (-■-) y emulsión digerida (-▲-).

Tanto la emulsión inicial como la emulsión digerida presentaron un comportamiento dosis-respuesta en función de la concentración de proteína soluble. Las curvas de inhibición se ajustaron a un comportamiento del tipo alostérico-sigmoideal y los parámetros de ajuste obtenidos se muestran en la **Tabla II.6**.

**Tabla II.6.** Parámetros de ajuste obtenidos de las curvas de inhibición utilizando como inhibidores el hidrolizado, la emulsión y la emulsión digerida.

Parámetros	HA	$E_i$	$E_{d60}$
$V_{max}$ (%inhibición)	$96,2 \pm 6,4^a$	$66,9 \pm 7,1^b$	$109 \pm 28^a$
h	$1,7 \pm 0,3^a$	$4,3 \pm 2,1^a$	$1,1 \pm 0,3^b$
$K_h$ (mg/ml)	$0,14 \pm 0,02^a$	$0,29 \pm 0,03^b$	$0,13 \pm 0,07^a$
R	0,9779	0,8787	0,9717

Extrapolando el % de inhibición hacia concentraciones altas de péptidos inhibidores, la  $E_i$  presentó una  $V_{máx}$  de  $66,9 \pm 7,1$  y un h de  $4,3 \pm 2,1$ , valores significativamente

diferentes a los hallados para la emulsión digerida ( $V_{\max}$   $109 \pm 28$  y  $h$   $1,1 \pm 0,3$ ), **Tabla II.6**. Evidentemente los péptidos antihipertensivos presentes en la emulsión inicial eran diferentes en naturaleza y/ o más probablemente se encontraban en menor cantidad que aquellos presentes al final del proceso simulado de digestión gastrointestinal llevado a cabo. Más allá de la mayor dispersión de datos encontrada para  $E_i$  resulta evidente que el mecanismo de inhibición enzimática fue diferente para ambas emulsiones, siendo el comportamiento de  $E_{60}$  más parecido al correspondiente a HA y al captopril. Posiblemente la presencia de una población de moléculas, proteínas/péptidos, menos polidispersa y de menor tamaño, equivalente al captopril, facilite la inhibición enzimática.

El  $EC_{50}$  obtenido en la emulsión inicial fue de  $0,29 \pm 0,03$  mg/ml y para su par digerida de  $0,13 \pm 0,07$  mg/ml (**Tabla II.6**). El  $EC_{50}$  del hidrolizado obtenido por acción enzimática exógena fue de  $0,14 \pm 0,02$  mg/ml, inferior al de la emulsión inicial. La emulsión se formuló con una relación 50:50 aislado/hidrolizado. Sabemos por estudios previos realizados en nuestro laboratorio que los polipéptidos presentes en el APA poseen baja acción inhibitoria sobre la ECA, precisamente porque los péptidos antihipertensivos necesitan ser liberados de la secuencia primaria de las proteínas mediante una hidrólisis (Aphalo y col., 2015). Tomando esto en cuenta, solo los péptidos, aportados por el hidrolizado, presentes en la emulsión son capaces de inhibir a la ECA. La determinación del contenido de proteína en el soluble incluye la presencia de aislado e hidrolizado, por lo que si el contenido de proteína se expresa solo en función del aporte producido por este último, la concentración disminuiría a la mitad dando como resultado un  $EC_{50}$  de  $0,15$  mg/ml similar al del hidrolizado. De esta manera, el resultado queda expresado en función de la fracción activa presente en la emulsión.

Para realizar el ensayo de inhibición una porción de la emulsión se centrifugó y se extrajo el sobrenadante acuoso, el cual fue utilizado para corroborar la acción inhibitoria sobre ECA y la determinación del contenido proteico por el método de Lowry. Que se haya obtenido un  $EC_{50}$  similar entre el HA y la  $E_i$  nos permite afirmar que los péptidos con capacidad de inhibir a la ECA se encuentran presentes mayoritariamente o en cantidad suficiente en la fase continua de la emulsión, siendo posible su separación mediante centrifugación. Tal como se comentó previamente, los péptidos con capacidad inhibitoria son de pequeña longitud, particularmente en amaranto se han identificado dos tetrapéptidos, ALEP y VIKP, derivados de las globulinas con acción antihipertensiva *in vitro* (Vecchi y Añón, 2009). Este tipo de

péptidos aunque migren y logren anclarse en la interface poseerían una alta velocidad de desorción.

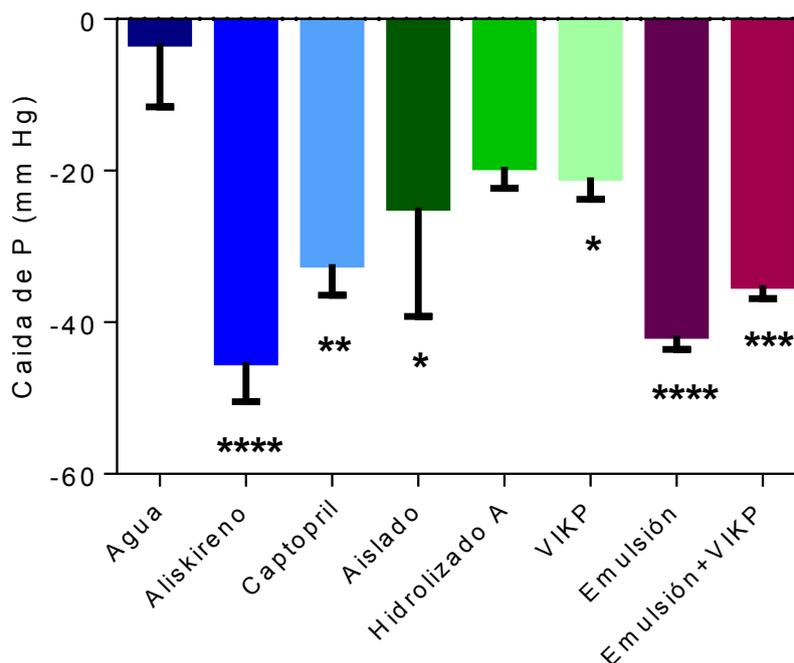
Luego de la digestión gastrointestinal simulada de la emulsión fue posible detectar la presencia de péptidos con capacidad de inhibir a la ECA en la misma extensión que el hidrolizado obtenido por acción de alcalasa ( $EC_{50}$  de  $0,13 \pm 0,07$  mg/ml, **Tabla II.6**). Las enzimas digestivas no fueron capaces de hidrolizar los péptidos inhibidores presentes inicialmente en la emulsión y/o durante el proceso de digestión simulada se formaron nuevos péptidos activos a partir del aislado o hidrolizado, siendo los tensioactivos utilizados como sustratos por las enzimas digestivas. Esta hipótesis se corresponde con en el hecho de que las curvas de inhibición de la  $E_i$  y la  $E_{d60}$  presentaron comportamientos diferentes.

### **II.3.4. Ensayos *in vivo***

#### **II.3.4.1. Medición indirecta de la presión arterial**

Para estudiar la biodisponibilidad y el efecto hipotensor de las proteínas y péptidos de amaranto se utilizaron cepas de ratas Wistar espontáneamente hipertensas (SHR). Dichos animales se dividieron en 8 grupos y se alimentaron con dispersiones de muestras disueltas en 2 ml de agua. Las muestras ensayadas fueron: hidrolizado de alcalasa (HA), aislado de amaranto (APA), péptido VIKP, emulsión y emulsión conteniendo VIKP. Se utilizó como control negativo agua destilada y como controles positivos captopril (inhibidor de la ECA) y aliskireno (inhibidor de la renina). La medición de la presión en los animales se realizó tres veces previo a la administración de las muestras en estudio en diferentes días y luego de las 3 h de la administración orogástrica de las muestras. En la **Figura II.17** se muestra la disminución de la presión arterial sistólica luego de 3 h de administradas las diferentes muestras en estudio.

La administración de agua destilada, utilizada como control negativo, dio como resultado una disminución de la presión sanguínea igual a  $-3 \pm 8$  mm Hg. La gran dispersión que presentó este resultado es producto de la variabilidad entre los animales ( $n= 6$ ), por lo que sería conveniente en próximos ensayos utilizar un número mucho mayor de estos. Las muestras que presentaron diferencias significativas en comparación con el control negativo luego de las 3 h posteriores a la administración orogástrica fueron el aliskireno ( $-45 \pm 5$  mm Hg), la emulsión en la que se utilizó 0,5% p/v de HA y 0,5% p/v de APA como tensioactivo ( $-42 \pm 2$  mm Hg), la emulsión con el péptido VIKP adicionado ( $-35 \pm 2$  mm Hg), el captopril ( $-32 \pm 4$  mm Hg), el aislado ( $-25 \pm 14$  mm Hg) y el péptido VIKP ( $-21 \pm 3$  mm Hg) (**Fig. II.17**).



**Figura II.17.** Disminución de la presión sanguínea sistólica en ratas SHR luego de ser alimentadas con las diferentes muestras en estudio. Los resultados se presentan como la Media  $\pm$  SEM. Un \* indica diferencia ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,0007$ ), \*\*\* ( $P < 0,0001$ ) siendo las muestras comparadas con el control negativo (agua).

El hidrolizado ( $-20 \pm 3$  mm Hg) fue la única muestra en estudio que no presentó diferencias significativas ( $p < 0,07$ ) con respecto al control negativo, aunque la caída de la presión fue similar a la del péptido VIKP. Si bien se verificó una caída de presión en los animales que consumieron hidrolizado, la variabilidad hallada en los resultados del control negativo dificultó el análisis de datos.

Como se describió previamente en la Introducción, el sistema renina-angiotensina (SRA) está regulado por dos proteasas: la renina y la enzima convertidora de angiotensina (ECA). El aliskireno se utiliza comercialmente como inhibidor de la renina, esta enzima es la responsable de hidrolizar el angiotensinógeno en el decapeptido angiotensina-I, sustrato de la ECA. La inhibición de esta enzima que se encuentra en el paso previo a la producción de angiotensina-II evita la acumulación y potencial acción de la ECA sobre la angiotensina-I, lo que explica la mayor caída de la presión arterial obtenida luego de la administración a los animales de este compuesto. El captopril, utilizado comercialmente como una droga inhibidora de la ECA, logró una

disminución de la presión arterial de los animales muy importante pero inferior a la correspondiente al aliskireno coincidentemente con el punto de inhibición del sistema SRA. Las emulsiones transportadoras de los péptidos de amaranto lograron reducir la presión arterial de los animales con respecto al control negativo siendo las diferencias encontradas no significativas con respecto al aliskireno y al captopril.

Estos resultados indican que los péptidos con acción antihipertensiva lograron su pasaje a través del tracto gastrointestinal de las ratas SHR de manera intacta y sin pérdida de su actividad y/o que durante la hidrólisis llevada adelante por las enzimas del tracto gastrointestinal los péptidos/proteínas presentes en las muestras se hayan transformado en nuevos productos bioactivos. Los péptidos presentes originalmente en la muestra y/o los productos de la digestión gastrointestinal una vez ubicados en el lumen intestinal lograron atravesar los enterocitos llegando al flujo sanguíneo y de esa manera ejercer su efecto fisiológico.

Según los resultados obtenidos a partir de los ensayos de inhibición de ECA, el HA presentó *in vitro* un  $EC_{50}$   $0,14 \pm 0,02$  mg/ml (**Tabla II.6**) y una disminución de la presión *in vivo* de  $-20 \pm 3$  mm Hg (**Fig. II.17**). La emulsión conteniendo HA+APA inhibió a la ECA *in vitro* con un  $EC_{50}$   $0,13 \pm 0,07$  mg/ml (**Tabla II.6**) y cuando se le administró a las ratas logró una disminución de la presión de  $-42 \pm 2$  mm Hg (**Fig. II.17**). Luego de la digestión gastrointestinal *in vitro* de la emulsión la actividad inhibitoria se mantuvo con respecto al HA y en la administración a los animales logró una mayor caída de presión. Como se comentó previamente en el análisis de las curvas de inhibición obtenidas con la emulsión  $E_i$  y la emulsión digerida  $E_{d60}$ , es posible que luego de la acción proteolítica de las enzimas digestivas se formen nuevos péptidos inhibidores de la ECA a partir de los polipéptidos provenientes del APA y el HA. Luego de la digestión gastrointestinal *in vivo* del aislado se corroboró un efecto hipotensor del mismo, con una disminución de la presión igual a  $-25 \pm 14$  mm Hg (**Fig. II.17**).

La incorporación del péptido VIKP a la emulsión, con probada capacidad antihipertensiva *in vitro* demostrada por Vecchi y Añón (2009),  $EC_{50}$  0.09 mg/ml, no presentó diferencias significativas con respecto a la emulsión formulada con APA+HA. Se corroboró un efecto hipotensor del péptido VIKP,  $-21 \pm 3$  mm Hg, administrado en una concentración de 50mg/kg de rata. Evidentemente la composición y cantidad generada de los diferentes péptidos inhibidores provenientes del HA y el APA liberados luego de la digestión gastrointestinal *in vivo* fue un factor importante para

producir la inhibición de la ECA y como consecuencia un efecto hipotensor (Norris y FitzGerald, 2013).

Los resultados obtenidos para el hidrolizado están de acuerdo a lo publicado por Fritz y col., (2011), en donde evaluaron la caída de la presión de ratas hipertensas luego de la administración de hidrolizado de amaranto en una proporción de 2,4 g/kg rata con un contenido de proteína similar al utilizado en el presente estudio. El valor obtenido por estos autores fue de  $\Delta P = -25$  mm Hg, luego de transcurridas 3 h de administración. A su vez, Ramírez-Torres y col., (2017) alimentaron ratas SHR con hidrolizado de amaranto obtenido con alcalasa en un proporción de 1,2 g/kg de rata obtuvieron una disminución significativa de la presión arterial de los animales luego de las 4 h, disminución que osciló entre los 20-25 mm Hg. Hasta la fecha son los dos únicos estudios que se han realizado y publicado relacionados con la administración de hidrolizados de amaranto con alcalasa a ratas SHR.

Medina-Godoy y col., (2013) evaluaron el efecto antihipertensivo de hidrolizados de globulina 11S de amaranto modificada genéticamente. La modificación consistió en la incorporación de secuencias peptídicas en tándem con probada actividad inhibitoria de la ECA: el dipéptido Val-Tyr y el tripéptido Ile-Pro-Pro. Las ratas alimentadas con una proporción de péptidos igual a 50 mg/kg de rata presentaron una caída de presión de -28 mm Hg luego de las 3 h de administración por vía oral. La concentración de péptidos utilizada por kg de rata fue similar a la administrada en el presente estudio utilizando el péptido VIKP, presentando una disminución de la presión igual a  $-21 \pm 3$  mm Hg.

Otras fuentes proteicas han sido estudiadas en ensayos *in vivo*, por ejemplo Lafarga y col., (2016) reportaron una caída de presión arterial de  $14,33 \pm 2,19$  mm Hg utilizando hidrolizados obtenidos con papaína a partir de seroalbúmina bovina. La medición la realizaron luego de las 2 h de administrada una cantidad de 200 mg de hidrolizado/ kg de rata. Girgih y col., (2015) testearon el efecto hipotensor de hidrolizados de bacalao y obtuvieron un  $\Delta P$  de -15 mm Hg luego de las 4 h de administración de 200 mg de hidrolizado/kg de rata. Ngo y col., (2014) utilizaron hidrolizados de gelatina obtenidos por acción de alcalasa para administrárselos a ratas SHR. La caída de la presión sistólica registrada luego de 2 h después de la ingestión fue de aproximadamente -28 mm Hg utilizando 1 g de hidrolizado/ kg de rata. Li y col., (2007) utilizaron hidrolizado de proteínas de arroz obtenidos también por acción de alcalasa y una secuencia peptídica (Thr-Gln-Val-Tyr) con potente capacidad inhibitoria ( $EC_{50} = 18,2 \mu M$ ) para chequear el efecto hipotensor de los mismos. Las cepas SHR alimentadas con 600

mg/kg de hidrolizado y 30 mg/kg del tetrapéptido lograron disminuir la presión arterial de los animales -10 mm Hg y -30 mm Hg, respectivamente. A diferencia de lo encontrado en el presente trabajo, no hallaron un efecto hipotensor en el aislado de proteínas de arroz.

En cuanto a la incorporación de péptidos inhibidores de ECA en sistemas de transportes, Hen y col., (2003) encapsularon un péptido sintético, Leu-Lys-Pro, en liposomas y con ellos alimentaron oralmente a ratas SHR en una proporción de 0,18 mM de péptido/kg de rata. Estos autores observaron que la presión arterial de los animales disminuía notablemente luego de 4 h pasada la administración. La reducción máxima de la presión sanguínea del tripéptido (Leu-Lys-Pro) sin encapsulación fue de aproximadamente 30 mmHg. Sin embargo, el péptido encapsulado en liposomas exhibió efectos de reducción de presión arterial más significativos ( $p < 0,01$ ) luego de 4 y 6 h de su administración, alcanzado 45 mm Hg ,aproximadamente, al mayor tiempo; el efecto hipotensor se mantuvo hasta las 10 h de administración.

La presión arterial es resultado del producto del volumen minuto (mantenida por la contracción cardíaca) por la resistencia periférica (mantenida por la contracción de los vasos de resistencia). Lo que se corroboró en los ensayos realizados en este trabajo de Tesis es el efecto de las diferentes muestras de amaranto sobre la presión arterial en un sistema modelo animal, ratas hipertensas, no se puede afirmar si dicho efecto se debe exclusivamente a un efecto vasodilatador/resistencia periférica o si también existe alguna acción depresora sobre la contracción miocárdica. Según los estudios llevados adelante por Fritz y col., (2011), haciendo uso de músculos papilares aislados de corazón del mismo tipo de ratas hipertensas que el empleado en esta Tesis, no existiría, en principio, ningún efecto inotrópico (contractibilidad del corazón) negativo significativo, en consecuencia bajo condiciones "*in vivo*" el corazón no se vería afectado y la disminución de la resistencia periférica sería la causa de la caída en presión sanguínea detectada en los animales luego de la administración del hidrolizado de amaranto .

Comprobado el efecto hipotensor de las proteínas/péptidos de amaranto y asumiendo que las diferentes muestras ensayadas ejercen su rol sobre la resistencia del sistema vascular periférico, se realizaron una serie de experimentos *ex vivo* tendientes a comprobar dicha hipótesis haciendo uso de aorta de rata.

### II.3.4.2. Medición de la contracción del músculo liso vascular aislado

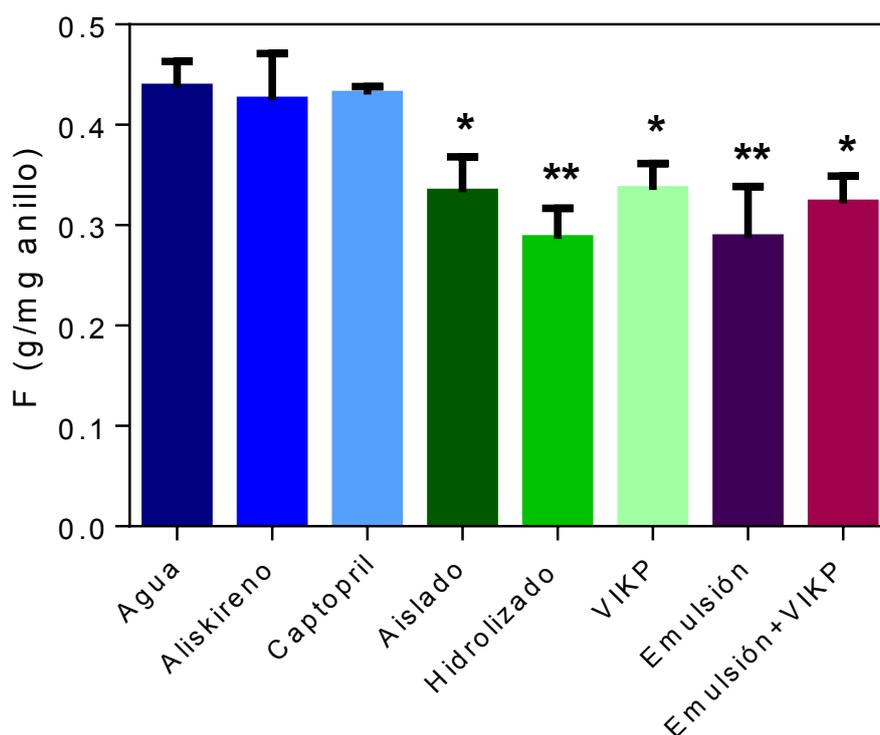
Para corroborar el efecto vasodilatador de las diferentes muestras en estudio y atribuir ese efecto a la acción sobre el sistema renina-angiotensina, principalmente a la inhibición de la ECA, se determinó la contractilidad de la aorta torácica de las ratas utilizadas en el ensayo *in vivo* discutido previamente. Como se describió en el inciso **II.2.5.5**, en la realización de este ensayo se emplearon como estímulos de la aorta una alta concentración de potasio, que actúa sobre los canales voltaje-operados, y norepinefrina, agonista fisiológico que actúa sobre canales receptor-operados. El efecto final, tanto del potasio como de la norepinefrina, fue el aumento del tono vascular del músculo liso aislado, en este caso, de aorta torácica. Tanto el potasio como la norepinefrina a nivel fisiológico desencadenarían un aumento de la presión en los vasos sanguíneos.

Los preparados de aorta se estabilizaron durante 1 h a tensión de reposo de 2 g y luego se expusieron a una concentración de K (80 mM) y norepinefrina en concentraciones crecientes de  $10^{-6}$  M y  $10^{-7}$  M.

#### II.3.4.2.1. Reactividad de anillos de aorta frente al tratamiento con Potasio y norepinefrina

Las muestras de aorta torácica tratadas con potasio que presentaron diferencias significativas de contractilidad respecto a la de los animales control, a los que se les administró sólo agua, fueron el aislado, el hidrolizado, el péptido VIKP, la emulsión y la emulsión con el VIKP. Como se muestra en la **Figura II.18**, la contractilidad de la aorta correspondiente a los animales control fue de  $0,44 \pm 0,02$  g/mg, mientras que las correspondientes a los animales tratados variaron entre  $0,29 \pm 0,03$  g/mg (animales alimentados con emulsión e hidrolizado) y  $0,34 \pm 0,03$  g/mg (animales alimentados con el péptido VIKP).

El tratamiento de las aortas torácicas con norepinefrina mostró diferencias significativas en la contractilidad vascular entre el grupo de animales alimentado con agua ( $0,44 \pm 0,02$  g/mg) y los grupos de hidrolizado ( $0,29 \pm 0,03$  g/mg), el péptido VIKP ( $0,34 \pm 0,03$  g/mg) y la emulsión conteniendo VIKP ( $0,32 \pm 0,03$  g/mg) (**Fig. II.19**).

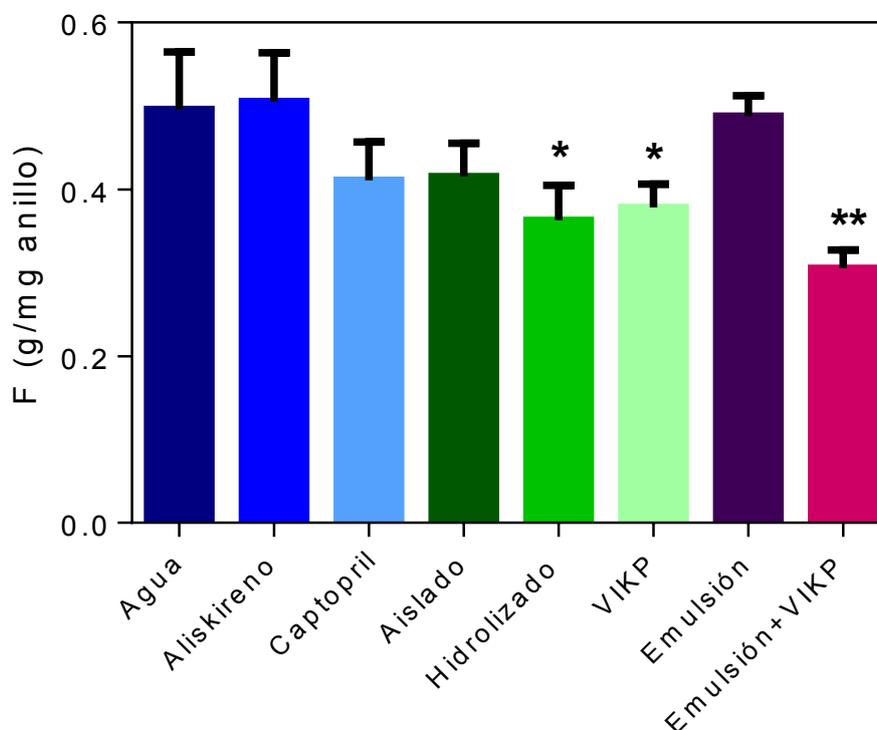


**Figura II.18.** Contractibilidad de los anillos de aorta sometidos a un estímulo con Potasio. En el gráfico se puede apreciar la fuerza contráctil para las diferentes muestras en estudio. (Media  $\pm$  SEM). Un \* indica diferencia ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,003$ ) comparando las muestras contra el control negativo.

La contractilidad de las aortas provenientes de los animales a los que se les suministró captopril y aliskireno, no presentaron diferencias significativas con respecto al control negativo, animales a los que se les suministró agua, para ninguno de los estímulos utilizados, potasio y norepinefrina. Evidentemente estos inhibidores no estarían ejerciendo su acción sobre el SRA local, resultado esperable dado que estos dos compuestos actúan a nivel del aparato circulatorio intacto. Se ha sugerido que los péptidos derivados de fuentes alimentarias tienen mayor afinidad por los tejidos y se eliminan más lentamente que el captopril sintético (Fujita y Yoshikawa, 1999).

Por lo tanto, en base a estos experimentos y a los resultados obtenidos en los mismos podríamos concluir que el efecto ejercido por la administración de distintas muestras de amaranto sobre la presión arterial de ratas hipertensas se debió a una disminución del tono vascular y una caída de la resistencia periférica de los vasos. Esto podría

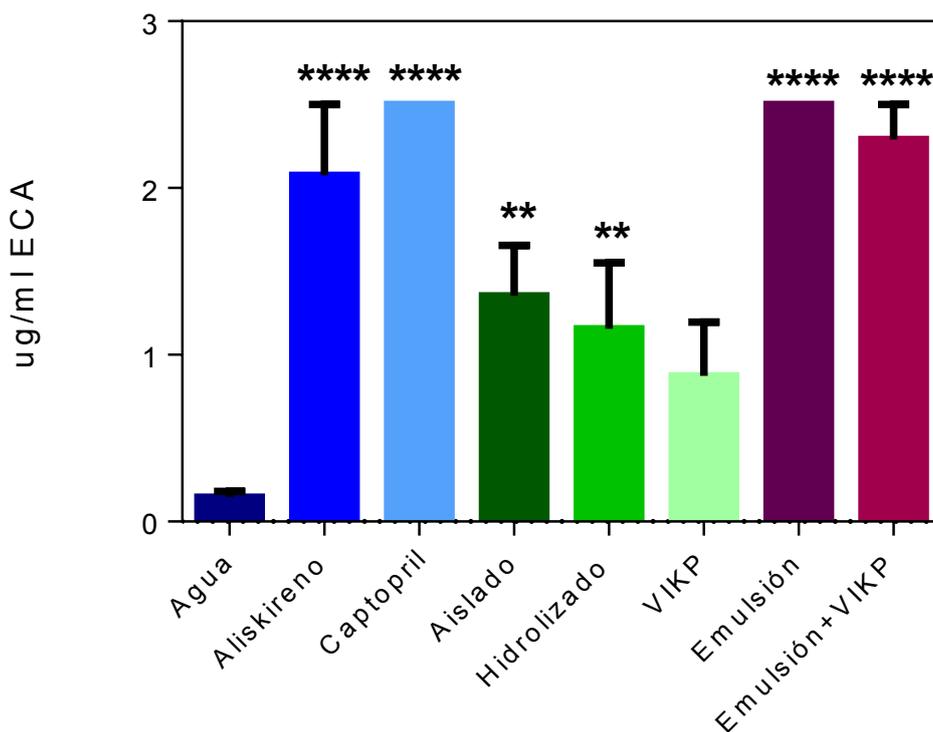
deberse a una acción inhibitoria sobre el sistema renina- angiotensina local, además del efecto de inhibición sobre la ECA circulante.



**Figura II.19.** Contractibilidad de los anillos de aorta sometidos a un estímulo con Norepinefrina. En el gráfico se puede apreciar la fuerza contráctil para las diferentes muestras en estudio. (Media  $\pm$  SEM). Un \* indica diferencia ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,003$ ) comparando las muestras contra el control negativo.

#### II.3.4.3. Cuantificación de la enzima convertidora de angiotensina en plasma

Para conocer si las diferentes muestras en estudio tienen algún efecto en la modulación de los niveles de la enzima convertidora de angiotensina presente en plasma, se determinó la concentración de la misma mediante un Kit ELISA. En la **Figura II.20** se pueden observar las concentraciones de enzima en plasma expresadas en  $\mu\text{g}$  de ECA/ ml de plasma.



**Figura II.20.** Concentración de ECA (µg/ml) en plasma para las diferentes muestras en estudio. (Media ± SEM). Un \* indica diferencia (P < 0,05), \*\*\*\* (P < 0,0001), comparando las muestras contra el control negativo.

El control negativo, plasma de animales hipertensos a los que se les suministró agua, presentó la menor concentración de enzima ( $0,14 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ ). El plasma de los animales a los que se administró captopril contenía  $2,5 \pm 0,0 \mu\text{g/ml}$  de ECA y el correspondiente a aliskireno  $2,07 \pm 0,42 \mu\text{g/ml}$ , ambos valores son significativamente superiores al contenido de enzima del control negativo (P < 0,0001). La administración a los animales con la emulsión ( $2,5 \pm 0,0 \mu\text{g/ml}$ ) y la emulsión conteniendo el péptido VIKP ( $2,3 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$ ) tuvieron como consecuencia un aumento (P < 0,0001) de los niveles de ECA en plasma respecto al control negativo y de la misma magnitud que los controles positivos (captopril y aliskireno).

Por su parte, la administración del aislado y el hidrolizado también generaron un aumento de los niveles de ECA en plasma con respecto al control:  $1,35 \pm 0,30 \mu\text{g/ml}$  y  $1,15 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente (P < 0,05); aunque la proporción de dicho aumento fue inferior al provocado por los controles positivos.

La administración del péptido VIKP a las ratas hipertensas fue la única muestra que no provocó ninguna variación estadísticamente significativa en el contenido de la ECA en

el plasma, al igual que el agua; aunque los niveles enzimáticos determinados ( $0,87 \pm 0,32 \mu\text{g/ml}$ ) fueron similares a los correspondientes al hidrolizado y el aislado.

Nuestra hipótesis antes de realizar este ensayo era que probablemente el tratamiento con las diferentes muestras produciría una disminución en los niveles de ECA plasmáticos dado que esta enzima actúa a nivel sérico, sin embargo no sólo la hipótesis era errada sino que los resultados obtenidos fueron inversos a los esperados. Probablemente la inhibición de la ECA plasmática *in vivo* por efecto de la administración de las diferentes muestras de amaranto genere la síntesis *de novo* de la enzima, quizá a través de un sistema de “up regulation” como el observado por ejemplo en el tratamiento de pacientes con compuestos bloqueantes de los receptores adregénicos, en los que se ha detectado un aumento de la concentración de catecolaminas plasmáticas.

Estudios publicados en la literatura realizados con las drogas sintéticas utilizadas en el tratamiento de la hipertensión también registraron un aumento en los valores de ECA en plasma y en otros tejidos. Por ejemplo Chai y col., (1992) hallaron que luego de la administración crónica (14 días) de lisinopril (10 mg/kg) a ratas Sprague-Dawley aumentó significativamente los niveles de ECA en plasma y pulmón, pero no en el otros tejidos estudiados, aorta, testículos y riñones. Estas ratas suelen tener mayor relación de cola para la longitud del cuerpo en comparación con ratas Wistar y son utilizadas en el estudio del tratamiento de la hipertensión al igual que las cepas SHR. Kohzuki y col., (1991) encontraron que la inducción de ECA resultó ser específica de órganos cuando ratas Sprague-Dawley se alimentaron con lisinopril de manera crónica; la ECA total plasmática aumentó 1,75 veces y la ECA total en pulmón aumentó en un 30% en comparación con los animales utilizados como controles, pero no hubo un cambio demostrable en la concentración total de ECA en el riñón, la glándula suprarrenal o la aorta. A pesar de esto, durante el tratamiento crónico con lisinopril, la actividad de la ECA en todos estos órganos se inhibió con bajos niveles de ECA libre. La inducción de ECA en el plasma y el pulmón no parece disminuir significativamente la efectividad de los inhibidores de la ECA en el tratamiento crónico de pacientes con hipertensión o insuficiencia crónica cardíaca (Chai y col., 1992).

Restaría determinar, en un futuro próximo, si el aumento de la cantidad de ECA en plasma se corresponde con un incremento de su síntesis, por ejemplo mediante la determinación de RNAs mensajeros específicos.

Cabe además señalar, que la mayor cantidad de ECA plasmática detectada no necesariamente implica que sea total o parcialmente activa, hecho que se debe

corroborar a través de la determinación de la actividad de la ECA del plasma. A su vez, la inducción de ECA en plasma, en principio, no parece afectar la efectividad de los inhibidores en estudio.

Estos estudios serán realizados próximamente en nuestro laboratorio para poder aportar nueva información a los mecanismos de acción involucrados en el efecto hipotensor de los péptidos derivados de las proteínas de amaranto.

## II.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

- Fue posible caracterizar el proceso simulado de digestión gastrointestinal utilizando una emulsión formulada con 0,8% p/v de APA-pH 2,0. Mediante el seguimiento del tamaño de partícula durante las diferentes etapas del proceso digestivo se caracterizó la acción de los principales componentes de los fluidos gástrico y duodenal. La extensión de la lipólisis se determinó cuantificando la liberación de los ácidos grasos libres, arrojando un valor de 30% al final de la digestión junto con un aumento significativo en el tamaño de partícula debido a los procesos de desestabilización, como la agregación y coalescencia que ocurren durante la digestión simulada de la emulsión.
- Una vez caracterizado el sistema se realizó el proceso simulado de digestión gastrointestinal sobre una emulsión formulada con 1% p/v de APA+HA pH-2,0. El hidrolizado de amaranto se utilizó como fuente de péptidos bioactivos y como tensioactivo en la formación de la emulsión. Luego del proceso simulado de digestión, las gotas de aceite se distribuyeron en tres poblaciones diferentes, en donde parte de las gotas de aceite de la emulsión fueron digeridas extensivamente en tanto que otras no experimentaron hidrólisis o la misma fue reducida.
- La utilización de la enzima convertidora de angiotensina obtenida a partir pulmones de conejos se caracterizó utilizando captopril como control positivo e hidrolizado de amaranto como fuente de péptidos inhibidores. La concentración que generó la inhibición del 50% de la ECA utilizando captopril fue de  $517 \pm 46$  nM, superior al  $EC_{50}$  obtenido con la enzima comercial,  $39,2 \pm 11,2$  nM. Similar comportamiento fue hallado cuando se utilizó hidrolizado como inhibidor, presentando un  $EC_{50}$   $1,3 \pm 0,2$  mg/ml versus un  $EC_{50}$   $0,14 \pm 0,02$  mg/ml con la enzima comercial.
- La evaluación de la capacidad antihipertensiva *in vitro* de la emulsión 1% p/v de APA+HA pH-2,0 sometida a un proceso simulado de digestión gastrointestinal presentó un  $EC_{50}$   $0,13 \pm 0,07$  mg/ml, demostrando ser igual de efectiva que el hidrolizado obtenido a partir de alcalasa. Los péptidos bioactivos presentes en la emulsión fueron resistentes al proceso digestivo y/o durante el mismo se liberaron nuevos péptidos antihipertensivos por acción de las enzimas digestivas.
- La medición de la presión arterial sistólica en ratas espontáneamente hipertensas a las que se les administró diferentes muestras de amaranto

permitió corroborar la actividad antihipertensiva *in vivo*. El hidrolizado de amaranto arrojó una disminución de la presión arterial igual a  $-20 \pm 3$  mm Hg, similar al péptido antihipertensivo VIKP y la emulsión conteniendo APA+HA presentó una disminución de  $-42 \pm 2$  mm Hg, del mismo orden de magnitud que las drogas utilizadas comercialmente para el control de la hipertensión (captopril y aliskireno). Luego de la digestión gastrointestinal *in vivo* se generaron péptidos antihipertensivos además de los presentes en el hidrolizado, probablemente a partir de la hidrólisis del aislado proteico de amaranto ( $-25 \pm 14$  mm Hg).

- Los péptidos antihipertensivos pudieron: atravesar el proceso digestivo exitosamente, atravesar el lumen intestinal, resistir el ataque de las peptidasas presentes en los enterocitos y en el plasma, para llegar a ejercer su efecto sobre la enzima diana (ECA).
- A excepción del péptido VIKP, todas las muestras de amaranto presentaron niveles aumentados de ECA en plasma luego de los tratamientos. Si bien existen antecedentes de este efecto luego de la administración crónica de drogas antihipertensivas, resta por averiguar si la enzima se encuentra activa y si su concentración aumentada frente al control se debe a un mecanismo de “up regulation”.

## II.5. BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262.
- Aluko, R. E. (2015). Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 235–262.
- AOAC. (1990). Association of Official Analytical Chemists, Method 940.28. Inc. Official Methods of Analysis. (Ed.15th).Washington, DC: Williams, S.
- Aphalo, P., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (2015). Amaranth sprouts: A potential health promoting and nutritive natural food. *International Journal of Food Properties*, 18(12), 2688–2698.
- Barba de la Rosa, A. P., Barba Montoya, A., Martínez-Cuevas, P., Hernández-Ledesma, B., León-Galván, M. F., De León-Rodríguez, A., & González, C. (2010). Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: Antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 23(2), 106–111.
- Bellesi, F. A., Martinez, M. J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., & Pilosof, A. M. R. (2016). Comparative behavior of protein or polysaccharide stabilized emulsion under in vitro gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 52, 47–56.
- Borghi, C., & Cicero, A. F. G. (2017). Nutraceuticals with a clinically detectable blood pressure-lowering effect: a review of available randomized clinical trials and their meta-analyses. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(1), 163–171.
- Chai, S. Y., Perich, R., Jackson, B., Mendelsohn, F. A. O., & Johnston, C. I. (1992). Acute and chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors on tissue angiotensin-converting enzyme. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 19(4), 7–12.
- Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637–1648.
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., & Añón, M. C. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry*, 126(3), 878–884.
- Fujita, H., & Yoshikawa, M. (1999). LKPNM: A prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology*, 44(1–2), 123–127.

- Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B., & Lin, R. (2009). The effect of simulated digestion in vitro on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 137–143.
- Girgih, A. T., Nwachukwu, I. D., Hasan, F., Fagbemi, T. N., Gill, T., & Aluko, R. E. (2015). Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates and their antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *Food & Nutrition Research*, 59(5), 29788.
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., Li, H., Adebisi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Kinetics of enzyme inhibition and antihypertensive effects of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemist's Society*, 88(11), 1767–1774.
- Guang, C., Phillips, R. D., Jiang, B., & Milani, F. (2012). Three key proteases — angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin — within and beyond the renin-angiotensin system. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 105(6–7), 373–385.
- Gumus, C. E., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2017). Gastrointestinal fate of emulsion-based  $\omega$ -3 oil delivery systems stabilized by plant proteins: Lentil, pea, and faba bean proteins. *Journal of Food Engineering*, 207, 90–98.
- He, R., Aluko, R. E., & Ju, X. R. (2014). Evaluating molecular mechanism of hypotensive peptides interactions with renin and angiotensin converting enzyme. *PLoS ONE*, 9(3).
- Hen, T. L., Lo, Y. C., Hu, W. T., Wu, M. C., Chen, S. T., & Chang, H. M. (2003). Microencapsulation and modification of synthetic peptides of food proteins reduces the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1671–1675.
- Henda, Y. Ben, Labidi, A., Arnaudin, I., Bridiau, N., Delatouche, R., Maugard, T., & Bordenave-Juchereau, S. (2013). Measuring angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity by micro plate assays: Comparison using marine cryptides and tentative threshold determinations with captopril and losartan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(45), 10685–10690.
- Hernández-Ledesma, B., Del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 23–35.
- Houston, M. (2005). Nutraceuticals, vitamins, antioxidants, and minerals in the prevention and treatment of hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 47(6), 396–449.

- Kim, Y. K., Yoon, S., Yu, D. Y., Lönnnerdal, B., & Chung, B. H. (1999). Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human alpha s1-casein expressed in *Escherichia coli*. *The Journal of Dairy Research*, *66*(3), 431–9.
- Kohzuki, M., Johnston, C. I., Chai, S. Y., Jackson, B., Perich, R., Paxton, D., & Mendelsonhn, F. A. O. (1991). Measurement of angiotensin converting enzyme induction and inhibition using quantitative in vitro autoradiography: tissue selective induction after chronic lisinopril treatment. *Journal of Hypertension*, *9*, 579-587.
- Lafarga, T., Aluko, R. E., Rai, D. K., O'Connor, P., & Hayes, M. (2016). Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, *81*, 91–99.
- Li, G. H., Qu, M. R., Wan, J. Z., & You, J. M. (2007). Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I- converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, *16*, 275–280.
- Li, Y., Hu, M., & McClements, D. J. (2011). Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry*, *126*(2), 498–505.
- Malaki Nik, A., Wright, A. J., & Corredig, M. (2010). Surface adsorption alters the susceptibility of whey proteins to pepsin-digestion. *Journal of Colloid and Interface Science*, *344*(2), 372–381.
- Malaki Nik, A., Wright, A. J., & Corredig, M. (2011). Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different in vitro digestion models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *83*(2), 321–330.
- Martinez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., & Hernandez, L. B. (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food & Function*, *3*, 350–361.
- Masuyer, G., Douglas, R. G., Sturrock, E. D., & Acharya, K. R. (2015). Structural basis of Ac-SDKP hydrolysis by Angiotensin-I converting enzyme. *Nature*, *5*, 1–12.
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*, *1*(1), 32–59. <https://doi.org/10.1039/c0fo00111b>
- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: Principles, Practices and Techniques*. New York: CRC Press.

- Medina-Godoy, S., Rodríguez-Yáñez, S. K., Bobadilla, N. A., Pérez-Villalva, R., Valdez-Ortiz, R., Hong, E., & Valdez-Ortiz, A. (2013). Antihypertensive activity of AMC3, an engineered 11S amaranth globulin expressed in *Escherichia coli*, in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 5, 441-449.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., & Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113.
- Mun, S., Decker, E. A., Park, Y., Weiss, J., & McClements, D. J. (2006). Influence of interfacial composition on in vitro digestibility of emulsified lipids: Potential mechanism for chitosan's ability to inhibit fat digestion. *Food Biophysics*, 1(1), 21–29.
- Mun Saehun, A. D. E., & McClements, D. J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*, 40(6), 770–781.
- Ngo, D. H., Kang, K. H., Ryu, B., Vo, T. S., Jung, W. K., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2014). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 174, 37–43.
- Norris, R., & FitzGerald R. (2013). Antihypertensive Peptides from Food Proteins. In Hernandez-Ledesma, B., Hsieh, C. (Ed), *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*, 45–65: InTechOpen.
- Ramírez-Torres, G., Ontiveros, N., Lopez-Teros, V., Ibarra-Diarte, J., Reyes-Moreno, C., Cuevas-Rodríguez, E., & Cabrera-Chávez, F. (2017). Amaranth Protein Hydrolysates Efficiently Reduce Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Molecules*, 22(11), 1905. <https://doi.org/10.3390/molecules22111905>
- Rinaldi, G. J. (2005). Blood pressure fall and increased relaxation of aortic smooth muscle in diabetic rats. *Diabetes & Metabolism*, 31(5), 487–495.
- Saleh, A. S. M., Zhang, Q., & Shen, Q. (2016). Recent research in antihypertensive activity of food protein-derived hydrolyzates and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(5), 760–787.
- Sarkar, A., Goh, K. K. T., Singh, R. P., & Singh, H. (2009). Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1563–1569.
- Sentandreu, M. Á., & Toldrá, F. (2006). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chemistry*, 97(3), 546–554.

- Singh, H., & Sarkar, A. (2011). Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 47–57.
- Suarez, S. E., & Añón, M. C. (2017). Comparative behaviour of solutions and dispersions of amaranth proteins on their emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 74, 115-123.
- Vecchi, B., & Añón, M. C. (2009). ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*, 70(7), 864–870.
- Wouters, A. G. B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2016). Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 786–800.

# ***CAPÍTULO 3***

**Actividad  
antihipertensiva *in  
vitro* de galletitas  
elaboradas a base  
de harina de  
amaranto**

---

### III. Introducción al capítulo

En los anteriores capítulos se estudió el desarrollo, caracterización y la actividad antihipertensiva de emulsiones elaboradas a partir de aislado e hidrolizado proteico de amaranto. En el presente capítulo nos propusimos utilizar harina de amaranto como materia prima para la elaboración de galletitas.

La harina de amaranto es el principal producto comercial derivado del grano y es la materia prima de más fácil acceso para elaborar un producto a base de amaranto. Poder conocer las características fisicoquímicas y la potencial actividad biológica de un producto terminado a base de harina de amaranto representó todo un desafío debido a la complejidad del sistema alimentario en estudio.

La harina de amaranto se utilizó para elaborar galletitas de tipo artesanal. Las galletitas son un producto de consumo masivo por su facilidad para transportarlas y su larga vida útil. Tradicionalmente son elaboradas con trigo blando ("soft") en el cual la lisina es el principal aminoácido limitante. La concentración de lisina en los granos de amaranto es de 5,96 g/16 g N la cual es sustancialmente más alta que la correspondiente a harina de trigo, 2,90 g/16 g N (Dodok y col., 1997).

El grano de amaranto posee un contenido de proteínas elevado en comparación con los tres cereales de mayor importancia agronómica y comercial a nivel mundial como son el arroz, el maíz y el trigo, los cuales contribuyen con más de la mitad del aporte proteico a la dieta humana (**Tabla III.1**; FAO, 2011).

**Tabla III.1.** Composición aproximada del grano de Amaranto y de tres cereales de importancia en la alimentación humana. Adaptación del libro *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology*. Paredes-López 1994.

Compuesto	Amaranto	Maíz	Arroz	Trigo
Proteína (% p/p)	17,9	10,3	8,5	14
Lípidos (% p/p)	7,7	4,5	2,1	2,1
Fibra (% p/p)	2,2	2,3	0,9	2,6
Cenizas (% p/p)	4,1	1,4	1,4	1,9
Carbohidratos (%p/p)	57	67,7	75,4	66,9

El amaranto también posee un alto contenido de fibra dietaria, calcio y hierro en mayor concentración que los cereales antes mencionados (Bressani y García-Vela, 1990; Berganza y col., 2003; Venskutonis y Kraujalis, 2013). Como resultado de estas características la planta de amaranto se ha comenzado a cultivar en diversas regiones

y países del mundo tales como Sud América, África, India, China y los Estados Unidos (Aguilar y col., 2013).

Además de las características nutricionales, los granos de amaranto son libres de gluten y sus productos están emergiendo como una alternativa de consumo saludable. Utilizar la harina de amaranto como base única para elaborar productos alimenticios permite incorporar a las personas celíacas al grupo de potenciales consumidores.

Más allá de presentar las ventajas antes mencionadas, se ha descrito que el amaranto aportaría diversas actividades biológicas beneficiosas para la salud del consumidor, las que pueden provenir de péptidos encriptados en sus proteínas de reserva como también de otras sustancias presentes en la semilla, como polifenoles, escualeno y fibra (Fritz y col., 2011; Orsini Delgado y col., 2016; Moronta y col., 2016; Sabbione y col., 2016a, b; Quiroga y col., 2017). Visto el amplio espectro de actividades biológicas mostrado por péptidos derivados de las proteínas de almacenamiento de este grano decidimos estudiar la presencia de actividad antihipertensiva en un producto final para el consumo, elaborado a partir de harina de amaranto.

### III.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

La información disponible sobre el estudio de péptidos bioactivos antihipertensivos en la literatura se basa principalmente en la utilización de muestras purificadas como péptidos, fracciones proteicas e hidrolizados o digeridos derivados de aislados proteicos. En este sentido resultó de interés para elaborar galletitas el estudio de las características fisicoquímicas y bioactivas de la harina de amaranto, principal producto comercial derivado del grano. Las galletitas, como un producto final listo para el consumo, constituyen un sistema alimentario complejo en comparación con las muestras proteicas mencionadas previamente las cuales han sido exhaustivamente estudiadas en cuanto a sus características antihipertensivas. Verificar la potencial actividad antihipertensiva en un producto final para el consumo será de relevancia para asegurar el desarrollo de un alimento con funcionalidad probada.

En base a lo expuesto, en el presente capítulo nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

- Elaborar galletitas a base de harina de amaranto como única fuente de aporte proteico.
- Caracterizar desde el punto de vista fisicoquímico la harina, la masa y las galletitas de amaranto a fin de estudiar el proceso de elaboración y los atributos del producto final.
- Estudiar la potencial actividad antihipertensiva de la harina y las galletitas luego de ser sometidas a un proceso de digestión gastrointestinal simulado.

## III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

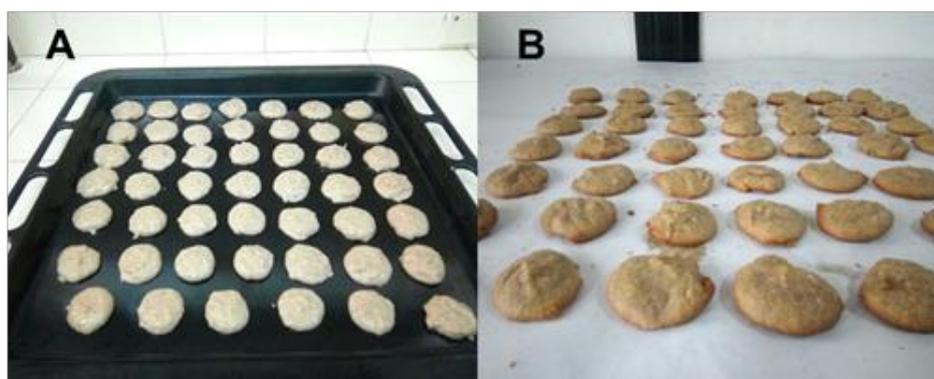
### III.2.1. Elaboración de la masa y galletitas

Las galletitas se prepararon con harina de amaranto (Nutraceutica Sturla SRL), sacarosa (Ledesma), aceite de girasol (Cocinero, Molinos Río de La Plata), esencia de vainillina (La Virginia) y polvo de hornear sin gluten. En la **Tabla III.2** se puede observar la proporción de cada ingrediente utilizado.

**Tabla III.2.** Composición porcentual de cada ingrediente en las galletitas

Ingredientes	Formulación (%p/p)
Harina de Amaranto	37,1
Azúcar	22,3
Aceite de girasol	11,1
Polvo para hornear	0,6
Esencia de vainilla	1,0
Agua	27,8

La masa se preparó hidratando la harina previamente con el agua e incorporando luego los demás ingredientes por mezclado. Una vez que se alcanzó la consistencia deseada, la que se estableció empíricamente durante las primeras pruebas realizadas, la masa se fraccionó y se colocó en una placa para horno empleando una cuchara pequeña, cocinándose a 160°C durante 15 min. El horno eléctrico (Ariston, Fabriani, Italia) utilizado para la cocción se precalentó durante 20 min a la temperatura antedicha. En la **Figura III.1** se pueden visualizar la masa (**panel A**) y las galletitas luego del horneado (**panel B**).



**Figura III.1.** Masa previo a la cocción (panel A) y galletitas horneadas (panel B).

### III.2.2. Composición centesimal de la harina, masa y galletitas

#### III.2.2.1. Humedad

El contenido de agua se determinó indirectamente luego de conocer la contribución de la sustancia seca a la masa total por secado en estufa a  $105 \pm 1$  °C y presión atmosférica hasta peso constante, método 928.10 de la AOAC, (AOAC, 1990). La determinación se realizó por triplicado.

#### III.2.2.2. Cenizas

La determinación de cenizas se realizó gravimétricamente por calcinación de la muestra a  $550 \pm 5$  °C y presión atmosférica hasta cenizas blancas método 923.03 de la AOAC (AOAC, 1990). La determinación se realizó por triplicado.

#### III.2.2.3. Proteínas

El contenido total de proteína se determinó mediante el método de microKjeldhal combinado con el método colorimétrico de Nkonge y Ballance (Nkonge y Ballance, 1982), utilizando el factor de conversión de 5,85 g de proteína/g de nitrógeno (Paredes-López, 1994). La determinación se realizó por triplicado.

#### III.2.2.4. Lípidos

La determinación del contenido de lípidos se realizó por extracción directa empleando el equipo de Soxhlet (AOAC, 1990). La muestra se extrajo con éter etílico llevándose a cabo 8 sifonadas para lograr una extracción completa de los lípidos presentes en la misma. Luego se determinó gravimétricamente el extracto seco, previa eliminación de solventes. El ensayo se realizó por triplicado.

El porcentaje de grasa se calculó utilizando la **ecuación III.1**:

$$\% \text{ grasa} = (m_2 - m_1 / m) \times 100 \quad \text{ec. III.1}$$

Donde:  $m_2$ , masa en gramos del balón con grasa después del secado (g);  $m_1$ , masa del balón vacío (g);  $m$ , masa de muestra (g).

#### III.2.2.5. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono se determinaron utilizando el método de FCB (Fehling-Causse-Bonnans) luego de una hidrólisis ácida total (Menegassi y col., 2011). El ensayo se realizó por triplicado.

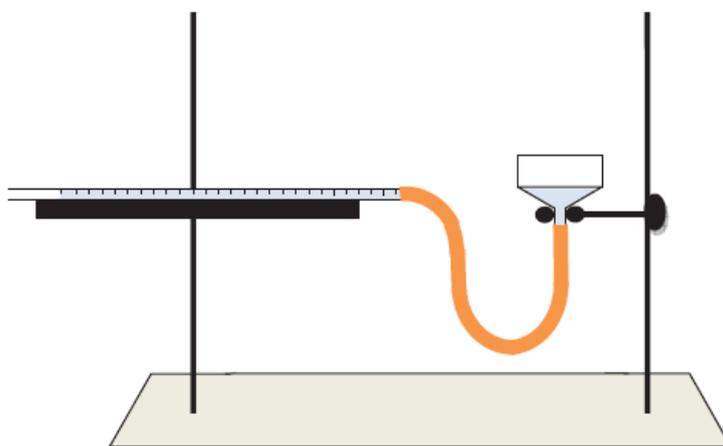
### III.2.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El estudio y análisis de los parámetros térmicos de las diferentes muestras se realizó mediante calorimetría diferencial de barrido. La metodología utilizada se encuentra descrita en el ítem I.2.6 del capítulo 1. Para realizar las corridas calorimétricas se pesaron aproximadamente 15 mg de cada muestra en las cápsulas de medidas. Las dispersiones la harina, masa, galletitas, almidón y almidón-sacarosa se prepararon al 20% p/p. La muestra de almidón-sacarosa se preparó respetando la proporción de estos componentes en las galletitas. La cantidad de agua se encontraba en exceso para producir la gelatinización del almidón.

### III.2.4. Caracterización de la harina

#### III.2.4.1. Ensayo de absorción de agua

Se determinó la capacidad de imbibición de agua de la harina de amaranto. Para tal fin se empleó un equipo de Baumann el cual consiste en una base perforada, sobre la cual se colocó papel de filtro, que se conectó a una pipeta graduada a través de un tubo flexible. La base y la pipeta se encuentran en posición horizontal y al mismo nivel (**Fig. III.2**). El sistema se llenó de agua, se enrasó la pipeta y se colocó una capa uniforme de muestra (50 mg) sobre el papel de filtro. Se midió la variación del volumen de agua de la pipeta en función del tiempo hasta que se obtuvo un volumen constante. Los resultados se expresaron como ml de agua imbibida por g de harina. La absorción de agua se determinó a 25°C y las curvas obtenidas se ajustaron a un comportamiento de tipo exponencial para calcular la velocidad inicial ( $v_i$ , ml/g min) de absorción de agua y la WIC (ml/g).



**Figura III.2.** Esquema del equipo de Bauman.

La capacidad de imbibición (water imbibing capacity: WIC) de agua se determinó como:

$$\text{WIC} = \text{ml de agua absorbida} / \text{g de muestra}$$

### III.2.4.2. Capacidad de retención de solventes

El perfil de capacidad de retención de solventes (CRS) se determinó de acuerdo con el método AACC 56-11 (2000). Se suspendieron muestras de harina de amaranto (5 g) con 25 g de agua, 500 g/l de sacarosa, 50 g/l de carbonato de sodio y 50 g/l de ácido láctico. Las muestras se hidrataron durante 20 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1000g durante 15 min y 20°C. Cada precipitado obtenido se pesó y el CRS para cada solvente se calculó de acuerdo a lo indicado por Barrera y col., (2007):

$$\% \text{ CRS} = (\text{PP} / \text{PH} \times 86 / (100 - \% \text{ H}) - 1) \times 100 \quad \text{ec. III.2}$$

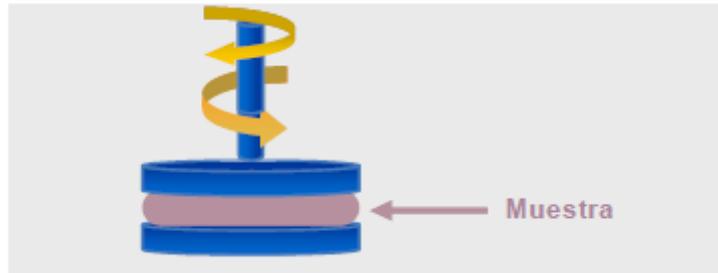
donde: PP es el peso del precipitado (g); PH el peso de la harina (g); % H el contenido de humedad de la harina. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

### III.2.5. Caracterización de la masa

#### III.2.5.1. Ensayos dinámicos en reómetro oscilatorio

Los ensayos oscilatorios son muy sensibles a la composición química y a la estructura de los alimentos por lo que son los métodos dinámicos más ampliamente utilizados para estudiar el comportamiento viscoelástico de los mismos (Steffe, 1996). La muestra se somete a un esfuerzo (en un reómetro de esfuerzo controlado) o una deformación (en un reómetro de velocidad controlada) que varía armónicamente con el tiempo y se registran el desfase entre las oscilaciones del esfuerzo y la deformación y los cambios en la amplitud de la oscilación. En los reómetros de esfuerzo controlado se fija la amplitud del esfuerzo y se mide la deformación mientras que en los de velocidad controlada se fija la deformación y se mide el esfuerzo. Se define como rango de viscoelasticidad lineal de un material a aquel en el cual las propiedades del mismo no dependen de la magnitud del esfuerzo aplicado, de la deformación realizada o de la velocidad de aplicación de la deformación.

Si tenemos una muestra a la cual se aplica un esfuerzo de cizalla entre dos platos paralelos (**Fig. III.3**), de forma tal que el plato inferior se encuentra fijo mientras que el superior se mueve describiendo un movimiento sinusoidal de frecuencia  $\omega$ , entonces la deformación del material está dada por la **ecuación III.3**.



**Figura III.3.** Esquema de la situación de la muestra entre las placas del reómetro para la realización de los ensayos.

$$\gamma = \gamma_0 \text{ sen } (\omega t) \quad \text{ec. III.3}$$

donde:  $\gamma$  es la deformación del material,  $\gamma_0$  es la amplitud de la deformación,  $\omega$  es la frecuencia angular (rad/s) y  $t$  el tiempo (s).

Si la amplitud de la deformación que se aplica es pequeña, de forma tal de encontrarnos dentro del rango de viscoelasticidad lineal, el esfuerzo producido está dado por la **ecuación III.4**.

$$\sigma = \sigma_0 \text{ sen } (\omega t - \delta) \quad \text{ec. III.4}$$

donde:  $\sigma_0$  (Pa) es la amplitud del esfuerzo y  $\delta$  es el ángulo de desfase, que separa al esfuerzo realizado de la deformación. En los objetos sólidos ideales, que presentan un comportamiento elástico, el esfuerzo y la deformación se encuentran en fase ( $\delta = 0$ ). Mientras que en un líquido viscoso ideal se presenta una diferencia de fase de  $90^\circ$  entre el esfuerzo y la deformación. Aquellos elementos que presentan ángulos de desfase entre  $0^\circ$  y  $90^\circ$  se denominan viscoelásticos y presentan un comportamiento intermedio entre el sólido ideal y el líquido viscoso ideal.

La **ecuación III.4** también puede escribirse como:

$$\sigma = G' \gamma + (G''/\omega)\dot{\gamma} \quad \text{ec.III.5}$$

donde:  $G'$  (Pa) es el módulo de almacenamiento o módulo elástico (**ec. III.6**) y  $G''$  (Pa) es el módulo de pérdida o viscoso (**ec. III.7**). El módulo elástico se encuentra relacionado con la respuesta del material como un sólido mientras que el módulo viscoso se relaciona con la respuesta del material como un fluido. Ambos módulos son

función de la frecuencia y se pueden expresar en función de la amplitud y el ángulo de desfasaje:

$$G' = (\sigma_0 / \gamma_0) \cos(\delta) \quad \text{ec. III.6}$$

$$G'' = (\sigma_0 / \gamma_0) \sin(\delta) \quad \text{ec. III.7}$$

$G' \gamma_0$  puede interpretarse como la componente del esfuerzo que se encuentra en fase con la deformación y  $G'' \gamma_0$  puede interpretarse como la componente del esfuerzo que se encuentra desfasada en  $90^\circ$  de la deformación.

Otras funciones que describen el comportamiento viscoelástico de la muestra y su dependencia con la frecuencia son el módulo complejo (**ec. III.8**) y la tangente del ángulo de desfasaje (**ec. III.9**).

$$G^* = \sigma_0 / \gamma_0 \quad \text{ec. III.8}$$

$$\tan(\delta) = G'' / G' \quad \text{ec. III.9}$$

La  $\tan(\delta)$  se vincula con la relación entre la energía perdida por la muestra por ciclo respecto a la energía almacenada por ciclo (Steffe, 1996).

La masa se preparó como se describió en el ítem **III.2.1**. Para la realización de los ensayos se empleó un reómetro oscilatorio de esfuerzo controlado Haake RS 600 (Haake, Alemania). Las medidas se realizaron a  $25^\circ\text{C}$  utilizando como sensor un sistema plato – plato de superficie rugosa con una separación entre los mismos de 1,0 mm. Se cubrieron los bordes de las muestras con vaselina para evitar la pérdida de humedad durante el ensayo. Se realizaron barridos de esfuerzo entre 0,5 y 200 Pa a una frecuencia de 1 Hz para determinar el rango de viscoelasticidad lineal de las muestras. Se fijó un esfuerzo de 5 Pa, comprendido dentro del intervalo de viscoelasticidad lineal, para realizar los barridos de frecuencia, los cuales fueron realizados entre 0,005 y 100 Hz. En ambos ensayos las muestras se dejaron relajar durante 5 min, entre los platos, antes de comenzar la medida. Se determinaron el módulo elástico ( $G'$ ), el módulo viscoso ( $G''$ ), el módulo complejo, la tangente del ángulo de desfasaje ( $\tan(\delta)$ ). La medida se realizó por triplicado.

### III.2.5.2. Microscopia confocal de la masa

Para estudiar las características microestructurales de la masa se tomaron fotografías en un microscopio confocal utilizando el procedimiento descrito en el ítem **I.2.15** del capítulo 1. Para la tinción de las masas se utilizó la metodología descrita por Correa y col., (2014). Una pequeña porción de la masa fue distribuida sobre un portaobjetos de vidrio y luego teñida con una mezcla acuosa de rodamina B (0,001% p/v) e isotiocianato de fluoresceína (FITC) (0,01% p/v). Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm para el FITC y 568 nm para la rodamina B, la longitud de onda de emisión fue de 518 nm y 625 nm para FITC y rodamina B, respectivamente.

### III.2.6. Caracterización de las galletitas

#### III.2.6.1. Factor Galletita

El factor galletita es uno de los test predictivos que se utilizan para evaluar las características de calidad de las galletitas y establecer una correlación con otros ensayos de evaluación fisicoquímica como por ejemplo el CRS o capacidad de retención de solventes (Colombo y col., 2008).

Luego de la cocción, 10 galletitas fueron tomadas al azar y se determinó el diámetro y espesor con un calibre PRO-MAX NSK (Electronical Digital Caliber, Japón) como el que se observa en la **Figura III.4**. El factor galletita comúnmente denominado “Cookie Factor” y abreviado como CF, se calculó como el cociente entre el diámetro y el espesor de las galletitas (Barrera y col., 2007).



**Figura III.4.** Determinación del diámetro de las galletitas con un calibre digital.

#### III.2.6.2. Actividad acuosa

Se define como actividad acuosa al cociente entre la presión parcial de vapor de agua en equilibrio con el alimento y la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. La actividad acuosa se relaciona con la disponibilidad del agua; cuanto

mayor sea la interacción del agua con los constituyentes del alimento, más ligada se encontrará y menor será el valor de la actividad acuosa.

Se determinó la actividad acuosa de las galletitas a 25°C por el método higrométrico de la AOAC 978.18 (AOAC, 1990). Se utilizó un equipo AQUALAB (Decagon Devices, Inc, Pullman, USA) que utiliza la técnica del punto de rocío. La muestra se colocó en una cámara sellada que contiene un espejo y se esperó a que se equilibre y condense el vapor de agua sobre el mismo. La temperatura del espejo se controló mediante un circuito Peltier y una célula fotoeléctrica detectó la condensación sobre el espejo. Cuando esto ocurre la condensación de la humedad en el espejo, se detecta un cambio en la reflectancia mediante un haz de luz. En el equilibrio, la humedad relativa del aire en la cámara es igual a la actividad de agua de la muestra.

Se utilizó como patrón para calibrar el equipo una solución saturada de  $K_2SO_4$ . El ensayo se realizó por triplicado.

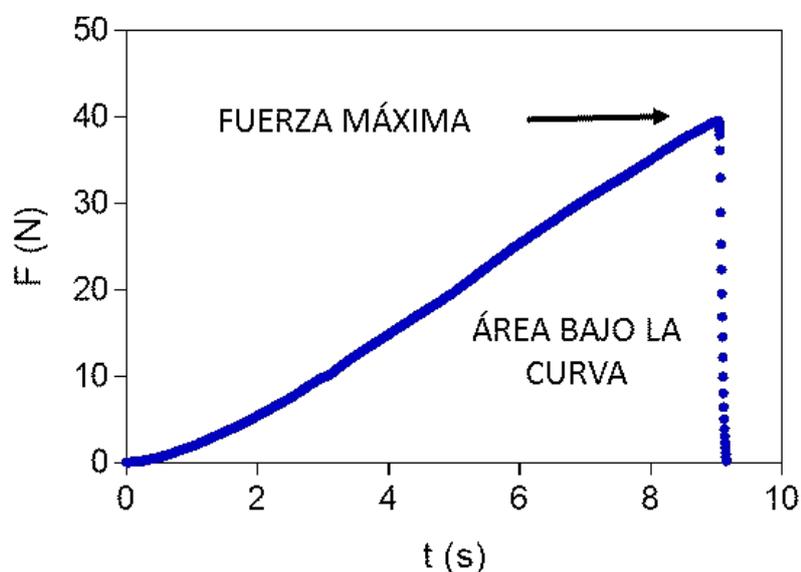
### III.2.6.3. Ensayos de textura

Se analizó la textura de las galletitas en un texturómetro TA Xt2i, (Stable microsystem, Reino Unido). Se utilizó la sonda Volodkevich Bite Jaws como la que se muestra en la **Figura III.5** que simula el ejercicio de morder y cortar la muestra (galletita) con los dientes incisivos.



**Figura III.5.** Sonda Volodkevich Bite Jaws utilizada en el ensayo de textura de compresión de las galletitas.

Los parámetros registrados fueron el valor de la fuerza máxima de compresión y el área bajo la curva (**Fig. III.6**). La fuerza máxima hace referencia a la firmeza del producto y el área bajo la curva formada durante el ensayo al trabajo necesario para cortar la muestra (Szczesniak, 1987).



**Figura III.6.** Parámetros registrados durante los ensayos de textura.

Parámetros del ensayo:

- Velocidad pre-ensayo: 5 mm/s
- Velocidad post-ensayo: 5 mm/s
- Velocidad de ensayo: 0,5 mm/s
- Compresión del 20%

Las medidas se realizaron en frío el día de la cocción de las galletitas. Se tomaron muestras en diferentes tiempos de almacenamiento desde el día 1 (día de elaboración) hasta el día 19, en 9 días diferentes, para analizar los cambios de textura que experimentan las galletitas. El almacenamiento se hizo en bolsas plásticas de polietileno (Cryovac BB2800, Buenos Aires, Argentina) selladas al vacío como las que se muestran en la **Figura III.7**. Para obtener los parámetros correspondientes a cada día se ensayaron entre 10 y 15 galletitas, realizando el test en la cara superior, tomando bordes y centro, y promediando los valores obtenidos.



**Figura III.7.** Galletitas almacenadas en bolsas plásticas de polietileno para realizar el ensayo de estabilidad en el tiempo utilizando un texturómetro.

#### III.2.6.4. Medición del color de las galletitas

El color es una característica de calidad de gran importancia, dado que es el primer aspecto que perciben los consumidores o usuarios, y puede determinar la aceptación o rechazo de un producto y su valor (León y col., 2006; Wu y Sun, 2013). El color se representa tradicionalmente usando el espacio de color CIELAB (o CIE 1976  $L^*a^*b^*$ ). En esta representación de color,  $L^*$  representa la luminosidad de una muestra,  $a^*$  la variación de verde a rojo, y  $b^*$  la variación de azul a amarillo.

Se utilizó la metodología desarrollada por Goñi y Salvadori (2017) en donde se utiliza un sistema de visión computacional (SVC), compuesto por un ambiente de iluminación controlada, una cámara digital y un programa para procesar la información obtenida.

Se utilizó una cámara NIKON D3100 en modo manual y para procesar las imágenes se empleó el programa MATLAB (The Mathworks Inc., Natick, Massachusetts, USA) utilizando interfaces gráficas. Para calibrar o probar el sistema se utilizó el objetivo clásico de una carta de colores ColorChecker Passport (X-Rite Inc., Grand Rapids, Michigan, USA), formada por 24 parches de diferentes colores (**Figura III.8**). Luego de tomadas las imágenes se ingresaron y procesaron en el MATLAB y se realizó la transformación entre los espacios de color, es decir, del espacio RGB (fotos digitales) al espacio CIELAB. Como resultado se obtienen los valores promedios, desviaciones estándares, mínimos y máximos de los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en la región de interés.



**Figura III.8.** Carta de colores ColorChecker Passport.

### **III.2.7. Bioactividad de la harina y galletitas**

#### **III.2.7.1. Digestión gastrointestinal simulada**

La harina y las galletitas de amaranto se sometieron a una digestión gastrointestinal simulada utilizando la metodología descrita en el inciso **II.2.1** del capítulo 2 con una modificación al inicio de la digestión. Como la harina y las galletitas poseen un contenido de hidratos de carbono elevado, se incluyó al inicio del proceso simulado de digestión gastrointestinal el tratamiento con fluido símil saliva.

Las muestras conteniendo 200 mg de proteína se suspendieron e incubaron durante 5 min a 37°C con fluido símil saliva (2,38 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,19 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3 g/l NaCl, pH 6,8,  $\alpha$ -amilasa 60 mg 70 U/l, Sigma). Luego se adicionaron 12 ml de fluido símil jugo gástrico (termostatizado a 37°C), se ajustó el pH a 2 con HCl y se dejó en agitación durante 60 min a 37 °C. Finalmente se adicionaron 12 ml de fluido símil jugo duodenal, 6 ml de bilis y 875  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  5 mM, se ajustó el pH a 7 y se incubó durante 60 min a 37°C con una agitación de 100 rpm en un agitador orbital. La hidrólisis se detuvo por calentamiento de la mezcla de reacción a 85°C durante 10 min en baño de agua. Finalmente las suspensiones se liofilizaron y guardaron en heladera hasta el momento de su utilización.

Se determinó el contenido de proteína y el grado de hidrólisis de los digeridos utilizando las metodologías detalladas en los incisos **III.2.2.3** del presente capítulo y el **I.2.2** del capítulo 1, respectivamente.

### **III.2.7.2. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina**

Los ensayos de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina se realizaron sobre muestras de harina y galletitas sometidas a un proceso de digestión gastrointestinal simulado. El digerido obtenido se filtró en embudo con papel de filtro y el soluble se liofilizó y guardó en heladera hasta el momento de su utilización.

El ensayo de inhibición se realizó siguiendo la metodología descrita en el ítem **II.2.4**, utilizando la enzima convertidora de angiotensina comercial.

### **III.2.8. Análisis estadístico**

Para los ensayos estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Prism Inc., USA). Los datos experimentales se promediaron a partir de al menos dos ensayos independientes y los resultados se presentan como la media +/- la desviación estándar. Los análisis de varianza significativa de medias (ANAVA) se realizaron haciendo uso de la prueba de Tuckey con un  $\alpha = 0,05$  (95% de confianza).

### III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.3.1. Caracterización de la harina de amaranto

##### III.3.1.1. Composición centesimal

Los resultados obtenidos para la composición centesimal de la harina se muestran en la **tabla III.3**. La harina comercial utilizada en la elaboración de las galletitas no especificaba en su rótulo la especie de amaranto a partir de la cual fue elaborada. Para su comparación con otros trabajos de la literatura se tendrán en cuenta valores de diferentes especies. La harina de amaranto utilizada para la elaboración de las galletitas era integral.

**Tabla III.3.** Composición centesimal de la harina, masa y galletita. Los valores se encuentran expresados en g componente/100 g muestra en base seca.

Muestra	Humedad	Proteínas	Cenizas	Lípidos	HdC	Fibra
Harina	11,8 ± 0,3	17,8 ± 0,1	4,3 ± 0,02	7,1 ± 0,6	55,1 ± 2,4	15,7
Masa	33,4 ± 0,7	8,2 ± 0,3	2,2 ± 0,04	18,4 ± 0,2	63,8 ± 0,3	7,4
Galletita	14,0 ± 0,7	8,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	18,6 ± 0,3	60,7 ± 1,8	9,9

Paredes-López, (1994) ha informado la composición porcentual de diversas especies de amaranto *cruentus*, *caudatus*, *edulis*, *hybridus*, *retroflexus* y *mantegazzianus*. Los valores determinados en este trabajo para contenido de agua, proteína, cenizas y lípidos son similares a los informados por este autor, mientras que se encontraron diferencias para los valores de hidratos de carbono y fibra. El contenido de hidratos de carbono resultó menor en la harina empleada (55,1 % p/p) que en cualquiera de las siete variedades de semillas analizadas (58,6 – 71,7% p/p base seca) mientras la fibra, calculada por diferencia para la harina, (**Tabla III.3**), resultó mucho mayor que la fibra cruda informada por Paredes López, (1994) para las semillas (2,5 – 6,6% p/p base seca). Los valores de fibra cruda representan principalmente el contenido de lignina y la mayor parte de la celulosa presente en el amaranto (Pedersen y col., 1900). Sin embargo la fibra dietaria incluye lignina y celulosa así como hemicelulosas, sustancias pécticas, gomas y otros carbohidratos.

Otros autores han reportado valores de fibra dietaria similares a los encontrados en este trabajo. Aguilar y col., (2013) determinaron el contenido proteico, de lípidos y de fibra total de dos nuevas variedades de amaranto (*Amaranthus cruentus* var. Candil (CC), *Amaranthus hypochondriacus* var. Dorado (HD)) y de dos líneas avanzadas

(*Amaranthus hypochondriacus* x *Amaranthus cruentus* H17a (H17) y *Amaranthus cruentus* G6/17a (G6)). Los valores de proteína variaron para las diferentes muestras de 12,26 % a 15,85 %, los valores de lípidos totales de 7,19 % a 9,29 % y los de fibra dietaria de 15,91% a 17,80 %, todos ellos expresados en % p/p base seca. Estos resultados están de acuerdo con los valores encontrados para la harina objeto de estudio, solo cabe resaltar el valor de proteína levemente superior a lo presentado por Aguilar y col., (2013). La diferencia encontrada podría atribuirse a que la variedad en estudio no coincide con las utilizadas en el trabajo de Aguilar y col., (2013), sumado a la variación debida al efecto de diferentes factores bióticos y abióticos.

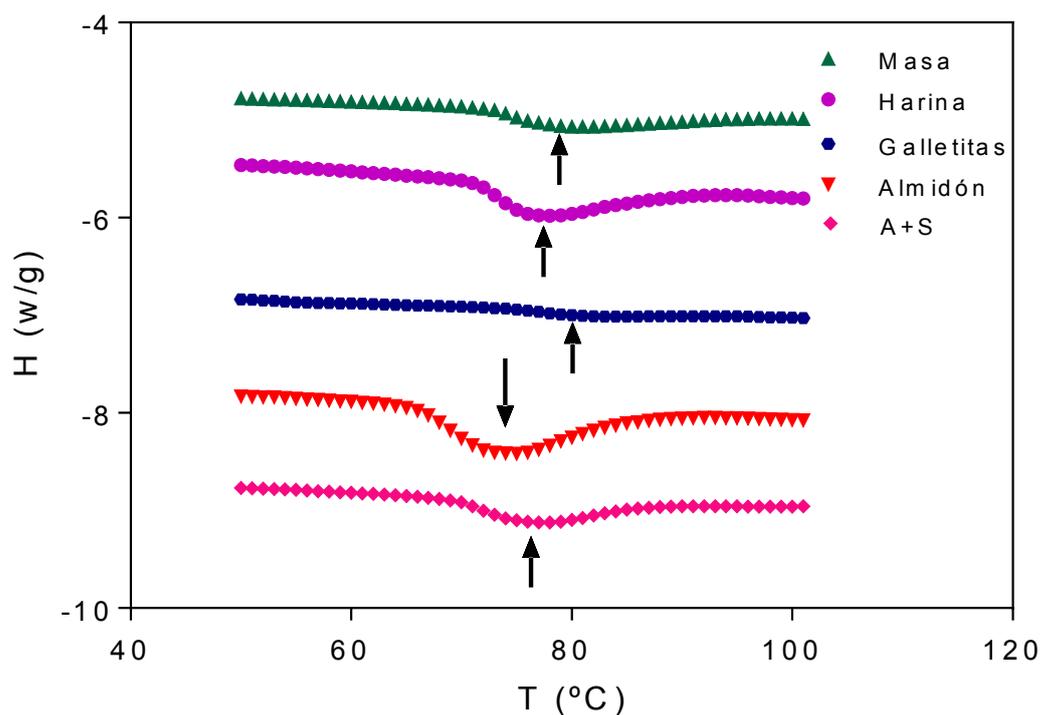
Tosi y col., (2001) determinaron el contenido de fibra soluble e insoluble por el método oficial de la AOAC encontrando valores entre el 9-16% p/p en base húmeda para la harina obtenida a partir del grano entero (*Amaranthus Cruentus*) y Menegassi y col., (2011) hallaron un valor de fibra total (soluble + insoluble) determinada por el método enzimático-gravimétrico de 13% p/p en base seca para la harina sin desgrasar y de 13,8% p/p base seca para harina desgrasada.

En el trabajo de Menegassi y col., (2011) así como en este trabajo la determinación de hidratos de carbono se realizó hidrolizándolos con una solución de HCl, calentando a reflujo durante 2 h y determinando azúcares reductores en la solución neutralizada y filtrada. Consideramos que los métodos empleados inciden en los valores informados para estos dos componentes, y que algunas especies que integran la fibra podrían ser determinadas como hidratos de carbono totales o viceversa modificando las condiciones de ensayo.

### III.3.1.2. Parámetros térmicos

En la **Figura III.9** se presentan los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido para las diferentes muestras: harina, masa, galletita, almidón y la mezcla almidón/sacarosa (A+S).

Se analizaron dispersiones de harina en agua al 20% p/p. Los termogramas obtenidos muestran un pico principal a  $77,7 \pm 0,5$  °C, y uno más pequeño, a mayor temperatura,  $99,7 \pm 0,8$  °C (**Tabla III.4**). El pico con menor temperatura de máxima deflexión correspondería, en principio, a la gelatinización del almidón de amaranto, mientras que el de mayor estabilidad térmica a la desnaturalización de proteínas, coincidiendo con los resultados mostrados por Menegassi y col., (2011).



**Figura III.9.** Termogramas de las diferentes muestras en estudio.

**Tabla III.4.** Parámetros térmicos obtenidos de los termogramas para cada una de las muestras ensayadas: Temperatura de inicio de la gelatinización  $T_i$  (°C), Temperatura de gelatinización  $T_g$  (°C), entalpía de gelatinización  $\Delta H_g$  (J/g de muestra en base seca) y la temperatura de desnaturalización  $T_d$  (°C).

MUESTRA	$T_g$ (°C)	$T_i$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_d$ (°C)
Harina	$77,7 \pm 0,5^{a,b}$	$71,2 \pm 0,5^b$	$7,8 \pm 1,1^b$	$99,7 \pm 0,8$
Masa	$75 \pm 5^b$	$70,6 \pm 2,0^b$	$5,9 \pm 1^b$	-
Galletitas	$81,6 \pm 2,2^a$	$74,8 \pm 0,7^a$	$2,2 \pm 0,8^c$	-
Almidón de amaranto	$74,2 \pm 0,3^{a,b}$	$66,3 \pm 0,0^c$	$15,4 \pm 1,7^a$	-
Almidón/sacarosa	$77,3 \pm 0,2^{a,b}$	$70,1 \pm 0,7^b$	$6 \pm 2^b$	-

Martínez y Añón, (1996) y Sabbione y col., (2015) informaron temperaturas de desnaturalización para aislado de amaranto y sus fracciones proteicas. Algunas de ellas, albúminas y globulinas 7S ( $T_d = 70-75$  °C), podrían contribuir levemente al primer pico, mientras que la globulina 11S y la globulina P, se desnaturalizan a temperaturas cercanas a los 100 °C.

La entalpía que se informa en la **Tabla III.4**,  $7,8 \pm 1,1$  J/g materia seca, se calculó considerando únicamente el área del primer pico, ya que el área del segundo pico fue muy pequeña.

Se utilizó almidón de amaranto obtenido en nuestro laboratorio por Condés (2012) para estudiarlo por calorimetría diferencial de barrido y se realizó una mezcla almidón/sacarosa en la misma proporción hallada en la galletita. Los resultados obtenidos en estos ensayos permiten confirmar y atribuir el pico principal de los termogramas de harina de amaranto a la gelatinización del almidón. La entalpía asociada a la gelatinización del almidón en la harina, ( $7,8 \pm 1,1$  J/g, **Tabla III.4**) representa aproximadamente la mitad de la hallada para el almidón puro ( $15,4 \pm 1,7$  J/g, **Tabla III.4**). Teniendo en cuenta que los valores de entalpía se expresaron en J/g de muestra en base seca y que la harina de amaranto contiene un contenido de carbohidratos, mayoritariamente almidón, de  $55,1 \pm 2,4$  % p/p, se puede aseverar que la entalpía calculada corresponde a la cantidad de almidón presente en la harina.

La proporción utilizada en la mezcla almidón/sacarosa fue de 44,6/55,4 respectivamente. No hubo diferencia en la temperatura de gelatinización del almidón en ausencia o presencia de sacarosa, pero si en la del inicio del pico de gelatinización. La entalpía calculada,  $6 \pm 2$  J/g, se corresponde con la proporción de almidón en la mezcla.

### III.3.1.3. Capacidad de retención de solventes

A fin de caracterizar el comportamiento funcional de la harina utilizada y teniendo presente que la hidratación previa de la misma resultó importante para la preparación de las galletitas (inciso **III.3.2.1**), se evaluó su capacidad de retención de solventes (CRS), en agua, y en soluciones de carbonato de sodio, ácido láctico y sacarosa. En la **Tabla III.5** se presentan los resultados obtenidos con la harina de amaranto y con harina de trigo refinada con fines comparativos.

**Tabla III.5.** Caracterización fisicoquímica de la harina. Capacidad de retención de solventes (%).

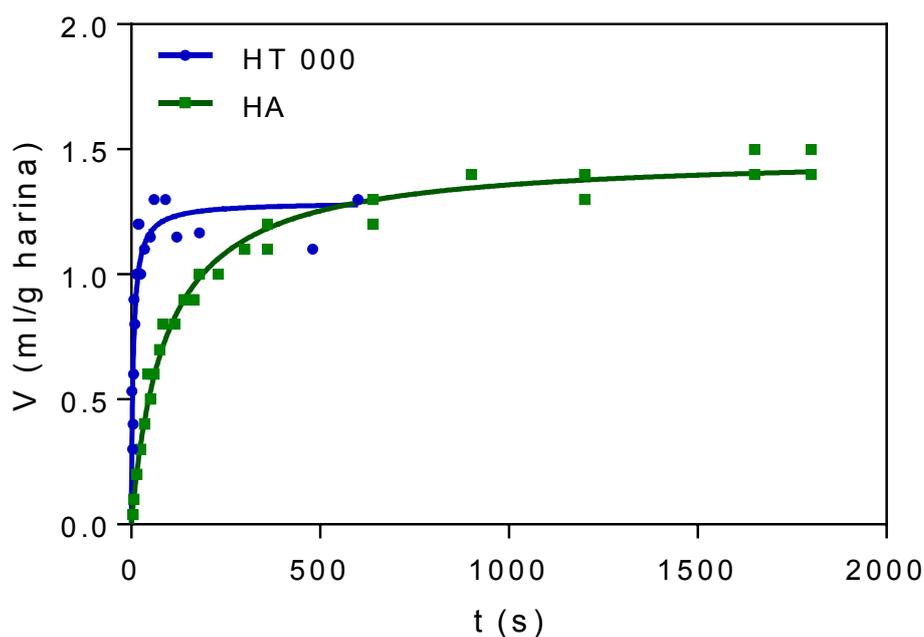
Muestra	Agua	Sacarosa	Carbonato de Sodio	Ácido láctico
Harina de Amaranto	$165,72 \pm 1,8^b$	$224,44 \pm 1,6^b$	$161,2 \pm 4,2^b$	$176,4 \pm 1,7^b$
Harina de Trigo 000	$73,1 \pm 8,3^a$	$99,1 \pm 0,3^a$	$84,6 \pm 0,6^a$	$109,9 \pm 1,6^a$

La capacidad de retención de solventes fue un método inicialmente propuesto para evaluar la calidad de trigos blandos (Gaines, 2000), y la hidratación en cada solvente orienta sobre la contribución funcional de los distintos componentes de las harinas. Mientras que la CRS en ácido láctico se vincula con las fracciones proteicas que integran el gluten en la harina de trigo, los otros tres solventes se relacionan o bien con la totalidad de los componentes hidratables, CRS en agua, o con las fracciones de hidrocoloides glucídicos, CRS en carbonato con el almidón dañado y CRS en sacarosa con los pentosanos. Barrera y col., (2007) informaron que las harinas de trigo con menor CRS en agua o CRS en carbonato permitieron obtener galletitas de mejor calidad y que estos parámetros fueron más altos en las harinas de trigo con alta proporción de almidón dañado, el cual es capaz de absorber más de tres veces la cantidad de agua que absorbería el mismo almidón sin dañar.

La CRS en agua y CRS en sacarosa fue 2,26 veces mayor para la harina de amaranto que para la harina de trigo, mientras que la CRS en carbonato fue 1,9 veces mayor (**Tabla III.5**). Mariotti y col., (2009) atribuyen a los polisacáridos no almidón presentes en el amaranto la gran capacidad de retención de agua. El amaranto posee una proporción interesante de polisacáridos no almidón, entre los cuáles se destacan los pentosanos (Burisová y col., 2001), lo que explicaría la gran retención de agua y la CRS en sacarosa que hemos determinado.

#### **III.3.1.4. Capacidad de imbibición de agua (WIC)**

La WIC puede definirse como la absorción espontánea de agua líquida. Es un índice importante para evaluar el comportamiento como ingrediente, en este caso la harina, en diversos productos alimenticios. Se ha demostrado que la WIC afecta no solo las condiciones de procesamiento, sino también la calidad del producto final (Jovanovich y col., 2003). A su vez, la velocidad de absorción de agua tiene importancia en la formulación de alimentos ya que, por ejemplo, podría influir en el orden de adición de los ingredientes secos a una mezcla y también podría usarse para definir, si es necesario, la rehidratación previa de un ingrediente seco antes de adicionarlo a la mezcla (Pilosof, 1985). En la **Figura III.10** se puede observar la variación del volumen de agua en función del tiempo, hasta que se obtiene un volumen constante, para la harina de amaranto y una harina de trigo refinada utilizada con fines comparativos.



**Figura III.10.** Variación del volumen de agua en función del tiempo. HT000 (harina de trigo refinada), HA (harina de amaranto).

La WIC de la harina de amaranto no mostró diferencias significativas con la correspondiente a la harina de trigo refinada (**Tabla III.6**,  $P < 0,05$ ). La velocidad inicial de absorción de agua ( $v_i$ , ml agua/g min) de la harina de trigo refinada fue 3,7 veces mayor que la de la harina de amaranto.

**Tabla III.6.** Capacidad de imbibición de agua para harina de amaranto y harina de trigo 000.

Muestra	$v_i$ (ml/g min)	WIC (ml/g)
Harina de Amaranto	$1,15 \pm 0,56^a$	$1,44 \pm 0,09^a$
Harina de Trigo 000	$4,29 \pm 0,40^b$	$1,18 \pm 0,06^a$

La falta de correlación entre los resultados de estas determinaciones y los presentados previamente de CRS, dos métodos que evalúan la hidratación de las harinas, podría explicarse teniendo en cuenta que, mientras que en la CRS el agua está en exceso frente a la muestra, en los ensayos de imbibición, el polvo se pone en contacto con una cantidad de agua limitada (superficie húmeda).

Los componentes hidratables no entran en juego de la misma forma confirmando la participación de la fracción de la fibra en la hidratación de las harinas en los ensayos con agua en exceso.

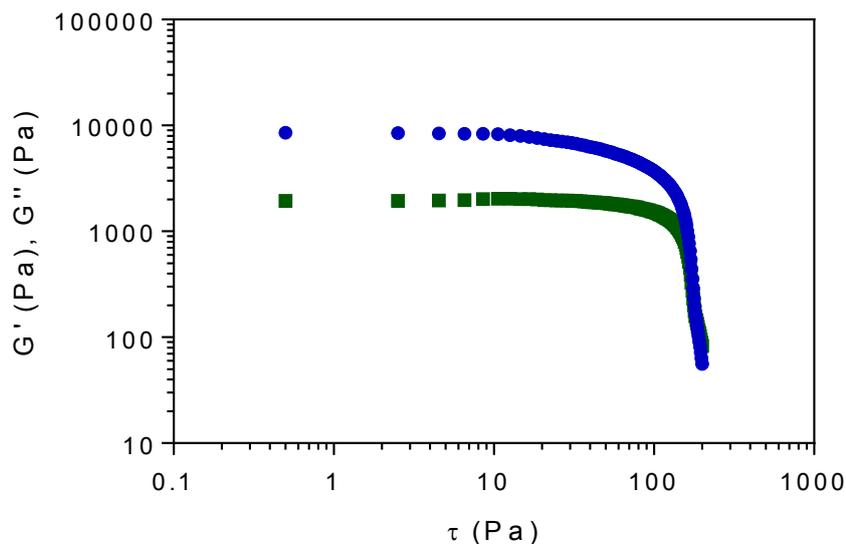
### **III.3.2. Caracterización de la masa**

#### **III.3.2.1. Características reológicas**

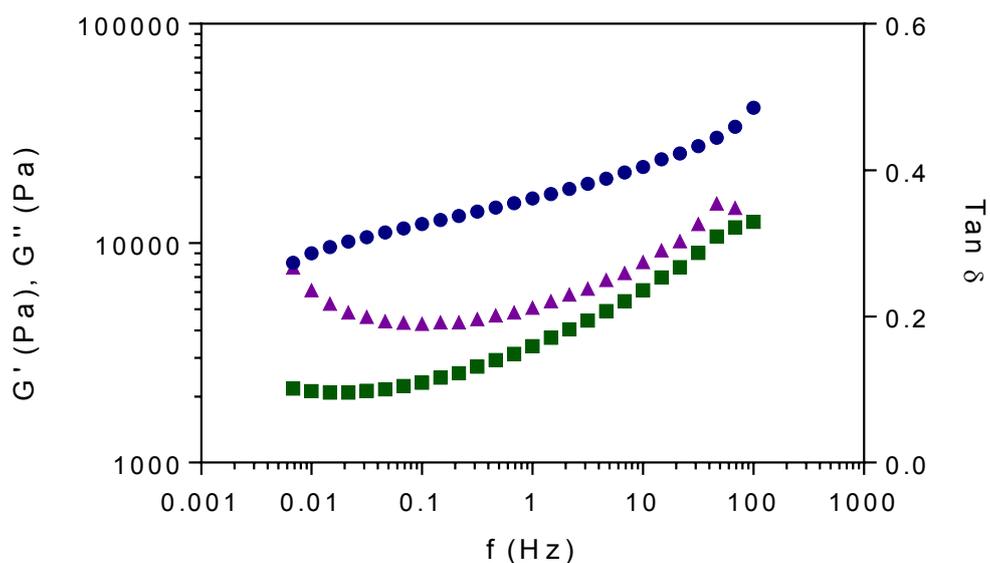
Para definir la formulación de las galletitas se probaron algunas variantes antes de seleccionar la receta que se presenta en este trabajo. Durante las pruebas se observó que la hidratación de la harina de amaranto es un punto crítico porque ejerce gran influencia en las características de textura del producto final. Por esa razón las galletitas se elaboraron con la harina comercial previamente hidratada, para lo cual se adicionó el agua a la harina de amaranto y se dejó reposar durante 10 min hasta alcanzar la apariencia de arena mojada. Luego se incorporaron los restantes ingredientes obteniéndose la masa. Ya que la hidratación de la harina resultó importante, y a fin de mantener las condiciones de preparación de las galletitas utilizando otras harinas comerciales o harina elaborada en el laboratorio, se analizó el comportamiento reológico de la masa con el propósito de encontrar datos experimentales objetivos que permitan mantener las características de la misma.

Como se comentó en materiales y métodos, para evaluar las características reológicas de las masas lo primero que se hizo fue obtener un barrido de esfuerzo para determinar el rango de viscoelasticidad lineal (**Fig. III.11**). El límite superior del rango de viscoelasticidad lineal para la masa fue de aproximadamente 10 Pa y de acuerdo a estos resultados se eligió una deformación de 5 Pa para la realización del barrido de frecuencias en los ensayos con las muestras.

El barrido de frecuencia muestra cómo el comportamiento viscoso y elástico del material cambia con la velocidad de aplicación de la deformación o el esfuerzo, mientras que la amplitud de la señal se mantiene constante (Steffe, 1996). En la **Figura III.12** puede observarse el espectro mecánico o barrido de frecuencias obtenido para la masa.



**Figura III.11.** Barrido de esfuerzo para la determinación del rango de viscoelasticidad lineal,  $G'$  (●),  $G''$  (■).



**Figura III.12.** Espectro mecánico de la masa.  $G'$  (●),  $G''$  (■),  $\tan \delta$  (▲).

Al realizar el barrido de frecuencias, la masa presentó un comportamiento de sólido viscoelástico, el módulo elástico fue superior al viscoso ( $G' > G''$ ) en todo el rango ensayado, con una dependencia de ambos módulos respecto a la frecuencia. A 1 Hz los valores de los módulos elástico  $G'$  y de pérdida  $G''$  fueron 15990 y 3389 Pa, respectivamente, mientras que la tangente del ángulo de desfasaje resultó igual a 0,21.

A muy baja frecuencia, la  $\tan(\delta)$  disminuye cuando la frecuencia aumenta (entre 0,01 y 0,05 Hz), luego permanece prácticamente constante (entre 0,05 y 0,2 Hz), y aumenta a mayores Hz con el aumento de la frecuencia. Pedersen y col., (2004) estudiando masas de galletitas encontraron un comportamiento similar al descripto, en donde, las diferencias en la  $\tan(\delta)$  implican que la masa actúa más como un sólido cuando se encuentra sometida a pequeños cambios en el esfuerzo, pero cuando los cambios son más drásticos la masa tiene un comportamiento similar a un líquido. A su vez, sugieren que el aumento de las características viscosas a altas frecuencias está determinado por la fase grasa en la masa.

Otros estudios publicados en la literatura describen un comportamiento similar de las masas en presencia de harina de amaranto. Mariotti y col., (2009) estudiaron las características reológicas de diferentes masas libres de gluten adicionadas con harina de amaranto, entre otros componentes, para incrementar la calidad nutricional de dichas masas. Para las formulaciones ensayadas en todo el rango de frecuencias,  $G'$  fue mayor que  $G''$  sugiriendo un comportamiento de sólido viscoelástico. En general la presencia de harina de amaranto en la formulación determinó altos valores de  $G'$  y  $G''$ . Si se comparan los valores hallados a 1Hz para las masas obtenidas en esta Tesis ( $G' = 15990$  Pa,  $G'' = 3389$  Pa), y aquellos informados por Mariotti y col., (2009) ( $G' = 20000$  Pa y  $G'' = 2000$  Pa) utilizando la siguiente formulación: almidón de maíz (59% p/p), harina de amaranto (40% p/p) y aislado de arveja (1% p/p), se puede ver que masa objeto de estudio en la presente Tesis resultó ser menos elástica.

Las tangentes del ángulo de desfase reflejaron estas diferencias, dado que Mariotti y col. (2009) obtuvieron valores que oscilaron entre 0,11 y 0,18, según la formulación utilizada, mientras que en nuestro caso la  $\tan(\delta)$  fue de 0,21, sugiriendo la formación de una masa más blanda y ligeramente menos elástica.

### III.3.2.2. Composición centesimal y parámetros térmicos

Además de la caracterización reológica que definió las características de la masa se determinó la composición centesimal de la masa elaborada según la formulación indicada en Materiales y métodos. Los resultados se presentan en la **Tabla III.7**, que a diferencia de la tabla presentada en el **inciso III.3.1.1**, donde también se puede muestra la composición centesimal, los valores están expresados en base húmeda.

**Tabla III.7.** Composición centesimal de la harina, masa y galletita. Los valores se encuentran expresados en g componente/100 g muestra en base húmeda.

Muestra	Humedad	Proteínas	Cenizas	Lípidos	HdC	Fibra
Harina	11,9 ± 0,2	15,7 ± 0,1	3,79 ± 0,02	6,3 ± 0,6	48,6 ± 2,4	13,7
Masa	34,2 ± 0,2	5,4 ± 0,3	1,46 ± 0,04	12,1 ± 0,2	42 ± 1	4,8
Galletita	14,3 ± 0,9	7,4 ± 0,1	1,91 ± 0,10	15,9 ± 0,3	52 ± 1	8,5

El análisis de los resultados muestra un aumento en el contenido de humedad y lípidos con respecto a la harina, debido a la adición de estos ingredientes en la formulación de la masa y una disminución del contenido de proteínas, cenizas, carbohidratos y fibra debido al mezclado de la harina con los demás componentes.

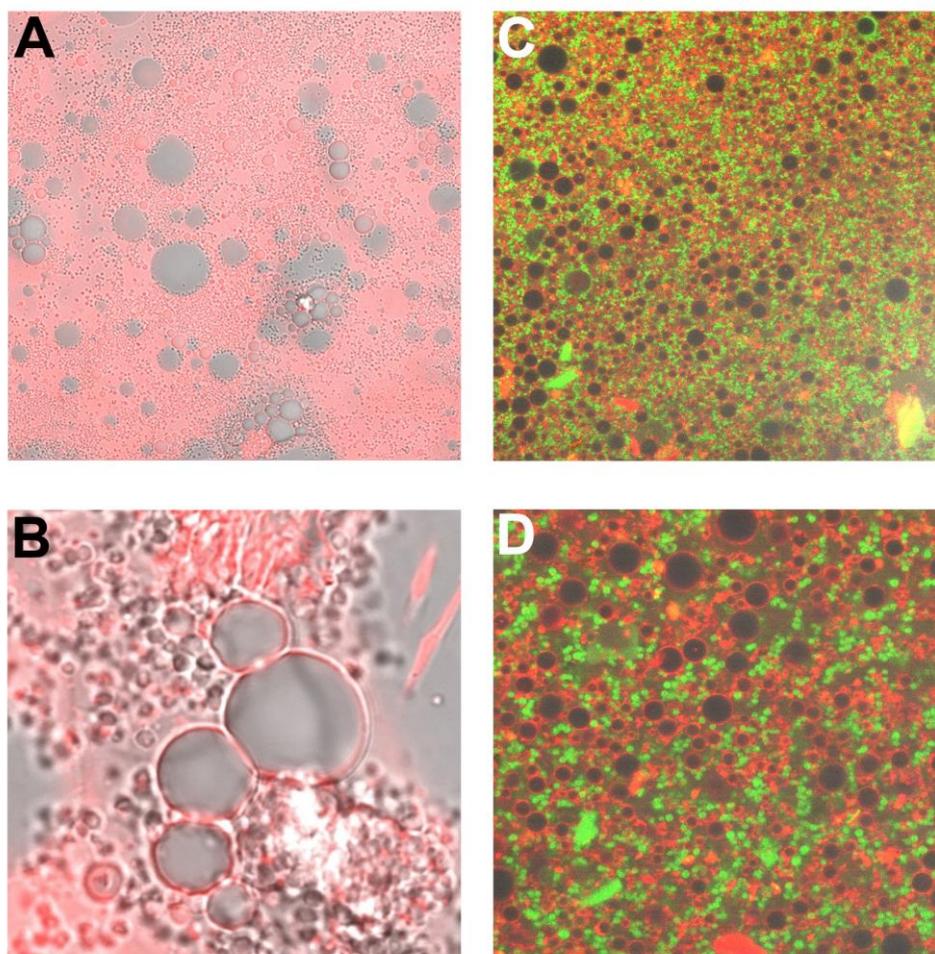
En la **Tabla III.4** (página 173) se muestran los parámetros térmicos determinados por DSC. Se observan las mismas temperaturas de inicio, de gelatinización del almidón y entalpía que las determinadas para la harina de amaranto. No hubo diferencias significativas en la entalpía asociada al proceso de gelatinización. La pequeña endoterma atribuida a la desnaturalización de proteínas no se detecta en los termogramas obtenidos para las masas. Cabe mencionar que la dispersión de la  $T_i$  y de la  $T_g$  de las masas fue muy superior a la hallada en los termogramas de las demás muestras, lo que puede reflejar diferencias en la homogeneidad de las mismas.

### III.3.2.3. Microscopía confocal

La microscopía confocal láser de barrido presenta como ventaja frente a otros tipos de microscopía que es una técnica no invasiva por lo que permite la visualización de la microestructura de la muestra con menores alteraciones. Se minimiza así el riesgo de observar artefactos debidos a modificaciones en la muestra durante su preparación ya que la misma no necesita ser fijada o deshidratada (Newberry y col., 2003). Por este motivo el uso de esta técnica se ha incrementado en los últimos años para el estudio de la microestructura de diferentes sistemas.

Dicha técnica se utilizó en la presente tesis con el objetivo de estudiar la microestructura de la masa y la distribución de las principales macromoléculas que la componen. En la **Figura III.13** se observan las fotos de las masas teñidas solo con Rodamina B (fotos A y B) y en las fotos C y D se muestran las masas teñidas con Rodamina B y FITC; el FITC tiene afinidad tanto por proteínas como por almidón y en las imágenes las proteínas se observan teñidas de color rojo-anaranjado mientras que los gránulos de almidón se visualizan en verde.

Las imágenes obtenidas con la menor magnificación (**Fig III.13, A y C**) permiten obtener una perspectiva de la masa, mientras que las mayores magnificaciones permiten una mejor caracterización de la estructura (**Fig. III.13, B y D**). En todas las fotos se puede apreciar cómo las proteínas además de ubicarse como relleno de la matriz, rodean las gotas de aceite, que se observan como círculos grises o negros, manteniendo al aceite emulsionado en la masa (Zhang y col., 2016). Los gránulos de almidón y las proteínas se encuentran mezclados formando parte de la matriz.



**Figura III.13.** Fotos de la masa teñida con Rodamina B (A y B) y utilizando Rodamina B+FITC (C y D). Todas las fotos se tomaron utilizando el objetivo HCX PL APO CS 63,0X con inmersión en aceite. Las fotos A y D se tomaron utilizando un zoom óptico de 2,5 y la foto B con un zoom óptico de 6,5.

### III.3.3. Caracterización de las galletitas

#### III.3.3.1. Composición centesimal y parámetros térmicos

Se determinó la composición centesimal de las galletitas de acuerdo a la metodología previamente descrita y los resultados se presentan en la **Tabla III.7** (página 178). Durante la cocción, la masa perdió aproximadamente el 58% del agua. Debido a esta pérdida de humedad, los demás componentes se concentraron siendo los carbohidratos los principales constituyentes de las galletitas ( $52 \pm 1\%$  p/p), seguidos por los lípidos ( $15,9 \pm 0,3\%$  p/p), fibra ( $8,5\%$  p/p), proteínas ( $7,4 \pm 0,1\%$  p/p) y los minerales ( $1,91 \pm 0,1\%$  p/p). Según la composición previamente descrita, una porción de 30 g, entre 5 y 6 galletitas aportará 113 Kcal.

Luego del estudio de la composición centesimal, las galletitas se analizaron por calorimetría diferencial de barrido para conocer el comportamiento térmico del almidón luego de la cocción de las mismas.

Las temperaturas determinadas en los termogramas son más altas que las respectivas de la masa, lo que se explica por el aumento de la concentración de los sólidos, principalmente de la sacarosa. Este efecto de la sacarosa es ampliamente conocido y se han propuesto varias explicaciones para este fenómeno, incluida la competencia entre el almidón y la sacarosa para el agua disponible, la inhibición de la sacarosa de la hidratación granular y las interacciones entre sacarosa y almidón (Lund y Lorenz, 1984).

El almidón gelatiniza parcialmente durante la cocción de la masa. Esto se evidencia por la reducción de la entalpía determinada para las galletitas en relación a la determinada para la masa, y por la existencia de una endoterma con una pequeña área, la cual se redujo casi al tercio de la correspondiente a la masa (5,9 contra 2,2 J/g, **Tabla III.4**, página 173).

#### III.3.3.2. Factor galletita

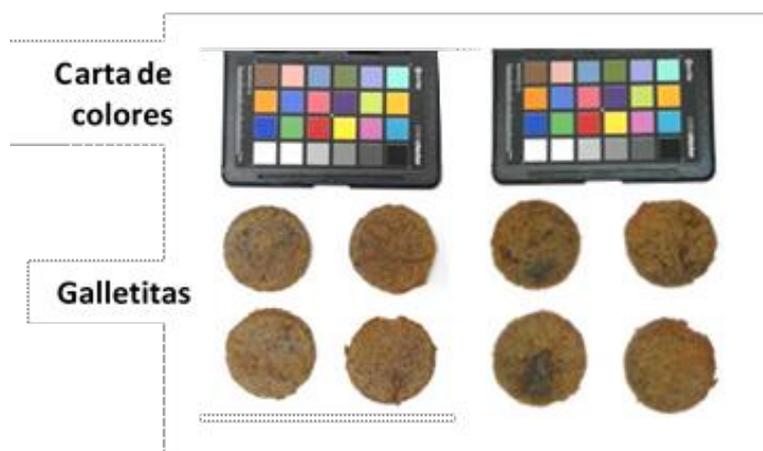
El factor galletita o “Cookie factor”, CF (Sindhuja y col., 2005; Barrera y col., 2007) es, como se indicó en Materiales y métodos, el cociente entre el diámetro y el espesor de las galletitas. Es utilizado para evaluar harinas destinadas a la elaboración de galletitas; la harina que permite mayor expansión y menor espesor será la mejor. En particular, para galletitas dulces se espera que cuando las harinas posean baja capacidad de retención de agua (CRS en agua) el azúcar se hidrate más fácilmente formando un jarabe, disminuyendo la viscosidad de la masa (Barrera y col., 2007). Esta característica producirá mayor expansión y menor tiempo de cocción. Se mencionó previamente que en la harina de amaranto, cuya CRS en agua es muy alta,

varios componentes contribuyen a la hidratación, entre ellos la fracción de fibra, el almidón y la proteína. En esta tesis, el CF determinado,  $4,5 \pm 0,6$ , resultó más bajo que los obtenidos en galletitas elaboradas con harinas de trigo adecuadas (5,9 a 6,4, Barrera y col., 2007) o con mezclas trigo-amaranto (7,8 a 6,5, Sindhuja y col., 2005), y similar al de los trigos considerados de mala calidad galletitera (4,1 a 5,1, Barrera y col., 2007). Calderón de la Barca y col., (2010) informaron el mismo CF que el determinado en este trabajo, para galletitas preparadas con harina de arroz y harina de amaranto previamente popeada. Sindhuja y col., (2005) determinaron el CF para galletitas preparadas con mezclas, en las cuales la harina de amaranto se colocó en cantidades crecientes, hasta reemplazar el 35% de la harina de trigo. En este estudio el CF disminuyó entre 14% y 17% con el agregado creciente de harina de amaranto entre 10 y 35% en la mezcla de harinas. Estos resultados indican que la presencia de harina de amaranto produce una disminución en el factor galletita.

### III.3.3.3. Medida del color

El color es una característica de calidad de gran importancia, dado que es el primer aspecto que perciben los consumidores y puede determinar la aceptación o rechazo de un producto (León y col., 2006; Wu y Sun, 2013). El color se representa tradicionalmente usando el espacio de color CIELAB; en esta representación de color, se determina:  $L^*$  (luminosidad, desde 0 a 100, oscuro a claro),  $a^*$  donde los valores negativos corresponden al color verde y los valores positivos al color rojo;  $b^*$ , donde los valores negativos corresponden al color azul y los valores positivos al color amarillo. Se determinó el color de las galletitas en las superficies superior e inferior utilizando un sistema de visión computacional (SVC), compuesto por un ambiente de iluminación controlada, una cámara digital y un programa para procesar la información obtenida (Goñi y Salvadori, 2017). En la **Figura III.14** se muestran algunas galletitas, el panel de comparación de color y los datos obtenidos.

Las galletitas presentaron zonas más claras y más oscuras, tanto en la cara superior como en la inferior. Si bien el color no fue uniforme, el método de medida permite calcular los parámetros del espacio CIELAB. El parámetro  $L$  es mayor en la superficie superior que en la inferior, es decir la base es algo más oscura ( $P < 0,05$ ), debido a la forma de cocción empleada. En ambas superficies las galletitas presentan  $a^*$  y  $b^*$  similares y positivos, sin diferencias significativas, configurando un color marrón rojizo.



CIELAB parámetro	Cara superior	Cara inferior
L*	36,9 ± 4,0 <sup>a</sup>	30,9 ± 3,7 <sup>b</sup>
a*	6,5 ± 2,3 <sup>a</sup>	7,8 ± 2,7 <sup>a</sup>
b*	16,0 ± 3,7 <sup>a</sup>	15,2 ± 4,6 <sup>a</sup>

**Figura III.14.** Parámetros L, a y b de la cara superior e inferior de las galletitas.

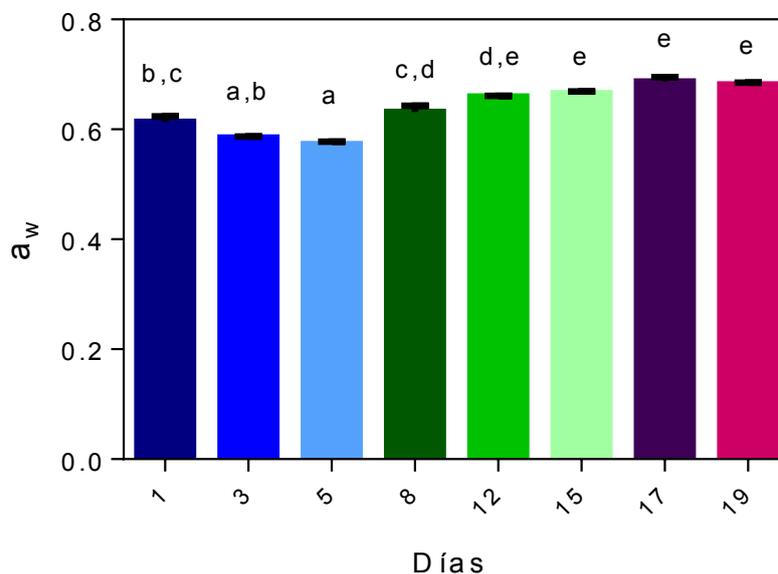
#### III.3.3.4. Actividad acuosa

La actividad del agua ( $a_w$ ) es un parámetro fundamental para la estabilidad de los alimentos. Este parámetro es útil para estimar la susceptibilidad de los alimentos a distintas reacciones y al crecimiento de microorganismos. Por ejemplo, valores menores a 0,7 facilitan, desde el punto de vista de estabilidad microbiana, una vida útil a largo plazo a temperatura ambiente. Por esta razón, el contenido de humedad expresado como  $a_w$  0,7 es generalmente denominado “contenido de humedad seguro” (Chirife y Buera, 1994).

Una vez elaboradas y frías, las galletitas fueron colocadas en bolsas de polietileno termoselladas a razón de 10 galletitas por bolsa. Las bolsas sirvieron para almacenarlas durante tres semanas a temperatura ambiente.

El día de la elaboración y durante el período mencionado se determinó la actividad acuosa ( $a_w$ ) y los parámetros de textura de las galletitas. En la **Figura III.15** se presentan los resultados obtenidos para  $a_w$ . Durante el periodo de almacenamiento todas las determinaciones de  $a_w$  se encontraron por debajo del valor de seguridad 0,7. Se observó una leve, progresiva y significativa disminución de la actividad acuosa hasta el quinto día de almacenamiento ( $p < 0,05$ ), a partir del cual la misma aumentó significativamente hasta el día 12 ( $p < 0,05$ ), manteniéndose constante hasta el final del almacenamiento (día 19). Teniendo en cuenta que la permeabilidad al agua de las

bolsas utilizadas es muy baja, el aumento de la  $a_w$  podría deberse, al menos parcialmente, a la liberación de agua que se produce al recristalizar la sacarosa y posiblemente a la retrogradación del almidón (Piga y col., 2005).



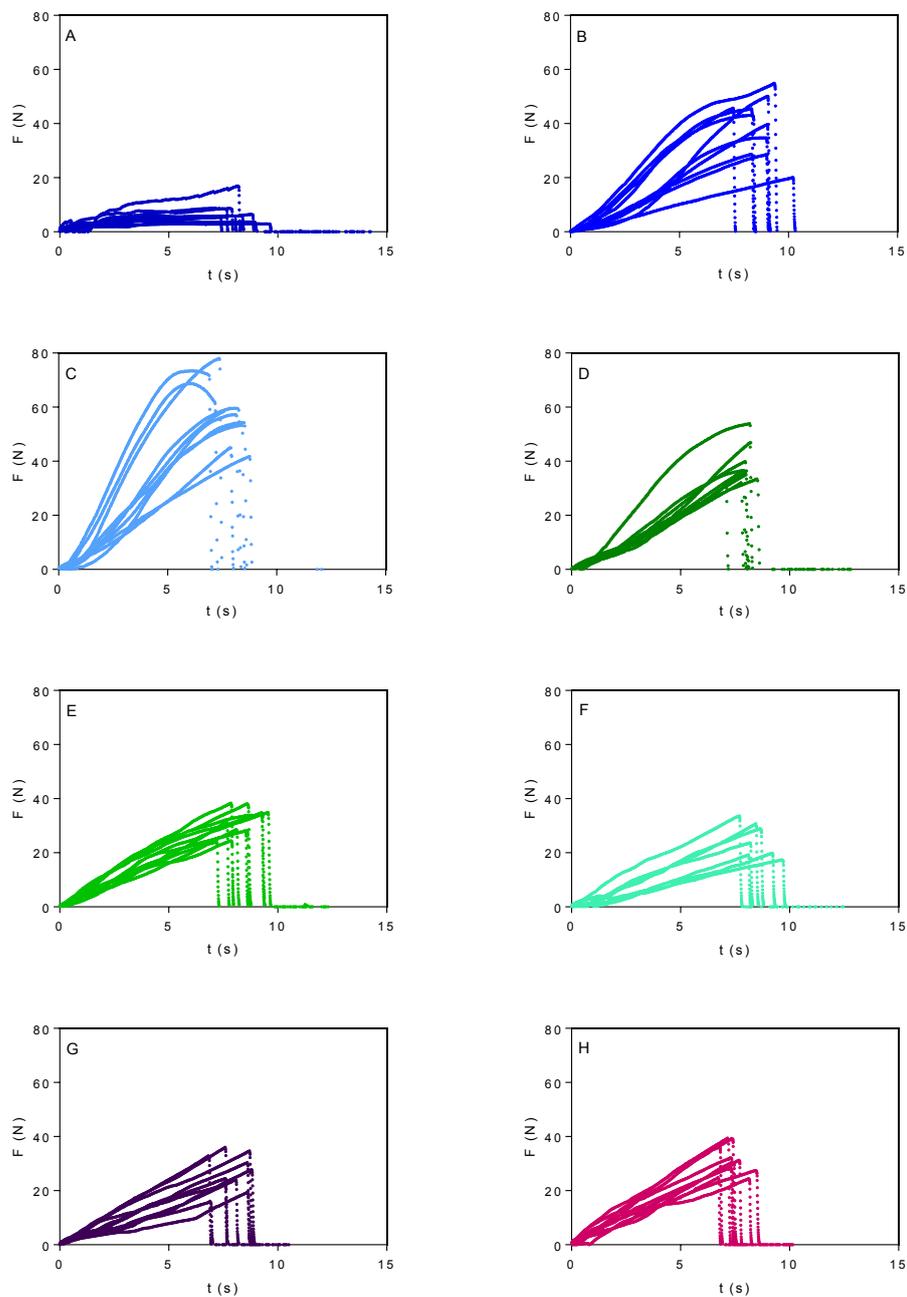
**Figura III.15.** Actividad acuosa de las galletitas a lo largo del periodo de almacenamiento en bolsas plásticas de polietileno.

### III.3.3.5. Textura de galletitas

#### III.3.3.5.1. Estabilidad en el tiempo de almacenamiento

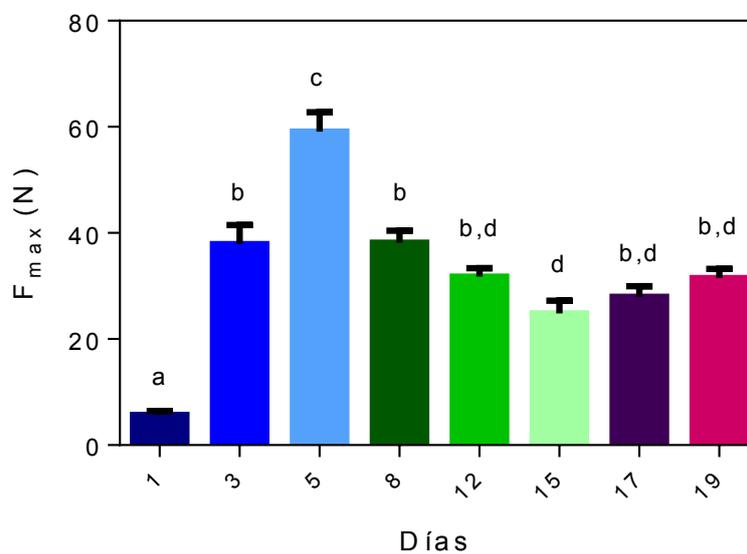
Se midió la textura de las galletitas (10 determinaciones/galletita) el día de su elaboración y después de 3 semanas de almacenamiento en bolsas plásticas multilaminadas. El parámetro elegido para evaluarlas fue la Firmeza o Dureza, que corresponde a la fuerza máxima alcanzada en los ensayos y el área bajo la curva formada durante el ensayo que se corresponde con el trabajo necesario para cortar la muestra. En la **Figura III.16** se visualizan los gráficos obtenidos correspondientes a los diferentes días de almacenamiento y a partir de los cuales se calculó la firmeza y el área bajo la curva. La fuerza máxima registrada (**Fig. III.17**) aumentó significativamente hasta el quinto día, en el que alcanza su máximo valor, 10 veces mayor que la observada el día de la elaboración. A partir de este momento la firmeza disminuye significativamente hasta el día 8, manteniéndose constante hasta el final del almacenamiento, con un leve descenso el día 15 ( $p < 0,05$ ). La energía requerida para el ensayo, asociada al área bajo las curvas obtenidas, varió con la misma tendencia que la firmeza, aunque los datos obtenidos presentaron mucha mayor dispersión (**Fig.**

**III.18).** Las galletitas almacenadas durante 5 días requirieron siete veces más energía para que la sonda penetre en ellas que las recién elaboradas.

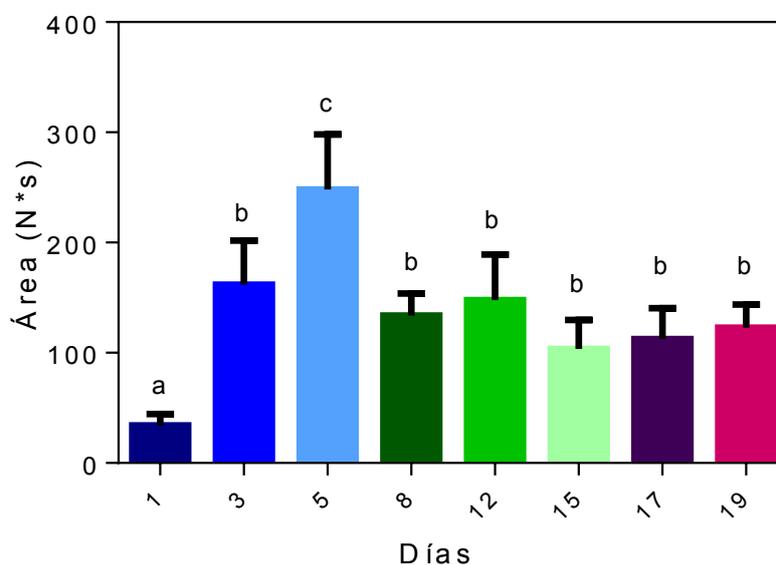


**Figura III.16.** Fuerza máxima de compresión en función del tiempo. De izquierda a derecha se muestran los gráficos obtenidos en función del tiempo de almacenamiento en bolsas plásticas. A= día 1, B= día 3, C= día 5, D= día 8, E= día 12, F= día 15, G= día 17, H= día 19.

Las variaciones de  $a_w$  y firmeza presentan cierta correlación. Piga y col. (2005) describieron cambios en la textura de amarettis, cambiando de textura blanda y húmeda en el interior a harinosa cuando se verificó un aumento de  $a_w$  durante el almacenamiento.



**Figura III.17.** Fuerza máxima registrada en función de los días de almacenamiento de las galletitas confinadas en bolsas de polietileno.



**Figura III.18.** Área bajo la curva registrada en función de los días de almacenamiento de las galletitas confinadas en bolsas de polietileno.

### III.3.4. Actividad antihipertensiva de la harina y galletitas

Luego de la caracterización fisicoquímica de la harina, la masa y las galletitas y estudiado el proceso de elaboración así como los atributos del producto final, nos propusimos investigar la presencia de péptidos bioactivos tanto en la harina como en las galletitas. Dichas muestras se sometieron a la acción secuencial de las enzimas presentes en el tracto digestivo; amilasa, pepsina, pancreatina y lipasa en presencia de un medio emulando las condiciones de pH y fuerza iónica. Los sucesivos pasos modificaron el producto de una forma similar a lo que ocurriría al ingerirlo. La liberación de los productos bioactivos, en este caso, los péptidos bioactivos, fueron estudiados mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina *in vitro*.

#### III.3.4.1. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina

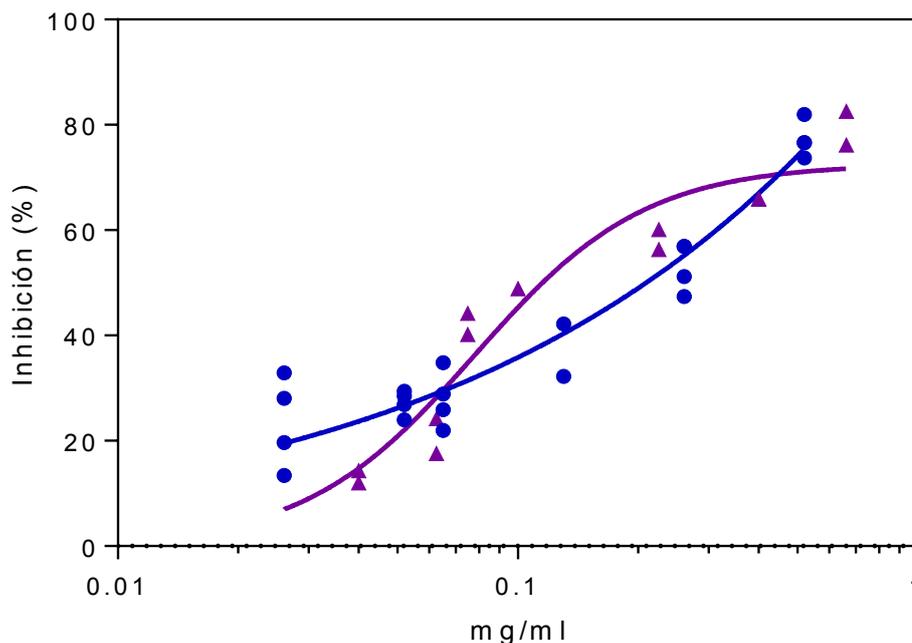
El contenido de proteína y el grado de hidrólisis de las muestras digeridas se muestran en la **Tabla III.8**. Ambas muestras resultaron hidrolizadas de manera extensiva; el grado de hidrólisis fue aproximadamente de 40%, superior al determinado sobre el aislado proteico de amaranto hidrolizado con alcalasa (20%) utilizado en el capítulo 2.

**Tabla III.8.** Contenido de proteína y grado de hidrólisis determinado sobre la harina y galletitas luego de la digestión gastrointestinal simulada (DGS).

Muestra	Proteína (% p/p)	GH (%)
Harina DGS	13,1 ± 0,1	38,2 ± 0,8
Galletitas DGS	7,1 ± 0,1	41,0 ± 2,0

Las muestras de harina y galletitas digeridas fueron utilizadas para detectar la presencia de péptidos bioactivos con capacidad de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina *in vitro*. Los ensayos se realizaron utilizando la enzima comercial. Ambas muestras presentaron un comportamiento dosis-respuesta frente a la concentración de proteínas (**Fig. III.19**). Las curvas de inhibición obtenidas demuestran que durante la digestión gastrointestinal simulada se liberaron péptidos bioactivos con capacidad de inhibir a ECA, alcanzando para las dos muestras valores cercanos al 80% de inhibición enzimática.

La curva de inhibición de la harina se ajustó a un comportamiento del tipo alostérico sigmoideal a partir del cual se determinó la concentración proteica necesaria para generar una inhibición del 50% sobre la ECA. La harina digerida presentó un  $EC_{50}$  0,08 ± 0,01 mg/ml.



**Figura III.19.** Inhibición de la ECA en función de la concentración proteica para la harina (-▲-) y galletitas digeridas (-●-).

La curva de inhibición de las galletitas presentó un comportamiento exponencial con un  $EC_{50} = 0,23 \pm 0,03$  mg/ml. Según estos resultados, se necesitará aproximadamente el doble de concentración proteica en las galletitas digeridas para generar una inhibición similar a la de la harina digerida. Si bien las muestras presentaron un grado de hidrólisis semejante, evidentemente las proteasas tuvieron acceso, según las características de cada muestra, a diferentes sitios de corte, generando probablemente diferentes composición de péptidos inhibidores. Que se hayan generado péptidos inhibidores en las dos muestras digeridas, pero presentando variabilidad en la composición, se refleja en la diferente forma de las curvas obtenidas, en donde la inhibición en función de la concentración proteica se expresó de manera diferente.

Teniendo en cuenta los resultados de inhibición *in vitro* de la enzima convertidora de angiotensina presentados en el capítulo 2, si se compara el valor del  $EC_{50}$  de la harina digerida ( $EC_{50} 0,08 \pm 0,01$  mg/ml) con el  $EC_{50}$  obtenido utilizando hidrolizado de alcalasa como inhibidor ( $EC_{50} 0,14 \pm 0,02$  mg/ml, **Tabla II.2**), se observa que son significativamente iguales. Durante la digestión gastrointestinal simulada de la harina se generaron péptidos inhibidores de ECA que son iguales de efectivos que los generados durante el proceso de hidrólisis con alcalasa. Es importante acotar, que los grados de hidrólisis fueron significativamente diferentes: 20% y 40% para el

hidrolizado obtenido con alcalasa y el digerido de la harina respectivamente. Las galletitas como se indicó previamente presentaron un  $EC_{50}$   $0,23 \pm 0,03$  mg/ml, superior al valor obtenido para el hidrolizado de alcalasa.

Según los resultados del ensayo *in vivo* presentados en el capítulo 2, las animales alimentados con las diferentes muestras de amaranto en una proporción de 1,875 g proteína/kg de rata lograron reducir la presión sanguínea en ratas hipertensas de manera significativa, demostrando un efecto hipotensor a nivel fisiológico. Considerando que cada rata pesó en promedio aproximadamente 300 g y que la administración de la muestra se realizó en forma de suspensión utilizando 2 ml de agua, el valor de 1,875 g proteína/kg de rata podría expresarse en otras unidades de la siguiente manera: 280 mg de proteína/ml de suspensión administrada. Esta concentración de proteína fue la que en promedio se le administró a cada rata. Teniendo en cuenta este cálculo y considerando que la harina de amaranto y las galletitas contienen 15,7% p/p y 7,4% p/p de contenido proteico en su composición respectivamente, se necesitará en promedio 1,86 g de harina y 4 g de galletitas para, en principio, generar una disminución de la presión en ratas hipertensas similar a las muestra de amaranto estudiadas en el capítulo previo. El peso de las galletitas de amaranto fue en promedio 5 g, o sea que la administración de una cantidad menor a 1 galletita de amaranto pondría de manifiesto la actividad biológica en ratas hipertensas, en la medida que estas tuvieran la misma respuesta "*in vivo*" que el ensayo de digestión simulada "*in vitro*". Esto deberá, por supuesto, ser verificado experimentalmente suministrando a ratas hipertensas galletitas como alimento, complementando los requerimientos de los animales con una dieta base adecuada.

Hasta el momento hay dos trabajos publicados en la literatura en donde se evaluó además de las características nutricionales, la actividad biológica sobre un producto terminado para el consumo con harina de amaranto en su composición. Antoniewska y col., (2018) elaboraron muffins utilizando mezclas de trigo sarraceno/amaranto (TS/A) en reemplazo parcial de la harina de trigo y evaluaron la actividad antioxidante *in vitro* del producto final. Según sus resultados, la incorporación de la mezcla trigo sarraceno/amaranto influyó de manera positiva en las propiedades nutricionales de los muffins al aumentar sustancialmente los ácidos grasos insaturados y el contenido de fibra. En cuanto a su capacidad antioxidante, la mezcla TS/A, mejoró su potencial antioxidante, inhibiendo eficazmente la descomposición de hidroperóxidos, evitando así la generación de productos de oxidación de lípidos secundarios tóxicos.

Chauhan y col., (2015) formularon galletitas libre de gluten a base de harina de amaranto. Para la elaboración de las galletitas utilizaron harina de amaranto integral y la misma harina germinada. Evaluaron la actividad antioxidante de dichas galletitas

utilizando el método del DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Pudieron detectar en las dos formulaciones un aumento de la capacidad antioxidante *in vitro* luego de la cocción de las galletitas y atribuyeron este aumento a la formación de pigmentos de color oscuro (color marrón) durante el proceso de cocción debido a la reacción de Maillard. Las galletitas elaboradas con la harina de amaranto germinada presentaron la mayor capacidad antioxidante. Estos autores concluyeron que las galletitas elaboradas con la harina germinada podrían ser una alternativa efectiva para individuos que padecen la enfermedad celíaca y para las personas conscientes de la salud dado el mayor valor nutricional y funcional del alimento obtenido.

Fritz y col., (2011) y Tovar-Pérez y col., (2009) han mostrado que las proteínas de amaranto intactas no son bioactivas o son menos bioactivas en términos de inhibición de la ECA. El hecho que la digestión gastrointestinal simulada produzca la liberación de péptidos bioactivos a partir de harina o de las galletitas elaboradas con amaranto es un resultado interesante, ya que al ingerir este producto, el propio organismo sería el encargado de convertir las proteínas en una fuente de péptidos bioactivos. Por otro lado como el proceso genera dichos péptidos, claramente estos resisten la digestión sin degradarse, lo cual es necesario para que puedan intervenir como ingredientes bioactivos en un alimento (Picariello y col., 2010).

La presencia de péptidos bioactivos luego de la digestión de la harina y las galletitas abre un campo de oportunidades para poder estudiar la potencial acción de estos péptidos en ensayos *in vivo* y de esa manera corroborar un posible efecto hipotensor en un producto terminado elaborado a partir de la harina de amaranto.

### III.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

En base a los resultados discutidos previamente se concluye lo siguiente:

- Fue posible formular y caracterizar galletitas a base de harina de amaranto como fuente única de proteínas e hidratos de carbono resultando de interés dicha formulación para grupos dietarios especiales como pueden ser las personas celíacas y veganas. La utilización para el consumo masivo también podría ser una vía de comercialización debido al rico aporte en proteínas y aminoácidos esenciales de este producto.
- La harina de amaranto presentó propiedades funcionales de hidratación, determinadas por WIC y SRS que la diferenciaron, en cuanto a su utilización para la elaboración de galletitas, de la harina de trigo refinada.
- El ensayo de almacenamiento en bolsas plásticas multilaminadas mostró que la firmeza de las galletitas aumentó hasta el día 5 y luego se mantuvo constante hasta el día 8, a partir del cual comenzó a bajar. Este tipo de ensayos que realizan una evaluación objetiva sobre la muestra se deben complementar con la evaluación sensorial de las galletitas, en donde se pone en juego la subjetividad de los consumidores.
- Luego de la digestión gastrointestinal simulada de la harina y las galletitas fue posible detectar péptidos bioactivos con capacidad de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina *in vitro*. Los péptidos liberados a partir de la harina demostraron ser más efectivos que los producidos luego de la digestión gastrointestinal simulada de galletitas, presentando un  $EC_{50}$  menor.
- La presencia de péptidos bioactivos en las galletitas digeridas, fue la primera evidencia de la actividad antihipertensiva *in vitro* en un producto listo para el consumo.

### III.5. BIBLIOGRAFÍA

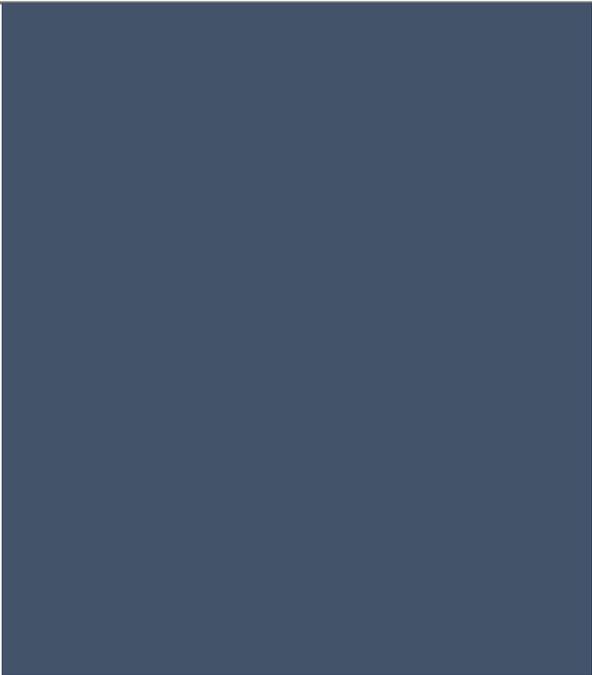
- Aguilar, E. G., Peiretti, E. G., Uñates, M. A., Marchevsky, E. J., Escudero, N. L., & Camiña, J. M. (2013). Amaranth seed varieties. A chemometric approach. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 7(4), 199–206.
- American Association of Cereal Chemistry. (2000). Approved methods of the AACC. St Paul Minnesota, USA.
- Antoniewska, A., Rutkowska, J., Pineda, M. M., & Adamska, A. (2018). Antioxidative, nutritional and sensory properties of muffins with buckwheat flakes and amaranth flour blend partially substituting for wheat flour. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 217–223.
- AOAC. (1990). Association of Official Analytical Chemists Inc. Official Methods of Analysis (15th edition). Washington DC: Williams, S.
- Barrera, G. N., Pérez, G. T., Ribotta, P. D., & León, A. E. (2007). Influence of damaged starch on cookie and bread-making quality. *European Food Research and Technology*, 225(1), 1–7.
- Berganza, B. E., Moran, A. W., Rodríguez M., G., Coto, N. M., Santamaría, M., & Bressani, R. (2003). Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58(3), 1–6.
- Bressani, R., & García-Vela, L. A. (1990). Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5), 1205–1209.
- Burisová, A., Tomášková, B., Sasinková, V., & Ebringerová, A. (2001). Isolation and characterization of the non-starch polysaccharides of amaranth seeds. *Chemical Papers*, 55(4), 254–260.
- Chauhan, A., Saxena, D. C., & Singh, S. (2015). Total dietary fibre and antioxidant activity of gluten free cookies made from raw and germinated amaranth (*Amaranthus* spp.) flour. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 939–945.
- Chirife, J., & Buera, M. P. (1994). Water activity, glass transition and microbial stability in concentrated/semimoist food systems. *Journal of Food Science*, 59(5), 921–927.

- Colombo, A., Pérez, G. T., Ribotta, P. D., & León, A. E. (2008). A comparative study of physicochemical tests for quality prediction of Argentine wheat flours used as corrector flours and for cookie production. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 775–780.
- Condés M. C. (2011). Películas compuestas y nanocompuestas, biodegradables y/o comestibles, en base a proteínas de amaranto y almidones de distinto origen botánico. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- Correa, M. J., Ferrer, E., Añón, M. C., & Ferrero, C. (2014). Interaction of modified celluloses and pectins with gluten proteins. *Food Hydrocolloids*, 35, 91–99.
- Calderon de la Barca, A. M., Rojas-Martínez, M. E., Islas-Rubio, A. R., & Cabrera-Chávez, F. (2010). Gluten-free breads and cookies of raw and popped amaranth flours with attractive technological and nutritional qualities. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 241–246
- Dodok, L., Modhir, A. A., Buchtová, V., Halásová, G., & Poláček, I. (1997). Importance and utilization of amaranth in food industry. Part 2. Composition of amino acids and fatty acids. *Food / Nahrung*, 41(2), 108–110.
- FAO. (2011). Food and nutrition paper. Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO expert consultation. Auckland.
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., & Añón, M. C. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry*, 126(3), 878–884.
- Gaines, C. S. (2000). Collaborative study of methods for solvent retention capacity profiles (AACC method 56-11). *Cereal Foods World*, 45, 303–306.
- Goñi, S. M., & Salvadori, V. O. (2017). Color measurement: comparison of colorimeter vs. computer vision system. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 538–547.
- Inglett, G. E., Chen, D., & Liu, S. X. (2015). Physical properties of gluten-free sugar cookies made from amaranth-oat composites. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 214–220.
- Jovanovich, G., Puppo, M. C., Giner, S. A., & Añón, M. C. (2003). Water uptake by dehydrated soy protein isolates: Comparison of equilibrium vapour sorption and water imbibing methods. *Journal of Food Engineering*, 56(4), 331–338.

- León, K., Mery, D., Pedreschi, F., & León, J. (2006). Color measurement in L\*a\*b\* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(10), 1084–1091.
- Lund, D., & Lorenz, K. J. (1984). Influence of time, temperature, moisture, ingredients, and processing conditions on starch gelatinization. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 20, 249–273.
- Mariotti, M., Lucisano, M., Ambrogina Pagani, M., & Ng, P. K. W. (2009). The role of corn starch, amaranth flour, pea isolate, and Psyllium flour on the rheological properties and the ultrastructure of gluten-free doughs. *Food Research International*, 42(8), 963–975.
- Martínez, E. N., & Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523–2530.
- Menegassi, B., Pilosof, A. M. R., & Arêas, J. A. G. (2011). Comparison of properties of native and extruded amaranth (*Amaranthus cruentus* L. - BRS Alegria) flour. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1915–1921.
- Moronta, J., Smaldini, P. L., Fossati, C. A., Añón, M. C., & Docena, G. H. (2016). The anti-inflammatory SSEDIKE peptide from Amaranth seeds modulates IgE-mediated food allergy. *Journal of Functional Foods*, 25, 579–587.
- Newberry, M. P., Simmons L. D., & Morgenstern M. P. (2003). Gluten rheology and functionality in the gluten proteins. In Royal Society of Chemistry (Ed.), *Confocal visualisation of MDD dough development* (pp. 263–266). Viterbo, Italia.
- Nkonge, C., & Ballance, G. M. (1982). A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-kjeldahl digests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(3), 416–420.
- Orsini Delgado, M. C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, 197, 1160–1167.
- Paredes-López, O. (1994). *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology*. New York: CRC Press.

- Pedersen, L., Kaack, K., Bergsøe, M. N., & Adler-Nissen, J. (2004). Rheological properties of biscuit dough from different cultivars, and relationship to baking characteristics. *Journal of Cereal Science*, 39(1), 37–46.
- Pedersen, B., Bach Knudsen, K. E. & Egmund B. O. (1900). The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*). Energy and fibre of raw and processed grain. *Plant Foods for Human Nutrition*, 40, 61–71.
- Picariello, G., Ferranti, P., Fierro, O., Mamone, G., Caira, S., Di Luccia, A., & Addeo, F. (2010). Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(3–4), 295–308.
- Piga, A., Catzeddu, P., Farris, S., Roggio, T., Sanguinetti, A., & Scano, E. (2005). Texture evolution of “amaretti” cookies during storage. *European Food Research and Technology*, 221(3–4), 387–391.
- Pilosof, A. M. R., Boquet, R., & Bartholomai, G. B. (1985). Kinetics of Water Uptake by Food Powders. *Journal of Food Science*, 50(1), 278–279.
- Quiroga, A. V., Aphalo, P., Nardo, A. E., & Añón, M. C. (2017). In vitro modulation of renin-angiotensin system enzymes by amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein-derived peptides: Alternative mechanisms different from ACE inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(34), 7415–7423.
- Sabbione, A. C., Ibañez, S. M., Martínez, E. N., Añón, M. C., & Scilingo, A. A. (2016a). Antithrombotic and antioxidant activity of amaranth hydrolysate obtained by activation of an endogenous protease. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(2), 174–182.
- Sabbione, A. C., Nardo, A. E., Añón, M. C., & Scilingo, A. (2016b). Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 20, 204–214.
- Sabbione, A. C., Scilingo, A., & Añón, M. C. (2015). Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 171–177.
- Sindhuja, A., Sudha, M. L., & Rahim, A. (2005). Effect of incorporation of amaranth flour on the quality of cookies. *European Food Research and Technology*, 221(5), 597–601.

- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering* (2da. Edición). East Lansing, Michigan: Freeman Press.
- Szczesniak, A. S. (1987). Correlating sensory with instrumental texture measurements—an overview of recent developments. *Journal of Texture Studies*, 18(1), 1–15.
- Tosi, E. A., Ré, E., Lucero, H., & Masciarelli, R. (2001). Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain by differential milling. *Food Chemistry*, 73(4), 441–443.
- Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A., & Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*, 116(2), 437–444.
- Venskutonis, P. R., & Kraujalis, P. (2013). Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: A review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(4), 381–412.
- Wu, D., & Sun, D. W. (2013). Colour measurements by computer vision for food quality control - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 29(1), 5–20.
- Zhang, N., Fu, Y., Chen, G., Liang, D., Abdunaibe, A., Li, H., & Hao, J. (2016). Highly concentrated oil-in-water (OW) emulsions stabilized by catanionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 495, 159–168.



# CONCLUSIONES GENERALES

---

En distintos estudios realizados en nuestro laboratorio se han caracterizado las propiedades funcionales y/o biológicas de las proteínas de almacenamiento del grano de amaranto y sus secuencias encriptadas (Ventureira y col., 2012a; Ventureira y col., 2012b; Quiroga y col., 2012; Bolontrade y col., 2013; Moronta y col., 2016; Orsini Delgado y col., 2016; Sabbione y col., 2016a; Sabbione y col., 2016b; Quiroga y col., 2017). Vistos estos resultados decidimos analizar la posible sinergia entre estas propiedades y su incidencia en la biodisponibilidad de compuestos bioactivos que formen parte de matrices alimentarias funcionales.

Inicialmente pensamos en el desarrollo de emulsiones aceite/agua preparadas a pH ácido y con alto contenido de proteínas provenientes de aislado (APA) y de hidrolizado proteico (HA) en iguales proporciones. En este sistema estamos haciendo uso de las propiedades formadoras y estabilizantes de emulsiones de las proteínas de APA y la presencia de péptidos bioactivos, en particular antihipertensivos, en HA, más allá de sus posibles propiedades tensioactivas. Consideramos que estos compuestos se encuentran presentes fundamentalmente en la fase continua de la emulsión y además pueden estar formando parte de la interface. Los resultados obtenidos mostraron claramente que es posible formar emulsiones estables, bajo las condiciones de ensayo, las cuales podrían ser vehículo de compuestos bioactivos. De hecho fue posible demostrar que los componentes presentes en la emulsiones fueron capaces de inhibir la enzima convertidora de angiotensina, ECA, en ensayos *in vitro* ( $EC_{50}$  de  $0,14 \pm 0,02$  mg/ml) y reducir la presión arterial sistólica de ratas hipertensas en 20 mm Hg.

Estas emulsiones también fueron sometidas a una digestión gastrointestinal simulada *in vitro* a efectos de contar con información más próxima de su posible desempeño en sistemas *in vivo*. Los resultados obtenidos indicaron que las emulsiones fueron susceptibles a fenómenos de agregación y coalescencia durante este proceso, consecuencia de la acción desestructurante de la interface de las sales biliares y de la acción proteolítica y lipolítica de pancreatina y lipasa ( $D_{4,3}$  emulsión original:  $1,22 \pm 0,01$   $\mu$ m y  $D_{4,3}$  emulsión digerida  $79,5 \pm 17,1$   $\mu$ m). Basados en los resultados obtenidos durante el proceso de digestión gastrointestinal simulado de emulsiones preparadas con APA podríamos además sugerir que las proteínas de amaranto son más resistentes a la digestión gástrica que a la duodenal.

Demostramos también que luego del proceso de digestión se mantenía la inhibición de ECA,  $EC_{50}$  de  $0,13 \pm 0,07$  mg/ml, hecho indicativo de una resistencia de los componentes bioactivos presentes en la emulsión al proceso digestivo y/o a la generación de nuevos péptidos antihipertensivos por acción de las enzimas digestivas.

Es de destacar que la ingestión de esta emulsión por ratas hipertensas provocó una disminución de la presión arterial de las mismas de 42 mm Hg, confirmando la estabilidad y biodisponibilidad de los péptidos durante la hidrólisis, su absorción a través de los enterocitos y su acción fisiológica a nivel plasmático y vascular. El efecto producido por la emulsión fue de similar magnitud al hallado en la administración de las drogas de utilización comercial, aliskireno y captopril, en el tratamiento de la hipertensión.

Estos resultados nos llevaron a pensar que, como se indicó previamente, las proteínas de amaranto nativas podrían generar durante el proceso de digestión simulado *in vitro* péptidos antihipertensivos, por dicha razón, desarrollamos una matriz alimentaria basada en harina de amaranto, producto con mayor accesibilidad y menor costo, que un aislado o hidrolizado proteico. El producto desarrollado fueron galletitas artesanales, producto de consumo masivo, costo relativamente bajo y larga vida útil. Tanto a partir de la harina como de las galletitas se generaron durante el ensayo de digestión gastrointestinal simulado *in vitro* péptidos capaces de inhibir en aproximadamente un 80% la actividad de ECA, siendo el valor promedio de inhibición,  $EC_{50}$ , de  $0,08 \pm 0,01$  mg/ml y  $0,23 \pm 0,03$  mg/ml para la harina y las galletitas, respectivamente. Muy probablemente debido a la diferencia en la complejidad y composición de las dos matrices ensayadas las proteasa digestivas tuvieron acceso a diferentes sitios de corte en las proteínas presentes, generando distintos productos de reacción en términos de cantidad y/o calidad.

Resta aún evaluar la calidad sensorial de las galletitas elaboradas y estudiar su capacidad hipotensora *in vivo* haciendo uso de un sistema modelo como el de ratas hipertensas o un ensayo en humanos.

Cabe destacar que los resultados obtenidos con las galletitas demuestran por primera vez la capacidad antihipertensiva *in vitro* de un producto basado en amaranto listo para el consumo. La bibliografía da cuenta de unos pocos estudios *in vivo* con alimentos funcionales, estudios que son la base indispensable para la realización de un alegato de salud.

Hemos comenzado recientemente el desarrollo de una matriz líquida emulsionada en base a proteínas de amaranto que esperamos se transforme en un futuro próximo en un nuevo alimento funcional, vista la importante reducción de la presión arterial de ratas hipertensas indicada anteriormente.

Los conocimientos generados en este trabajo de Tesis abren una perspectiva sumamente interesante para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales formulados con amaranto.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Bolontrade, A. J., Scilingo, A. A., & Añón, M. C. (2013). Amaranth proteins foaming properties: Adsorption kinetics and foam formation-Part 1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 319-327.
- Moronta, J., Smaldini, P. L., Fossati, C. A., Añón, M. C., & Docena, G. H. (2016). The anti-inflammatory SSEDIKE peptide from Amaranth seeds modulates IgE-mediated food allergy. *Journal of Functional Foods*, 25, 579–587.
- Orsini Delgado, M. C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, 197, 1160–1167.
- Quiroga, A. V., Aphalo, P., Nardo, A. E., & Añón, M. C. (2017). In vitro modulation of renin-angiotensin system enzymes by amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein-derived peptides: alternative mechanisms different from ACE inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(34), 7415–7423.
- Quiroga, A. V., Aphalo, P., Ventureira, J. L., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (2012). Physicochemical, functional and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) 7S globulin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(2), 397–403.
- Sabbione, A. C., Ibañez, S. M., Martínez, E. N., Añón, M. C., & Scilingo, A. A. (2016a). Antithrombotic and antioxidant activity of amaranth hydrolysate obtained by activation of an endogenous protease. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(2), 174-182.
- Sabbione, A. C., Nardo, A. E., Añón, M. C., & Scilingo, A. (2016b). Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 20, 204–214.
- Ventureira, J. L., Bolontrade, A. J., Speroni, F., David-Briand, E., Scilingo, A. A., Ropers, M. H., & Anton, M. (2012a). Interfacial and emulsifying properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates under different conditions of pH. *LWT - Food Science and Technology*.
- Ventureira, J. L., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (2012b). Effect of acid treatment on structural and foaming properties of soy amaranth protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 272–279.