

## Plan de Gestión de Datos

<b>INFORMACION SOBRE EL PROYECTO</b>	
<b>1. – Título del Proyecto</b>	
<b>- Título del Proyecto (en castellano)</b>	
<b>Desarrollo tecnológico para la obtención de bioactivos coencapsulados a partir de hierbas y descartes agroindustriales de la nuez pecán y repollo: estudios in vitro de los efectos prebióticos y actividades antimicrobiana, antioxidante y antitumoral.</b>	
<b>- Título del Proyecto (en ingles)</b>	
<b>Technological development to obtain coencapsulated bioactives from herbs and agro-industrial waste from pecan nuts and cabbage: in vitro studies of prebiotic effects and antimicrobial, antioxidant and antitumor activities.</b>	
<b>-Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen</b>	
<p>La búsqueda continua de fuentes naturales ricas en bioactivos, junto al creciente aprovechamiento de los descartes agroindustriales, plantea la necesidad de desarrollar y optimizar tecnologías que permitan la protección y conservación de las sustancias químicas para su potencial uso en formulaciones nutraceuticas, farmaceuticas y/o alimenticias. En nuestro país, la cáscara de nuez pecán es un desecho rico en polifenoles y otras sustancias con demostradas propiedades antioxidantes, antimicrobianas y citotóxicas. Otra de las fuentes de bioactivos es el repollo colorado, vegetal cultivado ampliamente en la región centro de nuestro país, que posee características de adaptabilidad al medio ambiente, rendimiento y además contiene importantes compuestos con efectos benéficos para la salud como antocianinas, fenoles, glucosinolatos y vitaminas. Por otro lado, la inulina es otro de los ingredientes que se está utilizando ampliamente en el mundo y en nuestro país, para la elaboración de alimentos funcionales, encontrándose en el alcaucil, raíces de achicoria, cardos cultivados y domésticos, hongos, hierbas como la bardana, entre otras. Esta fibra tiene numerosos efectos benéficos para la salud, como la regulación de la dislipidemia y la reducción del riesgo de aterosclerosis, entre otros. Luego de la extracción de los diferentes extractos, es necesario co-encapsularlos para preservar ciertas sustancias químicas naturales, incluidos carotenoides, polifenoles, fitoesteroles y probióticos, y así intentar conservar y/o potenciar la bioactividad de los compuestos que de otra manera se degradarían rápidamente. Por todo lo expuesto, el desarrollo tecnológico de métodos extractivos de bioactivos a partir de distintas matrices naturales (descartes agroindustriales y hierbas) junto a su co-encapsulación, permitirá la obtención de productos bioaccesibles y estables, potenciando las propiedades bioactivas y promoviendo la integración de economías regionales y más sustentables.</p>	
<b>-Descripción del Proyecto (en ingles) Resumen</b>	
<p>Continuous searching for natural sources rich in bioactive, together with the growing use of agroindustrial waste, raises the need to develop and optimize technologies that allow the protection and conservation of chemical substances for their potential use in nutraceutical, pharmaceutical and/or food formulations. In our country, the pecan nutshell is a waste rich in polyphenols and other substances with proven antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties. Another source of bioactives is red cabbage, a vegetable widely cultivated in the central region of our country, which has characteristics of adaptability to the environment, yield and also contains important compounds with beneficial health effects such as anthocyanins, phenols, glucosinolates and vitamins. On the other hand, inulin is another ingredient that is being widely used in</p>	



calefactor de columna, y un espectrómetro de masas AB SCIEX modelo 3200 Q TRAP triple cuadrupolo (MS/MS) híbrido con trampa de iones lineal con interfaz de ionización por electrospray (ESI).

**Encapsulación de los extractos:** la obtención de las micro y nano cápsulas con los extractos individuales y/o combinaciones de ellos, generados a partir de las diferentes matrices, se obtendrán mediante agentes encapsulantes: maltodextrinas, goma arábiga, almidones modificados, etc. Estos diferentes agentes son de bajo costo y ampliamente utilizados en la preparación de capsulas para contener antocianinas y ácidos fenólicos. Las soluciones conteniendo los extractos o mezclas de extractos con el agente encapsulante se homogeneizarán mediante ultra-turrax (IKA T25, EE.UU.), y se pretenderá analizar además mezclas de los distintos agentes encapsulantes. Las muestras luego se congelarán y liofilizarán en un equipo multitubo BK-FD18PT (PeetLab, China). Se caracterizarán las capsulas mediante: distribución de tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica (DLS) con Potencial Z, en un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra); obtención de imágenes por microscopía de fuerza Atómica (AFM) para obtener información de la morfología superficial a escala nanoscópica; y morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, Phenom World ProX, EE.UU.) y microscopía electrónica de transmisión (JEOL, modelo JEM-2100 plus, Japón). A su vez, se plantea el uso de la inulina obtenida en este proyecto como agente encapsulante, siendo un polisacárido utilizado como carrier de distintas drogas, entre las que se pueden nombrar a los compuestos fenólicos. El tratamiento posterior a la obtención de las cápsulas y la caracterización se llevará a cabo de la misma manera que la descrita anteriormente para los demás agentes.

**Caracterización de los compuestos encapsulados:** se cuantificarán los compuestos fenólicos y la inulina mediante espectrometría LC-ESI-MS/MS, previa disolución de las cápsulas en agua destilada a distintos intervalos de tiempo hasta lograr el valor máximo de compuestos, y de esta manera analizar la liberación de los mismos. Los compuestos fenólicos superficiales se analizarán mediante un esquema similar, pero utilizando etanol al 96%. La eficiencia de la encapsulación y la estabilidad de las cápsulas a diferentes condiciones de almacenamiento se evaluarán una vez por mes durante 6 meses: I) Temperaturas: -18, 4 y 25 °C; II) Empaque: sellado al vacío, bolsa sellada y/o protegida de la luz.

**Estudio de la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos a nivel intestinal y colónico in vitro:** se realizará una primera etapa de digestión gastrointestinal *in vitro* de las cápsulas simulando las condiciones de la fase gástrica y la fase intestinal del proceso digestivo. La etapa gástrica se llevará a cabo con pepsina en medio ácido a pH = 2, y la intestinal con bilis pancreática a pH neutro del duodeno. Al final de las etapas se cuantificarán los compuestos fenólicos y la inulina por espectrometría LC-ESI-MS/MS.

Ensayos a realizar con los extractos encapsulados:

**Estudio de la capacidad antioxidante:** se determinará la capacidad antioxidante de los diferentes extractos encapsulados mediante el radical libre DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) utilizando un método espectrofotométrico.

**Estudio de la actividad antimicrobiana:** la actividad antimicrobiana de los distintos extractos obtenidos se estudiará mediante la técnica de difusión en agar determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

**Estudio de bioactividad sobre células tumorales:**

**Cultivos celulares:** se utilizarán las líneas celulares humanas HepG2 (carcinoma hepatocelular), Caco-2 (adenocarcinoma colorrectal), A549 (carcinoma de pulmón) y PC3 (adenocarcinoma de próstata). Las distintas líneas celulares se cultivarán en el medio de cultivo DMEM-F12 (Gibco™, EE. UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco™, EE.UU.) a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en incubadora (Binder, Alemania), durante el periodo detallado en cada prueba.

**Ensayo de viabilidad celular:** Los efectos citotóxicos de los extractos sobre las distintas líneas se evaluarán mediante el ensayo de MTT. Se sembrarán 5 x 10<sup>3</sup> células por pocillos en placas de 96 pocillos, incubándose en estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Estas células se tratarán con distintas concentraciones de los extractos preparados en medio de cultivo. Se utilizarán como control negativo de citotoxicidad buffer fosfato (pH = 7) y controles positivos de citotoxicidad, Doxorubicina y peróxido de hidrogeno. Las placas se incubarán por 24, 28 y 72 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se utilizará el kit MTT (Invitrogen, EE.UU.) según las recomendaciones del fabricante y se medirán las absorbancias a 540 y 690 nm mediante un espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Alemania). La viabilidad celular (%) se determinará mediante la siguiente ecuación: Viabilidad% = (ABS muestra/ ABS medio) \* 100%. Por otro lado, se analizará la producción de lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante de cultivo de cada placa utilizando un kit comercial (Weiner Lab, Argentina) mediante espectrofotometría, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se calculará el porcentaje de LDH liberado de las células tratadas hacia el medio de cultivo mediante una relación con la liberación generada por células lisadas con Tritón X-100 al 1%, establecido como control positivo.

**Estudio de la actividad antioxidante in vitro:** se evaluará la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en un estudio indirecto para evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos, utilizando doxorubicina (DOX, agente

quimioterápico de amplio espectro) como generador del estrés oxidativo. Las líneas celulares serán cultivadas como fue descrito previamente. Se sembrarán  $5 \times 10^3$  células por pocillos en placas de 96 pocillos, incubándose en estufa a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 h. Las células en cultivo se expondrán a DOX en combinación con los extractos individuales y/o combinados, en las concentraciones determinadas en el ensayo MTT, durante 48 horas. El pellet de células obtenido se resuspenderá en una solución  $5 \mu\text{mol/L}$  de hidroetidina (HE, Invitrogen, EE.UU.) y se analizará mediante citometría de flujo usando el Citómetro de Flujo Attune NxT (Life Technology, EE.UU.). Se determinará el índice de fluorescencia media (IFM) mediante el programa FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, EE.UU.), el cual indica el valor de ROS producido por célula.

*Evaluación de apoptosis:* De acuerdo a la evaluación mediante MTT se seleccionará distintas concentraciones de extracto para evaluar apoptosis como mecanismo de muerte celular mediante citometría de flujo en las líneas estudiadas. La preparación del cultivo de células y la incubación de extractos se realizarán como se describió anteriormente. Se utilizarán DOX y peróxido de hidrogeno al 5% como controles positivos de inducción de apoptosis y el kit de Detección de Apoptosis FITC-Annexin V (Biosciences-BD, EE.UU.). El análisis se realizará a través del Citómetro de Flujo Attune NxT (Life Technology, EE.UU.), determinándose: % de células viables, % de células en apoptosis temprana, % de células en apoptosis tardía y % de células en necrosis. Se determinará el índice de apoptosis mediante la siguiente ecuación: Índice de Apoptosis = % Apoptosis total / % Apoptosis total control basal (medio de cultivo).

*Análisis de la capacidad prebiótica de los extractos:* la capacidad prebiótica de los extractos será evaluada sobre cepas ATCC de Bifidobacterias y/o Lactobacillus. Se incubarán las cepas en medio agarizado en anaerobiosis a  $37^\circ\text{C}$  por 48 h, para luego seleccionar una única colonia e incubarla en medio líquido a  $37^\circ\text{C}$  y 48 h con el prebiótico como fuente de carbono y un control sin ninguna fuente de carbono (control negativo). El crecimiento celular se evaluará mediante espectrofotometría a 600 nm, midiendo la densidad óptica a diferentes tiempos de cultivo.

**– Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad / ser de acceso público? (marque X)**

<b>X</b>	<b>NO</b>
	<b>SI. Elija una de las opciones:</b>
	A) Se encuentra en evaluación de protección por medio de patentes.
	B) No se inició el proceso de evaluación de patentabilidad, pero podría ser protegible.
	C) Existe un contrato con un tercero que impide la divulgación.
	D) Otro. Justifique.

**– Período de Confidencialidad: Es el periodo durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El periodo máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad / serán de acceso público.**

**Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios. Marque su opción con “X”.**

	<b>1 (UN) año</b>
	<b>2 (DOS) años</b>
	<b>3 (TRES) años</b>
	<b>4 (CUATRO) año</b>
	<b>5 (CINCO) años</b>



<b>X</b>	<b>Otro.</b> <b>Motivos: Se solicita confidencialidad durante 6 años debido a que los resultados serán parte de una publicación científica en una revista especializada del área, para lo cual es necesario que los datos no hayan sido publicados con anterioridad.</b>
----------	---

## **INSTRUCTIVO PARA LLENADO DEL PLAN DE GESTIÓN DE DATOS**

El PGD no es un documento definitivo, sino que se desarrollará a lo largo del ciclo de vida del proyecto.

### INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO

1- Título del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar el título completo del proyecto (en castellano), indicando además el código asignado por la SCAyT.

- Título del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar el título completo del proyecto en inglés.
- Descripción del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar la descripción del Proyecto en castellano.
- Descripción del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar la descripción del Proyecto en inglés.
- Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar tres palabras clave descriptivas del Proyecto, en castellano.
- Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar tres palabras clave descriptivas del Proyecto, en inglés.

2- Datos del Director/a del Proyecto

- Nombre y Apellido del Titular del Proyecto: Nombre completo y apellido del Titular del Proyecto.
- Unidad Académica: Nombre de la UA a la que pertenece el /la directora/a del Proyecto.
- Teléfono oficial de contacto: Número de teléfono de la oficina / laboratorio / Institución del Director/a del Proyecto, donde pueda ser contactado, incluyendo número de área / país (ej: Para la Santa Fe: + 54 9 342 4999-9999).
- Teléfono móvil de contacto: Número de t
- E-mail del Director/a del Proyecto: Correo electrónico de contacto del Director/a del Proyecto.

## DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

- Describa la toma de muestras / datos a realizar: Información descriptiva sobre la toma de muestras que resultaran en datos / conjuntos de datos. La descripción deberá incluir información de contexto (lugar de toman los datos; instrumentos etc).

Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad / ser de acceso público? Deberá marcar con una "X" la opción correcta. En caso de responder afirmativamente, deberá justificar debidamente, comprendiendo que solo en casos de extrema excepcionalidad esta restricción de acceso a los datos resulta practicable / aceptable.

-Período de Confidencialidad: Es el periodo durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El periodo máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad / serán de acceso público. Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios.



Dr. Gustavo J. Hein  
Director



Dra. María Eugenia Baravalle  
Codirectora