



Plan de Gestión de Datos

INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO

1. – Datos del Proyecto

- Título del Proyecto (en castellano)

Valorización de los subproductos de la nuez pecán (*Carya illinoensis*) para la obtención de extractos enriquecidos en compuestos fenólicos y evaluación de sus propiedades bioactivas.

CAI+D 2020 PI TIPO II
Código:
50620190100044L

- Título del Proyecto (en inglés)

By-products valorization of the pecan nut (*Carya illinoensis*) to obtain enriched extracts in phenolic compounds and the evaluation of their bioactive properties.

- Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen

El cultivo de nuez pecán se encuentra en constante expansión en Argentina y posee capacidad de adaptarse a los diferentes climas. La nuez pecán posee compuestos bioactivos que le otorgan al fruto propiedades fisiológicas tales como antioxidante, anti-inflamatoria, entre otras, con efectos benéficos en la salud debido al contenido de ácidos grasos mono y poli-insaturados, fitoesteroles, tocoferoles y otros micronutrientes. Además, la fracción no lipídica también es rica en compuestos bioactivos, que incluyen compuestos fenólicos, debiendo estar bioaccesibles para ejercer sus efectos biológicos. Los ácidos fenólicos de la nuez pecán también brindan propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias para la prevención y el tratamiento de la obesidad, la diabetes y los trastornos asociados. Sumado a esto, los taninos condensados e hidrolizables hacen que sea una fuente interesante y compleja de fitoquímicos con actividades biológicas relevantes. La extracción de compuestos fenólicos de las partes no comestibles de frutas y vegetales, como cáscaras, huesos, hojas y otras partes de las plantas, ha ganado interés, ya que se pueden obtener extractos enriquecidos en compuestos fenólicos purificados a partir de residuos sin ningún valor comercial. En ese sentido, los subproductos de la industrialización de la nuez (cáscaras, tabiques internos, etc.) poseen altos contenidos de compuestos fenólicos, algunos similares y en cantidades superiores a los del fruto, exhibiendo además, mayor capacidad antioxidante. Por lo tanto, el diseño tecnológico para la obtención de compuestos fenólicos con propiedades bioactivas de partes vegetales no comestibles de la nuez pecán es una oportunidad económica promisoría para la extracción de fitoquímicos con potenciales usos secundarios, el aprovechamiento integral y la sustentabilidad. Por todo lo expuesto, considerando que la nuez pecán posee compuestos fenólicos con probadas propiedades bioactivas, y basados en la evidencia de que en la cáscara y otras partes no comestibles del fruto se encuentran compuestos similares, es importante estudiar diferentes vías de extracción a partir de estas matrices residuales e investigar sus propiedades biológicas en un modelo murino de dislipidemia.

- Descripción del Proyecto (en inglés) Resumen

Pecan nut crop is constantly expanding in Argentina and it has the capacity to adapt to different climates. Pecan nut has bioactive compounds such as mono and polyunsaturated fatty acids, phytosterols, tocopherols and other micronutrients with antioxidant, anti-inflammatory, among others physiological properties providing beneficial health effects. Moreover, the non-lipid fraction is also rich in bioactive compounds, which includes phenolic compounds, and must be bio accessible to exert their biological effects. Pecan nut phenolic acids also provide antioxidant and anti-inflammatory properties that can exert an important role in the prevention and treatment of obesity, diabetes and associated disorders. In addition, condensed and hydrolysable tannins make it an interesting and complex source of phytochemicals with relevant biological activities. The inedible parts of fruits and vegetables, such as husks, bones, leaves and other parts of the plants are rich in phenolic compounds, so their extraction of these parts considered waste without any commercial value is gaining interest. In this sense, the by-products of the industrialization of pecan nut (shells, internal partitions, etc.) have high content of phenolic compounds, some similar and in amounts greater than those of the fruit, also exhibiting greater antioxidant capacity. Therefore, the



technological design to obtain phenolic compounds with bioactive properties of inedible vegetable parts of the pecan nut is a promising economic opportunity for the extraction of phytochemicals with potential secondary uses, integral use and sustainability. For all the above, considering that pecan nut possesses phenolic compounds with bioactive properties, and based on the evidence that similar compounds are found in the shell and other inedible parts of the fruit, it is important to study different extraction methodologies from these residual matrices and to analyze their biological properties in a murine model of dyslipidemia.

- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en castellano)

NUEZ PECAN COMPUESTOS FENÓLICOS PROPIEDADES BIOACTIVAS

- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en inglés)

PECAN NUT PHENOLIC COMPOUNDS BIOACTIVE PROPERTIES

2 – Datos del Director del Proyecto

- Nombre y Apellido

Gustavo Juan HEIN

- Unidad Académica

Centro Universitario Gálvez (Universidad Nacional del Litoral).

- Teléfono oficial de contacto

+ 54 3404 481203.

-Teléfono móvil de contacto

+ 54 3404 15537109.

-E-mail del Director del Proyecto

ghein@cu-galvez.unl.edu.ar

DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

-Describe la toma de muestras / datos a realizar

Obtención de muestras: se utilizarán nueces pecán ‘Carya illinoensis’ (variedades Mahan, Desirable, Stuart, Shoshoni; cosecha 2019), provistas por la firma Coopelit de su plantación localizada en la zona rural de Arocena (Santa Fe). Se separarán los tabiques y las cáscaras de las nueces pecán, se secarán en estufa de aire forzado a 40°C y se molerán en molino industrial (Retsch KG, Alemania) con malla de 1 mm. El polvo obtenido se tamizará y las fracciones se almacenarán a -24°C. Los extractos se obtendrán de acuerdo lo descrito en antecedentes bibliográficos. Las condiciones óptimas de cada sistema de extracción se determinarán por optimización de respuestas múltiples mediante la función de deseabilidad de Derringer. Una vez obtenidas las condiciones óptimas de extracción para cada sistema de extracción estudiado se realizará su correspondiente validación.

Enriquecimiento en compuestos fenólicos: en los extractos crudos realizados en las condiciones óptimas para cada sistema de extracción se realizará el enriquecimiento mediante purificación en cartuchos de SPE de C18 pre-acondicionados con acetato de etilo, metanol y agua. Los cartuchos se lavarán varias veces con agua acidificada (ácido acético 0,5%) para eliminar azúcares libres, ácidos orgánicos y otros compuestos que se co-extraigan con los compuestos fenólicos. Luego, la mezcla de compuestos fenólicos se eluirá con metanol al 100%, y los eluatos se evaporarán y liofilizarán para obtener los correspondientes EECF. El fraccionamiento de diferentes especies de compuestos fenólicos a partir de los EECF se realizará con una columna empacada con Sephadex LH-20 (20 x 2 cm), pre-acondicionada con metanol 80% (ácido acético 0,5%). Las distintas fracciones (fracción rica en flavonoides, fracción rica en taninos condensados, etc) se realizará por elución isocrática, utilizando distintos solventes orgánicos.

Contenido de fenoles totales de los extractos crudos, EECF y sus respectivas fracciones: se determinará por espectrofotometría.

Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos crudos, EECF y sus respectivas fracciones: se realizará mediante el uso de HPLC con detector de arreglo de diodos y detector de masas. Se utilizará un cromatógrafo líquido (UFLC) Shimadzu compuesto por 2 bombas modelo LC-20AD XR, desgasificador modelo DGU-20A3, inyector automático modelo SIL-20AC XR con horno 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).

Encapsulamiento de los extractos purificados seleccionados: serán encapsulados mediante secado spray con maltodextrina (DE 9-12) y goma arábiga (relación 1:1), mezclando esta solución con el extracto en relación 1:1 previo



al secado, que se realizará en las siguientes condiciones: Temperatura de entrada 150°C, alimentación 9 ml/min. Luego se recogerá el polvo obtenido y se almacenará a -20°C hasta realizarle las correspondientes determinaciones.

Estudio de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos a nivel intestinal y colónico in vitro: en los EECF se realizará en primera instancia una digestión gastrointestinal para simular las condiciones de las fases gástrica e intestinal del proceso digestivo. Etapa gástrica con pepsina en medio ácido (pH = 2) y la intestinal, con bilis-pancreatina a pH neutro del duodeno. Luego, se realizará una fermentación colónica *in vitro*: metodología que incluye una etapa de fermentación que simula los procesos que tienen lugar a nivel colónico, y que permitirá también medir los compuestos fenólicos bioaccesibles a nivel de intestino grueso.

Ensayos a realizar en los extractos purificados obtenidos bajo condiciones óptimas de extracción y validadas:

Estudio de capacidad antioxidante: se evaluará en los distintos extractos purificados obtenidos, así como en los encapsulados la actividad antioxidante mediante el radical libre DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl). Además, se medirá utilizando el método FRAP (poder antioxidante reductor del hierro).

Análisis del efecto de los extractos fenólicos en la absorción de lípidos en un modelo murino de dislipemia por administración de dietas ricas en grasas: se estudiarán los efectos de los extractos purificados en la absorción y acumulación de lípidos mediante un modelo de dislipemia por administración de dieta ricas en grasas.

Animales: se utilizarán ratas de la cepa Wistar con certificación genética, machos jóvenes de 8 a 12 semanas con una variabilidad de peso menor al 20%, que serán alojados en jaulas individuales. Los animales serán mantenidos en las Instalaciones del CMC del ICIVET Litoral, habilitadas y certificadas por el ANMAT de acuerdo a la disposición 6344, y por el SENASA de acuerdo a la disposición 617/2002, bajo condiciones ambientales controladas: temperatura entre 22 ± 3°C, fotoperiodo controlado (12hs de luz/12hs de oscuridad) y libre acceso a alimento comercial y agua.

Alimentación: durante 6 días las ratas se alimentarán de una dieta basal balanceada siguiendo los estándares generales de alimentación para animales de laboratorio, cumpliendo con todos sus requerimientos nutricionales. Pasados los 6 días de adaptación, las ratas serán aleatoriamente asignadas a 4 grupos (6 ratas por grupo) y serán alimentadas con las siguientes dietas: i) dieta control, ii) dieta control más extractos purificados, iii) dieta rica en grasas, y iv) dieta rica en grasas más extractos purificados. De ser necesario, se anexarán grupos experimentales de acuerdo a los EECF que se requieran evaluar. Las dietas serán administradas durante 9 semanas, tendrán la misma composición en macronutrientes (% de carbohidrato, lípidos y proteínas) y aportarán las mismas kCal/g, para lo cual las formulaciones serán sometidas a pruebas con calorímetro (Lamofiq). Los animales recibirán alimentación y agua *ad libitum* durante todo el estudio. Se realizará un seguimiento del peso de los animales durante el período experimental a través de la construcción de curvas de peso (variación del Peso (g) en función del Tiempo (días)). Para ello, los animales serán pesados 3 veces a la semana. Con los datos obtenidos, se confeccionarán las curvas de peso para cada grupo. También se hará un cálculo de la Comida Efectiva (CE, expresada en g/rata/día): que representa la comida en base seca que efectivamente es ingerida por los animales e ingesta calórica (CE, expresada en kJ/rata/día).

Toma de muestras: finalizado el período experimental, los animales ayunados serán sacrificados y se procederá a extraer y pesar los siguientes órganos: hígado, riñón, bazo, músculo gastronemius, grasa mesentérica, grasa perirrenal y grasa epididimal de acuerdo a procedimientos anteriores de nuestro grupo. Previo al inicio y luego del período experimental propuesto, se extraerá el menor volumen de sangre posible según los procedimientos vigentes en el CMC (teniendo en cuenta entre otros aspectos: la especie, el peso del animal, y la cantidad de extracciones), que fueron previamente aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV, UNL). Las muestras se procesarán inmediatamente para la obtención de plasma. Para ello se colocaran en tubos con anticoagulante y serán centrifugadas, para luego separar el plasma y conservarlo a -20 °C hasta las correspondientes determinaciones.

Determinaciones: la glucosa, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados (AGNE), colesterol total, HDL-colesterol se cuantificarán mediante reacciones enzimáticas colorimétricas de acuerdo al tipo de determinación utilizando kits comerciales (Wiener Lab y Randox) y siguiendo a las instrucciones del fabricante. Mediante cálculo se determinará la concentración de LDL-colesterol. Se aplicarán micrométodos analíticos validados en el CMC, que requieren un mínimo volumen de muestra gracias a la disponibilidad del espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Alemania). La cuantificación plasmática de insulina se realizará por radioinmunoensayo (RIA), en colaboración con laboratorios del IByME-CONICET.

– 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)

X **NO**

SI. Elija una de las opciones:



	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.
<p>– Período de Confidencialidad: Es el período durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El período 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.</p> <p>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”.</p>	
	1 (UN) año
	2 (DOS) años
	3 (TRES) años
	4 (CUATRO) año
	5 (CINCO) años
X	Otro.
<p>Motivos: Se solicita confidencialidad 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.</p>	

Gustavo Juan Hein

Gálvez, 24 abril de 2020



INSTRUCTIVO PARA COMPLETAR EL PLAN DE GESTIÓN (PGD)

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 – Datos del Proyecto

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 Claves descriptivas del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar tres palabras claves descriptivas del Proyecto, en castellano.

Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar tres palabras claves 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 Unidad Académica 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 Santa Fe: + 54 9 342 4999-9999).

Teléfono móvil de contacto: Número de teléfono móvil del director/ar del Proyecto, donde pueda ser contactado, incluyendo número de área/país.

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 resultarán en datos/conjuntos de datos. La descripción deberá incluir



información de contexto (lugar de toma de 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 sólo 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.

Deberá indicar los años que considera necesario prorrogar el período de confidencialidad y explicar los motivos.