



## **XXIII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**

Orden Poster: CE-069 (ID: 994)

**Autor: Gomez, Gabriela Noemi**

**Título: Propiedades enzimáticas de un extracto de ciegos pilóricos de pacú de cría regional**

Director:

Palabras clave: *Piaractus mesopotamicus*, BApNA, Tripsina, Jabones

Área de Beca: Cs. Naturales Y Exactas

Tipo Beca: Cofinanciadas Pos-doctorales

Periodo: 01/07/2016 al 30/06/2018

Lugar de trabajo: Facultad De Cs. Exactas Y Naturales Y Agrimensura

Proyecto: (14F010) Proteasas digestivas de *Piaractus mesopotamicus* (pacú). Su aislamiento y caracterización.

### **Resumen:**

*Piaractus mesopotamicus* (pacú) es una especie autóctona, distribuida ampliamente en la cuenca de los ríos Paraná-Paraguay, cuyo cultivo se incrementó sostenidamente en el NEA en los últimos años. El aprovechamiento de sus vísceras (desecho mayoritario) aporta un valor agregado a la cadena productiva ya que éstas representan una fuente potencial de enzimas digestivas, como la tripsina, muy utilizada en industrias químicas, agroalimentarias, farmacéuticas y curtiembres. Su aplicabilidad deriva de la estabilidad y actividad que esta enzima exhibe en condiciones adversas, tales como presencia de tensioactivos y agentes oxidantes. Actualmente, el origen de la tripsina es bovino y porcino, siendo las vísceras de peces una fuente latente para su obtención. Ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio, sobre ciegos pilóricos de pacú, especie no estudiada hasta el presente, demostraron la presencia de actividad tripsina y un comportamiento cinético y de estabilidad frente al pH con propiedades atractivas para su empleo industrial. El objetivo del presente trabajo fue ampliar dicha caracterización enzimática analizando el efecto de diferentes agentes químicos, potencialmente presentes en los medios donde actúa la tripsina a nivel industrial, tales como iones, detergentes, oxidantes e inhibidores, sobre un extracto de ciegos pilóricos de pacú, y comparar su comportamiento con el aquel exhibido por la tripsina porcina comercial. Esto tiene como fin reunir la información necesaria para evaluar la inserción de este producto en el circuito comercial.

**Muestras.** Ciegos pilóricos de ejemplares de pacú, colectados en bolsas de plástico selladas y mantenidas a -20 °C hasta su utilización, y tripsina porcina comercial.

**Preparación del extracto pilórico (EP).** El tejido fue disgregado con buffer Tris-HCl 50mM, NaCl 0.5mM, CaCl<sub>2</sub> 20mM, pH 7.8 (buffer A), sonificado y centrifugado, recogiendo el sobrenadante para estudios ulteriores.

**Tripsina porcina (TP).** Se preparó una solución (0,5 mg/mL) en buffer A.

**Actividad tripsina.** Se determinó sobre el sustrato cromogénico BApNA (N<sup>ω</sup>-benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida), siguiendo la reacción por medición de la absorbancia a 410 nm a través del tiempo en una lectora de microplacas termostatazada a 30°C. Mediante este ensayo se realizaron estudios cinéticos sobre ambas muestras evaluando diversos efectos: -NaCl: Se adicionó NaCl con concentraciones desde 0 a 30% (p/v). -Iones metálicos y agentes surfactantes: Se preincubaron con CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub> (10 mM) y Tritón X-100, Tween 20 y Tween 80 durante 30 minutos. - Inhibidores: Se incubaron con PMSF y EDTA por 30 minutos -Agentes oxidantes: La estabilidad se ensayó incubándolas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5, 15 y 30%) hasta 75 min, extrayendo alícuotas cada 15 minutos. -Estabilidad en presencia de jabones comerciales. Se preincubaron con soluciones 1% de jabones comerciales (Drive, Ace, Ariel, Gigante, Skip) durante 60 minutos a 40°C.

En todos los casos se determinó la actividad BApNA residual.

EP mostró ser menos sensible a la presencia de NaCl, reteniendo un 61% de su actividad inicial a alta concentración salina (30% P/V), mientras que la TP presentó una actividad residual del 40%. Ambas muestras son resistentes a la presencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> 10 mM. El EP mostró ser estable ante la presencia de surfactantes no iónicos (Tritón X-100 y Tween 20 y 80), exhibiendo actividad residual superior al 90%, mientras que, la tripsina porcina luego de ser tratada con Tween 20, redujo su actividad un 23%. La actividad de la TP, luego de ser preincubados con PMSF (inhibidor de serinoproteasas), fue nula mientras que el EP retuvo más del 60% de su actividad inicial; y al ser tratados con EDTA el EP y la TP experimentaron disminución del 50% y 60 % en su actividad. El EP resultó ser estable frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5 y 15% (P/V) mientras que TP exhibió disminución de su actividad a una concentración de peróxido del 15%. Tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, ambas redujeron su actividad de manera acentuada, siendo este efecto mayor en TP. Y por último, tanto EP como TP mostraron ser estables en presencia de todos los jabones testeados a 40°C, exhibiendo actividades cercanas al 100%.

En conclusión, el extracto obtenido a partir de ciegos pilóricos de pacú, mostró ser estable, tal como la tripsina porcina comercial, frente a los agentes ensayados, e incluso exhibió mayor tolerancia a la presencia de peróxido y sales, propiedades de interés para su empleo en la industria de productos de limpieza, como aditivo en formulaciones de jabones de lavar.

Estos resultados sugieren que la tripsina proveniente de ciegos pilóricos de pacú podría ser empleada como alternativa a la enzima empleada actualmente en la industria, otorgando valor a la cadena productiva de pacú, al aprovechar un recurso que actualmente constituye un desecho.