



## **XXVII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**

Orden Poster: CE-007 (ID: 2211)

**Autor:** Gonzalez, Maria Florencia

**Título:** Hidrólisis enzimática de colágeno de piel de surubí: evaluación de perfil electroforético y actividad antioxidante

Director: Gay, Claudia Carolina

Co-Director: Acevedo Gomez, Antonella

Palabras clave: Pseudoplatistoma sp, gelatina, metaloproteinasas, hidrolizados, Bothrops alternatus

Área de Beca: Cs. Naturales Y Exactas

Tipo Beca: Evc - Cin

Periodo: 01/09/2021 al 31/08/2022

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

Proyecto: (PICTO UNNE-2019-00011) Enzimas de fuentes alternativas, con potencial utilidad industrial, para un desarrollo sostenible en la región del Impenetrable.

### **Resumen:**

El colágeno es la proteína estructural más abundante en organismos vertebrados e invertebrados. Existen más de 28 tipos, siendo uno de los más abundantes el de tipo I (pieles, tendones y tejido óseo). El proveniente de especies acuáticas es una alternativa interesante ya que no presenta riesgo de transmisión de enfermedades bovinas-porcinas y su extracción es de bajo costo. La hidrólisis enzimática de colágeno de fuentes acuáticas, genera péptidos bioactivos cuyas posibles aplicaciones son de gran interés para la industria cosmética. Por otro lado, las metaloproteinasas del veneno de Bothrops alternatus (yarárá grande) degradan el colágeno de tipo I gelatinizado. En la región del Noreste de Argentina anualmente se producen para consumo mediante acuicultura, 74 tn de Pseudoplatistoma sp (surubí), lo que genera grandes cantidades de desechos (piel y vísceras) que podrían reutilizarse. El objetivo de este trabajo fue obtener hidrolizados del colágeno gelatinizado de la piel de surubí utilizando un extracto rico en metaloproteinasas de veneno de serpiente y estudiar su actividad antioxidante. Primeramente, se prepararon dos extractos, uno rico en pepsina de surubí (EAc) a partir de la disgregación mecánica del estómago de surubí con buffer y otro, rico en metaloproteinasas de veneno de yarárá grande (EMet), por combinación de dos técnicas cromatográficas. Se determinaron las actividades enzimáticas específicas de cada extracto y se realizó la extracción ácida enzimática del colágeno de la piel del surubí con la adición de EAc (10 U/g de piel) durante 72 h. El colágeno soluble obtenido (CS) se secó con bomba de vacío y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se determinó la concentración de hidroxiprolina (Hyp) y se calculó el contenido de colágeno. A partir de colágeno gelatinizado (GCS), se realizó una hidrólisis enzimática a pH constante (7,0) utilizando el extracto EMet (rico en metaloproteinasas, 0,1625 U/mg), empleando la relación sustrato: enzima de 200:1 (P:P). La hidrólisis se detuvo por calentamiento (100°C-10 min) y se determinó el grado de hidrólisis empleando la metodología de Adler-Nissen (factor de lisina 1/34,48 -masa molecular promedio de aminoácidos 108,63 g/mol). Se estudiaron los perfiles electroforéticos del GCS antes y después de la hidrólisis (12% tricina y 6%/6M urea-glicina-SDS-PAGE) y determinaron la actividad antioxidante empleando la técnica de Fenton. El porcentaje de inhibición del radical OH se calculó utilizando la fórmula: IROH (%) = [(Am-An)/(Ab-An)] × 100, donde Am, An y Ab son los valores de absorbancia de muestra, control negativo y blanco respectivamente, registrados a 536 nm. Por último, se realizó el análisis estadístico de los datos mediante ANOVA siguiendo el test de Tukey ( $p<0,05$ ). Los resultados mostraron valores de  $0,19 \pm 0,02$  mg/mL y  $1,54 \pm 0,13$  mg/mL para la concentración de Hyp y CS, respectivamente (siendo 28,4% del CS colágeno puro). El perfil electroforético del CS mostró un patrón de bandas compatibles con las cadenas alfa1, alfa2 y beta del colágeno tipo I. Luego del tratamiento GCS con EMet se obtuvo un grado de hidrólisis obtenido fue  $37,3 \pm 0,06$  % y se observó la desaparición de las cadenas alfa1, alfa2 y beta del CS y la aparición de bandas de degradación con masas moleculares menores a 20 kDa. La actividad antioxidante del GCS sin hidrolizar e hidrolizado presentó un comportamiento dosis dependiente. El cálculo de la concentración inhibitoria cincuenta (IC50; linealidad entre 2-70% de IROH) demostró que el colágeno gelatinizado hidrolizado (IC50: 0,011 mg/ml) incrementa la actividad antioxidante 3,7 veces respecto al colágeno gelatinizado sin hidrolizar (IC50: 0,041 mg/ml). Si bien el grado de hidrólisis alcanzado en nuestro trabajo es menor al obtenido en otro estudio, donde hidrolizan colágeno gelatinizado de piel de atún con alcalasa, la actividad antioxidante del colágeno gelatinizado de surubí sin hidrolizar e hidrolizado es elevada. La mezcla de péptidos obtenidos (masa molecular < a 20 kDa) con elevada actividad antioxidante, resulta atractiva para su potencial aplicación dermatológica. Ensayos posteriores permitirán estudiar las diferentes fracciones peptídicas del hidrolizado responsables de la actividad antioxidante, así como medir dicha actividad por otros mecanismos de inhibición de radicales.