

G. Sostenibilidad y Medio Ambiente

Obtención de péptidos bioactivos a partir de subproductos de la industria acuícola-pesquera de Ostión del Norte

Paula Santana¹, Fernanda Escamilla², Luis Gonzáles², Fanny Guzmán³, Carlos Jara⁴, Pedro Toledo⁵, Claudio Alvarez^{5,6},

¹Instituto de Ciencias Aplicadas, Facultad de Ingeniería, Universidad de Ciencias Aplicadas, Santiago, Chile

²Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México

³Núcleo Biotecnología Curauma (NBC), Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

⁴Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

⁵Departamento de Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile

⁶Laboratorio de Fisiología y Genética Marina (FIGEMA), Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Coquimbo, Chile

Resumen

En Chile, en las regiones de Valparaíso y Coquimbo se desechan al año cerca de 10 mil toneladas de descartes de productos del mar, generados luego del procesamiento de peces, crustáceos y moluscos del sector acuícola-pesquero. Por lo que se requiere urgentemente acuerdos público-privado para evaluar medidas de adaptación y mitigación para la gestión sustentable de estos desechos, acorde a las nuevas exigencias medio ambientales. Desde este problema, nace la oportunidad de hacer uso de estos desechos como fuente de moléculas atractivas para la obtención de biofármacos. El objetivo de este trabajo fue obtener péptidos bioactivos a partir de las vísceras del Ostión del norte (*Argopecten purpuratus*). Para ello, se realizó un análisis proximal para determinar el porcentaje de proteínas. Luego se emplearon dos enzimas, tripsina y pepsina, con el fin de hidrolizar las proteínas presentes en este subproducto y obtener un extracto de péptidos bioactivos. Posteriormente se evaluó la citotoxicidad y actividad antibacteriana de este extracto. Los resultados obtenidos indicaron que estos subproductos poseen un 48,5% de proteínas a partir de los cuales fue posible obtener péptidos bioactivos mediante la hidrólisis enzimática, resultando en compuestos de bajo los 6kDa. Finalmente se evaluó el extracto de péptidos a través de 1) un ensayo de hemólisis, observándose una baja citotoxicidad del extracto (2-5%), y 2) ensayo antibacteriano el cual arrojó que este extracto contiene péptidos activos frente a *Escherichia coli*, no así frente a *Staphylococcus aureus*.

Introducción

El procesamiento industrial de productos pesqueros y acuícolas para el consumo humano (214 millones de toneladas al 2020), generó una gran cantidad de subproductos no comestibles o subutilizadas como: cabeza, piel, vísceras, espina dorsal, escamas, cartílagos, sangre, entre otros, que oscilan entre el 25 y el 70% (Fao, 2022; Ucak y col., 2021). Estos subproductos, ricos de proteínas funcionalmente activas, se pueden descomponer mediante hidrólisis química, enzimática o fermentación microbiana, con la finalidad de obtener péptidos biológicamente activos (Ucak y col 2021). Desde el punto de vista biotecnológico, aprovechar los subproductos de la industria acuícola-pesquera para obtener péptidos bioactivos implica un enfoque sostenible y compatible con el medio ambiente, al tiempo que agrega valor a estos subproductos. De acuerdo con datos obtenidos del 'Catastro De Recursos Marinos Presentes en la Región de Coquimbo, 2017' a partir de las 3547 toneladas producidas de Ostión del norte en la región de Coquimbo Chile, se generan 600 toneladas de desechos correspondientes al 17% del total producido (Antonio Vélez, 2017). Aproximadamente un 55% de estos moluscos son descartes, correspondiendo principalmente a vísceras. Sin embargo, la demanda por estos insumos en la zona norte del país es escasa o nula, por lo cual la venta de estos productos se sustenta mayoritariamente por solicitudes de empresas ubicadas en el sur del país, donde se produce alimentos para uso animal. De esta manera, queda de manifiesto la necesidad de abordar la reutilización de estos descartes, entregando un valor agregado a dichos subproductos y mejorar la sustentabilidad de sus actividades productivas. Dado lo anterior, el objetivo de este trabajo es obtener biofármacos basados en péptidos, permitiendo la creación de terapias innovadoras que puedan ser aplicadas tanto en salud humana como animal, de tal forma de reducir el uso de medicamentos convencionales y sus impactos asociados.

Materiales y métodos

Obtención y procesamiento de materias primas: Subproductos de Ostión del Norte (vísceras) fueron acopiados a 4°C en recipientes de almacenaje de 500 L. Posteriormente fueron colocados sobre bandejas de acero inoxidable hasta formar una película delgada, no mayor a 1 cm de altura, para posteriormente poner las bandejas dentro de un horno con ventilación de flujo horizontal. Durante el secado se realizaron revisiones periódicas, removiendo ligeramente el material, facilitando y acelerando el secado. Los productos secos fueron molidos en un molino eléctrico, y tamizados a 250 µm. Las harinas fueron conservadas en cámara fría hasta su utilización. Análisis químico-proximal: El contenido de humedad de las muestras orgánicas, se determinó secando estas muestras en estufa a una temperatura de 95°C, hasta su peso constante. La proteína bruta fue determinada por el método Kjeldahl. Los lípidos totales se determinaron utilizando el método

Soxhlet. La fibra bruta, se obtuvo por digestión ácida y alcalina. Las cenizas se cuantificaron por combustión de la muestra a 500°C en horno mufla (método 942.05; AOAC 1996). Los extractos libres de nitrógeno (ELN) se calcularon restando la suma de todas las fracciones por encima de 100 (Tacon, 1989). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y expresadas en porcentaje de peso seco. El perfil de ácidos grasos se analizó mediante cromatografía de gases con los ácidos grasos metil-ésterificados (FAMES). Mientras que el perfil de aminoácidos se analizó mediante cromatografía HPLC equipado con un detector UV (Araujo y col 2008).

Obtención de péptidos bioactivos: Las harinas obtenidas a partir de las vísceras de ostiones se resuspendieron en buffer Tris-HCl 0.1 M, homogenizaron y centrifugaron a 21.380 xg por 5 min. Posteriormente, se recolectó el sobrenadante y las proteínas fueron cuantificadas mediante el método BCA. Luego las proteínas fueron hidrolizadas, en una proporción de 10:100 con pepsina (pH 2) y tripsina (pH 8) durante 0, 2, 4, 6 y 8 horas. **Electroforesis SDS-PAGE:** La separación de los péptidos se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-Tricina (González-Olivares y col., 2011). La corrida electroforética se llevó a 100V durante 2 horas. Los geles se tiñeron con Sypro Ruby (Sigma-Aldrich) y se analizaron mediante el software Image J.

Actividad hemolítica: El ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito por Santana y col., 2024. Brevemente, la solución de eritrocitos se mezcló en una proporción 1:1 con el extracto de péptidos bioactivos. PBS 10mM fue utilizado como control negativo (0% de hemólisis) y Tritón X-100 al 0,5% en PBS 10mM fue utilizado como control positivo (100% hemólisis). Luego se incubó durante 1 h con suave agitación (100 rpm) a 37 °C. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Actividad antimicrobiana: Para esto se emplearon como modelos las bacterias Gram negativa *Escherichia coli* y Gram positiva *Staphylococcus aureus*. El ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito por Santana y col., 2018. Brevemente, el cultivo bacteriano se diluyó 100 veces con TSB y se incubó a 200 rpm hasta obtener una OD_{600nm} en fase logarítmica (0,3-0,7). Las bacterias fueron lavadas y los sedimentos resultantes se resuspendieron en TSB al 1 % en solución salina tampón fosfato (PBS) 10 mM para luego ajustarlas a 1 x 10⁶ UFC/mL. Luego las bacterias fueron incubadas en conjunto con el extracto de péptidos bioactivos durante 1 h a 30°C. Después de la exposición, los cultivos de bacterias se diluyeron diez veces con el mismo tampón, aplicándose en placas de agar TSA para luego ser incubadas durante 12-16 h a 37°C.

Resultados y discusión

Un punto crítico en la obtención de proteínas de calidad a partir de subproductos de la industria acuícola-Los resultados indican que los subproductos del procesamiento de Ostión del Norte poseen una alta calidad nutricional, específicamente con niveles de proteínas de un 48,45% peso seco. Hasta ahora, no existen otros estudios que describan análisis proximales de subproductos de Ostión del Norte. Desde estos subproductos fue posible recuperar esos nutrientes y realizar proceso de hidrólisis enzimática utilizando pepsina y tripsina, logrando observar péptidos bioactivos bajo los 6kDa. Esto concuerda con lo reportado en otros estudios realizados con subproductos de moluscos, donde se han reportado péptidos entre los 0,3 y los 11 kDa (Cunha and Pintado, 2022). El extracto peptídico presentó una baja citotoxicidad, con un 2 a 5% de actividad hemolítica, así como también una interesante actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, no así frente a *Staphylococcus aureus*. Resultados similares fueron obtenidos para péptidos extraídos de *Crassostrea virginica*, *Haliotis discus* y *Mytilus coruscus* (Cunha and Pintado, 2022). Estos resultados marcan el comienzo para una futura identificación de nuevas moléculas con actividad biológica que puedan ser utilizados como fuente de nuevos biofármacos, contribuyendo así a la sostenibilidad ambiental en la pesca y acuicultura otorgando un valor agregado a los desechos orgánicos de esta industria. En próximos trabajos se considera evaluar otras propiedades funcionales de los extractos peptídicos, así como también su incorporación en alimento para peces marinos.

Palabras Clave:

Acuicultura, Ostión del norte, subproductos, péptidos bioactivos

Bibliografía

-FAO. 2022. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>

-Ucak y col., 2021, Mar. Drugs 2021, 19(2), 71; <https://doi.org/10.3390/md19020071>

-Antonio Vélez, 2017, Catastro De Recursos Marinos Presentes en la Región de Coquimbo, 2017, 105pp.

-AOAC Official Methods of Analysis of AOAC International; 15th ed.; 1996;

-Tacon, A. Nutrición y Alimentación de Peces y Camarones Cultivados: Manual de Capacitación. Organización de Las Naciones Unidas Para Agricultura y La Alimentación (FAO); Brasilia, 1989;

-Araujo, P.; Nguyen, T.T.; Frøyland, L.; Wang, J.; Kang, J.X. Evaluation of a Rapid Method for the Quantitative Analysis of Fatty Acids in Various Matrices. J. Chromatogr. A 2008, 1212, 106, doi:10.1016/J.CHROMA.2008.10.006.

-González-Olivares y col., 2011, Revista mexicana de ingeniería química, 10(2), 179-188.

-Santana y col., 2024, Pharmaceutics. 16(3): 378. doi: 10.3390/pharmaceutics16030378

-Santana y col., 2018, Biochem Biophys Res Commun. 15;498(4):803-809. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.061.

-Cunha and Pintado, 2022, Trends in Food Science & Technology 119: 348-370 doi: 10.1016/j.tifs.2021.08.017

Agradecimientos

Proyectos ANID-Chile: FOVI230188, FONDECYT 1231088, FONDEF ID23I10063