



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(QUÍMICA ACUÁTICA)

**OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN LAS
GLÁNDULAS SALIVALES POSTERIORES DEL PULPO *Octopus maya***

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
DAWRIN JESUS PECH PUCH

TUTOR PRINCIPAL
Dr. SERGIO RODRIGUEZ MORALES
UNIDAD DE QUÍMICA EN SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM

COMITÉ TUTOR
Dr. LEOVIGILDO QUIJANO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM
Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
Dr. CARLOS ROSAS VÁSQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNAM

UNIDAD ACADÉMICA SISAL, YUCATÁN. AGOSTO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México
Coordinación del Posgrado, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología,
Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510
Teléfono y Fax: (52) 56-22-5803, 5829, 5990 y 5991
Correo electrónico: posgrado@mar.icmyl.unam.mx
http://www.unam.mx/ciencias_mar_posgrado



OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN LAS GLÁNDULAS SALIVALES POSTERIORES DEL PULPO

Octopus maya

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

**Maestro en Ciencias
(Química acuática)**

P r e s e n t a

DAWRIN JESUS PECH PUCH

Director de tesis: Dr. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

Comité tutorial: Dr. LEOVIGILDO QUIJANO
Dra. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
Dr. CARLOS ROSAS VÁSQUEZ

Unidad Académica Sisal, Yucatán 2014

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo esta dedicado a mis padres:

Juan y Leydi

Ya que sin su apoyo, comprensión, amor e inspiración no hubiera podido lograrlo.

Agradezco a toda mi familia en especial a mis hermanas: Cindy y Grelty.

A esa persona tan especial, gracias por estar junto ami en esta vida:

Te amo mi pedacito de Océano....

A mi director de tesis Dr. Sergio Rodriguez Morales por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por todo el conocimiento compartido, la confianza y amistad brindada durante esta parte de mi vida.

A mi comité tutorial: Dr. Leovigildo quijano, Dra. Judith sánchez y Dr. Manuel Aguilar por sus comentarios los cuales enriquecieron mas, este trabajo.

Al Dr. Carlos Rosas Vásquez por su apoyo incondicional (conocimiento, equipo de trabajo, etc.) gracias.

A la Dra. Irma Soria Mercado por su apoyo, tiempo y consejos. Que aunque no se realizó la estancia, estoy muy agradecido por toda la ayuda.

A la encargada técnica del Laboratorio A de la Unidad de Quimica en Sisal, M. en C. Korynthia López Águilar; por toda la ayuda, consejos y amistad.

A la encargada técnica del Laboratorio B de la Unidad de Quimica en Sisal, Dra. Elsa Noreña Barroso por su tiempo y apoyo.

A las encargadas del laboratorio central por facilitarme el trabajo de laboratorio y siempre estar dispuestas a ayudar: Karlita y Elisa.

Gracias a todos los compañeros y amigos que conocí durante mi estancia en la Unidad: Jenie, Lety, Yesica, Jesica, Yolitzin, Diana, Gaby, Magda, Karina, Ismael, José, Edén, Esaú, Lalo, Abraham, Angel, Cuba, Fernando, Martín, Roberto, Daniel, Iratzio. Y los ya conocidos que también ayudaron: Marito y Papo.

Dr. Carlos Gonzales Salas: sin su ayuda no habría iniciado esto y que a pesar de estar lejos, siempre está pendiente. Gracias a usted cada día soy mejor estudiante y mejor persona.

Financiamiento:

- Proyecto FOMIX del estado de Yucatán No. **107350** “Obtención de Productos naturales de origen marino de la saliva del pulpo rojo (*Octopus maya*) como antiespasmódicos”.
- Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) TA200314-2 "Aislamiento de neuropéptidos presentes en la saliva del pulpo rojo de Yucatán (*Octopus maya*) y su evaluación como posible fármaco en el mal de Alzheimer"

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca para realizar mis estudios de Maestría.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	X
1.0 INTRODUCCIÓN	1
2.0 ANTECEDENTES	5
2.1 Productos naturales.....	5
2.2 Productos naturales de origen marino.....	6
2.2.1 Desventajas de los productos naturales de origen marino...	7
2.2.1.1 Incertidumbre taxonómica.....	7
2.2.1.2 Purificación de compuestos solubles en agua: efectos de un alto contenido de agua y sales.....	8
2.2.1.3 Cantidades pequeñas de metabolitos.....	8
2.2.1.4 Quiralidad de los metabolitos.....	10
2.2.1.5 Inestabilidad de los metabolitos.....	10
2.2.1.6 Dificultad de reabastecimiento.....	11
2.2.1.7 Compuestos no visibles en la región Ultravioleta....	11
2.3 Bioprospección.....	11
2.4 Bioprospección en moluscos.....	12
2.4.1 Bioprospección en cefalópodos.....	13
2.5 Productos naturales aislados del veneno de cefalópodos.....	14
2.6 El pulpo rojo de Yucatán <i>Octopus maya</i>	20
2.6.1 Importancia de la especie.....	20
2.6.2 Descripción de la especie.....	22
2.6.2.1 Ubicación taxonómica del pulpo <i>Octopus maya</i>	22
2.6.2.2 Distribución geográfica.....	22
2.6.2.3 Descripción general.....	23
2.6.2.4 Estrategia de alimentación.....	24
3.0 JUSTIFICACIÓN	27
4.0 HIPÓTESIS	28
5.0 OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo general	28
5.2 Objetivos específicos	28
6.0 METODOLOGÍA	29
6.1 Materiales.....	29
6.2 Instrumentación.....	29
6.2.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).....	29
6.2.2 Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS).....	30
6.2.3 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).....	31
6.3 Área de colecta.....	32
6.4 Colecta de las Glándulas Salivales Posteriores (GSP) del pulpo <i>Octopus maya</i>	33

6.5 Extracción acuosa de las GSP del pulpo <i>Octopus maya</i>	33
6.6 Obtención de la fracción metabólica (F1_1) y neurotóxica (F1_2) a partir del extracto crudo de las GSP del pulpo <i>Octopus maya</i> mediante ultrafiltración.....	34
6.6.1 Determinación de la actividad neurotóxica mediante el bioensayo <i>in vivo</i> en cangrejo fantasma (<i>Ocypode quadrata</i>).....	34
6.6.2 Determinación del intervalo de pesos moleculares de los compuestos presentes en la fracción neurotóxica (F1_2).....	35
6.7 Separación biodirigida de la fracción neurotóxica (F1_2) por Extracción en Fase Sólida (EFS) en cartucho de fase reversa.....	36
6.7.1 Análisis mediante CLAR de las fracciones F2_1 (actividad paralizante) y F2_2 (actividad relajamiento-descoordinación motora) obtenidas de la separación de la fracción neurotóxica F1_2.....	37
6.7.1.1 Determinación del perfil total de aminoácidos presentes en la fracción F2_2 (actividad relajamiento-descoordinación motora).....	37
6.7.1.2 Determinación del perfil total de aminoácidos libres presentes en la fracción F2_1 (actividad paralizante).....	39
6.8 Separación biodirigida de la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2) en cartucho de intercambio catiónico fuerte.....	39
6.8.1 Aislamiento del neuropéptido presente en la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2_5) mediante CLAR semipreparativa.....	40
6.8.2 Determinación de la secuencia del neuropéptido presente en la fracción (F2_2_5) mediante LC-MS.....	40
6.9 Estudio comparativo de la saliva generada <i>in vivo</i> con respecto del extracto generado mediante la extracción acuosa de las GSP en condiciones de pesquería.....	40
6.9.1 Extracción de la saliva <i>in vivo</i>	40
6.9.2 Separación y comparación del extracto neurotóxico obtenido a partir de las GSP <i>versus</i> el obtenido a partir de la saliva <i>in vivo</i>	41
7.0 RESULTADOS	43
7.1 Separación de la fracción neurotóxica (F1_2) mediante CLAR.....	45
7.2 Separación biodirigida de la fracción neurotóxica (F1_2) por EFS en cartucho de fase reversa.....	47
7.2.1 Análisis de la fracción causante de la actividad paralizante (F2_1) (completamente polar) mediante CLAR.....	49
7.2.1.1 Determinación del perfil total de aminoácidos libres presentes en la fracción causante de la actividad paralizante (F2_1).....	51
7.2.2 Análisis de la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2) (medianamente polar) mediante CLAR.....	52

7.2.2.1 Determinación del perfil total de aminoácidos presentes en la fracción causante de la actividad relajamiento- descoordinación motora (F2_2).....	52
7.3 Separación de la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2) mediante EFS en cartucho de intercambio catiónico fuerte.....	54
7.3.1 Aislamiento del neuropéptido presente en la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2_5) mediante CLAR semipreparativa.....	55
7.3.1.1 Primera determinación del perfil total de aminoácidos del neuropéptido aislado de la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2_5).....	56
7.3.1.2 Segunda determinación del perfil total de aminoácidos del neuropéptido aislado de la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2_5).....	57
7.3.2 Análisis espectrométricos del neuropéptido presente en la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2_5) aislado a partir de las GSP del pulpo <i>Octopus maya</i>	61
7.3.3 Evaluación de la bioactividad de la fracción neurotóxica F2_2_5.....	66
7.3.3.1 Evaluación de la actividad en un modelo de crustáceos: <i>Ocypode quadrata</i>	66
7.3.3.2 Evaluación de la actividad sobre un octópodo: <i>Octopus maya</i>	68
7.4 Esquema de trabajo de la separación biodirigida realizada a partir de las GSP.....	69
7.5 Extracción de la saliva <i>in vivo</i> y su comparación con respecto al extracto generado de las GSP en condiciones de pesquería.....	70
7.5.1 Comparación de la fracción F2_1 causante de la actividad paralizante obtenida de la saliva <i>in vivo versus</i> GSP.....	72
7.5.1.1 Determinación y comparación del perfil total de aminoácidos libres presentes en la fracción causante de la actividad paralizante obtenida de la saliva <i>in vivo versus</i> GSP.....	74
7.5.2 Comparación de la fracción F2_2_5 causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora obtenida de la saliva <i>in vivo versus</i> GSP.....	76
7.6 Esquema de trabajo de la separación biodirigida realizada a partir de la saliva <i>in vivo</i>	79
8.0 DISCUSIÓN.....	80
9.0 CONCLUSIONES.....	88
10.0 BIBLIOGRAFÍA.....	90

I.- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Moléculas aisladas de la saliva de pulpo de diferentes especies: (a) Octopamina, (b) Tiramina, (c) Serotonina, (d) Histamina, OctTK-I taquicinina I del <i>Octopus vulgaris</i> , OctTK-II taquicinina II del <i>Octopus vulgaris</i> , OctTK-III taquicinina I del <i>Octopus kaurna</i> y Eld Eledoisina, taquicinina aislada de <i>Eledona moschata</i> .	4
Figura 2. (a) Estructura de la esponjistatina 4; (b) esponja marina de Sudáfrica <i>Spirastrella spinispirulifera</i> ahora llamada <i>Trachycladus spinispirulifer</i> (Carter, 1879).	9
Figura 3. (a) Estructura de la dolastatina 10; (b) liebre de mar <i>Dolabella auricularia</i> (Lightfoot, 1786).	9
Figura 4. Estructura de la palitoxina, toxina aislada del zoántido <i>Palythoa toxica</i> , la cual presenta una estructura compleja.	10
Figura 5. Distribución geográfica de <i>Octopus maya</i> .	22
Figura 6. Ejemplar del pulpo rojo <i>Octopus maya</i> .	24
Figura 7. (a) Esquema de la fisiología de la masa bucal de un cefalópodo (modificado de Fry <i>et al.</i> , 2009); (b) fotografías (lateral y superior) del extremo anterior de la masa bucal del pulpo <i>Eledone cirrhosa</i> (modificado de Runham <i>et al.</i> , 1997).	25
Figura 8. Área relativa de pesca artesanal del pulpo <i>Octopus maya</i> , asignada a los pescadores de la Cooperativa “Tigres del Mar” en Sisal Yucatán.	32
Figura 9. Esquema de la técnica del arte de pesca artesanal “Jimba y Gareteo”.	33
Figura 10. Efecto del extracto crudo de las GSP. (a) Colecta de cangrejos fantasma para la realización de los bioensayos. (b) Inyección en el tercer pereiópodo del crustáceo. (c) Control negativo (es notoria la posición de ataque del cangrejo, junto con las quelas). (d) Efecto neurotóxico del extracto crudo (13 mg de extracto / 100 µL de agua inyectable), se puede observar la relajación de los músculos de los apéndices, así como la poca coordinación del crustáceo.	43
Figura 11. Efecto de los extractos de las GSP separados por la Membrana Amicon Millipore con corte de 3 kDa. (a) Efecto neurotóxico del extracto de GSP con peso molecular menor a 3 kDa (13 mg de extracto / 100 µL agua inyectable), se puede observar la poca coordinación del cangrejo y el movimiento exacerbado de los ojos. (b) Muerte del cangrejo, producto del efecto del extracto con peso molecular mayor a 3 kDa.	44
Figura 12. Cromatograma de la fracción neurotóxica (F1_2); en el cual aparecen los tiempos de retención seleccionados para colectar las 9 fracciones que se separaron (F1 no fue colectada).	45
Figura 13. Cromatograma de las fracciones activas separadas de la fracción neurotóxica (F1_2). Cada fracción se presenta en diferente color y se han sobrepuesto todos los cromatogramas para una mejor visualización.	46
Figura 14. SDS-PAGE de la fracción neurotóxica F1_2 en gel de poliacrilamida. Carril1: muestra de la F1_2 diluida (30 µg/µL); carril 2 y 4: marcador (peso molecular de 40 kDa a 5 kDa), carril 3: muestra de la F1_2 concentrada (50 µg/µL).	47
Figura 15. Cromatograma de la fracción F2_1, donde se observan dos señales	48

principales al inicio del análisis.	
Figura 16. Cromatograma de la fracción F2_2 obtenida de la separación por EFS en cartucho C18-U; donde es notoria la presencia de una sola señal principal.	48
Figura 17. Cromatograma de la fracción paralizante derivatizada con BTSFA, obtenido mediante GC-MS.	50
Figura 18. Aminograma obtenido de la fracción F2_1. Estándar usado: 100 pmol de c/u de los 18 aminoácidos, 50 pmol de cisteína y 100 pmol de ácido 2-aminobutírico (AABA) como estándar interno.	51
Figura 19. Aminograma de la fracción F2_2; en color negro, se visualiza el aminograma de un estándar de aminoácidos hidrolizado (100 pmol de c/u de los 18 aminoácidos, 50 pmol de cisteína y 100 pmol de ácido 2-aminobutírico (AABA) como estándar interno); en color azul, el aminograma de la F2_2.	52
Figura 20. Comparación de los cromatogramas obtenidos para la separación de la fracción F2_2. (a) Con gradiente de 0 a 35 % de acetonitrilo-agua, en donde se logró obtener una sola señal principal. (b) Con gradiente de 0 a 18 % de acetonitrilo-agua, donde es evidente una mejor separación de las señales constituyentes de la fracción.	53
Figura 21. Cromatograma de la fracción F2_2_5 en CLAR analítica; en donde se visualiza la presencia de una sola señal principal en el tiempo de análisis.	55
Figura 22. Cromatograma de la fracción F2_2_5 en CLAR semipreparativa; en el que se indican los tiempos de retención en los que se colectó la muestra (fracción tres) correspondiente a la señal principal.	55
Figura 23. Aminogramas de la fracción F2_2_5. (a) Aminograma de la muestra colectada. (b) Integración del aminograma de la muestra colectada (color negro), con el estándar de aminoácidos (color azul) de 100 pmol de c/u de los 18 aminoácidos, 50 pmol de cisteína y 100 pmol de ácido 2-aminobutírico (AABA) como estándar interno.	56
Figura 24. Cromatograma de la muestra colectada (señal principal) de la fracción F2_2_5 de las GSP.	57
Figura 25. Aminograma del estándar de 17 aminoácidos.	59
Figura 26. Aminograma del estándar de 17 aminoácidos (color rojo) <i>versus</i> la muestra hidrolizada con ácido, colectada de la fracción F2_2_5 (color azul).	61
Figura 27. Aminograma del estándar de 17 aminoácidos (color rojo) <i>versus</i> la muestra hidrolizada con ácido, colectada de la fracción F2_2_5 (color rosa).	61
Figura 28. Cromatogramas generados del análisis de las muestras obtenidas de la fracción F2_2_5 a partir de las Glándulas Salivales Posteriores (GSP); (a) Método 1, (b) Método 2.	63
Figura 29. Cromatograma y Espectro de masas obtenidos por LC-MS-ESI del polipéptido aislado de la fracción F2_2_5. (a) Cromatograma, (b) Espectro de Alta energía (High CID) del pico que eluye a 11.48 min	65
Figura 30. (a) Sedación del pulpo antes de realizar la disección. (b) Disección del pulpo, donde se pueden observar las GSP. (c) Obtención de la saliva <i>in vivo</i> , utilizando un par	70

de cables conductores de energía conectados a una pila de 9 Voltios.	
Figura 31. Cromatogramas obtenidos de la separación de la fracción F2_1. (a) Cromatograma de la fracción obtenida a partir de la saliva <i>in vivo</i> . (b) Cromatograma de la fracción obtenida a partir de las GSP.	72
Figura 32. Comparación de los cromatogramas obtenidos de la separación de la fracción F2_1; en color rosa, cromatograma de la fracción obtenida a partir de la saliva <i>in vivo</i> ; en color rojo, cromatograma de la fracción obtenida a partir de las GSP.	73
Figura 33. Aminogramas obtenidos de la fracción F2_1: (a) a partir de la saliva <i>in vivo</i> , (b) comparación de los aminogramas obtenidos vía saliva <i>in vivo</i> (color negro) versus GSP (color rosa). Estándar usado: 100 pmol de c/u de los 18 aminoácidos, 50 pmol de cisteína y 100 pmol de ácido 2-aminobutírico (AABA) como estándar interno.	74
Figura 34. Aminograma obtenido de la muestra colectada (TR: 3-4 min) de la fracción F2_1. Estándar usado: 100 pmol de c/u de los 18 aminoácidos, 50 pmol de cisteína y 100 pmol de ácido 2-aminobutírico (AABA) como estándar interno.	75
Figura 35. Cromatogramas obtenidos de la separación de la fracción F2_2_5; (a) cromatograma de la fracción obtenida a partir de la saliva <i>in vivo</i> , (b) cromatograma de la fracción obtenida a partir de las GSP.	76
Figura 36. Comparación de los cromatogramas obtenidos de la separación de la fracción F2_2_5; en color azul, cromatograma de la fracción obtenida a partir de la saliva <i>in vivo</i> ; en color negro, cromatograma de la fracción obtenida a partir de las GSP.	77

II.- ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de los principales compuestos aislados a partir de las GSP y saliva de diversos cefalópodos (imágenes obtenidas de http://www.marinespecies.org/index.php ; http://eol.org/ y http://www.arkive.org/).	16
Tabla 2. Reactivos para preparar el Gel de Poliacrilamida (PAGE en inglés).	35
Tabla 3. Fracciones obtenidas de la separación de la fracción neurotóxica F1_2, en cartucho C18-U.	37
Tabla 4. Fracciones obtenidas de la separación de la fracción con actividad relajamiento-descoordinación motora F2_2, en cartucho catiónico fuerte.	39
Tabla 5. Resultados del fraccionamiento por EFS en cartucho Strata C18-U (55 µm, 70 A, Phenomenex) de la fracción neurotóxica (250 mg de la F1_2 en 2 mL de agua).	47
Tabla 6. Resultados del fraccionamiento por EFS en cartucho de intercambio catiónico fuerte (SXC-Strata de Phenomenex®) de la fracción F2_2 del cartucho Strata C18-U (55 µm, 70 A, Phenomenex) (21 mg de la F2_2 en 2 mL de agua).	54
Tabla 7. Condiciones de la separación analítica, utilizando un gradiente de 0 a 45 % con dos fases móviles en 40 minutos. Fase A: agua con 0.1 % de TFA y 0.2 % de HFBA y Fase B: metanol.	59
Tabla 8. Lista de aminoácidos observados en el cromatograma de la fracción F2_2_5.	60
Tabla 9. Pesos moleculares de los posibles polipéptidos, de acuerdo a los aminoácidos detectados en el análisis de perfil de aminoácidos por DEDL.	64
Tabla 10. Resultados de la Dosis Efectiva Mínima (DEM).	67
Tabla 11. Resultados de la purificación para la obtención de la fracción paralizante y relajamiento-descoordinación motora a partir de las GSP.	67
Tabla 12. Resultados del fraccionamiento por EFS en cartucho Strata C18-U (55 µm, 70 A, Phenomenex) de la fracción neurotóxica de la saliva <i>in vivo</i> (92.4 mg en 2 mL de agua).	71
Tabla 13. Resultados del fraccionamiento por EFS en cartucho de intercambio catiónico fuerte (SXC-Strata de Phenomenex®) de la fracción F2_2 del cartucho Strata C18-U (55 µm, 70 A, Phenomenex) obtenida de la saliva <i>in vivo</i> (6.3 mg en 2 mL de agua).	71
Tabla 14. Resultados de la purificación para la obtención de la fracción paralizante y de la relajamiento-descoordinación motora a partir de la saliva <i>in vivo</i> .	78
Tabla 15. Aminoácidos encontrados en la fracción F2_1 con actividad paralizante; en naranja se señalan los aminoácidos concordantes.	83
Tabla 16. Aminoácidos encontrados en la fracción con actividad relajamiento-descoordinación motora; en naranja se señalan los aminoácidos concordantes.	85

III.- GLOSARIO DE ABREVIATURAS

GSP	Glándulas Salivales Posteriores
CCF	Cromatografía en Capa Fina
EFS	Extracción en Fase Sólida
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography- Mass Spectrometry Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
LC-MS	Liquid Chromatography- Mass Spectrometry Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas
DEM	Dosis Efectiva Mínima
MeOH	Metanol
AcCN	Acetonitrilo
TFA	Ácido Triflouracético
HFBA	Ácido Heptafluorobutírico
NH₄OH	Hidróxido de amonio
kg	Kilogramos
g	Gramos
p/v	Peso/Volumen
µg	Microgramos
L	Litros
mL	Mililitro
µL	Microlitros
m	Metros
V	Voltios

1.0 INTRODUCCIÓN.

Actualmente la producción de recursos pesqueros provenientes del océano es de 85 millones de toneladas, casi el 63 % de la producción mundial pesquera [1]. Esta situación ha sido generada por la modernización y el aumento en la capacidad de los buques pesqueros que han incrementado el número de oportunidades y la habilidad para encontrar y extraer organismos en el océano. Hoy en día, la mayoría de las especies pesqueras son explotadas a su límite; por tanto, la búsqueda del aprovechamiento sustentable de las diversas poblaciones pesqueras ha provocado el incremento en la utilización total de los organismos capturados, dado que generalmente, no todo lo que se obtiene del mar es adecuadamente usado [2]. A estos productos que no tienen una utilización directa o no se consideran ordinariamente vendibles se les conoce como “subproductos” (p.e. el eviscerado o descabezado). Estos subproductos generados por las plantas procesadoras de mariscos varían desde el 30 % al 85 % del peso de los organismos desembarcados [3].

Además de que estos subproductos representan un desperdicio parcial de los recursos naturales, pueden provocar problemas ecológicos (materia orgánica arrojada al mar que puede producir cambios en el ecosistema), ambientales (mantenimiento de sustancias tóxicas derivadas de tierra: PCB, dioxinas, metales pesados, etc.) y toxicológicos (propagación de parásitos presentes en las vísceras de los pescados tales como Anisakis) [1].

Los subproductos marinos contienen lípidos valiosos, fracciones de proteínas, ácidos nucleicos, minerales y otros compuestos bioactivos tales como la “astaxantina” un carotenoide utilizado como agente antioxidante y útil para la prevención de ciertos tipos de cáncer. Por tanto, la generación de productos con valor agregado a partir de subproductos es una técnica que se ha implementado para optimizar y aminorar la producción de desechos; por ejemplo la obtención de enzimas (serin-proteasas, tripsina, quimotripsina, elastina y colagenasa) a partir de intestinos de pescado, las cuales poseen aplicaciones médicas, farmacéuticas, cosméticas, higiénicas e industriales [2].

Una pesquería importante es la del pulpo rojo *Octopus maya*, especie endémica y uno de los recursos pesqueros más importantes de la Península de Yucatán [4, 5, 6, 7] y la quinta a nivel nacional. Respecto a su captura, no todo el producto es consumido; el 85 % se comercializa para consumo humano y el 15 % restante corresponde a subproductos (cerebro, estómago, pico, ojos, glándulas salivales, etc.) que son desechados al mar o confinados al basurero durante su evisceración [1]. Dentro de estas vísceras se encuentran las glándulas salivales posteriores, donde se produce la saliva, que ha demostrado ser vital en la mayoría de los octópodos, ya que muchos de ellos la utilizan para paralizar y matar a sus presas. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que indiquen si el *Octopus maya* produce esta secreción salival.

Cuando un pulpo emerge para alimentarse, en general de crustáceos y moluscos bivalvos, suele atraer a sus víctimas moviendo rápidamente la punta de un brazo como si fuera un gusano, o puede aproximarse deslizándose y precipitarse sobre su presa, envolviéndolo en su red de ventosas para asegurar una rápida inmovilización. Entonces coloca a su presa de tal forma que la parte anterior del cangrejo está cerca de su masa bucal, utilizando su rádula para generar un agujero en el caparazón o en la córnea del cangrejo, donde inyecta su saliva mediante la papila salival. Esta secreción salival es generada en las Glándulas Salivales Posteriores (GSP) y es transportada a la papila salival [8].

La saliva del pulpo tiene un efecto poderoso en el cangrejo, ya que lo paraliza en 1-2 minutos, se inhibe su respiración y aunque su corazón late, muere 10 minutos más tarde [9]. Además, la saliva contiene diferentes proteínas que comienzan la digestión del cangrejo, tales como tripsina, quimotripsina y quitinasas [10].

Diferentes grupos han estudiado las propiedades farmacológicas de los extractos de las glándulas salivales posteriores de los cefalópodos; por ejemplo, se han aislado aminas biogénicas como la tiramina [11], histamina [12], octopamina y serotonina [13] (**Figura 1**). Una proteína aislada de *Octopus vulgaris*, a la cual se le denominó cefalotoxina, causa la parálisis en cangrejos y después de 5 minutos su muerte [13]. Otras dos proteínas paralizantes, llamadas alfa y beta

cefalotoxinas con un peso molecular de aproximadamente 91, 200 y 33, 900 Da respectivamente, se aislaron de las GSP de *Octopus vulgaris* [14].

La eledoisina se aisló de los extractos con acetona de las GSP de *Eledona moschata* y *Eledona aldrovandi* (ahora *Eledone cirrhosa*), resultando ser un decapeptido que estimulaba las preparaciones del músculo liso de diferentes mamíferos, además de tener actividad hipotensora [15]. La toxina más estudiada de los cefalópodos, es la tetrodotoxina, ya que causó la muerte de varias personas que se encontraron con el pulpo de anillos azules *Hapalochlaena maculosa* [16]. Key y colaboradores en el 2002, encontraron que la saliva de *Eledona cirrhosa* tiene actividad hemolítica contra eritrocitos de mamíferos en concentraciones muy bajas; además, de presentar actividad insecticida [9].

Por último, recientemente, se han caracterizado dos taquicininas de la saliva de *Octopus vulgaris* que presentaron actividad sobre el íleon de cobayo, induciendo contracciones rápidas del íleon [17] y una de las GSP de *Octopus kaurna* con actividad más potente [18] (**Figura 1**). Las taquicininas son neuropéptidos que tiene actividad sobre el sistema nervioso central y entérico, y están conservadas desde los insectos hasta los mamíferos. Una propiedad interesante de este tipo de neuropéptidos es la inhibición de la placa β -amiloide implicada en el mal de Alzheimer [19].

Por tanto, el aprovechamiento de las glándulas salivales posteriores del pulpo *Octopus maya* para la obtención de productos naturales resultaría en una gran oportunidad para el descubrimiento de compuestos químicos y además contribuiría a la utilización total de los productos obtenidos durante su pesquería.

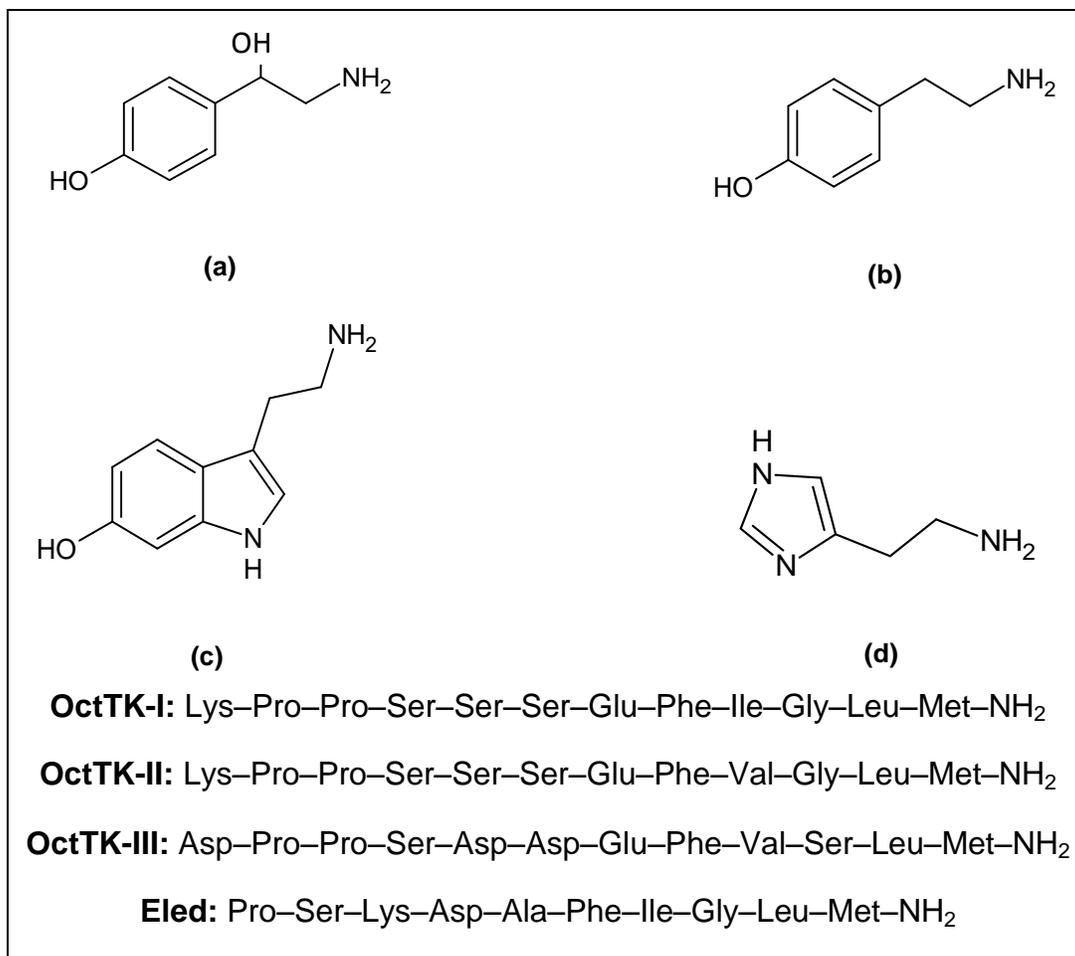


Figura 1. Moléculas aisladas de la saliva de pulpo de diferentes especies: **(a)** Octopamina, **(b)** Tiramina, **(c)** Serotonina, **(d)** Histamina, **OctTK-I** taquicinina I del *Octopus vulgaris*, **OctTK-II** taquicinina II del *Octopus vulgaris*, **OctTK-III** taquicinina I del *Octopus kaurna* y **Eled** Eledoisina, taquicinina aislada de *Eledona moschata*.

2.0 ANTECEDENTES.

2.1 Productos naturales.

Los llamados productos naturales son aquellas moléculas orgánicas pequeñas (< 2, 000 uma) que un organismo (unicelular o pluricelular) sintetiza y que no se requieren de manera estricta para la supervivencia de los organismos; sin embargo son importantes, porque constituyen defensas contra sus depredadores y comprenden una variedad de compuestos químicos que se caracterizan por ser específicos para cada especie [20].

El interés en el estudio de los productos naturales se ha incrementado en años recientes debido a que representan un reservorio formidable para la generación de nuevos medicamentos [21]. Los productos naturales incluyen clases de compuestos como: terpenoides, policétidos, aminoácidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, bases de ácidos nucleicos, ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), etc.; cuyo uso terapéutico a lo largo de la historia humana, ha sido a base de plantas. No es por tanto sorprendente que aproximadamente el 80 % de la población mundial dependa principalmente de medicamentos tradicionales como agentes de atención a la salud primaria [20]. Los datos de auditoría nacional con receta a partir de 1976 mostraron que aproximadamente el 40 % de las prescripciones de Estados Unidos contenían productos naturales derivados de plantas y microorganismos [20].

Para 1996 los productos naturales representaban menos del 1 % de todos los compuestos químicos publicados; sin embargo conformaban el 35 % o \$230 mil millones de dólares del total de ventas de productos farmacéuticos [22]. Por tanto, es de esperarse que las sustancias farmacológicas de los productos naturales puros, junto con sus derivados y compuestos sintéticos deducidos a partir de un precursor de producto natural, representen la mayor parte del mercado farmacéutico actual [23, 24].

La búsqueda de productos naturales se limita al descubrimiento y el desarrollo de medicamentos modernos que se han aislado o derivado a partir de fuentes naturales [25]. A causa de su acumulación en las vías enzimáticas, los productos

naturales tienen demostrada su capacidad para unirse a la enzima o en general a las proteínas objetivo y por lo tanto, también interactúan con las proteínas de la enfermedad destinada [26].

Es por todo lo anterior que los productos naturales pueden contribuir a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos en diferentes ámbitos: actuando como nuevos medicamentos que se pueden utilizar sin modificar, proporcionando bloques químicos de construcción para la síntesis de nuevos fármacos e indicando nuevos mecanismos farmacológicos de acción que permitan completar la síntesis de nuevos análogos.

Los productos naturales, seguirán siendo considerados como una de las mayores fuentes para la obtención de nuevos fármacos, no sólo por su diversidad estructural incomparable y su tamaño relativamente pequeño, sino también porque prometen propiedades similares a los fármacos; es decir, pueden ser absorbidos y metabolizados. Así mismo, es importante señalar que juegan un papel crucial para satisfacer la demanda en la exploración de nuevas moléculas, dado el aumento en la búsqueda de éstas [21].

2.2 Productos naturales de origen marino.

Los organismos marinos han evolucionado para colonizar una gran variedad de nichos ecológicos y con el afán de adaptar su existencia en esa amplia variedad de hábitats, han desarrollado una diversidad de rutas metabólicas secundarias, que producen un vasto número de compuestos químicos con el fin de adecuar su estilo de vida; estos incluyen una extensa gama: terpenos, péptidos, alcaloides, policétidos y un sin fin de estructuras desconocidas y sin caracterizar [21].

A pesar de que cerca de 21, 000 diferentes productos naturales marinos han sido aislados hasta ahora [27], este campo científico es todavía joven, en comparación con la larga tradición de investigación de productos naturales en el medio terrestre.

Dado el hecho de que más del 70 % de la superficie de la Tierra está cubierta por océanos y teniendo en cuenta además la rica biodiversidad del mar (varios Phyla del reino animal, como el Porífera y Bryozoa son exclusivamente acuáticos) estas

esperanzas parecen realmente justificadas. De hecho, estudios realizados en organismos marinos han llevado al aislamiento de una gran cantidad de metabolitos secundarios estructuralmente novedosos, que son desconocidos en el hábitat terrestre y por lo tanto constituyen una biblioteca potencial para el descubrimiento de compuestos líderes que puede derivar en el descubrimiento de fármacos [28].

En la última década, más de 5, 000 productos naturales de origen marino han sido publicados y muchos de estos compuestos han probado su potencial en diversos campos, particularmente como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer [21].

2.2.1 Desventajas de los productos naturales de origen marino.

Los organismos marinos contienen una enorme diversidad de productos naturales aún por descubrir y si bien, gracias a los grandes avances en la tecnología se han mejorado las técnicas de separación y aislamiento de dichos productos, aún existen algunas dificultades durante el proceso de obtención de los productos naturales, entre las principales podemos mencionar [20]:

2.2.1.1 Incertidumbre taxonómica.

La información taxonómica de los organismos puede facilitar las búsquedas bibliográficas sobre los reportes de compuestos producidos por la especie en estudio, así como los métodos de purificación.

Esto tiene cierto impacto en la selección del mejor esquema de purificación de los metabolitos nuevos; sin embargo, la identificación taxonómica de los organismos marinos es un reto y si ésta resulta incorrecta o incompleta puede causar dificultades al momento de realizar suposiciones acerca de la química que un organismo puede contener; por tanto la quimiotaxonomía, ciencia encargada de predecir los tipos de compuestos que puede contener un organismo, no siempre tiene éxito [20].

2.2.1.2 Purificación de compuestos solubles en agua: efectos de un alto contenido de agua y sales.

Existen muchas dificultades asociadas con el aislamiento y purificación de los compuestos altamente solubles en agua; debido a que éstos son extremadamente polares, se necesita utilizar un medio acuoso o bien disolventes muy polares como el metanol para realizar la extracción. En el caso de disoluciones acuosas, un problema inevitable es el crecimiento bacteriano y fúngico, el cual frecuentemente degrada los compuestos activos o bien genera falsos positivos en los bioensayos debido a las endotoxinas producidas por los microorganismos. La concentración de extractos acuosos también genera problemas, dado que se requiere una alta temperatura para evaporar el agua. Por otro lado, también es importante mencionar que los extractos acuosos contienen de manera frecuente agentes surfactantes, los cuales pueden causar burbujeo durante el proceso de concentración [20].

La abundancia de sales contenidas en el agua de mar de los extractos acuosos dificulta el proceso de extracción y fraccionamiento, ocasionando en la mayoría de los casos la necesidad de utilizar soluciones amortiguadoras.

2.2.1.3 Cantidades pequeñas de metabolitos.

Otra importante limitación de los métodos actuales es que la mayoría de los productos naturales marinos existen en muestras que son demasiado pequeñas para la industria química y farmacéutica.

Por ejemplo, la cantidad límite para realizar una técnica química común para el descubrimiento de compuestos bioactivos es de aproximadamente 10 µg. Sin embargo, esta cantidad de material no se aproxima a la requerida para la generación de fármacos o estudios biológicos [21].

La presencia de un metabolito muy potente en cantidades pequeñas puede complicar el proceso de extracción y aislamiento. Esto requiere una gran cantidad del organismo en estudio para el aislamiento del metabolito activo a un nivel que permita su posterior elucidación estructural. Un ejemplo es el aislamiento de sólo 10.7 mg del potente macrólido antitumoral “espongistatina 4” (**Figura 2**), para el

cual se requirieron aproximadamente 2.5 toneladas de la esponja marina de Sudáfrica *Spirastrella spinispirulifera* ahora llamada *Trachycladus spinispirulifer* (Carter, 1879). Los ensayos para reducir la biomasa de la esponja resultaron extremadamente laboriosos y fue necesario el uso de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) utilizando columnas que eran casi de 3 metros de largo y 15 cm de diámetro [20].

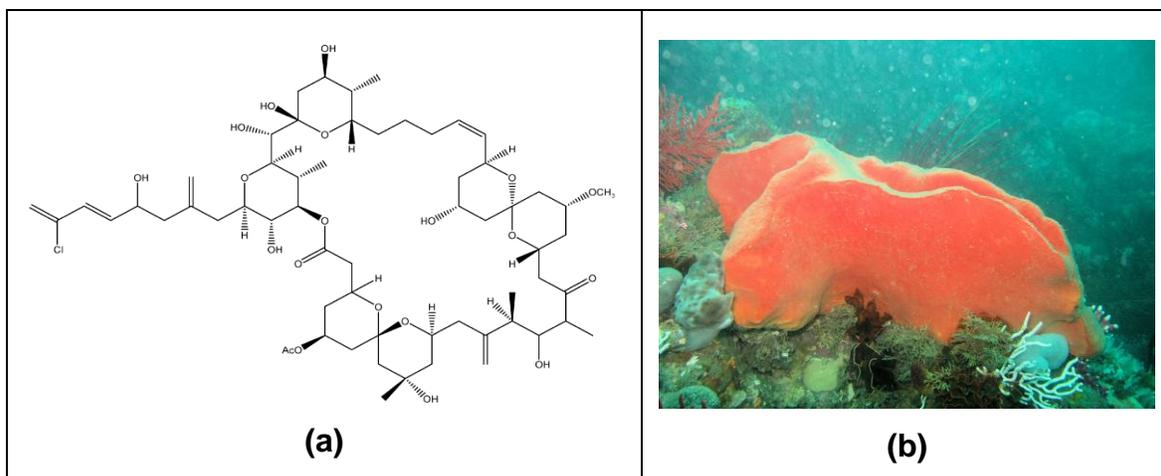


Figura 2. (a) Estructura de la espongistatina 4; (b) esponja marina de Sudáfrica *Spirastrella spinispirulifera* ahora llamada *Trachycladus spinispirulifer* (Carter, 1879).

Otro ejemplo es el aislamiento de casi 1 mg del péptido antitumoral dolastatina 10 (**Figura 3**), para el cual se necesitaron aproximadamente 2 toneladas de la liebre de mar *Dolabella auricularia* (Lightfoot, 1786) colectada en el Océano Índico.

La colecta duró casi 10 años y el proceso de separación fue muy difícil, incluyendo un total de 23 pasos utilizando diversas técnicas cromatográficas. Posteriormente, se hizo evidente que la dolastatina 10 podría ser producida por una cianobacteria que crece en *Dolabella auricularia* (Lightfoot, 1786) [20].

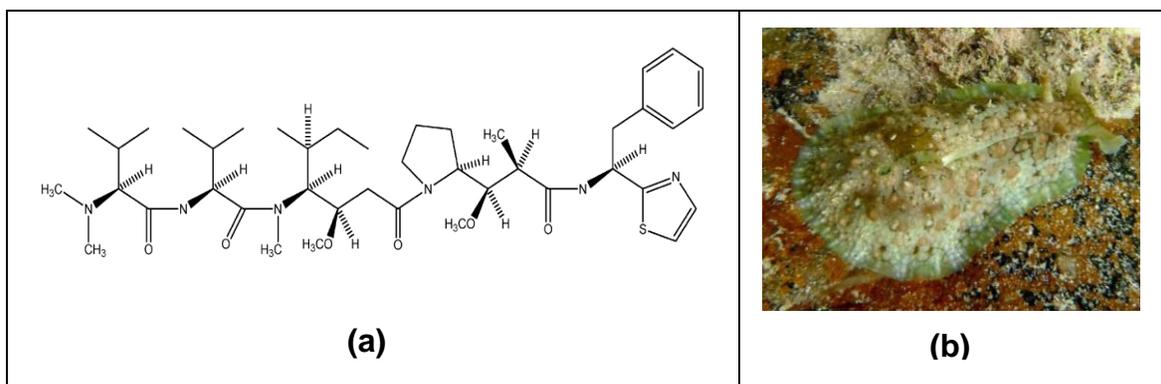


Figura 3. (a) Estructura de la dolastatina 10; (b) liebre de mar *Dolabella auricularia* (Lightfoot, 1786).

2.2.1.4 Quiralidad de los metabolitos.

Los productos naturales marinos abarcan una gama de estructuras desde muy simples hasta muy complejas, afortunadamente con el avance tecnológico en la capacidad de análisis estructural de moléculas orgánicas, ha sido posible determinar la estructura completa de compuestos naturales tan complejos como la palitoxina, que cuenta con 64 centros quirales [20] (**Figura 4**).

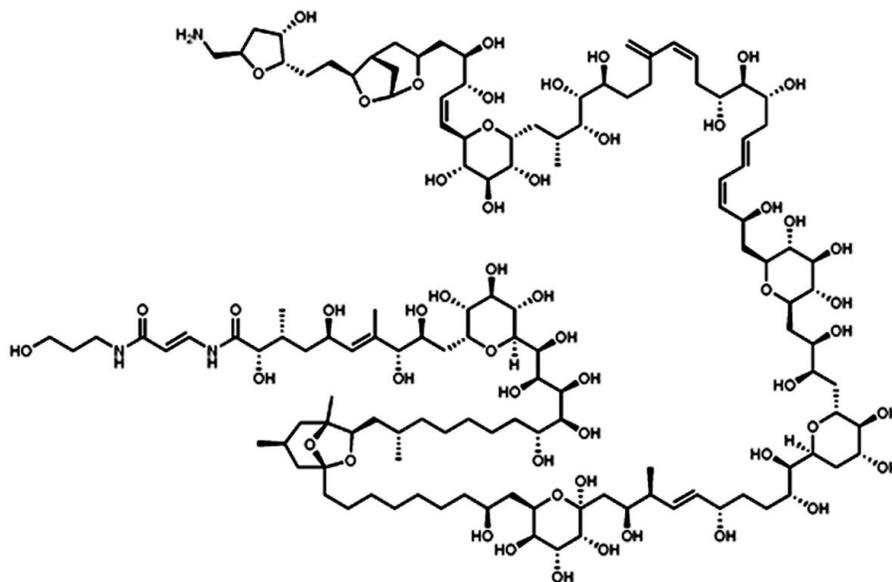


Figura 4. Estructura de la palitoxina, toxina aislada del zoántido *Palythoa toxica*, la cual presenta una estructura compleja.

Sin embargo, la presencia de varios centros quirales, no solo en la palitoxina, sino en la mayoría de los productos naturales marinos ha dificultado su síntesis para realizar estudios preclínicos (fase II y III) y su comercialización.

2.2.1.5 Inestabilidad de los metabolitos.

Los extractos marinos pueden contener compuestos extremadamente lábiles. La descomposición de éstos puede ocurrir en cualquier etapa durante el proceso de purificación. Factores como el calor, la luz, el aire y el pH pueden generar la degradación de los compuestos. Algunos materiales utilizados para la separación también pueden activar algún tipo de reacciones, ocasionando la desaparición de la actividad durante el proceso de fraccionamiento del extracto crudo [28].

2.2.1.6 Dificultad de reabastecimiento.

La obtención de grandes cantidades de un compuesto natural para los estudios preclínicos puede ser un desafío; la mayoría de ellos se han aislado de organismos demasiado pequeños, representando un reto para la farmacología moderna. Si el compuesto deriva de un organismo que crece en una ubicación tropical remota, se pueden tener dificultades de colecta o bien pueden existir problemas para conseguir el permiso para colectar y enviar el material de estudio; lo cual incrementa el costo de la campaña de colecta [27].

Por otro lado, los organismos pueden producir sólo cantidades pequeñas del compuesto deseado en determinadas condiciones ambientales o ecológicas; dificultando el reabastecimiento, ya que no hay garantía de que un compuesto sea encontrado en la misma especie o en el mismo lugar de un año a otro [29].

2.2.1.7 Compuestos no visibles en la región Ultravioleta.

La detección ultravioleta es la técnica preferida para el análisis de productos naturales mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), por su facilidad de uso y alta sensibilidad. Sin embargo, un aspecto desfavorable de algunos productos naturales marinos es la carencia de grupos cromóforos en UV; tal es el caso del Prialt. Hasta hace poco la única alternativa para solventar este problema, era la utilización del detector de índice de refracción, desafortunadamente este tipo de detectores se limitan a la utilización de eluciones isocráticas [20].

2.3 Bioprospección.

El término “bioprospección” se refiere al proceso de búsqueda de recursos genéticos y compuestos bioquímicos potencialmente valiosos en la naturaleza. Durante muchos años los productos naturales y el conocimiento tradicional han contribuido de manera importante en la búsqueda de fármacos; sin embargo, la diversidad de enfermedades han ido evolucionando y generando resistencia a los diferentes medicamentos, por lo que la búsqueda de nuevos fármacos aún

continúa en nuestros tiempos. Las plantas y sobre todo los microorganismos terrestres constituyen fuentes valiosas para encontrar nuevos agentes bioactivos; sin embargo, resulta de mayor importancia explorar ambientes disponibles que presenten una mayor diversidad molecular, como los océanos [30].

En los últimos años la bioprospección de productos naturales de origen marino ha alcanzado una cantidad considerable de candidatos a fármacos, esto debido a la gran biodiversidad potencial que se encuentra en las profundidades de los océanos o en los arrecifes de coral, la cual es mucho mayor a la existente en los bosques lluviosos. Considerando el factor de la competencia o depredación en este medio, muchos organismos marinos poseen mecanismos de protección dependiendo de su estilo de vida, logrando desarrollar en muchos casos un sistema de defensa químico para poder sobrevivir [27].

Al ser liberadas en el medio marino, las toxinas o cualquier sustancia producida por los organismos marinos al principio se encuentran en gran concentración; sin embargo, al migrar con las corrientes, las toxinas se van diluyendo. Para contrarrestar este fenómeno de dilución muchas de las sustancias de origen marino son muy potentes [29]. Por tanto la existencia de un gran número de productos naturales y entidades químicas innovadoras provenientes del océano es cada vez más reconocida [31].

2.4 Bioprospección en moluscos.

Los moluscos son el segundo phylum animal más grande en la tierra, constituyendo aproximadamente el 7 % de los animales vivos. Actualmente, alrededor de 52, 000 especies de moluscos marinos han sido descritas [32] y se estima una diversidad de 100, 000 a 200, 000 especies [33]. Filogenéticamente, los moluscos se han diversificado en siete u ocho clases: Gasteropoda, Bivalvia, Scaphopoda, Cephalopoda, Polyplacophora, Monoplacophora, Caudofoveata y Solenogastres. Las clases Caudofoveata y Solenogastres a menudo se combinan en una sola clase, la clase Aplacophora [34, 35].

Alam y Thomson en 1998 reportaron la existencia de 585 compuestos obtenidos de tan sólo 135 especies de moluscos marinos [36]; esto implica que la diversidad química en los moluscos es superior a su diversidad de especies, aunque esta diversidad química abarca muchos compuestos estructuralmente relacionados y derivados de las mismas vías bioquímicas. Con poca frecuencia, los mismos metabolitos secundarios convergen a través de las diversas clases de moluscos [37, 38]. Blunt y colaboradores (2003) revelan que en una sola especie de molusco se han podido aislar de dos, a un máximo de 58 compuestos [39].

A la fecha, menos del 1 % de los moluscos se han estudiado con el fin de encontrar productos naturales; por lo que existe una necesidad de investigación focalizada, dirigida hacia hipótesis específicas relacionadas con los mecanismos de defensa de los moluscos, a fin de maximizar las tasas de éxito de futuras investigaciones [39].

2.4.1 Bioprospección en Cefalópodos.

Los cefalópodos, a pesar de ser una de las clases de menor importancia en términos de la riqueza de especies, han sido objeto de varios estudios químicos interesantes (Con excepción de *Nautilus spp.*). Estas especies son organismos depredadores de cuerpo blando, que han perdido la protección de la concha como una adaptación a un estilo de vida pelágico activo. Su comportamiento altamente evolucionado, el camuflaje y la capacidad de rápidos movimientos, reducen la necesidad de productos químicos de defensa contra los depredadores [40], aunque la secreción de tinta en un cefalópodo es un tipo de mecanismo de defensa química [35].

A pesar de esto, siguen siendo vulnerables a los agentes patógenos en un medio marino microbianamente rico y por ser depredadores activos, se ven en la necesidad de poseer glándulas de veneno para poder someter a sus presas [36]. Dado la alta diversidad de péptidos bioactivos que se encuentran en los depredadores caenogastrópodos de la familia Conidae [39, 41], el aumento en el

esfuerzo de investigación en los venenos y las glándulas secretoras de cefalópodos, es probable que sea altamente gratificante.

Además de los venenos, una gama de otros productos naturales han sido aislados de los cefalópodos. Estos incluyen la tinta citotóxica (tirosinasa) de la *Sepia officinalis* [40], así como los péptidos ováricos [42], péptidos que atraen espermatozoides [43] y un nuevo péptido cardioactivo aislado del cerebro del pulpo *Octopus vulgaris* [44]. Los compuestos reportados de cefalópodos por Baker y Murphy en 1981 son bastante simples, pero ampliamente distribuidos, tales como aminoácidos aromáticos, noradrenalina y algunos benzoquinoles [36].

En general, a pesar de alta distribución de los cefalópodos, la investigación sobre sus moléculas orgánicas bioactivas ha sido limitada [33].

2.5 Productos naturales aislados del veneno de cefalópodos.

El veneno es una mezcla de diferentes componentes, de los cuales derivan diversas funciones. Los venenos animales son ricos en recursos como péptidos y proteínas, los cuales son utilizados para cumplir diversos roles adaptativos: inmovilización, muerte o la digestión metabólica de la presa o competidor. Otros venenos proteicos pueden actuar de manera sinérgica para mejorar la actividad o diseminar las toxinas. Los diferentes venenos animales poseen una máxima efectividad hacia diferentes presas y esto se debe a los procesos de evolución adaptativa de los mismos; es decir, cada especie posee un veneno altamente especializado para cierta presa [38].

La saliva secretada por los pulpos es una mezcla de diferentes sustancias biológicamente activas, cuya función es inmovilizar y paralizar a la presa unos segundos después de ser capturada. Asimismo, esta secreción salival contiene enzimas hidrolíticas utilizadas para realizar una pre-digestión y despegar los músculos adheridos al caparazón del molusco ó crustáceo. La información acerca de las propiedades de la saliva permite clasificarla como: venenosa, especialmente para crustáceos; farmacológica, con un amplio rango de

compuestos químicos presentes; digestiva, por la presencia de proteasas y otras enzimas [10].

Hasta ahora se han realizado una variedad de estudios acerca de los extractos obtenidos a partir de glándulas salivales posteriores de algunos cefalópodos. En la **Tabla 1** podemos observar los principales compuestos que se han extraído a partir de las GSP y saliva de cefalópodos.

Tabla 1. Lista de los principales compuestos aislados a partir de las GSP y saliva de diversos cefalópodos (imágenes obtenidas de <http://www.marinespecies.org/index.php>; <http://eol.org/> y <http://www.arkive.org/>).

Especie	Compuestos aislados
 <p><i>Eledone moschata</i> (Lamarck, 1798)</p>  <p><i>Eledone cirrhosa</i> (Lamarck, 1798) Antes: <i>Eledone aldrovandi</i> (Montfort, 1802)</p>	<p style="text-align: center;">Eledoisina</p> <p>Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂</p> <p>A partir de: GSP. Aislado por: Erspamer y Anastasi en 1962 [45]. Actividad: Propiedades hipotensoras y estimulantes del músculo liso en mamíferos.</p>
 <p><i>Enteroctopus dofleini</i> (Wülker, 1910) Antes: <i>Octopus dofleini</i> (Wülker, 1910)</p>	<p style="text-align: center;">Componente proteico</p> <p>A partir de: GSP. Aislado por: Songdhal y Shapiro en 1974 [46]. Actividad: Tóxico para los crustáceos, con un peso molecular de 23, 000 ± 1, 000 Da.</p>



Octopus vulgaris
(Cuvier, 1797)



Octopus vulgaris
(Cuvier, 1797)

Cefalotoxina

A partir de: GSP.

Aislado por: Ghiretti en 1960 [47].

Actividad: Paralizante y letal en cangrejos (74.05% proteína, es inactivada con la tripsina). Inhibe fuertemente la coagulación de la sangre en crustáceos y humanos; también modifica la actividad eléctrica del sistema nervioso central en los cangrejos.

α - y β -Cefalotoxina

A partir de: GSP (fracciones de la Cefalotoxina).

Aislado por: Cariello y Zanetti en 1977 [14].

Actividad: Glicoproteínas compuestas de un 50% de carbohidratos y con un efecto paralizante altamente superior a las fracciones activas extraídas hasta ese momento. Sus pesos moleculares son 91, 200 y 33, 900 Da respectivamente.

Enzimas

A partir de: GSP.

Aislado por: Morishita en 1978 [13]; Grisley y Boyle en 1987 [13] y Nixon en 1984 [13].

Actividad: Enzimas digestivas, que causan la hidrólisis del músculo esquelético de sus presas (tripsina, quimotripsina y quitinasas).

Taquicininas

OctTK-I: Lys-Pro-Pro-Ser-Ser-Ser-Glu-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂

OctTK-II: Lys-Pro-Pro-Ser-Ser-Ser-Glu-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂

A partir de: Saliva.

Aislado por: Kanda y colaboradores en 2003 [17].

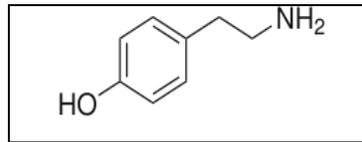
Actividad: Inducen contracciones en el recto de carpas e íleon del cobayo. Actúan sobre vertebrados, como los peces que suelen ser presa o enemigos naturales de los *Octopus*.



Octopus vulgaris
(Cuvier, 1797)

Aminas Biogénicas y otros

Tiramina

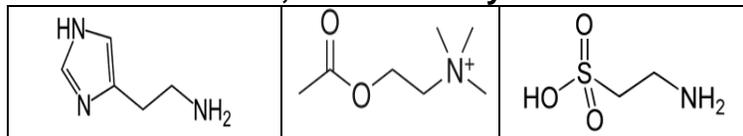


Aislado de: Saliva.

Aislado por: Henze en 1913 [11].

Actividad: Afecta el sistema nervioso central de los cangrejos con efecto paralizante.

Histamina, Acetilcolina y Taurina

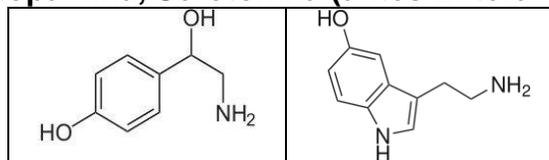


Aislado de: Saliva.

Aislado por: Botazzi en 1922 [12].

Actividad: Actúan en conjunto para dar origen al efecto paralizante en cangrejos.

Octopamina, Serotonina (antes Enteramina)



Aislado de: Saliva.

Aislado por: Erspamer en 1948 [48].

Actividad: Neurotransmisores del sistema nervioso central (SNC).

SE-Cefalotoxina



Sepia esculenta
(Hoyle, 1885)

A partir de: GSP.

Aislado por: Ueda en 2008 [49].

Actividad: Glicoproteína capaz de provocar pérdida de movimientos espontáneos, parálisis y eventualmente muerte en los cangrejos. Primera neurotoxina de naturaleza proteica extraída de un decapodiforme. El peso molecular de esta sustancia es de 100 kDa y es soluble únicamente en agua altamente salada.



Sepia latimanus
(Quoy & Gaimard, 1832)

Proteína PLA2

A partir de: GSP.

Aislado por: Fry y colaboradores en 2009 [18].

Actividad: Fosfolipasa tipo A2, con un peso molecular de 22 121 Da.



Hapalochlaena fasciata
(Hoyle, 1886)

Tetrodotoxina

A partir de: GSP y otros órganos.

Aislado por: Sheumack y colaboradores en 1978 [16].

Actividad: Potente neurotóxina (alcaloide), fatal para el humano (causa parálisis, dificultad para respirar y por último la muerte).



Hapalochlaena lunulata
(Quoy & Gaimard, 1832)

Proteína CAP

A partir de: GSP.

Aislado por: Fry y colaboradores en 2009 [18].

Actividad: Desconocida, se aisló únicamente de *Hapalochlaena maculosa*.



Hapalochlaena maculosa
(Hoyle, 1883)

 <p><i>Octopus kaurna</i> (Stranks, 1990)</p>	<p style="text-align: center;">Quitinasa</p> <p>A partir de: GSP. Aislado por: Fry y colaboradores en 2009 [18]. Actividad: Enzimática.</p> <p style="text-align: center;">Taquicinina</p> <p>OctTK-III: Asp–Pro–Pro–Ser–Asp–Asp–Glu–Phe–Val–Ser–Leu–Met–NH₂</p> <p>A partir de: GSP. Aislado por: Fry y colaboradores en 2009 [18]. Actividad: Induce contracciones en tejidos de vertebrados e invertebrados. Más potente que la OctTK-I y la OctTK-II.</p>
 <p><i>Sepia officinalis</i> (Linnaeus, 1758)</p>	<p style="text-align: center;">Enzimas</p> <p>A partir de: Saliva. Aislado por: Hanlon y Forsythe en 1985 [50]. Actividad: Conjunto de compuestos tales como: dopamina, serotonina, toxinas, enzimas proteolíticas y quitinasas; es probable que al menos dos de éstas últimas sean responsables de la separación del músculo adjunto al esqueleto de la presa.</p>

2.6 El pulpo rojo de Yucatán *Octopus maya*.

2.6.1 Importancia de la especie.

El pulpo rojo *Octopus maya* es una especie endémica y uno de los recursos pesqueros más importantes de la Península de Yucatán [4, 5, 6, 7]. Se considera que constituye una sola población debido a la inexistencia de barreras físicas y/o biológicas que pudieran impedir el intercambio genético entre los individuos en su zona de distribución [51].

La captura del pulpo en la península de Yucatán (que incluye dos especies, *O. vulgaris* y *O. maya*) ocupa el quinto lugar a nivel nacional y es la cuarta pesquería

más importante en el Golfo de México y el Caribe. El 70 % de la producción nacional proviene de Yucatán [52].

La pesquería de pulpo rojo se desarrolló a partir de 1949 [53] y su valor comercial ha motivado al incremento de flotas pesqueras en toda la región dónde se distribuye. En el período 1998-2006, se registraron capturas a nivel nacional de 16, 000 a 24, 000 toneladas [54].

Estudios previos han demostrado que existe una mayor concentración de *O. maya* en el estado de Campeche, principalmente entre Champotón y la ciudad de Campeche; esta zona tiene fondos mixtos con abundante vegetación y zonas de refugio para las poblaciones [55].

La producción pesquera de *O. maya* se ha mantenido estable gracias a los programas que controlan la pesca ilegal en las épocas de reproducción. Desafortunadamente en los últimos años la Península de Yucatán ha experimentado una migración masiva de personas procedentes del campo hacia la costa y esto ha provocado un aumento en la cantidad de pescadores en la zona costera, con el consecuente incremento en el esfuerzo de captura sobre los recursos pesqueros, incluyendo la del pulpo rojo *O. maya*. Estudios indican que cuando las poblaciones marinas se encuentran bajo un período de explotación pesquera, se afecta su abundancia, se vuelven más susceptibles a las enfermedades y suelen disminuir las tallas en las cuales se refleja la madurez reproductiva [56].

Afortunadamente estudios recientes han demostrado que *O. maya* posee un alto potencial para la acuicultura dadas sus características de adaptabilidad a las condiciones en cautiverio [7, 57]. El ciclo de vida para *O. maya* fue determinado entre 8 a 12 meses [58] y de 9 a 10 meses, para temperaturas de cultivo entre 25 y 30 °C [7, 57, 59]. El desarrollo embrionario para esta especie varía de 50 a 65 días en el medio natural [60].

Es una especie que habita en aguas someras de la plataforma continental de Yucatán, a una profundidad máxima de 32 brazas. Su hábitat principal son las zonas donde pueden encontrar cuevas para desovar y esconderse de los depredadores. Ocupan fondos lodosos o calcáreos, con escondites ocasionales, e inclusive pueden ser encontrados en las praderas de pastos marinos formados principalmente por *Thalassia testudinum*, en conchas vacías de moluscos gasterópodos (*Strombus gigas*, *Strombus costatus* y *Pleuroploca gigantea*) y cuevas existentes en la loza cárstica del fondo o entre rocas coralinas [61].

2.6.2.3 Descripción general.

El pulpo *Octopus maya* (**Figura 6**) se caracteriza por tener un cuerpo blando con un cerebro bien desarrollado y ocho brazos que están conectados entre sí por una membrana llamada umbrela. Cada brazo posee dos filas de ventosas; el número y disposición de las ventosas es un carácter taxonómico importante. Como en los vertebrados, los dos ojos grandes y complejos tienen cristalino, lo que le proporciona una visión aguda. Estos animales pueden cambiar el color y la textura de su piel ya que ésta consta de numerosas células con pigmentos (cromatóforos, iridóforos y leucóforos) responsables de la coloración y de los cambios de color. Pasan gran parte de su vida escondiéndose, pueden crecer hasta casi 1 m de largo; son animales de los fondos, por los que se desplazan con ayuda de sus brazos, pero en caso de peligro pueden desplazarse mediante la expulsión de agua a través de la cavidad respiratoria, la cual pueden orientar en diversas direcciones [63, 64, 65, 66, 67].

El rasgo que caracteriza a *O. maya* es la presencia de ocelos debajo de los ojos entre el segundo y tercer brazo; este pulpo es una especie que produce huevos grandes de desarrollo directo y según Voss y Solis-Ramirez (1966) posee de los mayores huevos de entre todas las especies de pulpo, pudiendo llegar a los 17 mm de largo [6]. Esto hace que sea una de las especies con más alto potencial para la acuicultura.



Figura 6. Ejemplar del pulpo rojo *Octopus maya*.

2.6.2.4 Estrategia de alimentación.

En general los cefalópodos poseen adaptaciones morfológicas para la captura de su presa, las cuales pueden clasificarse como: brazos y tentáculos, boca y masa bucal e intestino. La combinación de los brazos musculosos y las fuertes ventosas permiten que el octópodo pueda aplicar fuerzas de tracción para controlar y capturar a sus presas. Por otro lado, las ventosas fungen un papel importante como un sistema quimiotáctil para la búsqueda de alimento durante sus capturas [68].

Otra de las adaptaciones pertenecientes a los octópodos como predadores es la masa bucal, estructura compleja que comprende el pico y sus músculos asociados, la rádula, la papila salivar, las glándulas salivales y sus respectivos ductos, así como la glándula mandibular; esta masa está situada en la parte frontal del cerebro, justo en el centro de los tentáculos [69].

El pico es un órgano quitinoso de musculatura masiva mientras que la rádula se trata de una cinta que comprende dientes quitinosos; ésta realiza movimientos sucesivos análogos a los de una lima, cuya forma de funcionar aún no ha sido deducida; sin embargo se sabe que en general lleva la comida a través del esófago y en algunos octópodos está involucrada en las etapas iniciales de perforación de agujeros en las conchas de moluscos o exoesqueleto en el caso de crustáceos (**Figura 7**).

Otra estructura encontrada en la masa bucal es la papila salivar (segunda rádula); se sabe que la papila salivar es el órgano perforador esencial, el cual lleva las secreciones de las glándulas salivales posteriores (GSP) y las inyecta en el sitio perforado [70].

Las glándulas salivales posteriores, también consideradas como las glándulas venenosas contienen una mezcla de diversos compuestos tóxicos. Éstas al estar situadas detrás de la masa bucal, su secreción (saliva) es transportada a través de unos ductos musculares, hacia un canal terminal en común, el cual se abre cerca del extremo de la papila salivar, junto a la cavidad bucal [18] (**Figura 7**).

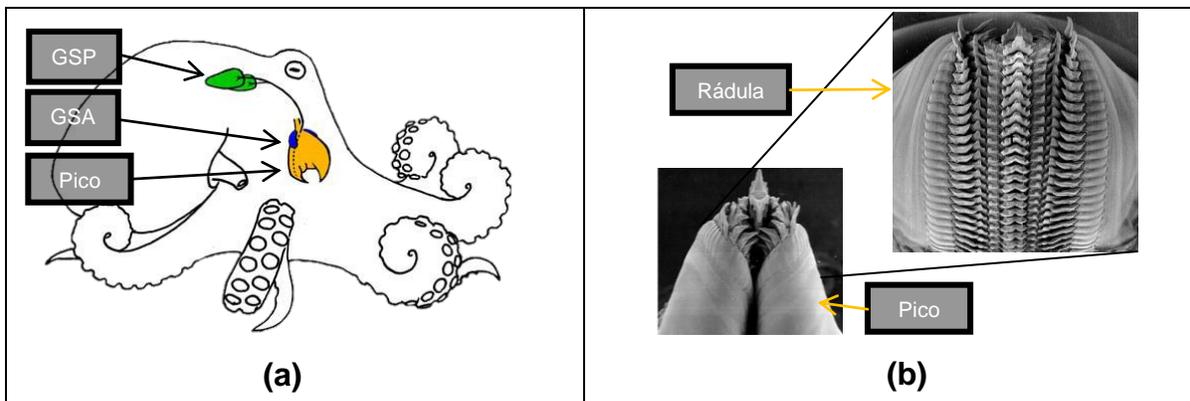


Figura 7. (a) Esquema de la fisiología de la masa bucal de un cefalópodo (modificado de Fry *et al.*, 2009 [18]); (b) fotografías (lateral y superior) del extremo anterior de la masa bucal del pulpo *Eledone cirrhosa* (modificado de Runham *et al.*, 1997 [71]).

El *Octopus maya* es un depredador carnívoro y su alimentación se basa principalmente en crustáceos, aunque también consume algunos peces y moluscos; es considerado depredador generalista, mas sin embargo su dieta en ocasiones está dominada por dos o tres especies únicamente. Mather en 1991 los clasificó como “generalistas especializados” [69, 72].

Respecto a la elección de sus presas, en específico los moluscos y crustáceos representan un problema para los pulpos, dado que el acceso a sus tejidos está protegido por una concha fuertemente calcificada (moluscos) y un exoesqueleto quitinoso (crustáceos); por tanto surge así la necesidad de primero inmovilizar a su presa activa y agresiva, para poder alimentarse de ella [70, 71].

La estrategia de alimentación del pulpo *Octopus maya* con respecto a los moluscos y crustáceos, es similar a otras especies de octópodos; se sabe que ésta involucra la manipulación de la presa, particularmente con la perforación de un agujero en la concha y en el ojo ó membrana artrodial de un crustáceo [73]. Se ha reportado que la realización del agujero anteriormente mencionado ocurre por la acción conjunta de la rádula y la papila salivar. La operación mecánica es optimizada mediante la secreción de saliva proveniente de las glándulas salivales posteriores la cual actúa química y enzimáticamente para debilitar las conchas [71]. Estudios recientes realizados en *O. maya* han demostrado que la ingestión de alimento ocurre 60 min después de que el pulpo ha capturado a la presa, iniciando el proceso digestivo [74].

Una vez que el agujero es completado, el pulpo inyecta (mediante el ducto conectado a la papila salival) un cóctel de toxinas y enzimas hidrolíticas: el agente tóxico paralizante induce la relajación de la presa, dando tiempo para que las enzimas contenidas en la saliva causen el desprendimiento de los músculos adjuntos al esqueleto y el pulpo pueda removerlos del caparazón para así tener acceso al tejido muscular y vísceras del endoesqueleto. En muchos casos un pulpo podría ser capaz de dominar y desmembrar un crustáceo usando la fuerza física, sin embargo, la falta de una pre-digestión realizada por la saliva, reduce la eficiencia de su alimentación [73].

En el caso del pulpo *Eledone cirrhosa* se sabe que durante su mecanismo de depredación, el crustáceo muestra signos de parálisis después de 1 minuto; efecto que se vuelve irreversible con 3 minutos acontecidos; el proceso de perforación por parte del pulpo se completa 9 minutos después del ataque y es hasta que han transcurrido 40 minutos cuando la ingestión del tejido de la presa inicia, por parte de este cefalópodo. La parálisis inicial se debe a la toxina salival inyectada, mientras que la digestión de los músculos es provocada por enzimas digestivas [75]. Se conoce también que la perforación puede realizarse en la superficie corneal del ojo o bien en el caparazón del crustáceo como vías para la entrada de la saliva [71].

3.0 JUSTIFICACIÓN.

La investigación de los productos naturales de origen marino, en específico el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios extraídos de moluscos marinos, es incipiente, pero aun así se han descubierto una gran diversidad de componentes con posible aplicación farmacológica. El pulpo rojo (*Octopus maya*) es un molusco endémico de la Península de Yucatán y que actualmente constituye el quinto lugar en recursos pesqueros nacionales. Sin embargo, en últimas fechas se ha reducido su captura, debido a problemas de sobreexplotación, mareas rojas, entre otros fenómenos. Un avance importante para atender esta problemática es la acuicultura, estrategia que se ha desarrollado exitosamente, donde inclusive ya se puede contar con organismos recién eclosionados. Desafortunadamente, gran parte de la biología de este organismo se encuentra sin estudiar, por ejemplo, parte de sus estrategias de alimentación y los mecanismos por los cuales ataca y paraliza a sus víctimas.

Ahora bien, esta disminución en las capturas no solo ocurre a nivel local, sino a nivel internacional, lo cual ha llevado a utilizar estrategias que ayuden en la utilización eficiente de los recursos capturados. En el caso del pulpo rojo de Yucatán, se utiliza el 85 % de lo capturado, sin embargo, el 15 % (aproximadamente 1,100 Toneladas de vísceras) es lanzado al mar o confinado en un basurero. Dentro de estas vísceras, se encuentran las glándulas salivales posteriores; donde se produce la saliva, la cual ha demostrado ser vital en la mayoría de los octópodos, ya que muchos de ellos la utilizan para paralizar y matar a sus presas. De otras especies de cefalópodos, se han aislado moléculas de las glándulas salivales posteriores para su empleo como herramientas farmacológicas o medicamentos; por ejemplo, la Eledoisina (polipéptido aislado del pulpo *Eledona moschata*) se ha utilizado como antihipertensivo o en oftalmología como agente lacrimógeno. Por lo tanto, el presente proyecto pretende buscar compuesto(s) bioactivo(s) de los subproductos de la pesquería del pulpo rojo de Yucatán.

4.0 HIPÓTESIS.

Existe una fracción con actividad neurotóxica presente en la saliva de las glándulas salivales posteriores del pulpo rojo *Octopus maya* con posible aplicación farmacológica humana y cuyos efectos son evidentes en sus presas.

5.0 OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Aislar, purificar y determinar la naturaleza química de los compuestos bioactivos presentes en las glándulas salivales posteriores del pulpo *Octopus maya*.

5.2 Objetivos específicos.

- Generar el extracto acuoso de las glándulas salivales posteriores colectadas en condiciones de pesquería del pulpo rojo de Yucatán.
- Separar los compuestos activos presentes en el extracto acuoso mediante un esquema de separación biodirigida, empleando técnicas cromatográficas.
- Evaluar la actividad biológica de los extractos y fracciones generados, en bioensayos.
- Determinar la naturaleza química de los compuestos aislados por métodos espectrométricos (LC-MS-MALDI-TOF Y LC-MS-ESI).

6.0 METODOLOGÍA.

6.1 Materiales.

Los disolventes y reactivos utilizados en todos los casos fueron grado RA (Reactivo Analítico) y los disolventes para CLAR fueron grado HPLC.

6.2 Instrumentación.

6.2.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

En cuanto al análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR, HPLC en inglés) se utilizaron dos equipos:

1.- Un sistema cromatográfico Polaris 211 (Varian, Inc., USA), con dos bombas 211, inyector automático 410, colector de fracciones 701, acoplado a dos detectores: un Detector Evaporativo de Difracción de Luz (DELD, ó ELSD en inglés) y un detector Ultravioleta (UV). Se emplearon tres métodos diferentes:

Pulpo 1 analítico: se utilizó una columna LUNA (C18, fase reversa, Phenomenex, Inc., USA). Como fase móvil agua (A): acetonitrilo (B), en un gradiente de 0 a 15 % B en 8 minutos y de 15 a 35 % B en 25 minutos, para regresar a la condición inicial 5 minutos después (100 % A). Detector de U.V. a 215 nm.

PulpoFr4_desarrollo3: se utilizó una columna LUNA (C18, fase reversa, Phenomenex, Inc., USA). Como fase móvil agua: acetonitrilo, en un gradiente de 0 a 18 % de acetonitrilo en un tiempo de 20 minutos de análisis. Detector de U.V. a 215 nm.

Para los métodos anteriores se emplearon 2 condiciones:

Condiciones analíticas: se utilizó una columna LUNA (250 X 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm). Para el detector DELD: Temperatura de Nebulización = 40 °C, Temperatura de Evaporación = 70 °C, Flujo de nitrógeno = 1.0 mL/min y se inyectaron 25 µL del extracto ó fracción (1 µg/µL).

Condiciones semipreparativas: se utilizó una columna LUNA (250 x 10.0 mm, tamaño de partícula 10 μm). Para el detector DELD: Temperatura de Nebulización = 40 °C, Temperatura de Evaporación = 70 °C, Flujo de nitrógeno = 3.0 mL/min y se inyectaron 25 μL del extracto ó fracción (1 mg/10 μL).

aa20_full_UV ELSD Auto original: como fase estacionaria se emplearon dos columnas en serie: la primera fue una columna PFP fase reversa (Pentafluorofenilo, 150 x 4.60 mm, tamaño de partícula 3.6 μm , Phenomenex, Inc., USA) unida a una columna Aeris Peptide fase reversa (XB-C18, 150 x 4.60 mm, tamaño de partícula 3.6 μm , Phenomenex, Inc., USA) y como fase móvil A (agua + 0.1 % de ácido trifluoracético + 0.2 % de ácido heptafluorobutírico), fase móvil B (metanol), en un gradiente de 0 a 45 % de B. Para el detector DELD: Temperatura de Nebulización = 40 °C, Temperatura de Evaporación = 70 °C, Flujo de nitrógeno = 2.5 mL/min. En condiciones analíticas se inyectaron 25 μL de la muestra (5 mg/mL).

2.- Sistema cromatográfico Waters 1525 (Waters Inc., USA) con dos bombas 1525, inyector manual, horno para columnas, desgasificador en línea, acoplado a dos detectores: un detector de fluorescencia de onda múltiple Waters 2475 y un detector Ultravioleta 2472 (UV). Se empleó una sola metodología.

AccQ-TAG de Waters: utilizando como fase estacionaria una columna AccQ-TAG (3.9 x 150 mm, tamaño de partícula 4 μm , Waters Inc., USA) y como fase móvil A (eluyente A: agua, 1:10 v/v): fase móvil B (acetonitrilo: agua, 60:40 v/v) en un tiempo de 40 minutos de análisis. Detección: detector de fluorescencia de onda múltiple Waters 2475, $\lambda_{\text{exc}} = 250 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emss}} = 395 \text{ nm}$ y Detector de U.V. a 215 nm. En condiciones analíticas se inyectaron 25 μL de muestra (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

6.2.2 Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS).

Respecto a los análisis espectrométricos se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos modelo ACQUITY, marca Waters acoplado a un Espectrómetro de Masas modelo

Synapt GS-2, marca Waters con un analizador de tiempo de vuelo tipo W reflecton.

Condiciones de análisis: se utilizó una columna fase reversa (ACQUITY UPLC BEH, C18, 2.1 X 100 mm, tamaño de partícula 1.7 μm). Tiempo de análisis 25 min, con un flujo de 0.3 mL por minuto y utilizando como fase móvil A: agua con 0.2 % de ácido fórmico y como fase móvil B: acetonitrilo con 0.2 % de ácido fórmico, gradiente de 0 a 18 % de B en 16 min, de 16 a 20 % de B en 4 min y de 20 al 97 % de B en 3 min; la ionización de la muestra se realizó por el método de electrospray (ESI): Temperatura de la cámara de ionización: 100 °C, Voltaje del capilar: 3.00 kV, Detección de iones: Positivos, Intervalo de masas: 50-2500 m/z Resolución: 20,000.

6.2.3 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).

Para estos estudios, se empleó un Cromatógrafo de Gases Agilent Technologies 6850 Network, con Detector de Masas 5975B-VL. Se utilizó una columna Zebron ZB-5MSi de Phenomenex, de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de grosor de película. Las condiciones para el análisis fueron : Temperatura inicial del horno 50 °C en 1 min, incremento de 15 °C hasta 350 °C durante 4 min, Temperatura del inyector 350 °C, Modo de inyección Split, razón de split 50:1 inyección manual, Volumen de inyección 1 μL , Gas acarreador Helio, Temperatura de la línea de transferencia 290 °C. Espectrómetro de masas, modo de análisis, detección en modo de barrido total del espectro (SCAN) de 50 a 550 m/z.

Los datos obtenidos del espectro de masas se compararon mediante el programa The NIST Mass Spectral Program, a través de la base de datos Agilent Technologies Wiley Registry 7th Edition with NIST 05 MS Spectra Revision D.05.01.

6.3 Área de colecta.

Las Glándulas Salivales Posteriores (GSP) se colectaron manualmente de pulpos (ambos sexos) que ingresaron a la Sociedad Cooperativa “Tigres del Mar,” S. A. de C. V. en el puerto de abrigo de Sisal, Yucatán, producto de la pesca ribereña en la costa Yucateca. El área de pesca abarca desde la localidad conocida como la Bocana (la carbonera) hasta Celestún (**Figura 8**). Los pulpos fueron capturados mediante el arte de pesca artesanal conocido como "jimba y gareteo" (**Figura 9**), técnica sustentable y conservativa, ya que las hembras en estado reproductivo no son capturadas, lo que permite la conservación de la especie.

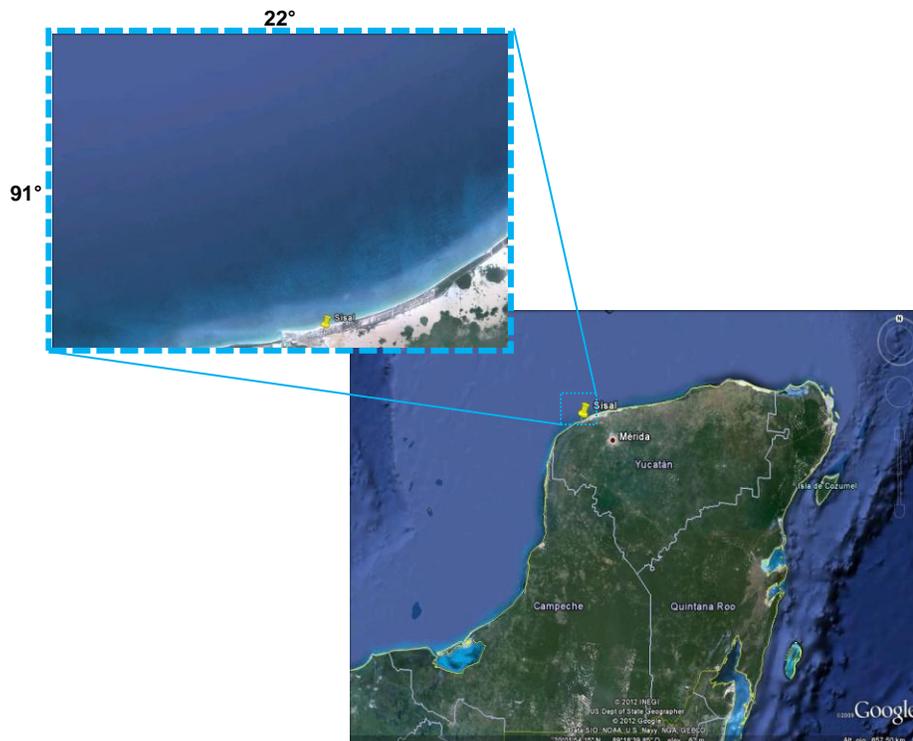


Figura 8. Área relativa de pesca artesanal del pulpo *Octopus maya*, asignada a los pescadores de la Cooperativa “Tigres del Mar” en Sisal, Yucatán.

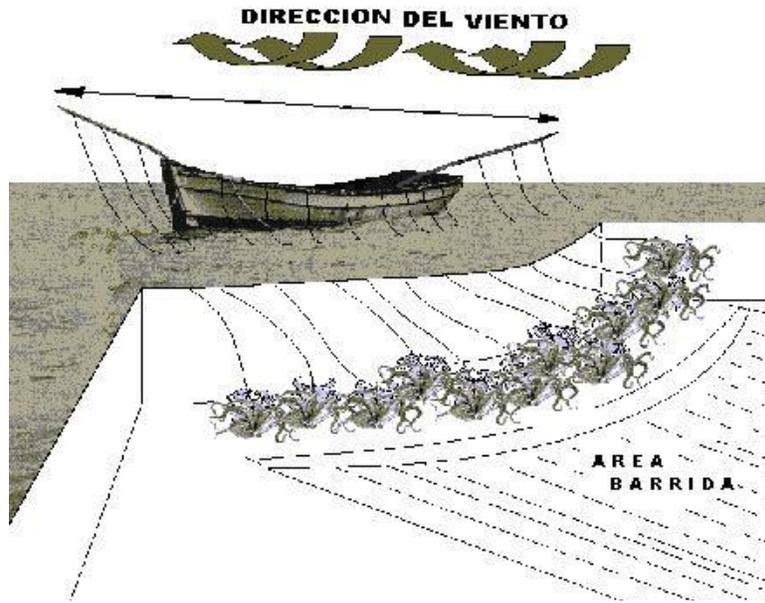


Figura 9. Esquema de la técnica del arte de pesca artesanal “Jimba y Gareteo”.

6.4 Colecta de las Glándulas Salivales Posteriores (GSP) del pulpo *Octopus maya*.

Las GSP (2, 000 pares) se colectaron manualmente de pulpos que ingresaron a la cooperativa e inmediatamente se introdujeron a frascos color ámbar previamente pesados, seguidamente los frascos fueron rotulados con el peso de las muestras colectadas y se colocaron dentro de una nevera con hielo, para posteriormente trasladarlos al laboratorio de Bioprospección Costera en la Unidad de Química en Sisal y conservarlos a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un ultracongelador (REVCO, Thermo-Science, USA) hasta el día de preparación del extracto crudo [16, 17, 18].

6.5 Extracción acuosa de las GSP del pulpo *Octopus maya*.

Una vez congeladas las GSP se liofilizaron a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.2 mBar [76]. Posteriormente se trituraron en un mortero de porcelana y se extrajo con agua bidestilada (1:20 p/v) [16, 17]. Inmediatamente la solución fue trasvasada a tubos Falcon y se centrifugó uniformemente ($3857\text{ rcf} / 20\text{ min} / 23\text{ }^{\circ}\text{C}$); se colectó el sobrenadante, se congeló a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un ultracongelador y posteriormente se liofilizó.

Ya liofilizado, el sobrenadante se trituró y se disolvió en la mínima cantidad de agua bidestilada posible (400 mL); la solución se trasladó a tubos Falcon y se centrifugó nuevamente (3857 rcf / 20 min / 23 °C) para recuperar el sobrenadante (extracto crudo) [17].

6.6 Obtención de la fracción metabólica (F1_1) y neurotóxica (F1_2) a partir del extracto crudo de las GSP del pulpo *Octopus maya* mediante ultrafiltración.

El extracto crudo de las GSP redisuelto en agua bidestilada, se separó en dos fracciones de diferente peso molecular utilizando membranas de ultrafiltración con un tamaño de corte de 3 kDa y 15 mL de volumen (Amicon, Ultracel, 3000 MWCO Milipore). Las membranas se colocaron dentro los tubos Falcon y se centrifugó el extracto crudo (3857 rcf / 1 h / 23 °C) hasta obtener una concentración de 1500 µL mínimo y óptimo de 250 µL en la membrana. Esto permitió separar la Fracción Metabólica cruda F1_1 (> 3 kDa, retenida en la membrana), de la Fracción Neurotóxica cruda F1_2 (< 3 kDa, filtrada en el tubo Falcon) [16, 46, 76].

Posteriormente se colectó el filtrado (fracción neurotóxica cruda), se liofilizó, se trituró y se trasvasó a un frasco ámbar previamente pesado y rotulado [16]. Para su análisis en condiciones analíticas, se procedió a utilizar el método de pulpo 1 analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución previamente desarrollado en el laboratorio (página 29) [77].

6.6.1 Determinación de la actividad neurotóxica mediante el bioensayo *in vivo* en cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*).

Todas las fracciones obtenidas a partir de la fracción neurotóxica (F1_2) se evaluaron en el bioensayo *in vivo* en el cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*). Los cangrejos fueron colectados en la duna costera del puerto de Sisal Yucatán y una vez capturados se conservaron vivos en un contenedor con arena para mantenerlos lo menos estresados posible.

En un principio se utilizaron diferentes crustáceos, desde cangrejos marinos (maxquil (*Libinia dubia*), morito (*Menippe spp.*) y jaiba azul (*Callinectes sapidus*)) hasta especies semi terrestres como el cangrejo violonista (*Uca spp.*). En todos los casos, fue posible determinar el efecto del extracto crudo; sin embargo la asequibilidad y la observación de la respuesta farmacológica fue más evidente en el cangrejo fantasma.

Preparación de las fracciones a ensayar: se pesaron 10 mg de extracto o fracción y se diluyeron en agua inyectable para obtener soluciones con las siguientes concentraciones 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg/mL. Como control negativo se procedió a utilizar 100 µL de agua inyectable.

Bioensayo: consistió en tomar 100 µL del extracto crudo o fracción diluida, e inyectarlos en el tercer pereiópodo (pata ambulatoria) del cangrejo fantasma; observando los efectos: parálisis, relajación, descoordinación motora y muerte [78].

6.6.2 Determinación del intervalo de pesos moleculares de los compuestos presentes en la fracción neurotóxica (F1_2).

Para realizar la estimación de los pesos moleculares, se utilizó el método de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE en inglés).

Para preparar el gel se utilizaron los siguientes reactivos (**Tabla 2**):

Tabla 2. Reactivos para preparar el Gel de Poliacrilamida (PAGE en inglés).

Reactivo	Cantidad
H ₂ O	2.475 mL
Acrilamida-Bis 30 %	3.0 mL
Amortiguador pH 8.8	1.95 mL
Persulfato de amonio	75 µL
TEMED (N,N,N,N-tetra-metil-etilendiamina)	3 µL

Los reactivos se mezclaron en un matraz en el orden presentado e inmediatamente se vertió la mezcla en el soporte (marca BioRad); seguidamente se esperó aproximadamente 30 minutos hasta obtener el gel. Es importante señalar que se empleó una concentración de 12 % de poliacrilamida, condición importante para la separación en el gel [79]. Ya gelificada la mezcla, se colocó el soporte con el gel dentro de la cámara de electroforesis, la cual estaba completamente llena de amortiguador (pH 8.8, Tris-HCl).

Para la separación se emplearon dos concentraciones diferentes de la fracción neurotóxica (F1_2) (30 y 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), las cuales se aplicaron en pocillos del gel. Además, en otro pocillo de gel se aplicó la referencia de la marca BioRad de 5, 10, 20 y 40 kDa. Para la visualización, a cada solución se le adiciono 50 μL de azul de Coomasie. Para desarrollar el gel se emplearon 80 V por 20 minutos y pasado este tiempo se pasó a 120 V por aproximadamente 2 horas. Al término, el gel se sumergió en TCA al 10 % por 15 minutos para posteriormente pasarlo a tinción.

6.7 Separación biodirigida de la fracción neurotóxica (F1_2) por Extracción en Fase Sólida (EFS) en cartucho de fase reversa.

Una muestra de 200 mg de la fracción neurotóxica se disolvió en 2 mL de agua bidestilada y se separó utilizando un cartucho de extracción en fase sólida C18-U de fase reversa (55 μm , 70 A, Strata C18-U de Phenomenex[®]). Primeramente se lavó el cartucho con metanol y posteriormente se acondicionó con agua bidestilada, seguidamente se aplicó la muestra disuelta en 2 mL de agua bidestilada y se eluyó con agua y mezclas de agua: acetonitrilo a una velocidad moderada y constante, de acuerdo con la **Tabla 3**.

Tabla 3. Fracciones obtenidas de la separación de la fracción neurotóxica F1_2, en cartucho C18-U.

Fracción	Elución correspondiente	mL adicionados
	Muestra	2
F2_1	H ₂ O 100 %	5
F2_2	H ₂ O:AcCN 90:10 %	5
F2_3	H ₂ O:AcCN 80:20 %	5
F2_4	H ₂ O:AcCN 50:50 %	5



Todas las fracciones colectadas se llevaron a sequedad en un rotaevaporador (BUCHI R-215); se determinó el rendimiento y se sometieron al bioensayo *in vivo* en el cangrejo fantasma (ver bioensayo, página 34).

6.7.1 Análisis mediante CLAR de las fracciones F2_1 (actividad paralizante) y F2_2 (actividad relajamiento-descoordinación motora) obtenidas de la separación de la fracción neurotóxica F1_2.

Las fracciones F2_1 (naturaleza polar) y F2_2 (naturaleza medianamente polar) fueron analizadas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), en condiciones analíticas utilizando el método PulpoFr4_desarrollo3 previamente desarrollado en el laboratorio (página 29) [77].

6.7.1.1 Determinación del perfil total de aminoácidos presentes en la fracción F2_2 (actividad relajamiento-descoordinación motora).

La fracción F2_2 fue sometida a hidrólisis ácida y básica para el análisis de aminoácidos por el método Pico-tag de Waters.

Hidrolisis ácida por el método de Pico-tag: se pesó 1 mg de la fracción F2_2 en un vial, el cual fue transferido a un reactor Pico-tag, luego se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico (HCl) 6 N), se cerró el reactor y se introdujo a la estación de calentamiento de Pico-tag a 106 °C por 18 horas.

Hidrólisis básica por el método de Pico-tag: de manera análoga se peso 1 mg de la fracción F2_2 en un vial, al cual se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 4 N y el vial sin tapa fue introducido al reactor del Pico-tag, el cual se cerró para introducirlo en la estación de calentamiento de Pico-tag a 100 °C por 7 horas bajo atmósfera de nitrógeno.

Una vez finalizada la hidrólisis ácida y básica de la fracción F2_2, cada una fue diluida en 500 µL de agua grado HPLC y filtrada utilizando filtros Acrodisc de disco (GHP, 13 mm, 0.45 µm esterilizados) para su posterior derivatización con el Kit de derivatización AccQ*Fluor Reagent Kit de Waters.

Preparación del agente derivatizante: para visualizar y cuantificar a los aminoácidos presentes en la fracción F2_2 mediante el detector de fluorescencia, se utilizó el agente derivatizante 6-aminoquinolil-N-carbamato de hidroxisuccinimidilo (AQC) el cual se disolvió en 1 mL de acetonitrilo, se agitó por 10 segundos y se colocó en un calentador de bloques a 55 °C por 10 minutos.

Derivatización de la muestra: se tomó 10 mL de la fracción F2_2 y se le añadieron 70 µL del amortiguador de boratos (2C, AQC Flour Reagent Kit) y 20 µL del AQC. Se agitó la mezcla por 10 segundos y se esperó 1 minuto a temperatura ambiente; seguidamente se colocó en un calentador de bloques a 55 °C por 10 minutos.

Análisis de la muestra: se obtuvo el perfil total de aminoácidos de las fracciones derivatizadas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) utilizando el método de AccQ-TAG de Waters (página 30). Se utilizó como **Estándar interno** 100 pmol de ácido 2-aminobutírico (AABA 2.5 mM, 40 µL en 960 µL de agua).

6.7.1.2 Determinación del perfil total de aminoácidos libres presentes en la fracción F2_1 (actividad paralizante).

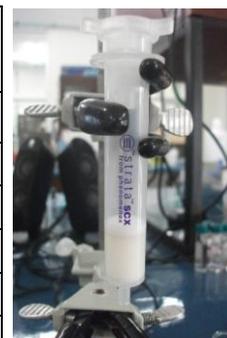
Para la obtención del aminograma de la fracción F2_1 se pesaron 10 mg de la fracción liofilizada y se dosolvieron en 1 mL de agua grado HPLC, luego se realizó una dilución 1:10, para tomar 10 mL de la solución y someterla al análisis del perfil de aminoácidos de acuerdo al método de AccQ-TAG de Waters (sección previa).

6.8 Separación biodirigida de la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2) en cartucho de intercambio catiónico fuerte.

Una muestra de 100 mg de la fracción F2_2 (H₂O: AcCN 90:10 %) se disolvió en 2 mL de agua bidestilada y se separó utilizando un cartucho de intercambio catiónico fuerte (SXC-Strata de Phenomenex[®]), previamente lavado con metanol y acondicionado con 10 % de ácido trifluoroacético (TFA) en agua; seguidamente se eluyó de acuerdo con la **Tabla 4**.

Tabla 4. Fracciones obtenidas de la separación de la fracción con actividad relajamiento-descoordinación motora F2_2, en cartucho catiónico fuerte.

Fracción	Elución correspondiente	mL adicionados
	Muestra	2
F2_2_1	H ₂ O:TFA 90:10	5
F2_2_2	HCl 0.1 N en H ₂ O	5
F2_2_3	HCl 0.1 N en MeOH	5
F2_2_4	1 % NH ₄ OH en MeOH	5
F2_2_5	2 % NH ₄ OH en MeOH	5



Todas las fracciones colectadas se llevaron a sequedad utilizando un rotaevaporador (BUCHI R-215); se determinó el rendimiento y se sometieron al bioensayo *in vivo* en el cangrejo fantasma (ver bioensayo, página 34). Para determinar la complejidad de las fracciones activas, éstas se analizaron mediante CLAR en el mismo sistema y condiciones utilizados para la fracción F2_2 (página 37).

6.8.1 Aislamiento del neuropéptido presente en la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2_5) mediante CLAR semipreparativa.

Para aislar al neuropéptido presente en la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2_5) obtenida de la separación por EFS en cartucho catiónico fuerte, se procedió a generar una solución de la muestra (10 mg / 100 μ L) la cual fue inyectada (25 μ L por inyección) en un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución CLAR utilizando el método PulpoFr4_desarrollo3 en condiciones semipreparativas (página 30). Se colectó el pico correspondiente a los tiempos de retención de 17 a 18 min.

Una vez aislado el neuropéptido, se procedió a determinar su perfil total de aminoácidos en el mismo sistema y condiciones utilizados para la fracción F2_2 (página 37).

6.8.2 Determinación de la secuencia del neuropéptido presente en la fracción (F2_2_5) mediante LC-MS.

El neuropéptido aislado fue sometido a *secuenciación de novo* mediante la técnica de LC-MS-ESI (Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas-Ionización por Electrospray) [16]. Utilizando el equipo en la Unidad de Servicios Especializados de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química-UNAM, en México, D.F. (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 30).

6.9 Estudio comparativo de la saliva generada *in vivo* con respecto del extracto generado mediante la extracción acuosa de las GSP en condiciones de pesquería.

6.9.1 Extracción de la saliva *in vivo*.

Captura y mantenimiento de los pulpos: Se colectaron un total de 25 organismos del medio silvestre, los cuales fueron capturados mediante el arte de pesca tradicional “jimba y gareteo”, empleando como carnada jaiba azul

(*Callinectes sapidus*), del puerto de Sisal, Yucatán, de acuerdo al área de muestreo (**Figura 8**).

Los pulpos capturados fueron mantenidos en un tanque de 200 L, con agua de mar, con recambio de agua constantemente (1 hora aproximadamente) hasta el momento del desembarco. Posteriormente, se trasladaron al área de los estanques de pulpo de la Unidad Académica Sisal (UA-S), donde fueron colocados individualmente en tanques de 80 L, con un sistema de aireación constante y flujo de agua con las siguientes condiciones: temperatura de 24.65-29.23 °C, salinidad de 35.7-35.8 ‰, oxígeno 4.93-5.23 mg/L y pH 7.6-7.7 [7, 57].

Disección de las glándulas salivales posteriores: El pulpo fue sedado en un baño de agua con hielo hasta la insensibilización del organismo (30-40 minutos); luego se colocó en una charola de disección acondicionada con hielo en la parte inferior y se procedió a realizar un corte del manto del pulpo dorsalmente; posteriormente se abrió la envoltura visceral para dejar al descubierto a todos los órganos internos, e inmediatamente se cortaron el esófago y el seno venoso que se encuentran por encima de las GSP; una vez localizadas las GSP éstas se liberaron cuidadosamente de sus cuatro arterias a las cuales se encuentran sujetas, dos arterias conectadas al órgano llamado estómago anterior (Crop) y las otras dos con conexión a la masa bucal [13].

Por último se cortó el conducto común que lleva la saliva a la papila salival y se estimuló con un par de cables conductores de energía unidos a una batería de 9 V. La secreción fue colectada en viales y conservada en un ultracongelador a – 70 °C. El procedimiento se realizó con los pulpos restantes, a fin de colectar al menos 2 mL de saliva, guardando toda la saliva en un solo vial.

6.9.2 Separación y comparación del extracto neurotóxico obtenido a partir de las GSP versus el obtenido a partir de la saliva *in vivo*.

Una vez obtenida la saliva *in vivo*, fue diluida en 3 mL de agua bidestilada y posteriormente pasada a través de una membrana Amicon Milipore con un tamaño de corte de 3 kDa; dicha membrana se colocó dentro los tubos Falcon y se

centrifugó (3857 rcf / 1 h / 23 °C) hasta obtener un volumen de 250 µL en la parte superior de la membrana. El filtrado fue colectado (fracción neurotóxica < 3 kDa), congelado en un ultracongelador a -70 °C y liofilizado nuevamente.

Una vez conseguida la fracción neurotóxica (< 3 kDa), se pesaron 150 mg y se disolvió en 2 mL de agua bidestilada. La solución se aplicó en un cartucho Strata C18-U de fase reversa (55 µm, 70 Å, Phenomenex®); seguidamente la fracción F2_2 adquirida a partir del cartucho Strata C18-U se eluyó en un cartucho de intercambio catiónico fuerte (SXC-Strata de Phenomenex®) hasta obtener la fracción F2_2_5 (para ambos cartuchos se determinaron los rendimientos).

La fracción F2_1 adquirida de la elución con agua en el cartucho Strata C18-U y la fracción F2_2_5 obtenida de la elución con 2 % NH₄OH en MeOH en el cartucho de intercambio catiónico fuerte se congelaron en un ultracongelador a -70 °C y se liofilizaron (-45 °C, 0.2 mBar).

Seguidamente las fracciones anteriores obtenidas partir de la saliva *in vivo* fueron sometidas al bioensayo neurotóxico para determinar su actividad (ver bioensayo, página 34). También fueron analizadas para conocer su complejidad mediante el sistema CLAR y comparadas con las fracciones obtenidas a partir de las GSP bajo las mismas condiciones.

7.0 RESULTADOS.

Las GSP obtenidas en condiciones de la pesquería se inspeccionaron para ver su integridad y coloración. En general todas las GSP presentaron una coloración amarilla ocre y una buena integridad del órgano. Las GSP se liofilizaron, molieron y como la saliva es un fluido acuoso, se decidió utilizar agua como disolvente de extracción. El extracto crudo al ser sometido al bioensayo *in vivo* en el cangrejo fantasma, presentó la actividad esperada, el cangrejo se paraliza en 2 min y es notorio, ya que disminuye su actividad y baja sus quelípedos (quelas o tenazas) y en 1 minuto empieza a temblar, sus extremidades se relajan distendiéndose y muere a los 10 minutos (**Figura 10**).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 10. Efecto del extracto crudo de las GSP. **(a)** Colecta de cangrejos fantasma para la realización de los bioensayos. **(b)** Inyección en el tercer pereiópodo del crustáceo. **(c)** Control negativo (es notoria la posición de ataque del cangrejo, junto con las quelas). **(d)** Efecto neurotóxico del extracto crudo (13 mg de extracto / 100 μ L de agua inyectable), se puede observar la relajación de los músculos de los apéndices, así como la poca coordinación del crustáceo.

Considerando que la mayoría de las proteasas presentes en la saliva de otros cefalópodos (entre ellos *O. vulgaris*) poseen un tamaño molecular entre 20-30 kDa y que el efecto neurotóxico está asociado con polipéptidos (página 4, **Figura 1**), se decidió separar el extracto mediante tamaño molecular utilizando ultrafiltración. Así, el extracto crudo se separó con una membrana Amicon de 3 kDa de corte. La separación resultó en dos fracciones una con moléculas de tamaño molecular menor a 3 kDa y otra con tamaño molecular mayor a 3 kDa.

La evaluación de estas dos fracciones en el bioensayo neurotóxico *in vivo*, reveló que la inyección de la fracción con tamaño molecular menor a 3 kDa presentó el efecto neurotóxico: movimientos rápidos de los ojos, relajación de todas sus extremidades, descoordinación motora y parálisis. Es importante señalar que el efecto se manifiesta en los primeros 10 segundos y el cangrejo regresa a su estado inicial 2 horas más tarde. El efecto de la segunda fracción (con tamaño mayor a 3 kDa), sólo provocó la muerte del cangrejo, sin presentar el efecto neurotóxico (**Figura 11**).



Figura 11. Efecto de los extractos de las GSP separados por la Membrana Amicon Millipore con corte de 3 kDa. **(a)** Efecto neurotóxico del extracto de GSP con peso molecular menor a 3 kDa (13 mg de extracto / 100 μ L agua inyectable), se puede observar la poca coordinación del cangrejo y el movimiento exacerbado de los ojos. **(b)** Muerte del cangrejo, producto del efecto del extracto con peso molecular mayor a 3 kDa.

7.1 Separación de la fracción neurotóxica (F1_2) mediante CLAR.

Se decidió utilizar la metodología de CLAR para la separación completa de la fracción neurotóxica mediante condiciones analíticas, muy similares a las reportadas en la literatura y enseguida en condiciones semipreparativas [77]. Cuando se inyectó el extracto neurotóxico al sistema CLAR se obtuvo el cromatograma correspondiente (**Figura 12**), donde se hizo evidente la complejidad del extracto. En el cromatograma aparecen varias señales que pueden pertenecer a un solo compuesto o a una mezcla de compuestos con la misma polaridad y por lo tanto presentan el mismo tiempo de retención. Se decidió coleccionar 9 fracciones en función del tiempo de retención (F1 no se coleccionó), las cuales están señaladas en el cromatograma.

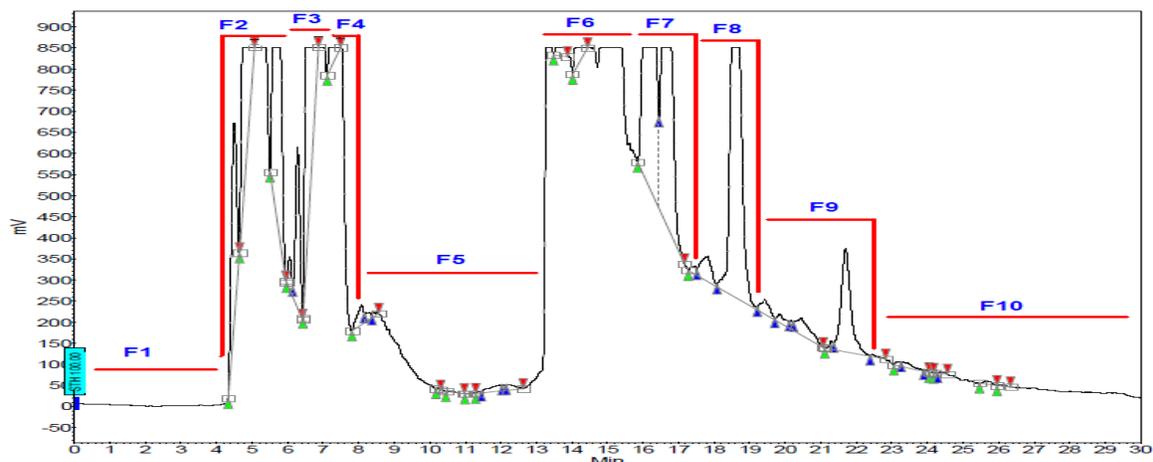


Figura 12. Cromatograma de la fracción neurotóxica (F1_2); en el cual aparecen los tiempos de retención seleccionados para coleccionar las 9 fracciones que se separaron (F1 no fue coleccionada). *Método Pulpo 1 analítico en condiciones analíticas* (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 29)

Una vez coleccionadas las fracciones, se verificó la separación de cada fracción empleando la metodología de CLAR en condiciones analíticas. Posteriormente se evaluó la actividad de las diferentes fracciones mediante el bioensayo *in vivo* en el cangrejo fantasma. Los resultados indicaron que las fracciones 6 y 9 presentan un efecto de relajamiento-descoordinación motora reversible, mientras que las fracciones 2 y 3, poseen un efecto paralizante reversible (**Figura 13**).

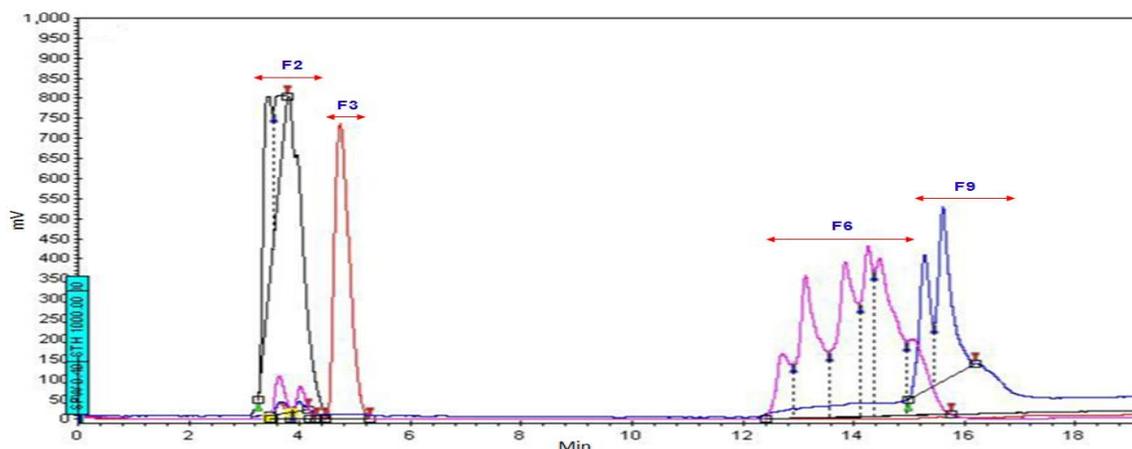


Figura 13. Cromatograma de las fracciones activas separadas de la fracción neurotóxica (F1_2). Cada fracción se presenta en diferente color y se han sobrepuesto todos los cromatogramas para una mejor visualización. *Método Pulpo 1 analítico en condiciones analíticas* (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 29).

Los organismos que fueron inyectados con la fracción 6 y en menor medida la 9, mostraron contracciones corporales involuntarias, pérdida de movilidad, falta de respuesta a estímulos y que las bajas a los 10 segundos; efecto que después de una hora desaparecía. Por otro lado, los organismos que fueron inyectados con las fracciones 3 y en menor medida la 2, se observaban inmóviles y sin respuesta a estímulos, permanecieron inmutables por unos 15 minutos, regresando después a la normalidad. En este punto, aunque ya se tenía caracterizada la fracción neurotóxica, las cantidades separadas resultaron ser menores a 10 mg y con un gasto de casi 15 L de fase móvil y aún las fracciones presentaban al menos dos compuestos o grupos de compuestos. Por lo anterior se procedió a buscar una mejor estrategia para la separación del extracto neurotóxico.

Al mismo tiempo para verificar la separación por tamaño molecular, se analizó la fracción neurotóxica mediante SDS-PAGE (**Figura 14**). En general los resultados demostraron que la fracción contiene compuestos con tamaño molecular menor a 5 kDa, por lo que el resultado validó el uso de las membranas Amicon en la separación por tamaño molecular.

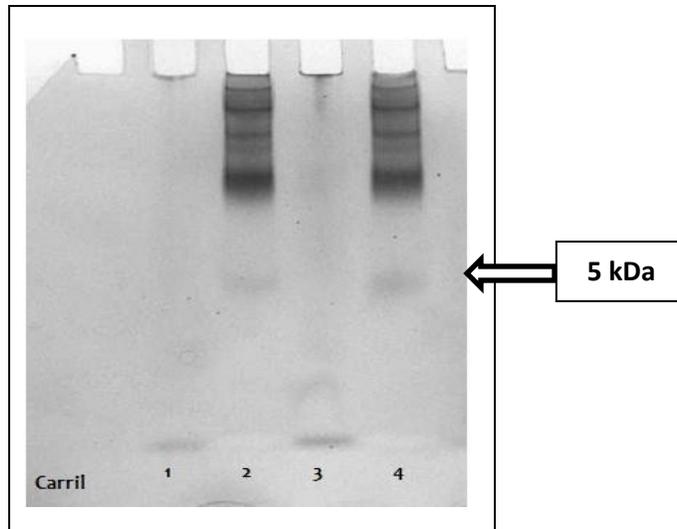


Figura 14. SDS-PAGE de la fracción neurotóxica F1_2 en gel de poliacrilamida. Carril1: muestra de la F1_2 diluida (30 µg/µL); carril 2 y 4: marcador (peso molecular de 40 kDa a 5 kDa), carril 3: muestra de la F1_2 concentrada (50 µg/µL).

7.2 Separación biodirigida de la fracción neurotóxica (F1_2) por EFS en cartucho de fase reversa.

La fracción F1_2 (menor a 3 kDa), se aplicó y eluyó en los cartuchos C18-U de acuerdo a la **Tabla 5**; además, en la tabla se presentan los datos de la cantidad obtenida y la actividad determinada en el bioensayo *in vivo* en cangrejo fantasma.

Tabla 5. Resultados del fraccionamiento por EFS en cartucho Strata C18-U (55 µm, 70 Å, Phenomenex) de la fracción neurotóxica (250 mg de la F1_2 en 2 mL de agua).

Fracción	Elución correspondiente	Cantidad obtenida (mg)	Actividad
	Muestra	43.5	Inactivo
F2_1	H ₂ O 100 %	122.0	Activo-Paralizante (70 segundos)
F2_2	H ₂ O:AcCN 90:10 %	21.0	Activo-Relajamiento y descoordinación motora (40 segundos)
F2_3	H ₂ O:AcCN 80:20 %	11.1	Inactivo
F2_4	H ₂ O: AcCN 50:50 %	1.4	Inactivo

De los resultados obtenidos, se observó que la actividad paralizante se encuentra en la fracción F2_1, correspondiente a la elución con agua, mientras que la actividad de relajamiento-descoordinación motora se presenta en la fracción F2_2, que se obtuvo en la elución con H₂O:AcCN 90:10 %. Al analizar las fracciones en el sistema CLAR en condiciones analíticas se obtuvieron los cromatogramas de la **Figura 15** y **Figura 16**, respectivamente.

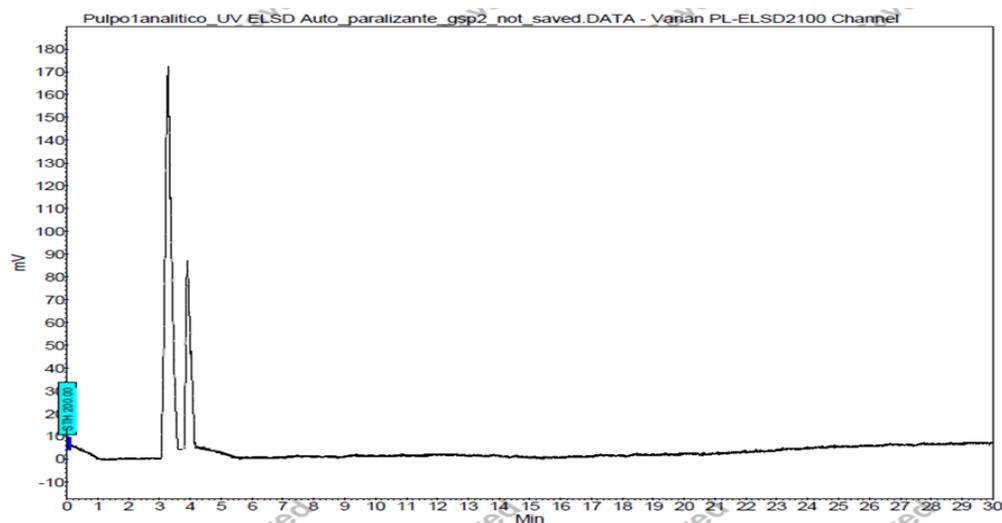


Figura 15. Cromatograma de la fracción F2_1, donde se observan dos señales principales al inicio del análisis. *Método Pulpo 1 analítico en condiciones analíticas* (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 29).

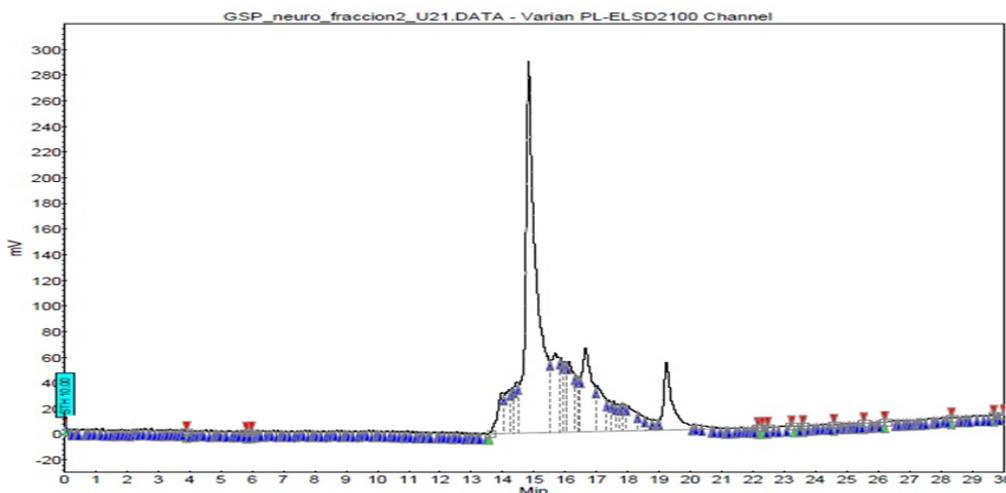


Figura 16. Cromatograma de la fracción F2_2 obtenida de la separación por EFS en cartucho C18-U; donde es notoria la presencia de una sola señal principal. *Método Pulpo 1 analítico en condiciones analíticas* (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 29).

Analizando los resultados y comparandolos con la separación por CLAR (cromatograma de la **Figura 13**), era evidente que la señal principal de la fracción

F2_2 (TR: 15 y 16 min) corresponde a una de las dos señales principales en el cromatograma (fracción 9). Por otro lado, el cromatograma de la fracción F2_1 presentó las dos señales, correspondientes a la fracción 2 y 3 de la separación por CLAR.

7.2.1 Análisis de la fracción causante de la actividad paralizante (F2_1) (completamente polar) mediante CLAR.

En el cromatograma de la **Figura 15** se pueden observar dos señales principales (TR: 3-4 min), lo que nos hace suponer que se trata de dos compuestos o dos grupos de compuestos, ambos de polaridad elevada y de naturaleza similar dado que son contiguos. Una de las señales es de mayor tamaño, lo que nos indica que muy probablemente este compuesto se encuentre en una mayor concentración.

Debido a que las dos señales principales de la fracción F2_1 no presentan una buena resolución y esto dificulta la colecta de cada señal, la fracción con actividad paralizante se sometió a diversos métodos de separación para tratar de aumentar la resolución [80]:

a) Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Con el objetivo de incrementar la selectividad en el proceso de separación se utilizaron diferentes columnas: fase reversa (C8, CN, C18 para proteínas, C12 para polipéptidos) y fase normal (empleando condiciones de interacciones hidrofóbicas, HILIC). Desafortunadamente al realizar el análisis de la fracción F2_1, no se logró mejorar la separación de las dos señales; obteniendo desde una menor resolución al realizar el análisis con las columnas CN y Aeris Peptide (C18), hasta una mayor resolución con la columna HILIC pero ésta implicaba la utilización de sales, lo cual incrementaba los pasos de separación [80].

b) Separación por extracción selectiva con NaOH y caracterización en CCF.

El carácter polar de la fracción F2_1, muy probablemente era debido a la presencia de algún compuesto ionizado (aminas principalmente), por lo que se decidió incrementar el pH y extraer los compuestos con un disolvente orgánico. Así, la fracción F2_1 se trató con base (NaOH, al 10 %) y se extrajo con Acetato

de etilo. El análisis de la fracción orgánica utilizando Cromatografía en Capa Fina (CCF) fase normal y reversa, reveló una disminución de la polaridad de los compuestos en la fracción; sin embargo su evaluación en el bioensayo resultó ser inactiva [80].

c) Extracción en Fase Sólida con cartucho de intercambio iónico y de fase reversa.

Cuando se utilizaron ambos cartuchos, los resultados demostraron que no se logró la separación, debido a la alta polaridad de la fracción F2_1, ya que en fase reversa la actividad se encontraba en la fase acuosa (100 % agua), mientras que en el intercambio iónico no era retenida en el cartucho.

d) Análisis mediante GC-MS.

Debido a la alta polaridad que presentaban los compuestos en la fracción F2_1, fue necesario someterlos a reacción con dos diferentes agentes silanizantes: BTSFA (N, O-bis (trimetilsilyl) triflouracetamida) y anhídrido triflouracético, antes de inyectarlos en el cromatógrafo de gases. Los resultados indicaron que la muestra se silaniza mejor con BSTFA.

Una vez silanizada la muestra, se realizó su análisis por GC-MS, todas las señales principales fueron analizadas con el detector de masas y para cada espectro generado, se buscó la identidad del compuesto presente, en la librería Wiley NIST 05 MS Spectra [80]. En la **Figura 17** se presenta el cromatograma obtenido.

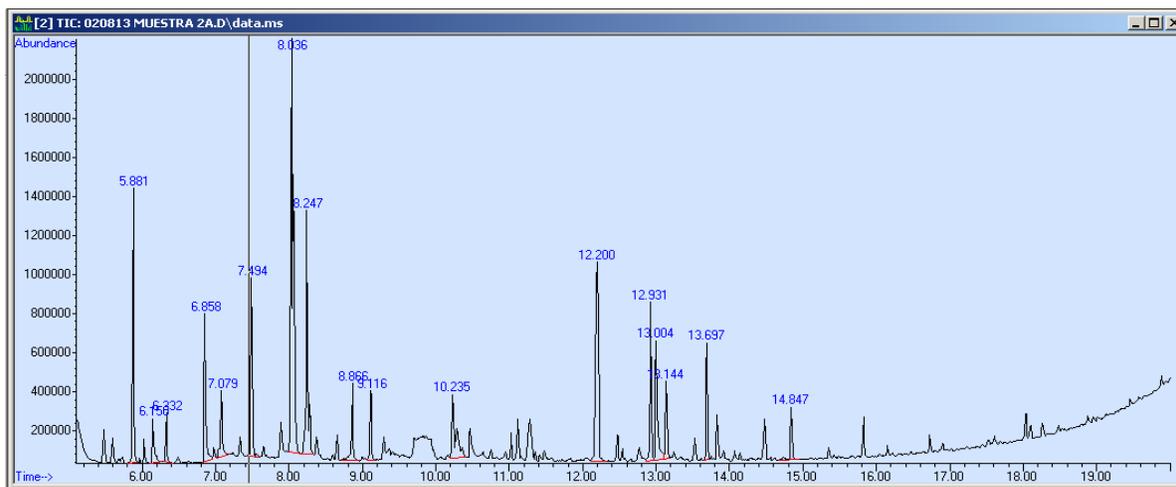


Figura 17. Cromatograma de la fracción paralizante derivatizada con BTSFA, obtenido mediante GC-MS. (Ver instrumentación para condiciones de análisis, página 31).

De este análisis se logró determinar la presencia de aminoácidos libres (Alanina, Ácido Glutámico, Prolina, Valina, Isoleucina, Leucina, Serina, Metionina, Treonina y Tirosina) además de carbohidratos (Talosa y Glucosa) como compuestos principales de la fracción (F2_1) [80].

7.2.1.1 Determinación del perfil total de aminoácidos libres presentes en la fracción causante de la actividad paralizante (F2_1).

Se realizó la determinación del perfil de aminoácidos libres presentes en la fracción F2_1, para comprobar los resultados del análisis mediante GC-MS. El aminograma se presenta en la **Figura 18**.

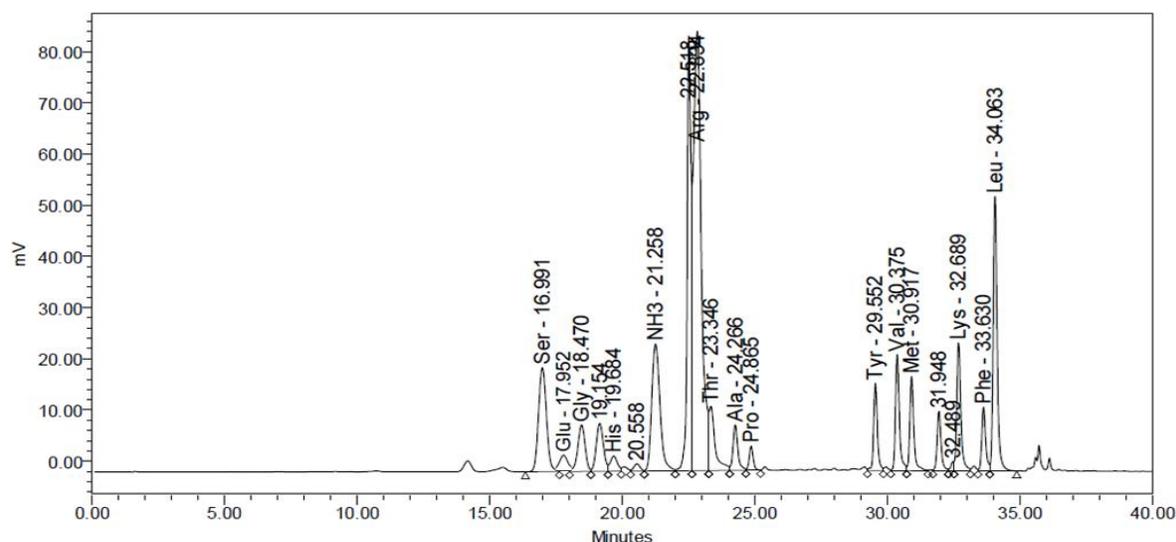


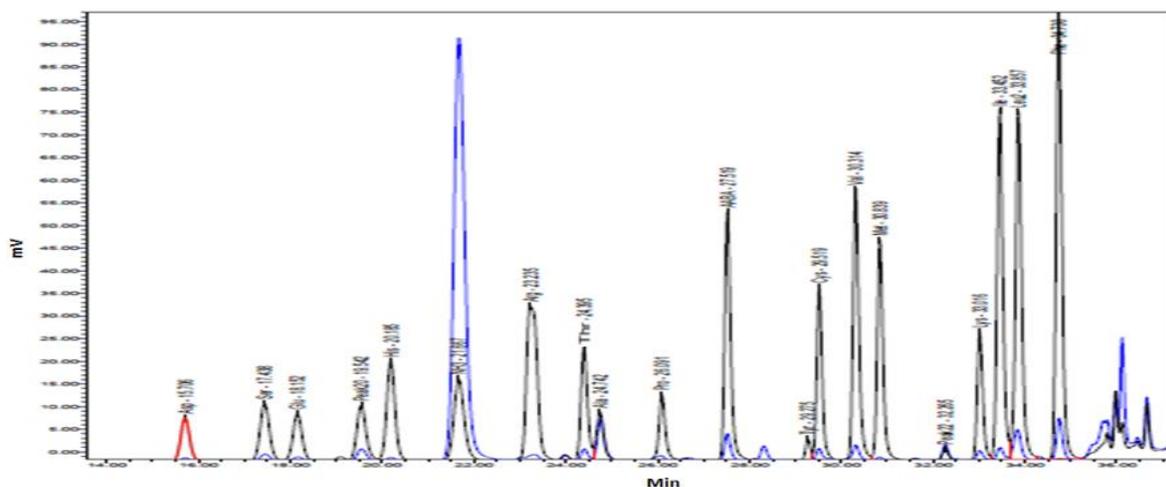
Figura 18. Aminograma obtenido de la fracción F2_1. Estándar usado: 100 pmol de c/u de los 18 aminoácidos, 50 pmol de cisteína y 100 pmol de ácido 2-aminobutírico (AABA) como estándar interno. *Método AccQ-TAG de Waters* (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 30).

En el aminograma (**Figura 18**) se observa la presencia de 14 aminoácidos: Serina, Ácido Glutámico, Glicina, Histidina, Arginina, Treonina, Alanina, Prolina, Tirosina, Valina, Metionina, Lisina, Leucina y Fenilalanina.

7.2.2 Análisis de la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2) (medianamente polar) mediante CLAR.

7.2.2.1 Determinación del perfil total de aminoácidos presentes en la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2).

Para establecer los aminoácidos constituyentes de la muestra activa, se realizó la hidrólisis ácida y básica (1.0 mg de la fracción F2_2) a 106 °C por 18 h y 7 h respectivamente. El aminograma se presenta en la **Figura 19**.



Por otro lado, se realizaron análisis con diferentes condiciones en el sistema CLAR: desde eluciones isocráticas con diferentes disolventes (metanol, acetonitrilo, isopropanol) y con diferentes gradientes. Inclusive se utilizaron diferentes columnas (Ciano, C8, C12, C4) para aumentar la selectividad y en ninguna de ellas se llevó a cabo una mejor separación que con la Columna LUNA (C18, fase reversa, 250 X 4.6 mm, tamaño de partícula 5 μ m Phenomenex, Inc., USA).

Sin embargo, se logró una mejor separación de la F2_2 utilizando un gradiente de 0 a 18 % con acetonitrilo-agua en 20 minutos; el comparativo del primer método analítico con respecto de este último, se presenta en la **Figura 20** [77].

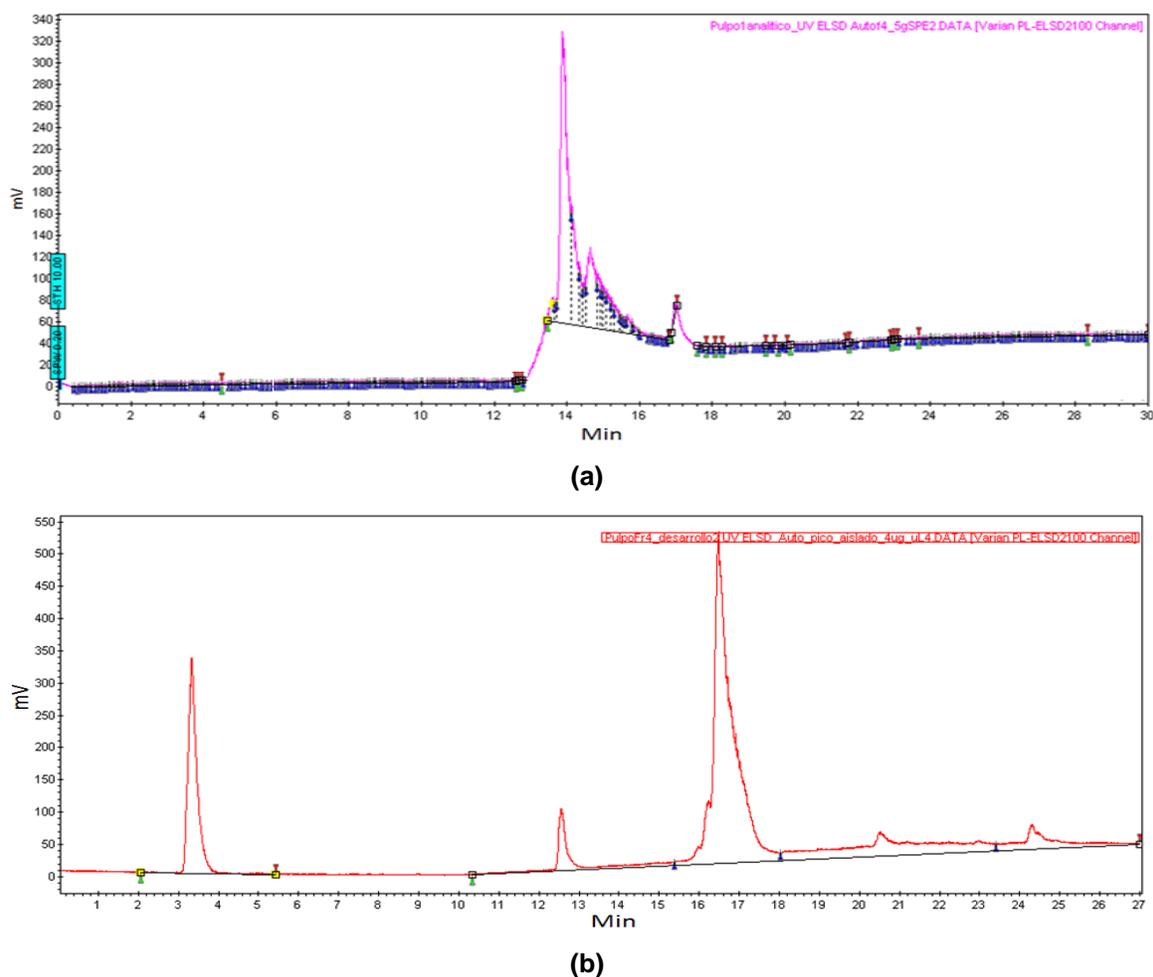


Figura 20. Comparación de los cromatogramas obtenidos para la separación de la fracción F2_2. **(a)** Con gradiente de 0 a 35 % de acetonitrilo-agua, en donde se logró obtener una sola señal principal. **(b)** Con gradiente de 0 a 18 % de acetonitrilo-agua, donde es evidente una mejor separación de las señales constituyentes de la fracción. *Método Pulpo 1 analítico y método PulpoFr4_desarrollo3 en condiciones analíticas* (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 29).

7.3 Separación de la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2) mediante EFS en cartucho de intercambio catiónico fuerte.

Tomando en cuenta la presencia de una señal intensa del NH_3 (grupo amino) en el aminograma, se procedió a utilizar un cartucho de intercambio catiónico fuerte. Los datos de la cantidad obtenida y la actividad determinada en el bioensayo *in vivo* en cangrejo fantasma se presentan en la **Tabla 6**. Es evidente que la actividad se presenta en la fracción F2_2_5 (2 % de NH_4OH en MeOH), causando una relajación del cangrejo en 20 segundos.

Tabla 6. Resultados del fraccionamiento por EFS en cartucho de intercambio catiónico fuerte (SXC-Strata de Phenomenex®) de la fracción F2_2 del cartucho Strata C18-U (55 μm , 70 Å, Phenomenex) (21 mg de la F2_2 en 2 mL de agua).

Fracción	Elución correspondiente	Cantidad obtenida (mg)	Actividad
	Muestra	4.4	Inactivo
F2_2_1	$\text{H}_2\text{O}:\text{TFA}$ 90:10	12.6	Inactivo
F2_2_2	HCl 0.1 N en H_2O	7.5	Inactivo
F2_2_3	HCl 0.1 N en MeOH	7.2	Inactivo
F2_2_4	1 % NH_4OH en MeOH	3.3	Activo-Relajamiento y descoordinación motora (30 segundos)
F2_2_5	2 % NH_4OH en MeOH	1.6	Activo-Relajamiento y descoordinación motora (20 segundos)

El análisis por CLAR analítica de la fracción F2_2_5 presentó un cromatograma con una sola señal, en el nuevo método (**Figura 21**).

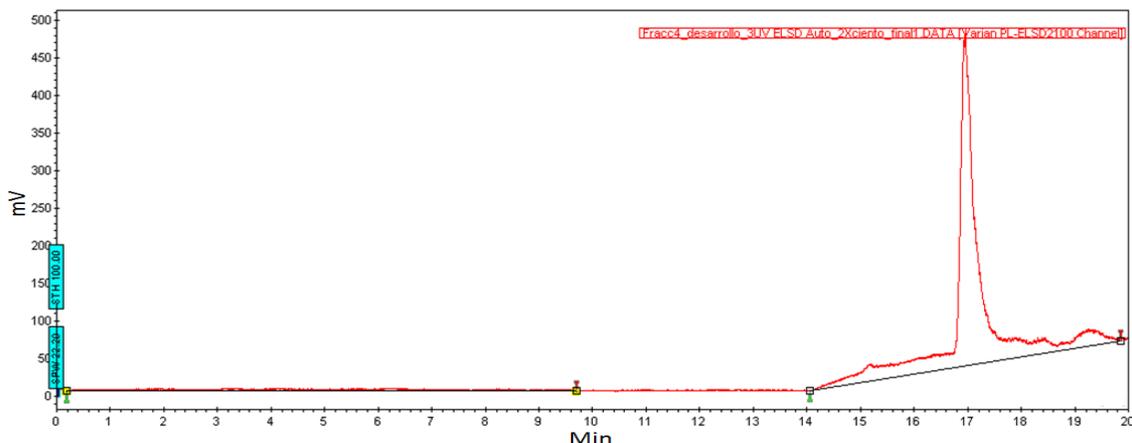


Figura 21. Cromatograma de la fracción F2_2_5 en CLAR analítica; en donde se visualiza la presencia de una sola señal principal en el tiempo de análisis. *Método PulpoFr4_desarrollo3 en condiciones analíticas* (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 29).

7.3.1 Aislamiento del neuropéptido presente en la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2_5) mediante CLAR semipreparativa.

Se realizó la colecta de la muestra correspondiente a la señal principal del cromatograma (TR: 17-18 min) de la fracción F2_2_5, utilizando una columna LUNA (C18, fase reversa, 250 x 10.0 mm, tamaño de partícula 10 μm Phenomenex, Inc., USA) (**Figura 22**); por cada 10 mg de muestra, se colectó 2 mg aproximadamente.

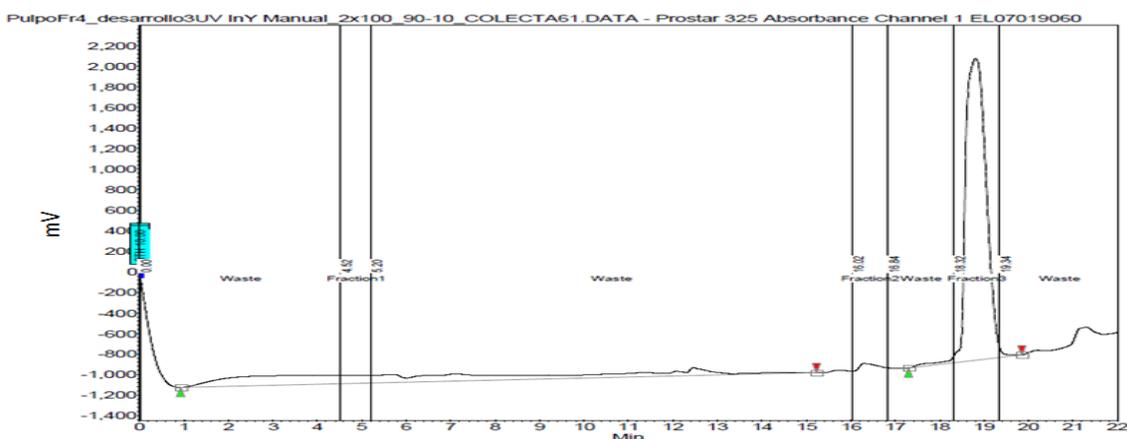
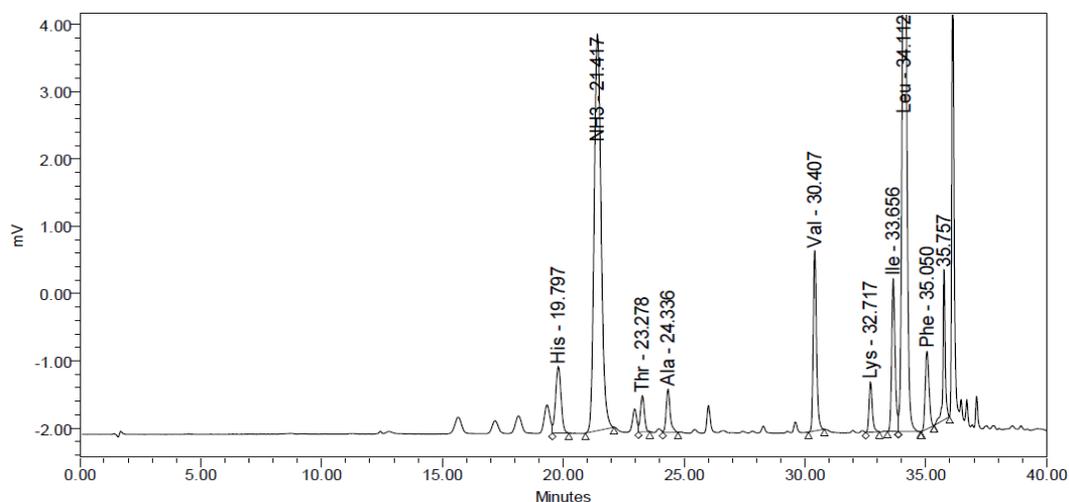


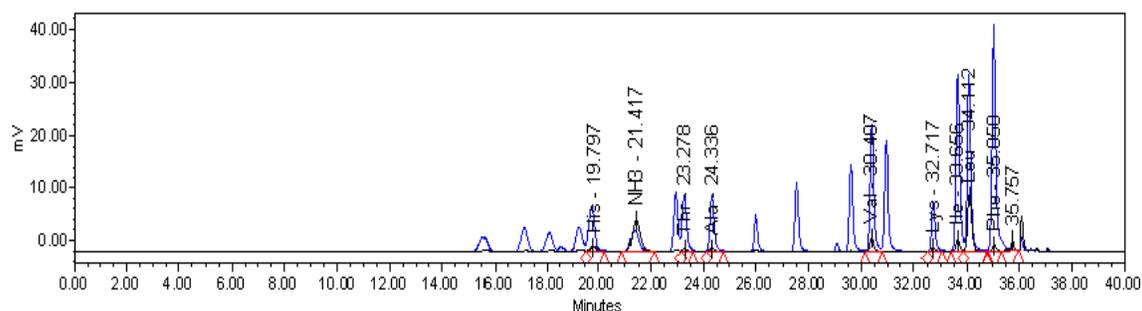
Figura 22. Cromatograma de la fracción F2_2_5 en CLAR semipreparativa; en el que se indican los tiempos de retención en los que se colectó la muestra (fracción tres) correspondiente a la señal principal. *Método PulpoFr4_desarrollo3 en condiciones semipreparativas* (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 30).

7.3.1.1 Primera determinación del perfil total de aminoácidos del neuropéptido aislado de la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2_5).

Para determinar los aminoácidos constituyentes de la muestra colectada (señal principal) de la fracción (F2_2_5), se realizó la hidrólisis ácida (1.0 mg de la muestra colectada) a 106 °C por 18 h. El aminograma se presenta en la **Figura 23**.



(a)



(b)

Figura 23. Aminogramas de la fracción F2_2_5. **(a)** Aminograma de la muestra colectada. **(b)** Integración del aminograma de la muestra colectada (color negro), con el estándar de aminoácidos (color azul) de 100 pmol de c/u de los 18 aminoácidos, 50 pmol de cisteína y 100 pmol de ácido 2-aminobutírico (AABA) como estándar interno. *Método AccQ-TAG de Waters* (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 30).

En el aminograma correspondiente a la muestra colectada (señal principal) obtenida de la fracción F2_2_5 (**Figura 23 (a)**), se puede observar la presencia de 8 aminoácidos: Histidina, Treonina, Alanina, Valina, Lisina, Isoleucina, Leucina y

Fenilalanina. Es interesante notar que aparece la señal correspondiente al grupo amino (NH_3), lo cual indica que el polipéptido se encuentra amidado en el C-terminal, dado que en el análisis no se presenta Ácido glutámico ni Ácido aspártico.

Cuando se verificó la pureza de la muestra colectada por CLAR, la señal principal estaba acompañada por otra señal pequeña (TR: 3-4 min) (**Figura 24**) y no fue posible dilucidar si los aminoácidos detectados correspondían a la señal principal.

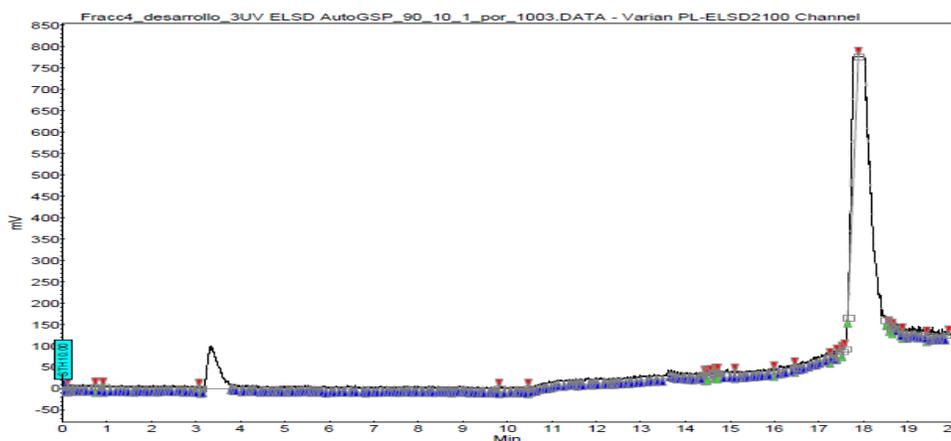


Figura 24. Cromatograma de la muestra colectada (señal principal) de la fracción F2_2_5 de las GSP. Método *PulpoFr4_desarrollo3* en condiciones analíticas (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 29).

7.3.1.2 Segunda determinación del perfil total de aminoácidos del neuropéptido aislado de la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2_5).

En un segundo reaislamiento de la muestra, una vez realizada la colecta de la fracción F2_2_5 (TR: 17-18 min) se procedió a determinar el perfil de aminoácidos mediante el sistema AccQ-TAG de waters. Sin embargo, por problemas técnicos con el detector de fluorescencia no se logró el análisis.

Por tal motivo se decidió implementar el método de CLAR con un Detector Evaporativo de Difracción de Luz (DELD o ELSD en inglés) [81], en el cual se optimizaron diferentes variables del sistema cromatográfico: flujo de la fase móvil, nivel de detección, cantidad de muestra a inyectar, nivel de resolución y reproducibilidad.

El trabajo principal en el desarrollo del método fue la resolución, por lo que se emplearon diversas columnas de manera individual y dos en serie:

Columna	Fase
Columna Varian C8, 250 x 4.6 mm, Microsorb –MV 100-5	Reversa
Columna Varian CN, 250 x 4.6 mm, Microsorb –MV 100-5	Reversa
Columna Varian C18, 250 x 4.6 mm, Microsorb –MV 100-5	Reversa
Columna LUNA 5u C8 (2) 100 A, 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm (Phenomenex)	Reversa
Columna Jupiter 4u C12 Proteo 90 A, 250 x 4.60 mm, tamaño de partícula 5 µm (Phenomenex)	Reversa
Columna Aeris Peptide XB-C18, 150 x 4.60 mm, tamaño de partícula 3.6 µm (Phenomenex)	Reversa
Columna Aeris widepore XB-C18, 150 x 4.60 mm, tamaño de partícula 3.6 µm (Phenomenex)	Reversa
Columna PFP 150 x 4.60 mm, tamaño de partícula 3.6 µm (Phenomenex)	Reversa
Columna AccQ-TAG 3.9 x 150 mm, tamaño de partícula 4 µm (Waters Inc., USA)	EPAA

*EPAA: Especial Para Aminoácidos

Las condiciones óptimas para determinar 14 señales correspondientes a 17 aminoácidos (**Figura 25**) pertenecen al método aa20_full_UV ELSD Auto original en condiciones analíticas (**Tabla 7**).

Tabla 7. Condiciones de la separación analítica, utilizando un gradiente de 0 a 45 % con dos fases móviles en 40 minutos. Fase A: agua con 0.1 % de TFA y 0.2 % de HFBA y Fase B: metanol [81].

Método	aa20_full_UV ELSD Auto original .METH		
Condiciones			
Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% Fase A	% Fase B
Pre-run	0.8	100	0
8	0.8	100	0
11	0.8	78	22
21	0.8	73	27
30	0.8	45	55
38	0.8	100	0
40	0.8	100	0

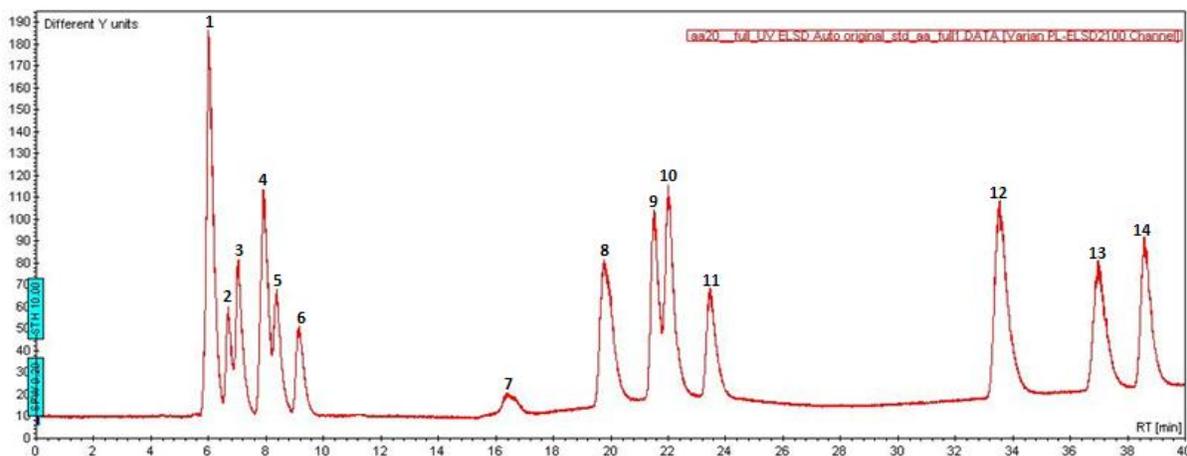


Figura 25. Aminograma del estándar de 17 aminoácidos. Método *aa20_full_UV ELSD Auto original* (5 mg/mL) (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 30).

Tabla 8. Lista de aminoácidos observados en el cromatograma de la fracción F2_2_5.

Número de pico	Aminoácido(s) correspondiente(s)
1	Glicina-Cisteína-Serina
2	Ácido aspártico
3	Glutamina
4	Alanina-Treonina
5	Ácido glutámico
6	Valina
7	Prolina
8	Lisina-Tirosina
9	Arginina
10	Histidina
11	Metionina
12	Fenilalanina
13	Isoleucina
14	Leucina

Al realizar el análisis de la muestra colectada (TR: 17-18 min) de la fracción F2_2_5 (previamente sometida a hidrólisis ácida) se obtuvo el cromatograma de la **Figura 26**; en el cual se observa la presencia de 8 señales, las cuales corresponden (por comparación con un estándar de aminoácidos) a: Serina (Glicina y Cisteína las descartamos por análisis previos), Alanina ó Treonina (ambos aminoácidos presentan el mismo tiempo de retención), Valina, Prolina, Histidina, Arginina, Metionina y Fenilalanina.

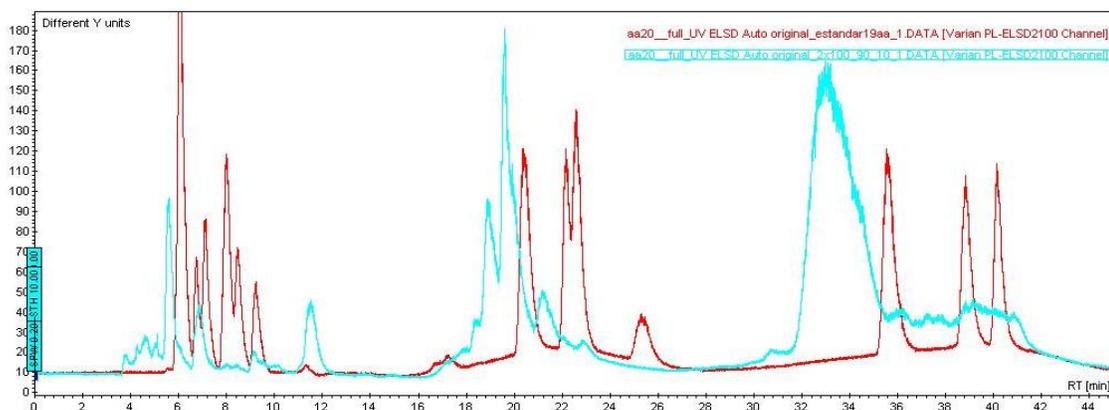


Figura 26. Aminograma del estándar de 17 aminoácidos (color rojo) versus la muestra hidrolizada con ácido, colectada de la fracción F2_2_5 (color azul). Método *aa20_full_UV ELSD Auto original* (10 mg/mL) (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 30).

En un segundo cromatograma (**Figura 27**) se obtuvieron resultados equivalentes, por lo que muy probablemente la señal principal de la fracción F2_2_5 se trate de un polipéptido de 8 a 9 aminoácidos.

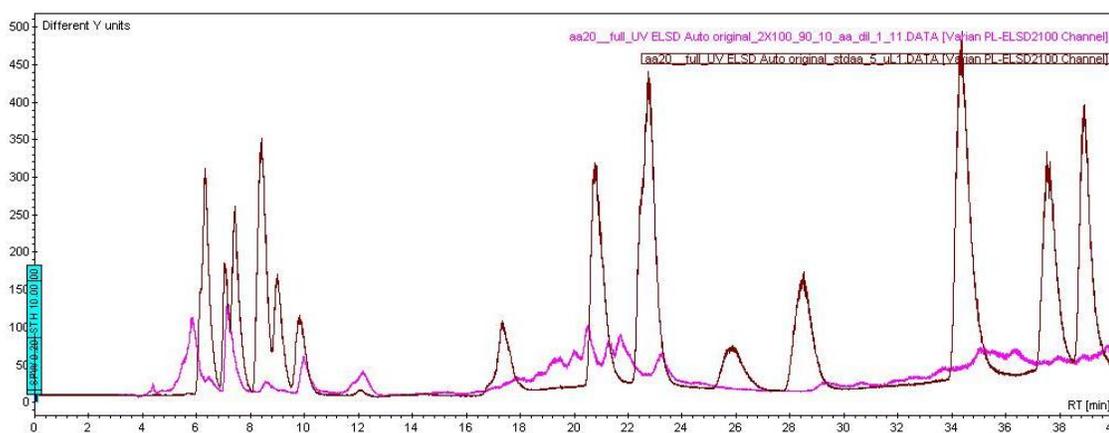


Figura 27. Aminograma del estándar de 17 aminoácidos (color rojo) versus la muestra hidrolizada con ácido, colectada de la fracción F2_2_5 (color rosa). Método *aa20_full_UV ELSD Auto original* (5 mg/mL) (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 30).

7.3.2 Análisis espectrométricos del neuropéptido presente en la fracción causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora (F2_2_5) aislado a partir de las GSP del pulpo *Octopus maya*.

En un intento por determinar el peso molecular y de manera alterna la secuencia del polipéptido presente en la muestra colectada (TR: 17-18 min) de la fracción F2_2_5. Las muestras se sometieron a estudios espectrométricos utilizando:

-LC-MS-Introducción Directa (Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas-Introducción Directa).

-LC-MS- MALDI-TOF (Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas de Tiempo De Vuelo –Ionización por Desorción Láser Asistida por Matriz).

-LC-MS- ESI (Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas-Ionización por Electrospray).

Los resultados de la Introducción Directa y del MALDI-TOF no proporcionaron ninguna señal, en gran medida por que el polipéptido tiene un peso molecular bajo. Sin embargo, el análisis realizado mediante ionización por Electrospray mostró cromatogramas y espectros interesantes, donde se observaron señales con masas moleculares pertenecientes a péptidos. Sin embargo, los cromatogramas presentaron más señales de las esperadas, dificultando la detección del polipéptido; debido principalmente a la sensibilidad del método (Femtomoles) y a las condiciones de análisis para el LC-MS: tiempo de análisis, gradiente, temperatura, pero principalmente por el empleo de ácido fórmico en las dos fases móviles. El uso del ácido triflouracético en ESI suprime la formación de iones y por lo tanto no se utiliza [83].

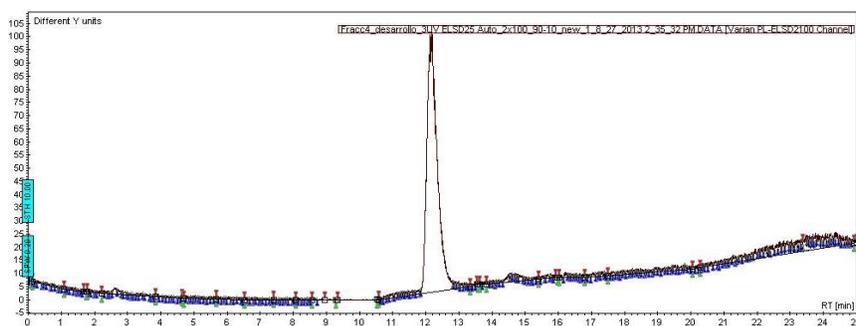
Para determinar el tiempo de retención del polipéptido en las condiciones de separación de la USAI, se realizaron varios análisis de las muestras obtenidas de la fracción F2_2_5 modificando tanto las condiciones de flujo como la fase móvil. Los métodos que se implementaron fueron:

1.- Método 1 desarrollado de acuerdo a las condiciones de la USAI. Tiempo de análisis: 25 minutos, flujo 0.3 mL/min, Fase móvil A: agua + 0.2 % ácido fórmico y Fase móvil B: acetonitrilo + 0.2 % ácido fórmico, empleando un gradiente de 100 % A de 0 a 2 min, 0-16 % de B de 2 a 15 min, 16-20 % B de 16 a 20 min y finalmente 100 % A de 20 a 25 min.

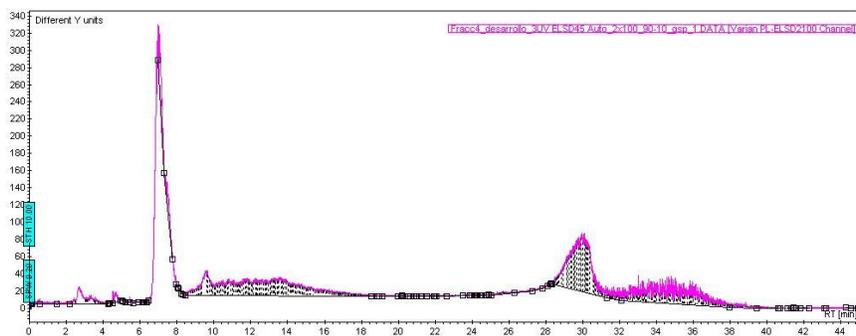
2.- Método 2 desarrollado de acuerdo a las condiciones de la USAI. Tiempo de análisis: 45 minutos, flujo 0.3 mL/min, Fase móvil A: agua + 0.2 % ácido fórmico y

Fase móvil B: acetonitrilo + 0.2 % ácido fórmico. Condiciones de gradiente de 3 % B inicial, 3-30 % B de 0 a 20 min, 30-97 % B de 20 a 35 min y finalmente de 97-3 % B de 35 a 45 min.

Los cromatogramas generados se presentan en la **Figura 28**, es evidente primero que existe una disminución del tiempo de retención al utilizar ácido fórmico, ya que pasó de 17-18 minutos (ver **Figura 21**, página 55) a 12-13 minutos (ver **Figura 28 (a)**) y segundo, que aún a pesar de emplear un gradiente con mayor porcentaje de disolvente apolar (de 30 al 97 % de acetonitrilo), solo se observa un pico principal. Por lo anterior, es muy probable que sea un solo polipéptido el causante de la actividad, ya que se han utilizado tres diferentes métodos con diferentes columnas y gradientes, y el resultado siempre es el mismo.



(a)



(b)

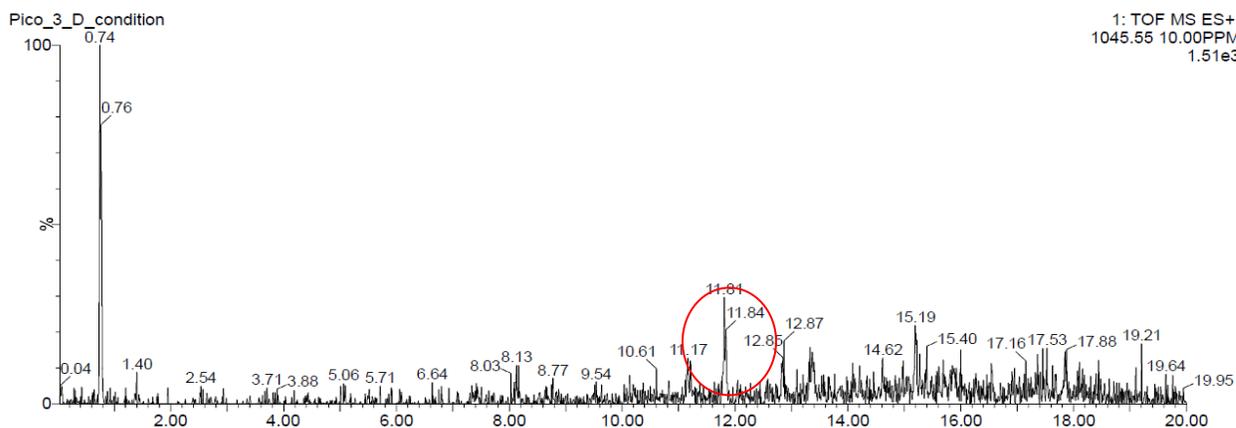
Figura 28. Cromatogramas generados del análisis de las muestras obtenidas de la fracción F2_2_5 a partir de las Glándulas Salivales Posteriores (GSP); **(a)** Método 1, **(b)** Método 2. **Sistema HPLC:** Sistema Binario Varian 211 (Varian Inc., USA), Detector Evaporativo de Difracción de Luz (DELD, ELSD en inglés). **Condiciones de separación:** Columna LUNA (C18, fase reversa, 250 X 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm Phenomenex, Inc., USA), Fase móvil acetonitrilo + 0.2 % ácido fórmico: agua + 0.2 % ácido fórmico, en un tiempo de 25 y 45 min de análisis respectivamente. Detección: ELSD, Temp. Nebulización = 40 °C, Temp. Evaporación = 70 °C, Flujo de nitrógeno = 1.0 mL/min; U.V. a 215 nm. Se inyectaron 25 µL de muestra (1 mg/mL).

Con la información del desplazamiento de los tiempos de retención en las condiciones de análisis de la USAI, se procedió a revisar en los cromatogramas las diferentes opciones de peso molecular (8 ó 9 aa, **Tabla 9**), en función al tiempo.

Tabla 9. Pesos moleculares de los posibles polipéptidos, de acuerdo a los aminoácidos detectados en el análisis de perfil de aminoácidos por DELD.

Alternativa	Aminoácidos que lo integran	Peso Molecular monoisotópico
1	Ala, Ser, Val, Pro, His, Arg, Met, Phe	944.47767
2	Thr, Ser, Val, Pro, His, Arg, Met, Phe	974.48824
3	Ala, Thr, Ser, Val, Pro, His, Arg, Met, Phe	1045.52535

Dos señales con los pesos moleculares posibles (Alternativa 1 y 2, de 8 aminoácidos) fueron encontrados en los cromatogramas, pero correspondieron a picos sumamente pequeños. Sin embargo, la tercera propuesta (Alternativa 3) correspondió a un pico con una altura media del cromatograma y se presenta a continuación (**Figura 29**):



(a)

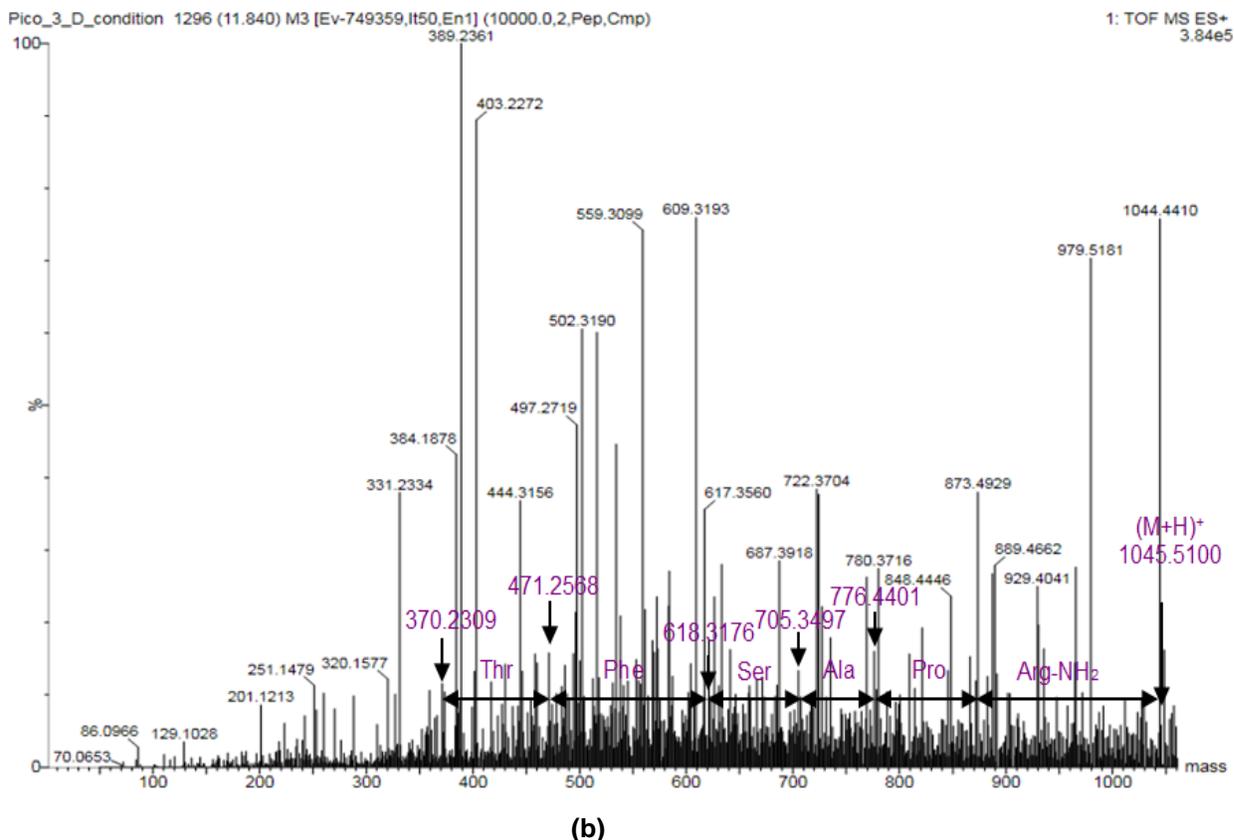


Figura 29. Cromatograma y Espectro de masas obtenidos por LC-MS-ESI del polipéptido aislado de la fracción F2_2_5. **(a)** Cromatograma, **(b)** Espectro de Alta energía (High CID) del pico que eluye a 11.48 min (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 30).

En el cromatograma de la **Figura 29(a)** se observa la señal en 11.84 min, la cual se encuentra dentro del intervalo de tiempo de retención del polipéptido en CLAR (determinado durante las pruebas realizadas bajo las mismas condiciones en las que fue analizada la muestra por LC-MS).

El espectro de masas del compuesto presente en esta señal (ESI, CID de alta energía) se muestra en la **Figura 29(b)** y corresponde a un polipéptido con peso molecular monoisotópico de 1, 045.5100 m/z correspondiente al ión $(M+H)^+$, propio de un polipéptido de 9 aminoácidos amidado e integrado por los aminoácidos encontrados: Alanina, Treonina, Serina, Valina, Prolina, Histidina, Arginina, Metionina y Fenilalanina (peso molecular monoisotópico encontrado 1, 045.5100 m/z y calculado $C_{46}H_{70}N_{14}O_{11}S_1$ de 1, 045.5253 m/z) [82].

Una ventaja de los espectros de masas adquiridos mediante la técnica de ionización por Electrospray, es que al ser una ionización suave, se pueden visualizar fragmentaciones que pueden llevar a determinar la secuencia del

polipéptido que le dio origen, estudio conocido como *secuenciación de novo* [83]. Tarea que se puede realizar de manera manual, o bien existen en el mercado diferentes programas comerciales y libres que permiten la determinación de la secuencia [82].

Al someter el espectro de masas para determinar la secuencia probable del polipéptido mediante el programa de adquisición (MassLinx 4.3.1, Waters), los resultados fueron inesperados; en particular, porque el polipéptido se encuentra amidado en el C-terminal y en su composición aminoacídica están presentes la Prolina (su N-terminal es lábil) y Arginina que suprimen la abundancia relativa de los fragmentos generados por ESI y que por otro lado, pueden inducir la fragmentación interna del polipéptido (formando iones que contienen el extremo C-terminal o N-terminal del polipéptido, dependiendo de la posición del aminoácido), dando como resultado que sea difícil su secuenciación [83]. Aún así, de manera manual, logramos identificar dentro del espectro de masas, 6 de los 9 aminoácidos esperados (**Figura 29**). Por la ubicación de los fragmentos encontrados, la secuencia parcial que se propone es la siguiente: X-X-X-Thr-Phe-Ser-Ala-Pro-Arg-NH₂.

7.3.3 Evaluación de la bioactividad de la fracción neurotóxica F2_2_5.

7.3.3.1 Evaluación de la actividad en un modelo de crustáceos: *Ocypode quadrata*.

A fin de conocer cuáles eran los extractos y fracciones con mayor actividad, se determinó la Dosis Efectiva Mínima (DEM), para ello se procedió a realizar diluciones logarítmicas de los extractos (rango 1000 µg/µL a 0.1 µg/µL) y cada dilución se aplicó a 2 cangrejos de 15 g aproximadamente. La dosis efectiva fue considerada como aquella concentración mínima en la que el extracto presentó el efecto. Los datos obtenidos de la DEM se presentan en la **Tabla 10** y es notorio como la concentración disminuye al purificar el extracto, resultado esperado para los compuestos específicos.

Tabla 10. Resultados de la Dosis Efectiva Mínima (DEM).

Fracción	Extracto	DEM ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1	Extracto crudo	40.0
1_2	Neurotóxico	40.0
1_1	Metabólico	43.0
2_1	H ₂ O 100 %	250.0
2_2	H ₂ O/AcCN 90:10 %	10.0
2_2_5	2 % NH ₄ OH en MeOH	1.0

A manera de resumen en la **Tabla 11** se enlistan las cantidades obtenidas de cada fracción activa, así como el rendimiento de cada fracción desde la generación del extracto crudo hasta la fracción con el neuropéptido aislado.

Tabla 11. Resultados de la purificación para la obtención de la fracción paralizante y relajamiento-descoordinación motora a partir de las GSP.

Fracción	Total (g)	Rendimiento (%)
GSP peso húmedo	503.00	100
GSP liofilizadas	110.00	21.86
Extracto crudo	40.92	8.14
Fracción neurotóxica (< 3 kDa)	17.63	3.50
EFS C18-U (f. paralizante)	8.74	1.73
EFS C18-U (f. relajamiento-descoordinación motora)	1.48	0.29
EFS Catiónico-Fuerte (f. relajamiento-descoordinación motora)	0.11	0.02

7.3.3.2 Evaluación de la actividad sobre un octópodo: *Octopus maya*.

Se realizaron pruebas de actividad de la fracción F2_2_5 en el pulpo *Octopus maya*, con dos objetivos, primero para determinar si la saliva presenta actividad en un organismo diferente a su presa natural (crustáceo) y segundo, los pulpos son caníbales y se piensa que utilizan su saliva para paralizar a sus congéneres; sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios.

Organismos: se utilizaron 6 pulpos de más de 300 g de peso, que se colectaron en las costas de Sisal y se mantuvieron en condiciones controladas [7, 57].

Bioensayo: Se preparó una solución de la fracción F2_2_5 (20 µg/µL) y se administró una dosis de 20 mg/kg de peso para cada pulpo. Como control negativo se inyectó agua inyectable. Las dosis se aplicaron en un tentáculo del pulpo y en el manto. Una vez aplicada la dosis, se procedió a observar los efectos de la saliva.

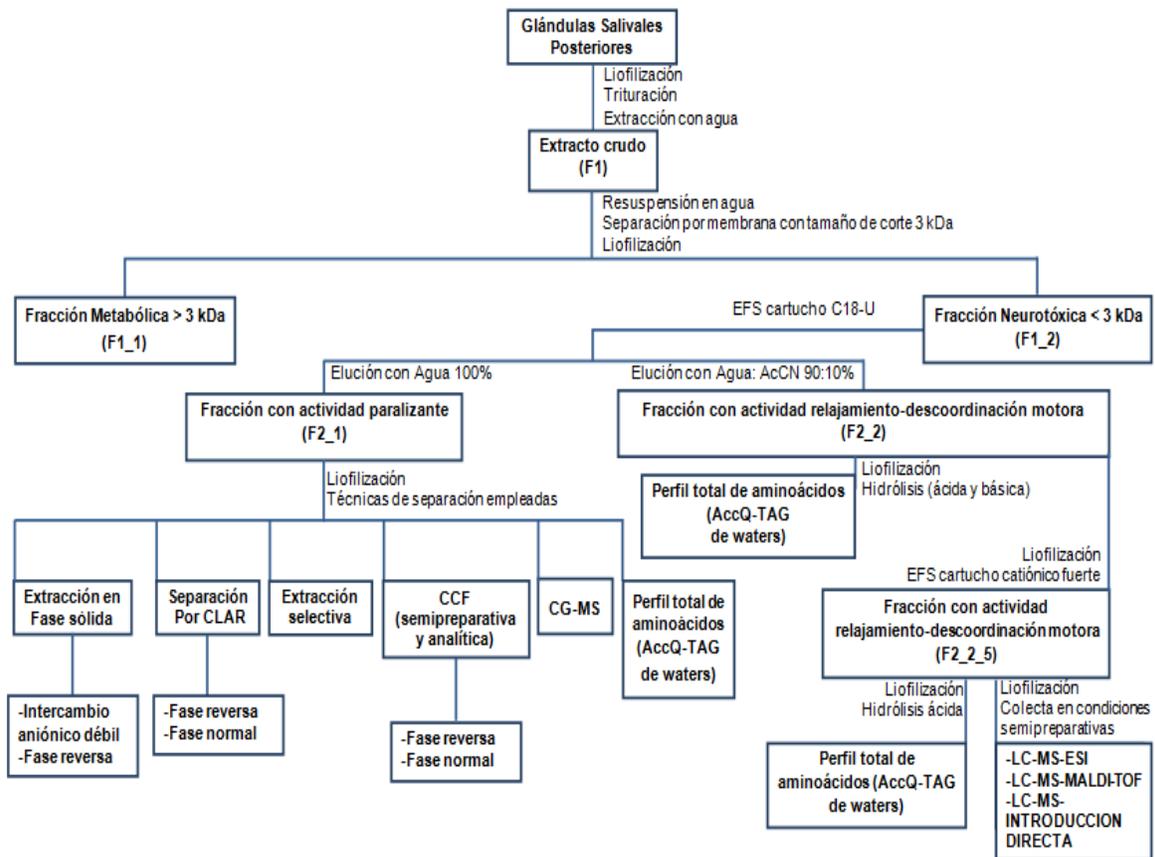
Resultados: Los resultados obtenidos son similares a los efectos observados en el bioensayo *in vivo* en el cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*):

- 40 segundos después de la inyección:
 - El pulpo se relaja por 30 segundos, acompañado de un cambio de coloración de rojo a pálido (blanco) y descoordinación motora.
 - Se nota una disminución en su agresividad (se puede manipular fácilmente y por tanto se vuelve más dócil).
- Transcurrido 1 minuto, el brazo (o tentáculo) donde fue inyectado queda completamente inmóvil y se nota una ausencia en la reacción de los cromatóforos (es decir el brazo queda pálido).
- Después de 2 minutos se observan cambios de coloración parcial en el hemisferio donde se realizó la inyección (la mitad del cuerpo del pulpo se torna blanca).

- Pasadas 3 horas después de la inyección, el pulpo recupera su movilidad y algunos cromatóforos del brazo donde se inyectó comienzan a reaccionar.
- 5 horas después de realizada la inyección, el pulpo retorna a su condición inicial, por lo que el efecto es reversible y muy probablemente mediado por receptores.

7.4 Esquema de trabajo de la separación biodirigida realizada a partir de las GSP.

A manera de resumen de la separación de la fracción neurotóxica, se presenta el esquema de trabajo realizado para la obtención tanto de la fracción con actividad paralizante, como de la fracción con actividad relajamiento-descoordinación motora a partir de las GSP.



7.5 Extracción de la saliva *in vivo* y su comparación con respecto al extracto generado de las GSP en condiciones de pesquería.

La saliva se colectó de 25 organismos adultos de *Octopus maya* (300 gr aproximadamente), los cuales se mantuvieron en estanques. Cada pulpo se colocó en hielo (para sedarlo) y se disecó para extraer las GSP y su conducto común. La disección se realizó de manera distal a proximal yendo de la masa bucal hacia las GSP. A continuación se estimuló el conducto común mediante un par de cables conductores de energía conectados a una pila de 9 Voltios para obtener la saliva y ésta se colectó en un vial (**Figura 30**). Se logró obtener un total de 1800 μL de saliva, la cual se sometió al mismo proceso de fraccionamiento que las GSP en condiciones de pesquería.

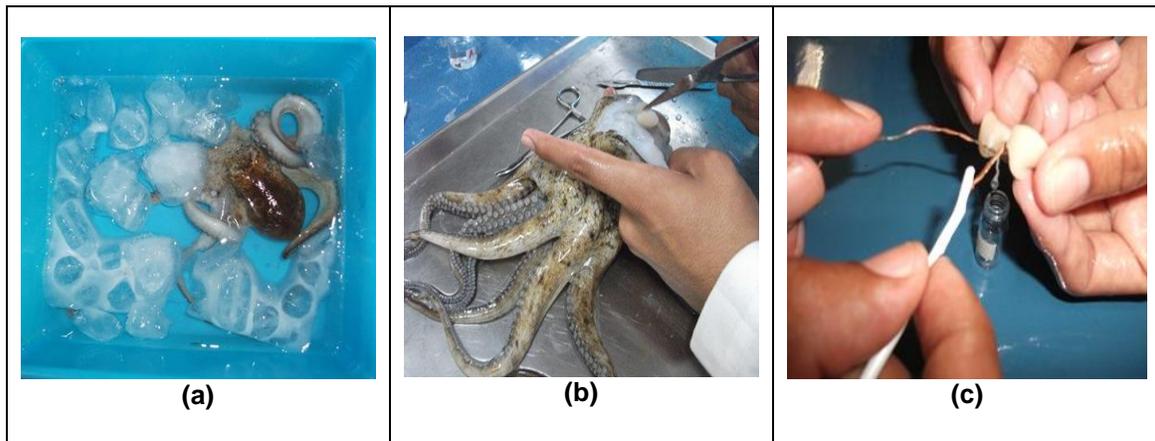


Figura 30. (a) Sedación del pulpo antes de realizar la disección. (b) Disección del pulpo, donde se pueden observar las GSP. (c) Obtención de la saliva *in vivo*, utilizando un par de cables conductores de energía conectados a una pila de 9 Voltios.

Una vez obtenida la fracción neurotóxica (< 3 kDa), se disolvió en 2 mL de agua bidestilada y se eluyó en un cartucho Strata C18-U de fase reversa (55 µm, 70 Å, Phenomenex®) los rendimientos se observan en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Resultados del fraccionamiento por EFS en cartucho Strata C18-U (55 µm, 70 Å, Phenomenex) de la fracción neurotóxica de la saliva *in vivo* (92.4 mg en 2 mL de agua).

Fracción	Elución correspondiente	Cantidad obtenida (mg)
	Muestra	47.8
F2_1	H ₂ O 100 %	13.6
F2_2	H ₂ O:AcCN 90:10 %	6.3
F2_3	H ₂ O:AcCN 80:20 %	3.4
F2_4	H ₂ O: AcCN 50:50 %	1.2

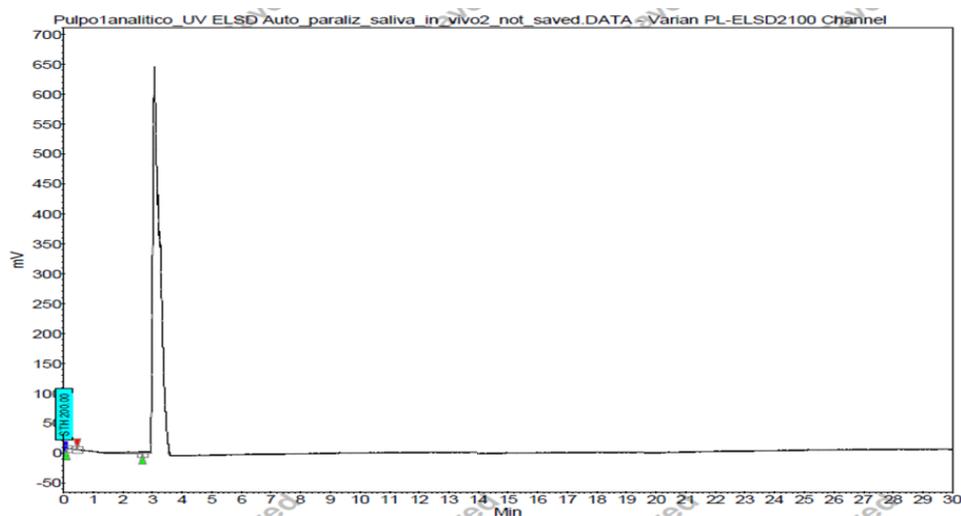
Seguidamente la fracción F2_2 se eluyó por el cartucho de intercambio catiónico fuerte (SXC-Strata de Phenomenex®) y se obtuvo la fracción F2_2_5; los rendimientos se observan en la **Tabla 13**. La fracción F2_1 y F2_2_5 se congelaron y se liofilizaron en condiciones de laboratorio.

Tabla 13. Resultados del fraccionamiento por EFS en cartucho de intercambio catiónico fuerte (SXC-Strata de Phenomenex®) de la fracción F2_2 del cartucho Strata C18-U (55 µm, 70 Å, Phenomenex) obtenida de la saliva *in vivo* (6.3 mg en 2 mL de agua).

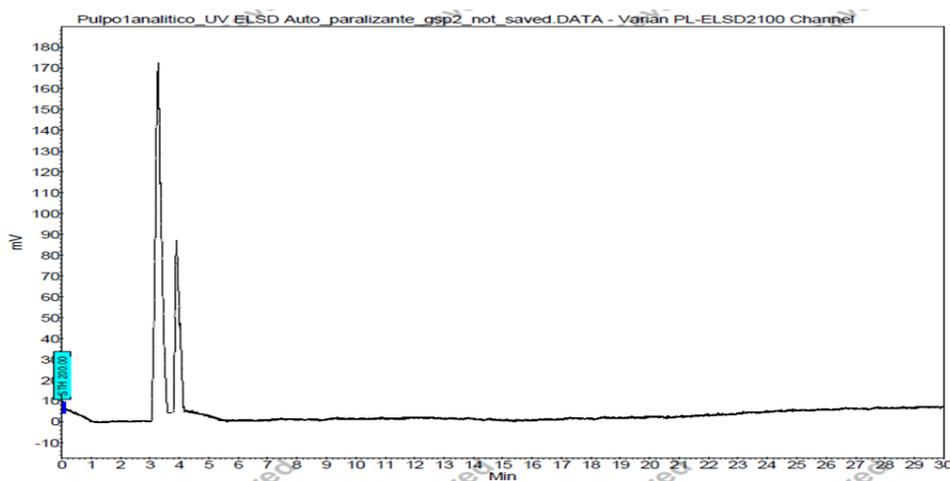
Fracción	Elución correspondiente	Cantidad obtenida (mg)
	Muestra	2.5
F2_2_1	H ₂ O:TFA 90:10	0.1
F2_2_2	HCl 0.1 N en H ₂ O	0.1
F2_2_3	HCl 0.1 N en MeOH	0.0
F2_2_4	1 % NH ₄ OH en MeOH	1.7
F2_2_5	2 % NH ₄ OH en MeOH	1.6

7.5.1 Comparación de la fracción F2_1 causante de la actividad paralizante obtenida de la saliva *in vivo* versus GSP.

Las fracciones obtenidas a partir de la saliva *in vivo* fueron analizadas para determinar su perfil cromatográfico en el sistema CLAR y se compararon con las fracciones obtenidas de las GSP bajo las mismas condiciones. Los cromatogramas se presentan en la **Figura 31**.



(a)



(b)

Figura 31. Cromatogramas obtenidos de la separación de la fracción F2_1. **(a)** Cromatograma de la fracción obtenida a partir de la saliva *in vivo*. **(b)** Cromatograma de la fracción obtenida a partir de las GSP. Método *PulpoFr4_desarrollo3* en condiciones analíticas (1.6 mg en 200 μ L) (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 29).

En el cromatograma correspondiente a la **Figura 31(a)** se observa una sola señal para la F2_1 obtenida a partir de la saliva *in vivo*, mientras que en el cromatograma de la F2_1 obtenida de las GSP (**Figura 31(b)**) se visualizan dos señales en el mismo tiempo de retención. Este resultado era esperado, ya que el extracto se generó utilizando agua como disolvente sobre un tejido liofilizado y triturado (GSP), por lo tanto aparecen otras moléculas como carbohidratos, aminoácidos (coextractivos), que normalmente no aparecen en la saliva que inyecta el pulpo.

También es importante destacar la mayor intensidad de la señal de la F2_1 de la saliva *in vivo*, respecto a la obtenida de las GSP. Esto muy probablemente indica una mayor concentración de este compuesto en la saliva del pulpo.

La coincidencia de la señal principal (TR: 3-4 min) de la fracción F2_1 tanto de las GSP como de la saliva *in vivo*, observada durante la evaluación de su complejidad en las mismas condiciones de análisis utilizando CLAR (**Figura 32**), permite suponer que el(los) compuesto(s) activo(s) que pretendemos aislar a partir de las GSP no son un artefacto generado durante el proceso extracción y fraccionamiento de las GSP, ya que también se encuentra presente en la saliva del pulpo *Octopus maya*.

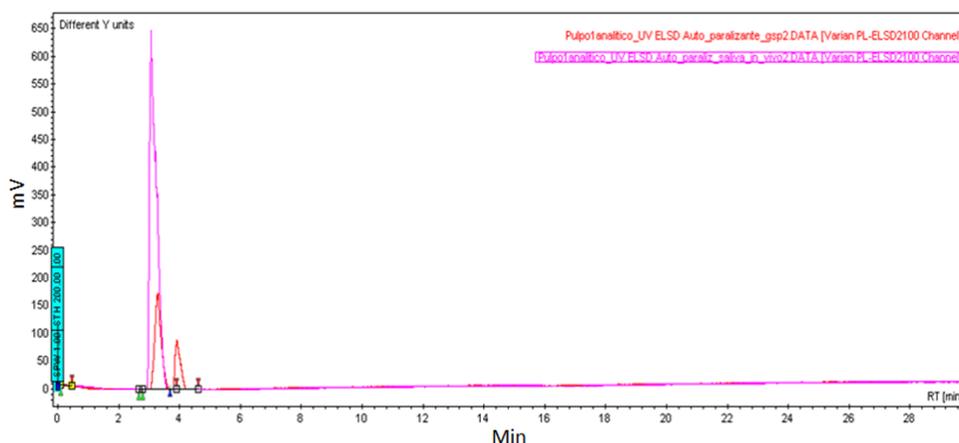


Figura 32. Comparación de los cromatogramas obtenidos de la separación de la fracción F2_1; en color rosa, cromatograma de la fracción obtenida a partir de la saliva *in vivo*; en color rojo, cromatograma de la fracción obtenida a partir de las GSP. Método *PulpoFr4_desarrollo3 en condiciones analíticas* (1.6 mg en 200 μ L) (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 29).

7.5.1.1 Determinación y comparación del perfil total de aminoácidos libres presentes en la fracción causante de la actividad paralizante obtenida de la saliva *in vivo* versus GSP.

El aminograma de la fracción F2_1 obtenida a partir de la saliva *in vivo* se presenta en la **Figura 33(a)**, donde se observa la presencia de 11 aminoácidos: Serina, Ácido Glutámico, Glicina, Histidina, Arginina, Treonina, Alanina, Tirosina, Valina, Metionina y Leucina.

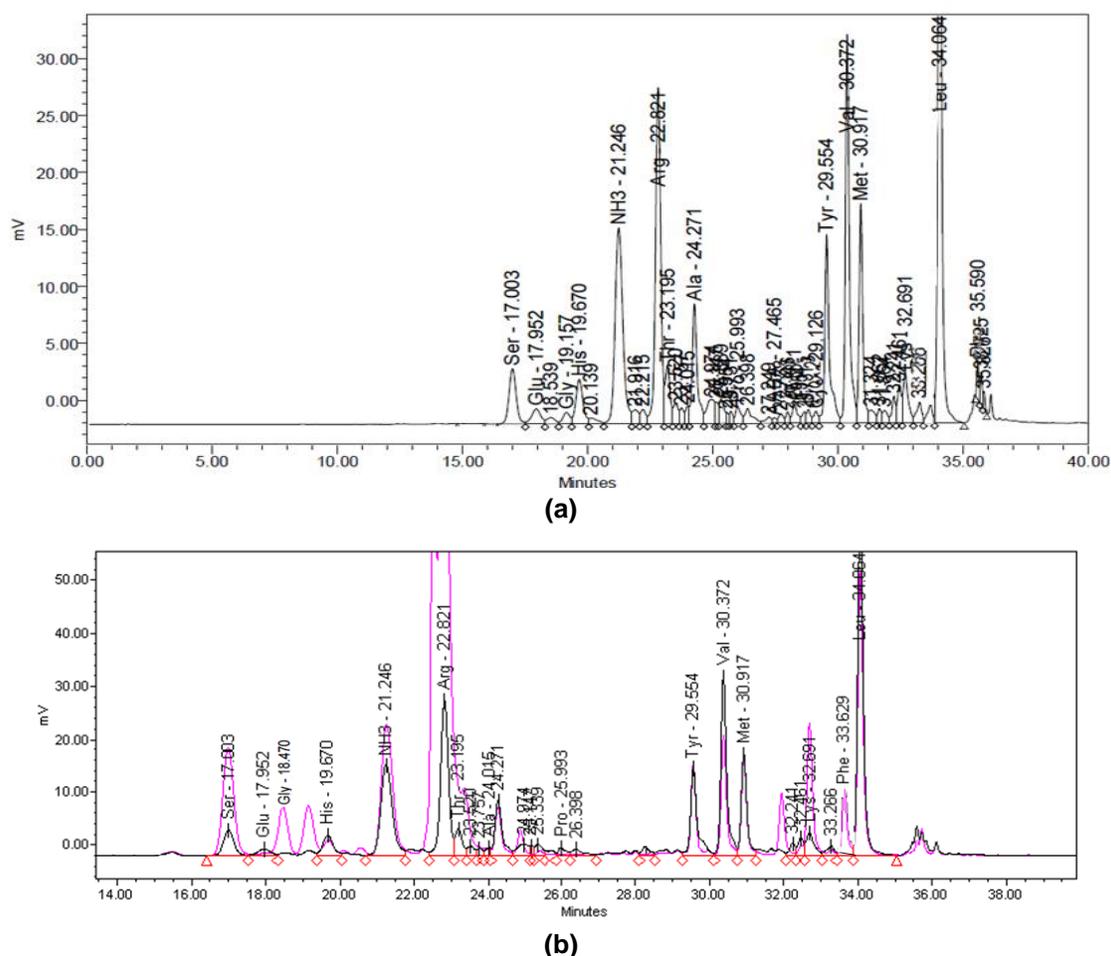


Figura 33. Aminogramas obtenidos de la fracción F2_1: **(a)** a partir de la saliva *in vivo*, **(b)** comparación de los aminogramas obtenidos vía saliva *in vivo* (color negro) versus GSP (color rosa). Estándar usado: 100 pmol de c/u de los 18 aminoácidos, 50 pmol de cisteína y 100 pmol de ácido 2-aminobutírico (AABA) como estándar interno. Método AccQ-TAG de Waters (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 30).

Es importante destacar que el número de aminoácidos presentes en la saliva *in vivo* es menor a los encontrados en las GSP (**Figura 33(b)**), esto se debe a que se extrae un tejido (GSP) con agua, que puede contener todos los aminoácidos.

Ahora bien, no era claro si los aminoácidos presentes en las GSP estaban presentes en el pico 1, que concordaba con la señal de la saliva *in vivo*, o bien en la segunda señal del cromatograma.

Por tanto, se decidió coleccionar la muestra que corresponde a los tiempos de retención de 3 a 4 min (señal principal) presente en la fracción F2_1 obtenida de las GSP; se logró coleccionar 1 mg de la muestra (TR: 3-4 min) y se le realizó la determinación de aminoácidos libres. El aminograma se presenta en la **Figura 34**.

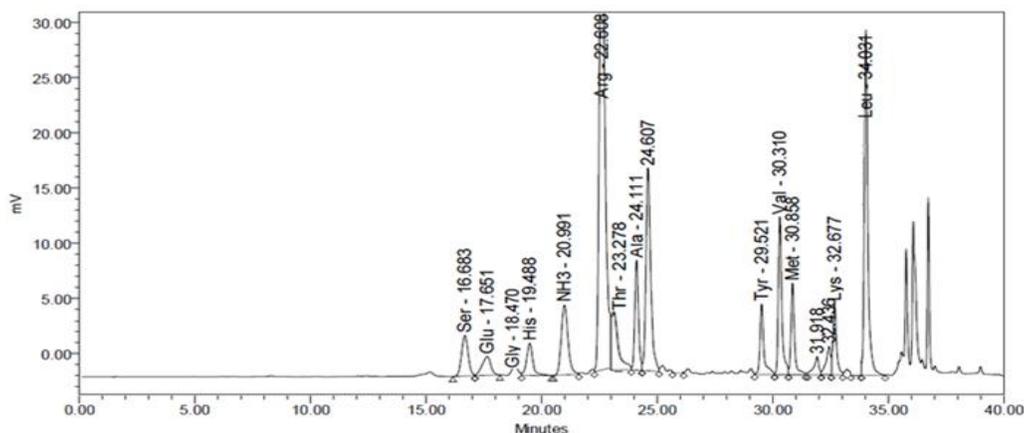


Figura 34. Aminograma obtenido de la muestra coleccionada (TR: 3-4 min) de la fracción F2_1. Estándar usado: 100 pmol de c/u de los 18 aminoácidos, 50 pmol de cisteína y 100 pmol de ácido 2-aminobutírico (AABA) como estándar interno. *Método AccQ-TAG de Waters* (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 30).

En el aminograma de la **Figura 34** se observa la presencia de 12 aminoácidos: Serina, Ácido Glutámico, Glicina, Histidina, Arginina, Treonina, Alanina, Tirosina, Valina, Metionina, Lisina y Leucina.

7.5.2 Comparación de la fracción F2_2_5 causante de la actividad relajamiento-descoordinación motora obtenida de la saliva *in vivo* versus GSP.

La fracción relajante-descoordinación motora aislada de la saliva *in vivo* se comparó con la separada de las GSP, los cromatogramas obtenidos se presentan en la **Figura 35**.

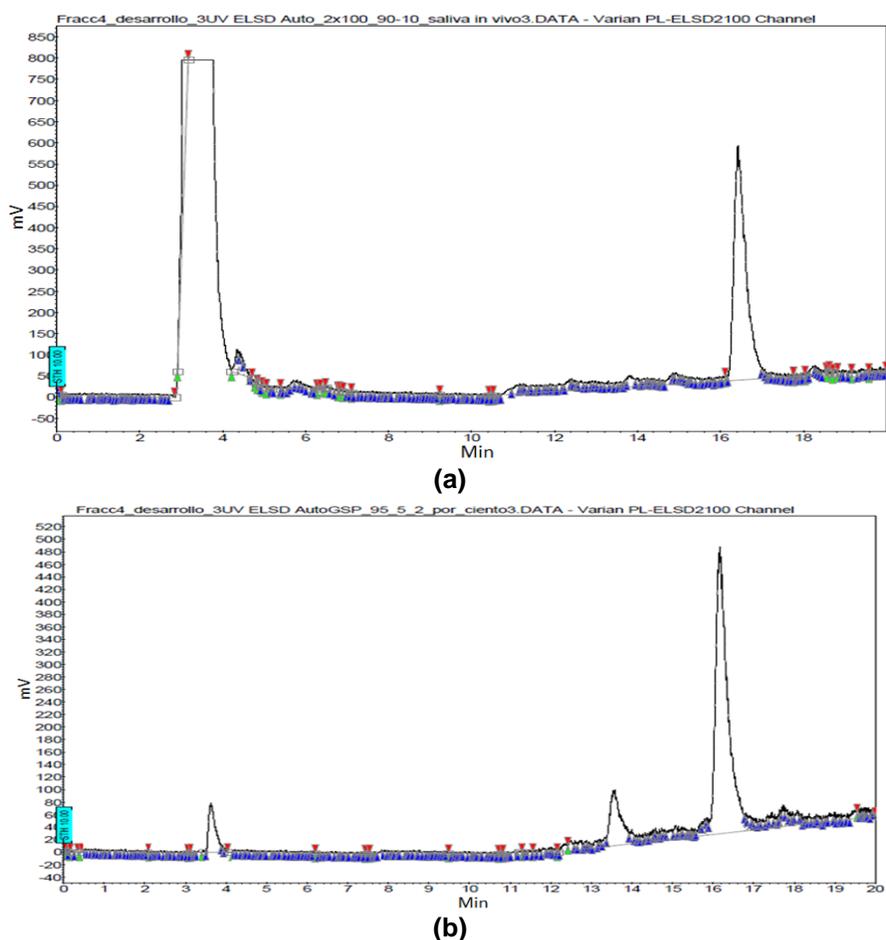


Figura 35. Cromatogramas obtenidos de la separación de la fracción F2_2_5; **(a)** cromatograma de la fracción obtenida a partir de la saliva *in vivo*, **(b)** cromatograma de la fracción obtenida a partir de las GSP. Método PulpoFr4_desarrollo3 en condiciones analíticas (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 29).

En el cromatograma de la **Figura 36** se observa la similitud de la señal principal (TR: 17-18 min); al mismo tiempo es notable la presencia de otras señales en el cromatograma correspondiente a la fracción F2_2_5 obtenido a partir de la saliva *in vivo* (**Figura 35(a)**).

Es importante destacar la mayor intensidad de la señal (TR: 3.5-4.5 min) de la F2_2_5 de la saliva *in vivo*, comparada con la fracción obtenida de las GSP; esta diferencia notoria, es debida principalmente al proceso de separación al que se somete el extracto de las GSP, en el cual las condiciones se optimizaron para separar el compuesto bioactivo.

La coincidencia de la señal principal (TR: 17-18 min) de la fracción F2_2_5 tanto de las GSP como de la saliva *in vivo*, observada durante la determinación del perfil cromatográfico en el sistema CLAR (**Figura 36**), nos permite suponer que el neuropéptido que pretendemos aislar a partir de las GSP no es un artefacto generado durante el proceso de extracción y fraccionamiento de las GSP, ya que también se encuentra presente en la saliva del pulpo *Octopus maya*.

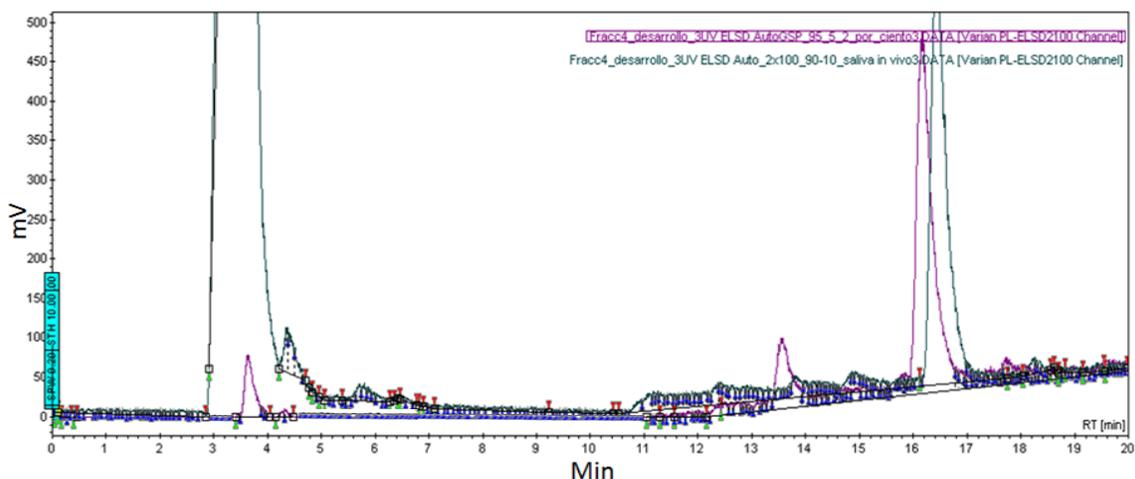


Figura 36. Comparación de los cromatogramas obtenidos de la separación de la fracción F2_2_5; en color azul, cromatograma de la fracción obtenida a partir de la saliva *in vivo*; en color negro, cromatograma de la fracción obtenida a partir de las GSP. Método *PulpoFr4_desarrollo3* en condiciones analíticas (ver instrumentación para condiciones de análisis, página 29).

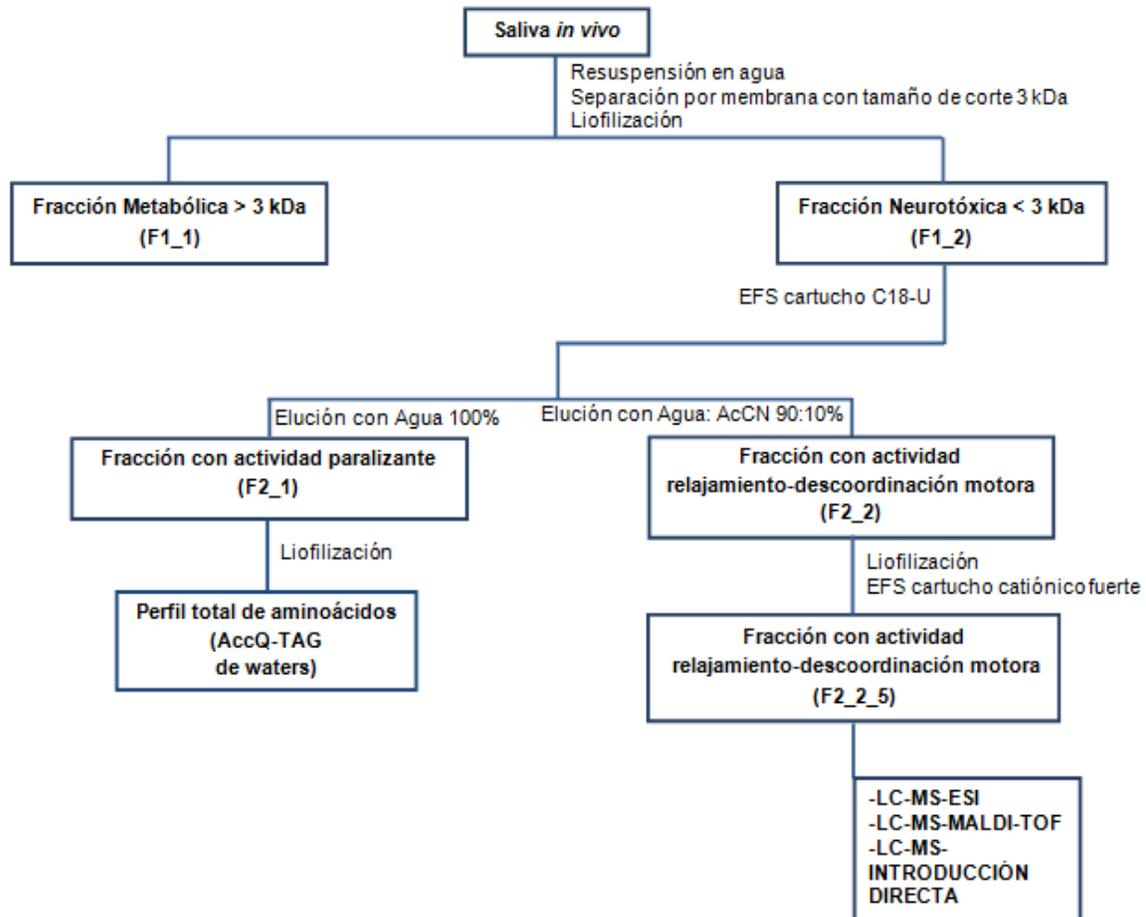
En la **Tabla 14** se observan los rendimientos de las fracciones con mayor actividad, obtenidas durante todo el proceso de fraccionamiento a partir de la saliva *in vivo*.

Tabla 14. Resultados de la purificación para la obtención de la fracción paralizante y de la relajamiento-descoordinación motora a partir de la saliva *in vivo*.

Fracción	Total (mg)
Saliva <i>in vivo</i>	1, 800 µL
Fracción neurotóxica (< 3 kDa)	92.4
Fracción metabólica (> 3 kDa)	30.0
EFS C18-U (f.paralizante)	13.6
EFS C18-U (f. relajamiento-descoordinación motora)	6.3
EFS Catiónico-Fuerte (f. relajamiento-descoordinación motora)	1.6

7.6 Esquema de trabajo de la separación biodirigida realizada a partir de la saliva *in vivo*.

A manera de resumen de la separación de la fracción neurotóxica, se presenta el esquema de trabajo realizado para la obtención tanto de la fracción con actividad paralizante, como de la fracción con actividad relajamiento-descoordinación motora a partir de la saliva *in vivo*.



8.0 DISCUSIÓN.

El efecto del extracto crudo obtenido de las GSP del pulpo *Octopus maya*, observado en el bioensayo *in vivo* en cangrejo fantasma, coincide con los resultados obtenidos en los experimentos con la saliva de pulpo realizados por Boyle en 1990 [8], el cual concluyó que la saliva de *Octopus vulgaris* ocasiona la parálisis del cangrejo (*Carcinus mediterraneus*; actualmente llamado *Carcinus aestuarii*) en 2 minutos y 10 minutos más tarde el organismos muere; y por Hanlon y colaboradores en 1996 [69], los cuales mencionaron que la saliva de *Eledone cirrhosa* causa la parálisis del crustáceo (*Carcinus maenas*) en 1 minuto y 3 minutos posteriores este muere. La variación en el tiempo de observación del efecto es debido a que en los experimentos tanto los pulpos como los crustáceos utilizados eran de diferentes especies.

Estudios recientes han demostrado que el pulpo rojo *Octopus maya* secreta la saliva a partir de las glándulas salivales posteriores [73], como la mayoría de los octópodos y que el mecanismo de entrada en los crustáceos es mediante inyección en la membrana artrodial.

Es importante señalar que el extracto crudo generado de las GSP presenta varios efectos: de las enzimas predigestivas y de los compuestos que causan el efecto neurotóxico. Lo que coincide con la actividad de la saliva, la cual es de vital importancia en la vida de los octópodos, ya que forma parte de sus estrategias de alimentación y defensa: al inyectar la saliva, primero paraliza y relaja a la presa y así la manipulan con facilidad, además de evitar el daño de los crustáceos con sus quelípedos (tenazas). Por otra parte, las enzimas les permiten realizar una predigestión de la presa, lo que aumenta la eficiencia de su alimentación ya que los pulpos se alimentan por succión [70].

El empleo de la técnica de ultrafiltración con membranas de corte molecular de 3 kDa ayudó en la separación de las moléculas por tamaño, de tal forma que se observó un efecto únicamente neurotóxico en la fracción menor a 3 kDa y uno exclusivamente metabólico en la fracción mayor a 3 kDa.

La selección del tamaño del poro de la membrana se realizó considerando que las moléculas bioactivas presentan tamaños moleculares menores a 3 kDa, mientras que las enzimas de la predigestión del cangrejo de manera extra-intestinal, tales como tripsina, quimotripsina y quitinasas tiene pesos moleculares mayores a 10 kDa [10].

Adicionalmente, una observación importante es que el extracto paraliza y predigiere a la presa; sin embargo, al separar la fase enzimático-digestiva (metabólica) de la neurotóxica, solo la primera ocasiona la muerte de la presa, la segunda ejerce su acción y dos horas después el cangrejo regresa a su condición original, resaltando la reversibilidad del proceso, muy probablemente mediado por receptores.

El uso de la extracción en fase sólida, en específico del cartucho C18-U, permitió hacer un pre fraccionamiento de la fracción neurotóxica (< 3 kDa) de acuerdo a la polaridad; se obtuvo la fracción F2_1 que presentó una actividad paralizante reversible y se caracterizó por poseer una alta polaridad, lo que permitió su obtención en la elución con agua; mientras que la fracción F2_2 presentó una actividad relajante-descoordinación motora reversible y se caracterizó por ser medianamente polar, lo que permitió su obtención con la elución de H₂O-AcCN 90:10 %.

El estudio de la fracción paralizante F2_1 se consideró importante porque:

- 1) El primer fármaco marino en el mercado (Prialt, Ziconotide) se aisló de la fracción paralizante del veneno de caracol marino *Conus magus*.
- 2) Las moléculas con actividad paralizante aisladas de octópodos hasta la fecha, poseen pesos moleculares mayores a 3 kDa. Ejemplo de esto son las proteínas, alfa y beta Cefalotoxinas con un peso molecular de aproximadamente 91, 200 y 33, 900 Da respectivamente, aisladas de las GSP del *Octopus vulgaris* por Cariello y Zanetti en 1977 [14].

Los resultados obtenidos demostraron la presencia de aminoácidos libres en la fracción paralizante de las GSP. Sin embargo, fue más interesante encontrar a los aminoácidos libres en la saliva *in vivo* de *O. maya*, por lo que muy probablemente

formen parte de su estrategia de alimentación. Hasta la fecha, no se ha reportado la existencia de aminoácidos en la saliva de octópodos. La observación de estos aminoácidos se puede explicar de varias formas:

1).- La presencia de algunos aminoácidos, principalmente el Ácido Glutámico en la fracción paralizante, que pueda llevar a la formación del neurotransmisor GABA (ácido γ - amino butírico) y con ello generar la parálisis (inhibición muscular) en el cangrejo, pues se ha encontrado el GABA en las fibras nerviosas inhibitorias de los pereiópodos (apéndices) de cangrejos [84, 85].

2).- Al ser un organismo carnívoro, *O. maya* depende de la absorción de aminoácidos para todas sus funciones vitales y la absorción de algunos aminoácidos está mediada por un mecanismo de transporte activo, dependiente de la presencia de algunos aminoácidos para ayudar a la absorción de otros [86].

La presencia de los carbohidratos (Talosa y Glucosa) y los otros compuestos encontrados en la fracción, se debe muy probablemente al empleo del agua como disolvente en la extracción de las GSP (tejido).

La determinación del perfil total de aminoácidos de la fracción F2_1 obtenida a partir de las GSP reveló una mayor cantidad de aminoácidos libres al compararlos con los obtenidos en el análisis por GC-MS (**Tabla 15**). En general, el método analítico de elección para determinar el perfil de aminoácidos es por CLAR, debido principalmente a que son compuestos polares, difíciles de vaporizar, por lo que es necesario silanizarlos, procedimiento que quizás no se realizó adecuadamente.

Tabla 15. Aminoácidos encontrados en la fracción F2_1 con actividad paralizante; en naranja se señalan los aminoácidos concordantes.

#	Saliva <i>in vivo</i> (AccQ-TAG)	GSP (F2_1) (AccQ-TAG)	GSP (F2_1) colecta (AccQ-TAG)	GSP (F2_1) (CG-EM)
1	Serina	Serina	Serina	Serina
2	Ácido Glutámico	Ácido Glutámico	Ácido Glutámico	Ácido Glutámico
3	Glicina	Glicina	Glicina	Treonina
4	Histidina	Histidina	Histidina	Alanina
5	Arginina	Arginina	Arginina	Prolina
6	Treonina	Treonina	Treonina	Tirosina
7	Alanina	Alanina	Alanina	Valina
8	Tirosina	Prolina	Tirosina	Metionina
9	Valina	Tirosina	Valina	Isoleucina
10	Metionina	Valina	Metionina	Leucina
11	Leucina	Metionina	Lisina	
12		Lisina	Leucina	
13		Leucina		
14		Fenilalanina		

En cuanto a la actividad de la fracción F2_1, fue necesario administrar una mayor cantidad (250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en comparación con la DEM determinada para el extracto neurotóxico (40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); contrario a lo esperado, si se considera que al purificar la fracción, el compuesto bioactivo deberá de estar en una mayor concentración y por lo tanto se debería de administrar una menor dosis para observar la actividad en el bioensayo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el efecto paralizante de la fracción neurotóxica obtenida de las GSP es una suma de efectos, primero el paralizante, pero enseguida se observa la relajación del cangrejo, mientras que en la fracción F2_1 se observa únicamente la parálisis del cangrejo.

Respecto a la fracción F2_2 con actividad relajamiento-descoordinación motora, al ser sometida a hidrólisis ácida y básica se obtuvo que ésta contiene 16 aminoácidos. Este resultado fue inesperado, debido a que los compuestos bioactivos reportados en la literatura son neuropéptidos de 10 y 12 aminoácidos (e inclusive algunos de ellos se repiten en la secuencia, ver **Figura 1**, página 4)

En el aminograma de la fracción F2_2 también fue evidente la señal intensa del NH_3 (grupo amino), lo cual nos indicó que la fracción estaba amidada, producto de una modificación transduccional que sufren los neuropéptidos con el fin de evitar la hidrólisis por enzimas endoproteasas, condiciones que están presentes en la saliva del pulpo, ya que contiene proteasas (tripsina y quimotripsina). Un ejemplo claro de esta modificación son las taquicininas ya reportadas en la literatura: la eledoisina y las octacininas, cuyo C-terminal está amidado, además el grupo (NH_2) es necesario para la actividad biológica sobre receptores de taquicininas [87].

La fracción F2_2 al ser sometida a un nuevo fraccionamiento utilizando extracción en fase sólida con un cartucho de intercambio catiónico fuerte, llevó a la obtención de la fracción F2_2_5; esta nueva fracción mostró un efecto de relajamiento-descoordinación motora en el cangrejo a los 20 segundos, actividad que duraba aproximadamente dos horas, ya que el crustáceo regresaba a su condición inicial. Al determinar el perfil de los aminoácidos de la muestra colectada que correspondía a la señal principal (TR: 17-18 min) de la F2_2_5 obtenida de las GSP, se logró observar una menor cantidad de aminoácidos con respecto a su fracción de origen F2_2 (**Tabla 16**). Sin embargo, considerando que el aislamiento de la fracción F2_2_5 utilizando el método PulpoFr4_desarrollo3 en condiciones semipreparativas era poco eficiente (implicaba mucho tiempo por la cantidad de análisis y por tanto el gasto de un gran volumen de disolvente), se decidió someter a la fracción F2_2_5 a un nuevo fraccionamiento por extracción en fase sólida utilizando los siguientes cartuchos: cartucho C18-U de fase reversa, cartucho catiónico fuerte, cartucho aniónico fuerte y aniónico débil. No obstante, todos los resultados resultaron infructuosos, por lo que se concluyó que el método PulpoFr4_desarrollo3 en condiciones semipreparativas es la mejor técnica de aislamiento a pesar de ser poco eficiente.

Tabla 16. Aminoácidos encontrados en la fracción con actividad relajamiento-descoordinación motora; en naranja se señalan los aminoácidos concordantes.

#	GSP (F2_2)	GSP F2_2_5 colecta (AccQ-TAG)	GSP F2_2_5 colecta (DELD)
1	Ácido Aspártico o Asparagina	Histidina	Serina
2	Serina	Treonina	Histidina
3	Ácido Glutámico o Glutamina	Alanina	Arginina
4	Histidina	Valina	Treonina
5	Arginina	Lisina	Alanina
6	Treonina	Isoleucina	Prolina
7	Alanina	Leucina	Valina
8	Prolina	Fenilalanina	Metionina
9	Tirosina		Fenilalanina
10	Cisteína		
11	Valina		
12	Metionina		
13	Lisina		
14	Isoleucina		
15	Leucina		
16	Fenilalanina		

Los espectros de masas obtenidos al analizar la muestra colectada (TR: 17-18 min) de la F2_2_5 obtenida de las GSP nos permiten confirmar la presencia de 6 de los 9 aminoácidos que integran al probable polipéptido encontrado e incluso de acuerdo al patrón de fragmentación, la probable secuencia X-X-X-Thr-Phe-Ser-Ala-Pro-Arg-NH₂.

De acuerdo al número de aminoácidos, este polipéptido de 9 aminoácidos sería el neuropéptido más pequeño encontrado en cefalópodos, después de la eledoisina que está conformada por 10. Respecto a la composición de los aminoácidos que constituyen a este neuropéptido se puede decir que 5 coinciden con la eledoisina, 4 con la octacinina I y 5 con la octacinina II y III.

Por tanto, los resultados sugieren que este polipéptido de 9 aminoácidos podría pertenecer al grupo de las taquicininas y que su estructura resultaría ser novedosa; sin embargo será necesario la secuenciación por degradación de Edman para determinar inequívocamente la estructura de esta nueva taquicinina.

Cuando esta nueva taquicinina se inyectó en los pulpos se observaron varias actividades: relajación-descoordinación motora, parálisis, cambio de coloración y efectos en cromatóforos, lo cual indica que la actividad del neuropéptido aislado es directamente sobre el sistema nervioso central de *O. maya* y que la reversibilidad de la actividad, es muy probablemente debida a la acción sobre receptores específicos. Al mismo tiempo cabe mencionar que este es el primer esfuerzo por conocer el efecto que la saliva de un cefalópodo tiene sobre su misma especie, corroborando así la importancia de este fluido como método de defensa y muy probablemente constituya uno de los mecanismos importantes del canibalismo en estos cefalópodos.

Una característica importante de las taquicininas es que son neuropéptidos conservados desde insectos hasta mamíferos, por lo que existen muchos estudios en el aislamiento de taquicininas de diferentes organismos para evaluarlos como fármacos. Actualmente se han aislado nuevas taquicininas presentes en la saliva de otros pulpos y a pesar de ser aisladas de un invertebrado, presentan características estructurales de taquicininas de vertebrados, como la substancia P. La variación estructural resulta en diferentes respuestas farmacológicas; por ejemplo, en un estudio de la acción de las taquicininas aisladas de *O. vulgaris* (octacinina I, II y III) sobre las contracciones musculares, la octacinina III presentaba una mayor actividad [88].

Las taquicininas juegan un papel importante en diversos procesos fisiológicos en los seres humanos. Estos incluyen mecanismos sensoriales periféricos como la nocicepción y la inflamación, así como funciones autónomas tales como la contractilidad del músculo liso en los sistemas vasculares, gastrointestinal y genitourinario.

Además, las taquicininas están implicadas en las vías del sistema nervioso central que median el dolor, la ansiedad, la coordinación motora y la cognición. Por lo tanto, las nuevas taquicininas encontradas en la saliva de los octópodos pueden proporcionar nuevos conocimientos sobre los requerimientos estructurales del ligando al unirse a los receptores, lo que permitiría el diseño de taquicininas más potentes y selectivas; esto tendría beneficios potenciales en el tratamiento de una variedad de trastornos incluyendo el síndrome del intestino irritable, síntomas del tracto urinario inferior, asma, dolor crónico, depresión, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer [88].

Todo el proceso de separación y purificación a la que son sometidas las GSP, para dar origen a las fracciones activas F2_1 con actividad paralizante y F2_2_5 con actividad relajamiento-descoordinación motora, ocasiona que éstas tengan rendimientos muy bajos de 1.73 % y 0.02 % respectivamente. Esto nos habla de la baja cantidad en la que se encuentran los compuestos activos dentro de las GSP, característica destacada de los metabolitos secundarios marinos.

La similitud del perfil cromatográfico que presentan las fracciones obtenidas a partir de la saliva *in vivo* con respecto a las aisladas a partir de las GSP, confirma que las fracciones F2_1 y F2_2_5 muy probablemente estén presentes en ambos extractos. Sin embargo, aunque cada forma de obtención tiene sus ventajas y desventajas, resulta más eficiente obtener las fracciones vía GSP, en gran medida porque su recolección a partir de los subproductos lleva a la obtención de 5 kg en una semana, mientras que se utilizaron 25 pulpos para obtener 1.8 mL de saliva. Aunado esto, se ha realizado la optimización de la metodología desarrollada, aunque desafortunadamente la fracción activa siempre vendrá acompañada de otros compuestos producto de las GSP.

9.0 CONCLUSIONES.

1.- El extracto de las GSP obtenidas de los subproductos de la pesquería resultó ser activo en el bioensayo *in vivo* en el cangrejo fantasma y presentó dos tipos de actividad: neurotóxica (reversible) con un peso menor a 3 kDa (F1_2) y metabólica (no reversible) con un peso mayor a 3 kDa (F1_1).

2.- La separación de la fracción neurotóxica (F1_2) mediante EFS de fase reversa (C18-U), ayudó a obtener dos fracciones con diferente actividad:

a) Una con actividad paralizante (F2_1) y muy polar.

b) Una con actividad relajante-descoordinación motora (F2_2), medianamente polar.

3.- Los estudios mediante GC-MS de la fracción con actividad paralizante (F2_1) dieron a conocer que está integrada por aminoácidos libres, azúcares y otras moléculas; y que muy probablemente la actividad es debida al ácido γ -aminobutírico, derivado del ácido glutámico.

4.- Los aminoácidos encontrados en la F2_1 a partir de la saliva *in vivo*, confirman la presencia de aminoácidos libres en la saliva y GSP del pulpo. Por tanto, de acuerdo a los estudios realizados, el pulpo rojo *Octopus maya* utiliza aminoácidos libres como parte de su estrategia de alimentación.

5.- La determinación del perfil total de aminoácidos de la fracción (F2_2) con actividad relajamiento-descoordinación motora reveló que las moléculas bioactivas son de origen proteico.

6.- Se logró aislar un polipéptido mediante separación biodirigida, con actividad relajamiento-descoordinación motora por métodos cromatográficos.

7.- La hidrólisis ácida y el perfil de aminoácidos reveló que el neuropéptido está formado por 9 aminoácidos y que está amidado.

8.- Los estudios de LC-MS establecieron la secuencia parcial X-X-X-Thr-Phe-Ser-Ala-Pro-Arg-NH₂, por lo que muy probablemente se trate de una nueva taquicinina.

9.- Tanto la fracción paralizante (F2_1) como la relajante-descoordinación motora (F2_2_5) pueden ser obtenidas a partir de las GSP o de la saliva *in vivo*.

10.- Por lo tanto, el aprovechamiento de las GSP del pulpo *Octopus maya* para obtener productos naturales es una alternativa viable que contribuye a la utilización total de los productos obtenidos durante su pesquería.

10.0 BIBLIOGRAFÍA.

1. Blanco, M.; Sotelo, C.; Chapela, M.; Pérez, M.R. Toward sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. *Food and Science Technology*. **2007**. 18, 29-36.
2. Kristbergsson, K.; Arason, S. Utilization of by-products in the fish industry. *Department of Food Science and Human Nutrition*. **2005**. 12, 233-258.
3. Ibañez, E.; Herrero, M.; Mendiola, J.A.; Castro-Puyana, M. Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. Ed. Hayes, M. *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. Springer Science+Business Media. **2012**. 2, 55-98.
4. Solís-Ramírez, M. J.; Chávez, E.A. Evaluación y régimen óptimo de pesca del pulpo en la Península de Yucatán. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. Centro De Investigaciones pesqueras y de estudios avanzados del IPN. **1985**. 13, 1-18.
5. Solís-Ramírez, M.J. Octopus fisheries in the Mexican waters of the Gulf of México and Caribbean Sea. *Bulletin of Marine Science*. **1991**. 49, 667-668.
6. Voss, G.L.; Solis-Ramírez, M.J. *Octopus maya*, a new species from the Bay of Campeche. *Bulletin of Marine Science*. **1966**. 16, 615-625.
7. Rosas, C.; Gallardo, P.; Mascaró, M.; Caamal-Monsreal, C.; Pascual, C. *Octopus maya*. Eds. Iglesias, J.; Fuentes, L.; Villanueva, R. *Cephalopod Culture*. Springer Science+Business Media Dordrecht. **2014**. 20, 383-396
8. Boyle, P.R. Prey Handling and salivary secretations in octopuses. *Tropic relationships in the marine environment*. Proceedings of the 24th European Marine biology Symposium. **1990**. 541-552.
9. Key, L.N.; Boyle, P.R.; Jaspars, M. Novel activities of saliva from the octopus *Eledone cirrhosa* Mollusca: Cephalopoda. *Toxicon*. **2002**. 40, 677-683.
10. Grisley, M.S.; Boyle, PR. Chitinase, a new enzyme in octopus saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **1990**. 2, 311-316.
11. Henze, M.Z. p- oxyphenethylamine isolation from the cephalopods. *Journal of Physiology and Biochemistry*. **1913**. 87, 51-55.
12. Bottazi, F. Ricerche sulla ghiandola salivare posteriore dei cefalopoi II. *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*. **1922**. 1, 69-74
13. Ghiretti, F. Toxicity of octopus saliva against crustacea. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1959**. 90, 726-741.

14. Cariello, L.; Zanetti, L. α - and β -cephalotoxin: two paralyzing proteins from posterior salivary glands of *Octopus vulgaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **1977**. 57, 169–173.
15. Erspamer, V.; Erspamer, G.V. Pharmacological actions of an eledoisin on extravascular smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*. **1962**. 19, 337-354.
16. Scheumack, D.D.; Howden, M.E.; Spence, I.; Quinn, R.J. Maculotoxin: a neurotoxin from the venom glands of the octopus *Hapalochlaena maculosa* identified as tetradoxine. *Science*. **1978**. 199, 188-189.
17. Kanda, A.; Eiko, I.U., Takuwa, K.K.; Minakata, H. Isolation and characterization of novel tachykinins from the posterior salivary gland of the common octopus *Octopus vulgaris*. *Peptides*. **2003**. 24, 35-43.
18. Fry, B.G.; Roelants, K.; Norman J.A. Tentacles of Venom: Toxic Protein Convergence in the Kingdom Animalia. *Journal Molecular Evolution*. **2009**. 68, 311-21.
19. Flashner, E.; Raviv, U.; Friedler, A. The effect of tachykinin neuropeptides on amyloid β aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2011**. 407, 13-17.
20. Cragg, G.M.; Newman, D.J.; Snader, K.M. Natural Products in Drug Discovery and Development. *Journal of Natural Products*. **1997**. 67, 52–60.
21. Houssen, W.E.; Jaspars, M. Isolation of Marine Natural Products. Eds. Sarker, S.D.; Nahar, L. *Natural products isolation*. Springer Science+Business Media. **2006**. 14, 367-362.
22. Shen, J.; Xu, X.; Cheng, F.; Liu, H.; Lao, X.; Shen, J.; Chen, K.; Zhao, W.; Shen, X.; Jiang, H. Virtual Screening on Natural Products for Discovering Active Compounds and Target Information. *Current Medicinal Chemistry*. **2003**. 10, 2327–2342.
23. Harvey, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*. **2000**. 5, 294–300.
24. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. *Journal of Natural Products*. **2003**. 66, 1022–1037.
25. Schoental, R. Toxicology of natural products. *Food and Cosmetics Toxicology*. **1965**. 3, 609–620.

26. Proksch, P.; Edrada, R.A.; Ebel, R. Implications of marine biotechnology on drug discovery. Eds. Proksch, P.; Müller, W. *Frontiers in Marine Biotechnology*. Horizon Bioscience. **2006**. 1, 1–19.
27. Spainhour, C.B. Natural Products. Ed. Gad, S.C. *Drug Discovery Handbook*. John Wiley & Sons, Inc. **2005**. 1, 11-72
28. Capon, J.R. Marine bioprospecting-Trawling for treasure and pleasure. *European Journal of Organic Chemistry*. **2001**. 4, 633-645.
29. Haefner, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*. **2003**. 3, 536-543.
30. Beutler, J.A. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. Ed. John Wiley & Sons. *Current Protocols in Pharmacology*. **2009**. 46, 9-11.
31. Bouchet, P. The magnitude of marine biodiversity. Ed. Duarte, C.M. *The Exploration of Marine Biodiversity: Scientific and Technological Challenges*. Foundation BBVA. **2006**. 2, 33–64.
32. Benkendorff, K. Molluscan biological and chemical diversity: secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs. *Biological Reviews*. **2010**. 85, 757–775.
33. Baker, J.T.; Murphy, V. Compounds from Marine Organisms. Ed. Habermehl, G. *Handbook of Marine Science*. CRC Press, Inc. **1981**. 89, 844-845
34. Haszprunar, G. Is the Aplousobranchia monophyletic?. A cladistic point of view. *American Malacological Bulletin*. **2000**. 15, 115–130.
35. Faulkner, D.J. Chemical defenses of marine molluscs. Ed. Paul, V.J. *Ecological Roles of Marine Natural Products*. Comstock Pub. **1992**. 3, 119–163.
36. Alam, M.; Thomson, R.H. *Handbook of Natural Products from Marine Invertebrates: Part 1 Phylum Mollusca*. Ed. Harwood Academic Publishers. **1998**. 288 pp.
37. Derby, C.D.; Kicklighter, C.E.; Johnson, P.M.; Zang, X. Chemical composition of inks of diverse marine molluscs suggests convergent chemical defenses. *Journal of Chemical Ecology*. **2007**. 33, 1105–1113.
38. Kordis, D.; Gubenslek, F. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. *Gene*. **2000**. 261, 43-52.
39. Olivera, B.M.; Rivier, J.; Clark, C.; Ramilo, C.A.; Corpuz, G.P.; Abogadie, F.C.; Mena, E.E.; Woodward, S.R.; Hillyard, D.R.; Cruz, L.J. Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science*. **1990**. 249, 257–263.

40. Russo, G.L.; De Nisco, E.; Fiore, G.; Di Donato, P.; D'ischia, M.; Palumbo, A. Toxicity of melanin-free ink of *Sepia officinalis* to transformed cell lines: identification of the active factors as tyrosinase. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. **2003**. 308, 293–299.
41. Myers, R.A.; Cruz, L.J.; Rivier, J.E.; Olivera, B.M. Conus peptides as chemical probes for receptors and ion channels. *Chemical Reviews*. **1993**. 93, 1923–1936.
42. Bernay, B.; Floc'h, M.B.; Gagnon, J.; Henry, J. Ovarian jelly-peptides (OPJs), a new family of regulatory peptides identified in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Peptides*. **2006**. 27, 1256–1268.
43. Zatylny, C.; Gagnon, J.; Boucard, E.; Henry, J.I. A water-bourne pheromonal peptide released by the eggs of *Sepia officinalis*. *Biochemistry & Biophysics Research Communications*. **2002**. 275, 217–222.
44. Kanda, A.; Minakata, H. Isolation and characterization of a novel small cardioactive peptide-related peptide from the brain of *Octopus vulgaris*. *Peptides*. **2006**. 27, 1755–1761.
45. Erspamer, V.; Anastasi, A. Structure and pharmacological actions of eledoisin, the active undecapeptide of the posterior salivary gland of Eledone. *Experientia*. **1962**. 18, 58–9.
46. Songdahl, J.H.; Shapiro, B.J. Purification and composition of a toxin from the posterior salivary gland of *Octopus dofleini*. *Toxicon*. **1974**. 12, 109–115.
47. Ghiretti, F. Cephalotoxin: the crab-paralysing agent of the posterior salivary glands of cephalopods. *Nature*. **1960**. 183, 1192–1193.
48. Erspamer, V. Active Substances in the posterior salivary glands of octopoda I. Enteramine Like substance. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*. **1948**. 4, 213-223.
49. Ueda, A.; Nagai, H.; Ishida, M.; Nagashima, Y.; Shiomi, K. Purification and molecular cloning of SE-cephalotoxin, a novel proteinaceous toxin from the posterior salivary gland of cuttlefish *Sepia esculenta*. *Toxicon*. **2008**. 52, 574–581.
50. Hanlon, R.T.; Forsythe, J.W. Advances in the laboratory culture of Octopuses for biomedical research. *Laboratory Animal Science*. **1985**. 1, 33-40.
51. SAGARPA. Evaluación de la población del pulpo (*Octopus maya*) en la Península de Yucatán 2002. Instituto Nacional de Pesca. Gobierno Federal. México. **2002**. 15 pp.

52. SEMARNAP. Anuario Estadístico de Pesca 1998. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Gobierno Federal. México. **1999**. 232 pp.
53. Solís-Ramírez, M.J.; Arreguín-Sánchez, F.; Seijo, J.C. Pesquería de pulpo de la plataforma continental de Yucatán. Eds. Flores-Hernández, D.; Sánchez-Gil, P.; Seijo, J.C.; Arreguín-Sánchez F. *Análisis y Diagnóstico de los Recursos Pesqueros Críticos del Golfo de México*. Universidad Autónoma de Campeche. **1997**. 7, 61-80.
54. SAGARPA. Evaluación de la población del pulpo (*Octopus maya*) en la Península de Yucatán 2007. Instituto Nacional de Pesca. Gobierno Federal. México. **2002**. 13 pp.
55. Solís-Ramírez, M.J. La pesquería del pulpo del golfo de México y Caribe mexicano. Ed. Secretaría de Pesca. *Atlas Pesquero y Pesquerías Relevantes de México*. INP.CENEDIC. Universidad de Colima. **1994**. 1, 5-48.
56. Van Heukelem, W.F. *Octopus maya*. Ed. Boyle, P.R, Cephalopod Life Cycles. Academic Press, London. **1983**. 2, 311-323.
57. Martínez, R.; Gallardo, P.; Pascual, C.; Navarro, J.; Sánchez, A.; Caamal-Monsreal, C.; Rosas, C. Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture*. **2014**. 426, 310-317
58. Boletzky, S.; Hanlon, R.T. A review of the laboratory maintenances, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Memoirs of the National Museum of Victoria*. **1983**. 44, 147-187.
59. Rosas, C.; Santos, J.; Marcaida, U.; Enriquez, C.; Mariño-Tapia, I.; Calva, R.; Ángeles-González, L.E.; López-Rocha, J.; Mascaró, M. Oceanographic conditions modulating the reproductive cycle of *Octopus maya* in the Yucatan Peninsula. XI Cephalopod International Advisory Council, 12 al 19 de Noviembre de **2012** en Florianopolis, Brasil.
60. Solís-Ramírez, M.J. Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solís. Ed. Instituto Nacional de Investigaciones Biológicas y Pesqueras (México). **1967**. 90 pp.
61. CONAPESCA; ITESM. Características generales, aspectos oceanológicos y geográficos del pulpo. SAGARPA. Gobierno Federal. México. **2004**. 175 pp.
62. Solís-Ramírez, M.J. The *Octopus maya* fishery of the Yucatán Peninsula. Ed. Lang, E.; Hochberg, A. *The Fishery and Market Potential of Octopus in California*. California Mexico Studies Center. **1996**. 1, 1-10.

63. Rocha, F. Biología, Ecología, Cultivo y Pesquerías De Cefalópodos. Instituto de Investigaciones Marinas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Vigo-España. **2003**. 6, 1-20.
64. Hernández, J.L. Biología, ecología y pesca del pulpo común "*Octopus vulgaris*" Cuvier 1797 en aguas de Gran Canaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. **2000**. 210 pp.
65. Brusca, R.C.; Brusca, G.J. Invertebrates. Second edition. **2003**. 936 pp.
66. Barnes, R. Invertebrate Zoology. Ed. Dryden Press. **1987**. 893 pp.
67. Pechenik, J. A. Biology of the Invertebrates. Ed. McGraw Hill, New York, 4th Edition. **2000**. 592 pp.
68. Fiorito, G.; Gherardi F. Prey-handling behaviour of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) on Bivalve preys. *Behavioural Processes*. **1999**. 46, 75–88.
69. Hanlon, R.T.; Messenger, J.B. Cephalopod behaviour. Ed. Cambridge University Press. **1998**. 232 pp.
70. Grisley, M.S.; Boyle, P.R.; Key, L.N. Eye puncture as a route of entry for saliva during predation on crabs by the octopus *Eledone cirrhosa* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **1996**. 202, 225-237.
71. Runham, N.W.; Bailey, C.J.; Carr, M.; Evans, C.A.; Malham, S. Hole drilling in crab and gastropod shells by *Eledone cirrhosa* (Lamarck, 1798). *Scientia Marine*. **1997**. 2, 67-76.
72. Rosas, C.; Cuzon, G.; Pascual, C.; Gaxiola, G.; López, N.; Maldonado, T.; Domingues, P. Energy balance of *Octopus maya* fed crab and artificial diet. *Marine Biology*. **2007**. 152, 371–378.
73. Canche-Ek, C.G. Conducta alimenticia y manejo de la presa en el pulpo rojo (*Octopus maya*, Voss y Solís-Ramírez, 1996) en la depredación de la jaiba azul (*Callinectes sapidus*). FMVZ-UADY. **2013**. 60 pp.
74. Martínez, R.; López-Ripoll, E.; Avila-Poveda, O.H.; Santos-Ricalde, R.; Mascaró, M.; Rosas, C. Cytological ontogeny of the digestive gland in post-hatching *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) and cytological background of digestion in juveniles. *Aquatic Biology*. **2011**. 11, 249–261.
75. McDonald, N.M.; Cottrell, G.A. Purification and mode of action of toxin from *Eledone cirrhosa*. *Toxicon*. **1970**. 3, 243-248.
76. Rustad, T. Hayes, M. Marine Bioactive Peptides and Protein Hydrolysates: Generation, Isolation Procedures, and Biological and Chemical Characterizations. Ed. Hayes, M. *Marine Bioactive Compounds: Sources,*

Characterization and Applications. Springer Science+Business Media. **2012**. 3, 99-113.

77. Reyes-Peñaloza, D. Facultad de química UNAM. Tesis en proceso **2014**.
78. Sánchez-Rodríguez, J.; Cruz-Vazquez K. Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860). *Archives of Toxicology*. **2006**. 7,436-441.
79. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **1970**. 15, 680–685.
80. Campos-Espinoza, G.Y. Estudio químico del efecto paralizante de la saliva del pulpo rojo de Yucatán (*Octopus maya*). Facultad de Química-UNAM. **2013**. 77 pp.
81. Wang, Y.; Shen, K.; Li, P.; Zhou, J.; Yan, C. Simultaneous determination of 20 underivatized amino acids by high performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detection. *Chinese Journal of Chromatography*. **2011**. 29, 908-911.
82. Ma, B.; Johnson, R. De Novo Sequencing and Homology Searching. *Molecular and cellular proteomics tutorials*. **2012**. 2, 111-149.
83. Adona, T.; Clauser, K. De Novo Peptide Sequencing via Manual Interpretation of MS/MS Spectra. *Current protocols in protein science*. John Wiley and sons, Inc. **2002**. 27, 1-19.
84. Sorenson, M.M. The free amino acids in peripheral nerves and isolated inhibitory and excitatory nerves fibres of *Cancer magister*. *Journal of Neurochemistry*. **1973**. 20, 1231-1245.
85. Atwood, H. Peripheral Inhibition in crustacean muscle. *Experientia*. **1968**. 24, 753-864.
86. Krehbiel, C.R.; Matthews J.C. Absorption of Amino Acids and Peptides. Ed. D'Mello, J.P.F. *Amino acids in animal nutrition*. CABI Publishing. **2003**. 3, 41-70.
87. Kreil, G. Occurrence, Detection, and Biosynthesis of Carboxy-Terminal Amides. *Methods in enzymology*. **1984**. 106, 218-223
88. Ruder, T.; Abid, S.A.; Ormerod, K.; Brust, A.; Roymanchadi, M.L.; Ventura, S.; Undheim, E.A.B.; Jackson, T.N.W.; Mercier, A.J.; King, J.F.; Alewood, P.F.; Fry, B.G. Functional characterization on invertebrate and vertebrate tissues of tachykinin peptides from octopus venoms. *Peptides*. **2013**. 47, 71-76.