



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**Estudio sistemático de la actividad hipoglucemiante de  
compuestos de bajo peso molecular provenientes del holobionte  
de *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860)**

### **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA ACUÁTICA

PRESENTA:

**BIÓL. MAR. NOEL FABIAN HERNÁNDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:**

DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS  
Instituto de Química, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

DR. LEOVIGILDO QUIJANO  
Instituto de Química, UNAM

DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ  
Unidad Académica de Sistemas Arrecifales Puerto Morelos, UNAM

DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

DR. RICARDO REYES CHILPA  
Instituto de Química, UNAM

**ASESOR EXTERNO:**

DR. JOSÉ FERNANDO LAZCANO PÉREZ  
Unidad Académica de Sistemas Arrecifales Puerto Morelos, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., OCTUBRE, 2021**



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.



**Estudio sistemático de la actividad hipoglucemiante de  
compuestos de bajo peso molecular provenientes del holobionte  
de *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA ACUÁTICA

PRESENTA:

**BIÓL. MAR. NOEL FABIAN HERNÁNDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:**

DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS  
Instituto de Química, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

DR. LEOVIGILDO QUIJANO  
Instituto de Química, UNAM

DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ  
Unidad Académica de Sistemas Arrecifales Puerto Morelos, UNAM

DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

DR. RICARDO REYES CHILPA  
Instituto de Química, UNAM

**ASESOR EXTERNO:**

DR. JOSÉ FERNANDO LAZCANO PÉREZ  
Unidad Académica de Sistemas Arrecifales Puerto Morelos, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., OCTUBRE, 2021**

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad y facilidades de complementar mi formación profesional y personal en sus instalaciones.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y la confianza en la realización del proyecto de maestría.

Al CONACyT por la beca número 736272 otorgada para la realización de los estudios de maestría.

Al CONACyT proyecto CB A1-S-7509 y al proyecto PAPIIT IG200218, por solventar gastos relacionados al proyecto.

A los apoyos recibidos (beca CONACYT, beca DGEP ó CEP, apoyo a Proyectos de Investigación CONACYT, PAPIIT-DGAPA-UNAM, indicando en cada caso la clave, número de registro o número de proyecto) y, otros apoyos recibidos.

A mi tutor, el Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros por darme un espacio y la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo. Su permanente disposición y apoyo incondicional en cada etapa del proyecto.

A los integrantes del comité tutor: Dr. Leovigildo Quijano, Dra. Judith Sánchez Rodríguez, Dr. José Estuardo López Vera, Dr. Ricardo Reyes Chilpa y al Dr. José Fernando Lazcano Pérez por sus acertados consejos y comentarios en el desarrollo del proyecto, además de su valiosa contribución en el desarrollo experimental.

A la M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan y el M. en C. Antonio Nieto Camacho, técnicos del Laboratorio de Pruebas Biológicas por su apoyo en el desarrollo experimental.

A la M. en C. Lucía del Carmen Márquez y M. en C. Lucero Ríos Ruiz, responsables del Laboratorio de Cromatografía de Gases y Líquidos por su asistencia técnica.

Al M. en C. Everardo Tapia Mendoza del Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC) por su apoyo técnico.

A la Dra. Sonia Marlen Escandón Rivera, técnico del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias por su apoyo técnico en experimentos de cromatografía.

Al Dr. Daniel Rosas Ramírez del Departamento de Química de Biomacromoléculas por su asesoramiento en los ensayos biodirigidos.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Este trabajo es el resultado del esfuerzo de muchas personas que propiciaron las condiciones para que hoy este escribiendo estas líneas.

Mi profundo agradecimiento a mis padres quienes me han dado todo en la vida, a pesar de la distancia, siempre me han hecho saber su apoyo incondicional. Espero la vida me confiera la oportunidad de retribuirles con creces.

A todos los integrantes del laboratorio de Química de biomacromoléculas 2 por hacer una estancia amena en su compañía.

Agradezco a los encargados de servicios escolares por facilitar todos los trámites durante mi estancia en el posgrado. Diana, Jazmín, Lupita y Gabriela con quienes tuve la oportunidad coincidir y que hacen la burocracia del posgrado mucho más amigable con su excelente trabajo.

A la señorita María del Carmen López Ortiz, asistente ejecutiva de la dirección del Instituto de Química, por facilitar los procedimientos para el ingreso a los laboratorios en época de confinamiento por la pandemia COVID.

Finalmente un agradecimiento a la familia Vanegas-Reza por su patrocinio de hospedaje durante gran parte de este proyecto.

A la M. en C. María Vanegas Reza por todo el apoyo en el proceso de escritura del manuscrito de tesis.

# Contenido

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| <b>I</b>    | <b>Introducción</b> .....   | 6  |
| <b>II</b>   | <b>Marco Teórico</b> .....  | 7  |
| 2.1         | <b>Cnidarios</b> .....  | 7  |
| 2.2         | <b>Capa Mucosa Superficial</b> .....  | 9  |
| 2.3         | <b><i>Palythoa caribaeorum</i></b> .....  | 12 |
| 2.4         | <b>Metabolitos aislados de cnidarios</b> .....                                      | 13 |
| 2.5         | <b>Diabetes mellitus</b> .....  | 16 |
| 2.5.1       | <i>Fisiopatología</i> .....   | 18 |
| 2.5.2       | <i>Regulación del metabolismo de la glucosa en sangre</i> .....                     | 20 |
| 2.5.3       | <i>Tratamientos para el control glucémico</i> .....                                 | 22 |
| <b>III</b>  | <b>Antecedentes</b> .....   | 25 |
| <b>IV</b>   | <b>Justificación</b> .....  | 27 |
| <b>V</b>    | <b>Hipótesis</b> .....  | 28 |
| <b>VI</b>   | <b>Objetivos</b> .....  | 28 |
| <b>VII</b>  | <b>Metodología</b> .....  | 29 |
| 7.1.        | <i>Obtención del extracto crudo</i> .....   | 29 |
| 7.2.        | <i>Purificación mediante ultrafiltración</i> .....                                  | 29 |
| 7.3.        | <i>Ensayo de inhibición de la <math>\alpha</math>-glucosidasa de levadura</i> ..... | 30 |
| 7.4.        | <i>IC<sub>50</sub> en <math>\alpha</math>-glucosidasa</i> .....                     | 31 |
| 7.5.        | <i>Purificación del compuesto activo por cromatografía</i> .....                    | 31 |
| 7.6.        | <i>Cromatografía acoplada a espectrómetro UV-visible</i>                            |    |
| 7.7.        | <i>Purificación del inhibidor por HPLC fase reversa</i> .....                       | 32 |
| 7.8.        | <i>Espectrometría de masas</i> .....  | 33 |
| 7.9.        | <i>Ensayo de Shinoda</i> .....  | 33 |
| <b>VIII</b> | <b>Resultados</b> .....   | 34 |
| 8.1         | <i>Extracto total del veneno de <i>P. caribaeorum</i></i> .....                     | 34 |
| 8.2         | <i>Fraccionamiento del extracto de <i>P. caribaeorum</i></i> .....                  | 34 |
| 8.3         | <i>Inhibición de la enzima <math>\alpha</math>-glucosidasa de levadura</i> .....    | 34 |
| 8.4         | <i>Espectrometría de masas y cromatografía HPLC-fase reversa</i> .....              | 37 |
| 8.5         | <i>Cromatografía acoplada a espectrometría de masas</i> .....                       | 40 |

|               |   |    |
|---------------|---|----|
| 8.6.          | <i>Cromatografía acoplada a espectrómetro UV-visible.....</i>   | 42 |
| 8.7           | <i>Cromatografía en capa fina.....</i>  | 42 |
| 8.8           | <i>Ensayo de Shinoda.....</i>   | 44 |
| 8.9           | <i>Ensayos de inhibición de la enzima <math>\alpha</math>-glucosidasa con extracto macerado en acetona.....</i> | 45 |
| <b>IX</b>     | <b>Discusión.....</b>   | 46 |
| <b>X</b>      | <b>Conclusión.....</b>  | 53 |
| <b>XI</b>     | <b>Literatura citada.....</b>   | 54 |
| <b>Anexos</b> | <b>.....</b>  | 65 |

## CONTENIDO DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Anatomía general de cnidarios .....   | 7  |
| <b>Figura 2.</b> Esquema de la descarga de un nematocisto .....  | 8  |
| <b>Figura 3.</b> Esquema general de la estructura del mucílago.....  | 10 |
| <b>Figura 4.</b> Modelo de la conformación de la CMS.....  | 11 |
| <b>Figura 5</b> <i>Palythoa caribaeorum</i> .....  | 12 |
| <b>Figura 6.</b> Estructura de la palitoxina.....  | 14 |
| <b>Figura 7.</b> Productos naturales aislados de cnidarios .....   | 15 |
| <b>Figura 8.</b> Actividad biológica reportada para productos naturales de cnidarios .....   | 16 |
| <b>Figura 9.</b> Digestión y absorción de los carbohidratos en el intestino delgado .....  | 18 |
| <b>Figura 10.</b> Esquema de los sitios de corte de las $\alpha$ -glucosidasas .....   | 19 |
| <b>Figura 11.</b> Puntos de regulación en el metabolismo de la glucosa .....   | 21 |
| <b>Figura 12.</b> Comportamiento de la acarbosa .....  | 35 |
| <b>Figura 13.</b> Comportamiento del extracto de <i>P. caribaeorum</i> .....   | 36 |
| <b>Figura 14.</b> La actividad inhibitoria.....  | 37 |
| <b>Figura 15.</b> Espectro de masas (ESI) de la fracción recuperada por precipitación con sulfato de amonio al 90 %.....                                   | 38 |
| <b>Figura 16.</b> Cromatografía de fase reversa (C18) del precipitado con 90 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ del extracto de <i>P. caribaeorum</i> ..... | 39 |
| <b>Figura 17.</b> Cromatograma de fase reversa de la muestra obtenida del <i>spin column</i> <sup>®</sup> .....  | 40 |
| <b>Figura 18.</b> Espectros de masas (ESI) en modo positivo de la fracción activa .....  | 41 |
| <b>Figura 19.</b> Espectro de masas en modo positivo de la fracción activa .....   | 42 |
| <b>Figura 20.</b> Cromatografía en capa fina de la muestra activa .....  | 43 |
| <b>Figura 21.</b> Prueba colorimétrica de Shinoda para flavonoides de la muestra activa .....  | 44 |

## Resumen

Los zoantídeos son cnidarios cuyo estudio toxicológico ha aumentado gracias a que presentan una variedad de moléculas activas asociadas a su veneno y a los simbiontes que contiene. *Palythoa caribaeorum* es un zoantídeo ampliamente distribuido en la Costa Occidental del Océano Atlántico, incluyendo costas mexicanas de baja profundidad, donde forman grandes tapetes coralinos. Son organismos cuyo interés de estudio toxicológico es reciente comparado con medusas y anemonas marinas, donde se han descrito múltiples compuestos con actividad citotóxica, hemolítica, antibacteriana y en canales iónicos. Este trabajo reporta una fracción de bajo peso molecular presente en el extracto acuoso de *P. caribaeorum*, que inhibe la actividad catalítica de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, enzima responsable de la absorción de azúcares en el intestino delgado de mamíferos. La molécula activa reportada tiene mayor afinidad por la  $\alpha$ -glucosidasa que la acarbosa, un medicamento usado actualmente para el control de la diabetes mellitus tipo 2. Las pruebas *in vitro* con una fracción semipurificada tienen inhibición reversible a una  $IC_{50}$ :  $53.76 \pm 5.3 \mu\text{g/mL}$ , sin embargo los componentes menos polares presentes en el mismo extracto, tienen actividad inhibitoria reversible en la enzima  $\alpha$ -glucosidasa con una  $IC_{50} < 17 \mu\text{g/mL}$ . La prueba colorimétrica de Shinoda indica que éstos pueden ser flavonoides; molécula que puede servir como una alternativa para el control glucémico en pacientes con diabetes tipo 2 con problemas de hiperglucemia asociados a los carbohidratos presentes dieta.

## Abstract

Zoanthids are cnidarians whose toxicological study has been increasing because they present a variety of active molecules associated with their venom and the symbionts they contain. *Palythoa caribaeorum* is a zoanthid well distributed on the Western Coast of the Atlantic Ocean, including shallow Mexican coasts, where they form large coral cover. They are organisms whose interest in toxicological study is recent compared to jellyfish and marine anemones, where multiple compounds with cytotoxic, hemolytic, antibacterial and ion channel activity have been described. This work reports a low molecular weight fraction present in the *P. caribaeorum* extract, which inhibits the catalytic activity of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme, responsible for the absorption of sugars in the small intestine of mammals. The active molecule reported in this work has higher affinity for  $\alpha$ -glucosidase than acarbose, a drug currently used for the control of type 2 diabetes mellitus. *In vitro* tests with a semi-purified fraction have reversible inhibition at  $IC_{50}$ :  $53.76 \pm 5.3$   $\mu$ g/mL, however the less polar molecules present in the same extract have reversible inhibitory activity in  $\alpha$ -glucosidase enzyme at  $IC_{50} < 17$   $\mu$ g /mL. Colorimetric tests suggest that active molecule is a flavonoid, which can be use as alternative for the glycemic control in type 2 diabetes mellitus patients and their hyperglycemic problems associated to diet carbohydrates content.

## I Introducción

La búsqueda de compuestos innovadores con actividad biológica que pueden ser usados como terapéuticos para diversos padecimientos, ha aumentado en los últimos años. Este campo ha crecido por la necesidad de dar tratamientos nuevos a enfermedades emergentes y sus variantes, o para mejorar los tratamientos existentes; por ejemplo, se buscan compuestos con mayor actividad para optimizar dosis, o la especificidad de compuestos activos, para eliminar o minimizar los efectos secundarios.

El reto para la investigación, debe abarcar diferentes áreas del conocimiento, tales como biología molecular, fisiología, proteómica, genómica, farmacología, química, etc. ya que, se busca describir el origen, desarrollo, tratamiento y cura de las enfermedades, a fin de mejorar las condiciones de los pacientes.

Dentro de los grupos más estudiados como fuente de moléculas novedosas, son los organismos marinos del filo Cnidaria, cuya principal característica es que todas las especies son venenosas. Su estudio ha hecho posible el descubrimiento de moléculas con actividad anticancerígena, antimicrobiana, hemolítica, como moduladores de distintos canales iónicos, entre otras actividades, que pueden ser aprovechadas en el tratamiento de múltiples padecimientos. La complejidad de su veneno y otras moléculas que se han descubierto entorno a ellos, los hace atractivos para estudios toxicológicos.

En este trabajo se evaluó la actividad inhibitoria de una fracción del extracto de *Palythoa caribaeorum*. Los resultados sugieren que dentro de la fracción estudiada, la molécula con actividad inhibitoria enzimática, corresponde probablemente a un flavonoide, y pudiera representar una alternativa para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

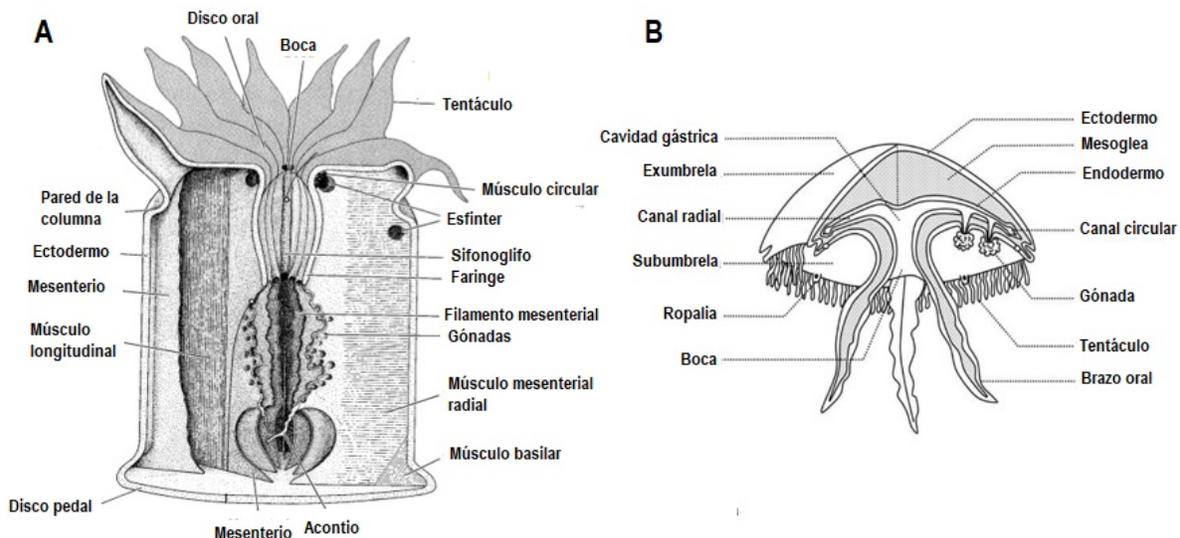
## II Marco Teórico

### 2.1 Cnidarios

Los cnidarios (filo Cnidaria) son organismos ancestrales, se agrupan en cinco clases: Hidrozoa, Scyphozoa, Cubozoa, Staurozoa y Anthozoa (D'Ambra y Lauritano, 2020). Son animales invertebrados con simetría radial o biradial, poseen dos capas de células: una llamada ectodermo y otra denominada endodermo o gastrodermis (ambas capas separadas por un tejido llamado mesénquima o mesoglea), poseen tentáculos, carecen de cefalización y tienen sistemas discretos de respiración, excreción y circulación (Brusca *et al.*, 2016). (Figura 1).

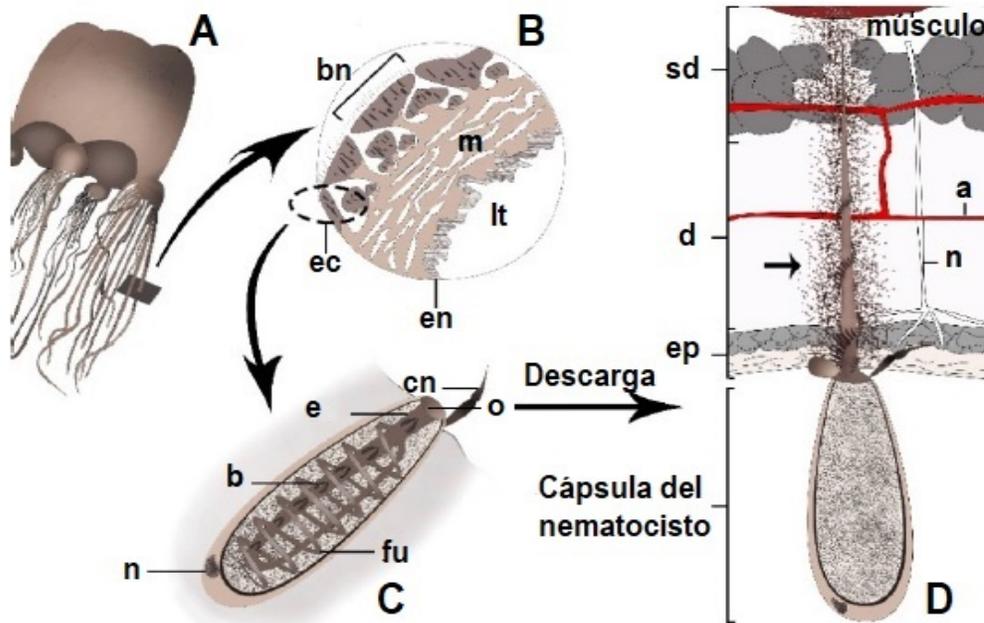
Actualmente se conocen más de 13,400 especies de cnidarios, marinos en su mayoría; de los cuales, aproximadamente 845 especies son corales escleractineos formadores de arrecifes de coral (Carpenter, Kent E., Abrar *et al.*, 2008; Leclère y Röttinger, 2017).

Todos los organismos pertenecientes al filio Cnidaria, poseen cnidocitos los cuales, son células especializadas para la defensa y depredación (Tardent, 1995).



**Figura 1.** Anatomía general de cnidarios. A) Forma pólipa. B) Forma medusoide. Imagen tomada de Ruppert y Barnes 1996.

Los cnidocitos albergan en su interior orgánulos altamente especializados llamados cnidocistos. Actualmente se reconocen 30 tipos de cnidocistos (Fautin, 2009) divididos en tres grandes grupos dependiendo de su función: cnidocistos de sujeción (espirocistos); cnidocistos aglutinantes, (pticocistos, exclusivos de actinarios y ceriantarios) y cnidocistos penetrantes (nematocistos) (Jouiaei *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Esquema de la descarga de un nematocisto. A) Esquema de una medusa. B) Vista de un corte transversal de un tentáculo de medusa donde se señala el lumen tentacular (lt), el endodermo (en), la mesoglea (m), el ectodermo (ec) y la batería de nematocistos (bn). C) Nematocisto inactivo, esta estructura contiene un coctel de toxinas en la superficie del filamento urticante (fu), que sale disparado cuando el cnidocilio (cn) es estimulado, también se muestra el opérculo (o), el eje (e), las barbas (b) y el núcleo (n). D) Esquema de un nematocisto activo, epidermis (e), dermis (d), subdermis (sd), nervio (n) y arteria (a) de la presa. Imagen modificada de Jouiaei *et al.* (2015)

Los nematocistos (Figura 2) son los cnidocistos mayormente estudiados, estos se encuentran principalmente en los tentáculos de los cnidarios (aunque también se encuentran en la campana y gastrodermis de cubomedusas) y juegan un rol

fundamental en la depredación, ya que contienen el veneno de estos organismos, neurotoxinas, enzimas lipolíticas y proteolíticas, etc. (Beckmann y Özbek, 2012).

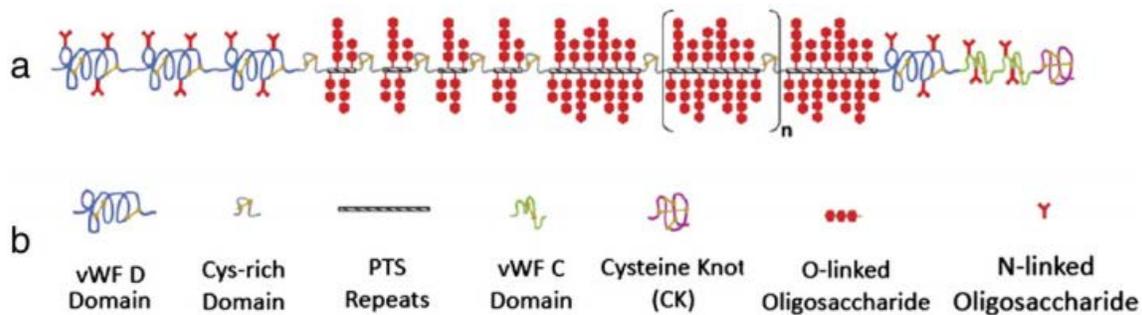
El mecanismo de descarga de los nematocistos es activado como respuesta a estímulos químicos y mecánicos, el cnidocilio censa continuamente el ambiente y es el responsable de iniciar el proceso de eversión. El cnidocilio recibe el estímulo, posteriormente se abre el opérculo del nematocisto, la presión hidrostática intracelular dispara el filamento urticante y libera el veneno. Todo el proceso ocurre en un tiempo de 3 ms y se ha documentado que el proceso es dependiente de iones calcio (Cannon y Wagner, 2003; Kass-Simon y Scappaticci, Jr., 2002). Los nematocistos, frecuentemente se encuentran en una capa exterior de los organismos, denominada Capa Mucosa Superficial.

## **2.2 Capa Mucosa Superficial**

La Capa Mucosa Superficial (CMS) se compone principalmente de un polímero elaborado por los mucocitos (células especializadas presentes en el cenénquima), el cual, es excretado sobre la superficie del coral (Krediet *et al.*, 2013).

La CMS es una barrera física entre los corales y el medio que los rodea, además, cumple con múltiples roles en estos organismos, tales como: protección contra la luz UV y deshidratación, es esencial para procesos de alimentación heterotrófica, así como limpieza de la colonia, ayudando en la remoción de sedimento (Ritchie, 2006).

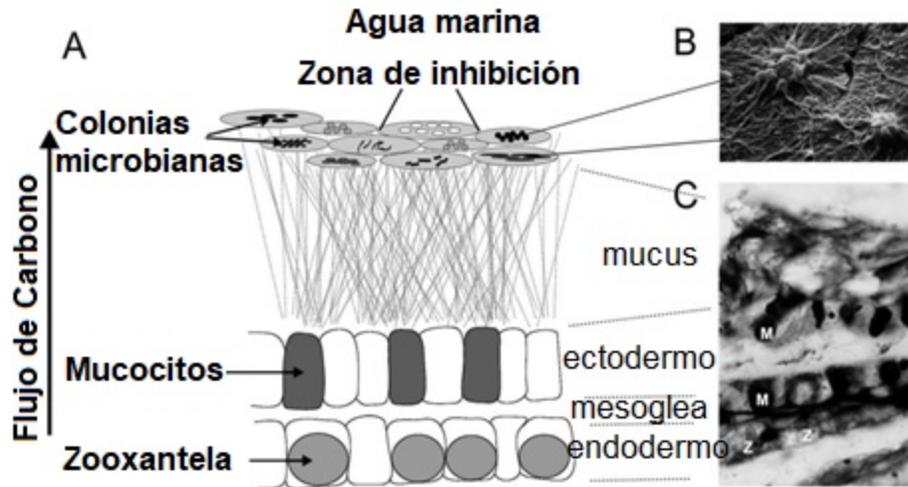
Asociadas a la CMS, se ha descrito una amplia variedad de comunidades microbianas, que se ven favorecidas por el alto contenido de material orgánico disuelto, y de glicoproteínas del mucílago (mucus), propiciando su cultivo *in situ* (Glasl *et al.*, 2016; Kooperman *et al.*, 2007; Koren y Rosenberg, 2006; Ritchie, 2006; Shnit-Orland y Kushmaro, 2009) (Figura 3). En este contexto, también se sabe que la CMS presenta compuestos que cumplen funciones aleloquímicas, propiciando de esta forma, el asentamiento selectivo de ciertas comunidades bacterianas (Brown y Bythell, 2005).



**Figura 3.** Esquema general de la estructura del mucílago. a) Monómero con regiones repetidas ricas en prolina, tirosina y serina (PTS repeats) glicosiladas. Flanqueadas por dominios D vWF (Factor von Willebrand, glucoproteína cuya función es permitir que las plaquetas se unan de manera estable a la superficie de un vaso roto en el inicio del proceso de hemostasia), dominio vWF C-terminal y nudo de cisteína (CK). b) símbolos que representan los dominios del esquema a). Bythell y Wild, 2011.

Dentro de la composición del mucus de la CMS hay glicoproteínas, las cuales tienen en sus extremos el dominio CK, abundante en cistinas (dos residuos de cisteína unidos por un puente disulfuro); a él, se anclan otros dominios CK para polimerizarse, y adquieren masas moleculares entre 1.4-2.5 MDa, y en casos excepcionales, mayores a 30 MDa (Jatkar *et al.*, 2010). Los niveles de glicosilaciones en las glicoproteínas, pueden variar entre moléculas de un mismo mucílago, en promedio el 80 % del mucílago son carbohidratos (Bansil y Turner, 2006), principalmente D-arabinosa, D-manosa y D-galactosa unidas por enlaces glicosídicos (Meikle *et al.*, 1988).

Las comunidades bacterianas que usan el mucílago de los cnidarios como nicho ecológico, son dinámicas en función de las condiciones del medio circundante y se estima que cumplen con diversas funciones, como la limpieza de desechos orgánicos y barrera contra patógenos (Shnit-Orland y Kushmaro, 2009) (Figura 4).



**Figura 4.** Modelo de la conformación de la CMS y el desarrollo de colonias bacterianas en la superficie del mucus (A), micrografía de la superficie con microscopio electrónico de barrido (B) y micrografía histológica de un corte transversal de tejido (C). M= mucositos Z= zooxantelas (Brown y Bythell, 2005).

La capacidad de los patógenos para usar de manera eficiente las fuentes de carbono, nitrógeno, etc. disponibles en el huésped (cnidario), determina su éxito de infección. Sin embargo, para que esto suceda, dicha capacidad debe sobrepasar la barrera defensiva de los comensales nativos del mucus del cnidario. Los comensales de la CMS pueden producir antibióticos, inhibidores de comunicación celular y una variedad de moléculas que aún no se conocen, pero que son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias y la formación de biopelículas de las mismas (Alagely *et al.*, 2011).

La CMS también juega un rol importante en la competencia por el espacio en los arrecifes, muchas especies de coral usan la dispersión de esta, como estrategia para detener el crecimiento de otras especies e invadir su nicho. Los corales pueden depositar hasta 15 mm de mucus sobre especies vecinas y permanecer sobre ellas por 6 días, este contacto prolongado causa graves daños a la especie invadida, por los nematocistos presentes en el mucus liberado (Brown y Bythell, 2005).

### 2.3 *Palythoa caribaeorum*

Los organismos del orden Zoantharia, mejor conocidos como zoantídeos, son pólipos que se encuentran organizados en colonias y a diferencia de los corales escleractíneos, no construyen estructuras rígidas de carbonato de calcio. Estos zoantídeos se encuentran distribuidos en la zona fótica de los mares tropicales (0-50 metros de profundidad). Esto les permite mantener relaciones simbióticas con organismos fotosintéticos, principalmente dinoflagelados del género *Symbiodinum* sp. (Acosta *et al.*, 2005).

*Palythoa caribaeorum* (Figura 5) es una de las especies más abundantes de zoantídeos presentes en los arrecifes de coral de las costas tropicales del Océano Atlántico occidental entre las latitudes 30 °N y 30 °S. Forma colonias incrustantes sobre sustratos duros unidos por un mismo tejido denominado cenénquima.



**Figura 5.** Colonia del zoantídeo *Palythoa caribaeorum*. Tomado de: <https://www.naturalista.mx/observations/35657658>

Los pólipos de *P. caribaeorum*, tienen cada uno, un disco oral que llega a medir hasta 1.3 cm de diámetro y se encuentra circundado por dos anillos de tentáculos. La parte superior, está cubierta por cálices rodeados por labios bajos y redondeados. Los discos orales se pegan unos con otros cuando la colonia está completamente expandida (Voss, 1976). Es un organismo altamente competitivo por el espacio, capaz de crecer y dispersarse sobre sustratos duros como algunos corales, invertebrados incrustantes y algunos moluscos, perjudicando su crecimiento (Gleibs *et al.*, 1995). Los organismos con quien tiene mayor competencia comprenden los géneros *Agaricia*, *Montastrea*, *Siderastrea* y *Porites*; en menor medida con el género *Millepora* y *Acropora* (Suchanek y Green, 1981).

*P. caribaeorum* es un depredador oportunista que se alimenta principalmente de partículas en suspensión, pequeños crustáceos y larvas de otros organismos, sus presas quedan atrapadas en los tentáculos y son introducidos a la cavidad gastrovascular para ser digeridas (De Santana *et al.*, 2015).

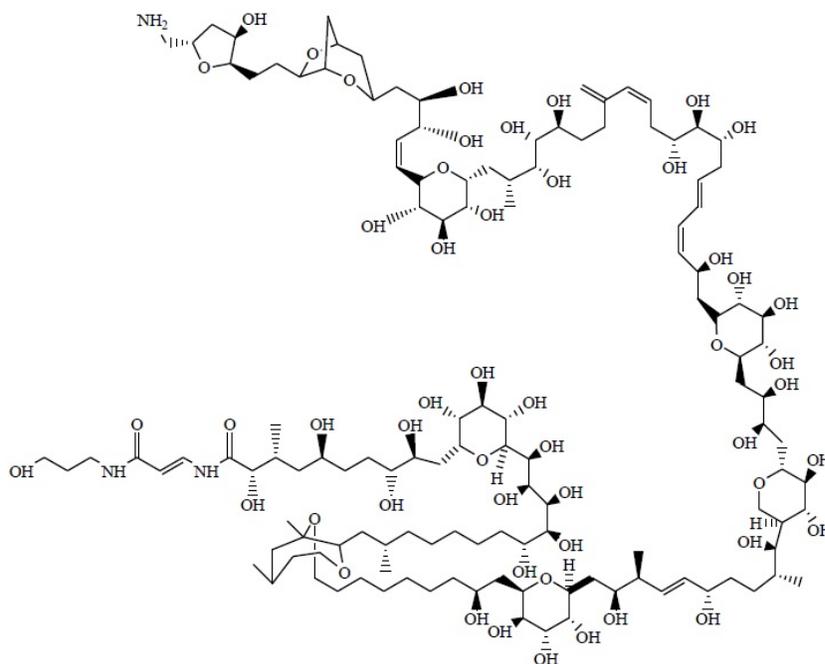
En la superficie de *P. caribaeorum*, la CMS es especialmente abundante comparada con la de los demás organismos del filo. Su volumen, densidad, viscosidad y composición está determinada por las condiciones ambientales y por diversos factores de estrés a los que se encuentra expuesto este organismo (Bythell y Wild, 2011; Jatkar *et al.*, 2010). La actividad antimicrobiana presente en la CMS se ha atribuido a las colonias bacterianas huéspedes de este nicho (Castillo *et al.*, 2001), sin embargo, la función específica de esta capa no ha sido estudiada (Ritchie, 2006).

## **2.4 Metabolitos aislados de cnidarios**

Las condiciones químicas y físicas de ecosistemas competitivos como los arrecifes de coral, propician que organismos sésiles como *P. caribaeorum* y otros cnidarios, produzcan una gran variedad de metabolitos primarios y secundarios, con actividades biológicas diversas, las cuales, al ser aisladas e identificadas pueden tener un potencial uso farmacéutico (Rocha *et al.*, 2011).

La identificación de dichos metabolitos, ha provocado que se incrementen los estudios de bioprospección en organismos del filo Cnidaria. En *P. caribaeorum*, los estudios empezaron a tomar relevancia en 1971, al descubrir la presencia de la palitoxina (Moore y Scheuer, 1971), aunque su estructura definitiva fue elucidada hasta diez años después (Moore y Bartolini, 1985).

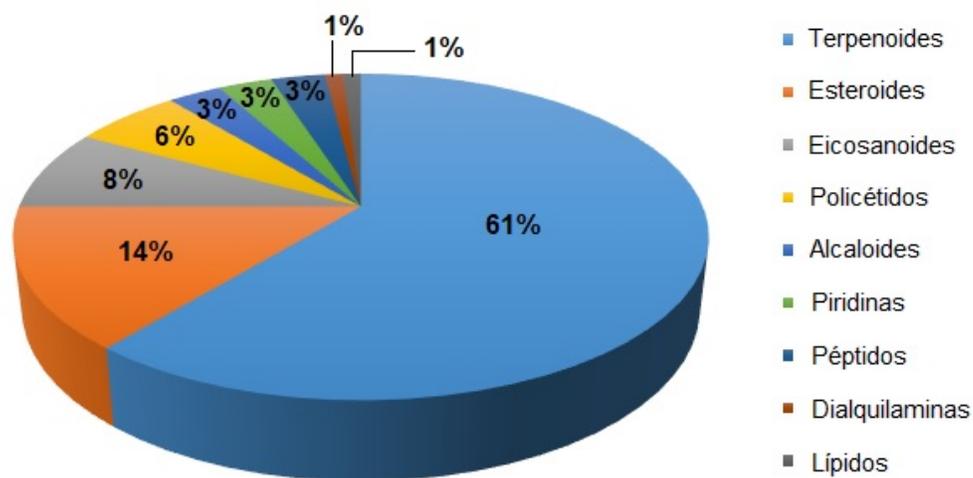
La palitoxina es una de las toxinas no proteicas más potentes que se conoce actualmente y, ahora sabemos que se encuentra en varias especies del género *Palythoa*, algas rojas, anemonas de mar y dinoflagelados como *Ostreopsis siamensis* (Warrell, 2012) (Figura 6). La dosis letal media en ratas, es de 0.089  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , afecta la bomba de sodio/potasio de la membrana celular, cuya función es mantener la homeostasis celular (Ramos y Vasconcelos, 2010).



**Figura 6.** Estructura de la palitoxina. Ramos y Vasconcelos 2010

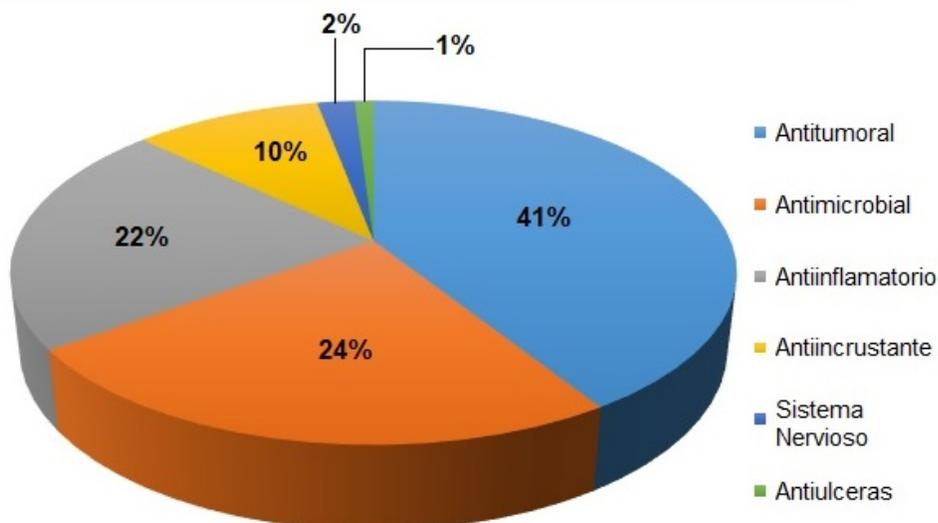
Además de la palitoxina, en corales blandos se ha descrito una variedad de diterpenos con actividad anticancerígena y antimicrobiana, aislados de octocorales del género *Lobophytum* y *Xenia* respectivamente (Bishara *et al.*, 2006; Coval *et al.*, 1996). Las gorgonias del género *Pseudopterogorgia*, también presentan sesquiterpenos y algunos esteroides que inhiben el crecimiento del protozooario *Plasmodium falciparum*, parásito causante de la variante más grave de la malaria (Ospina *et al.*, 2005). En total, se han descrito aproximadamente 3000 compuestos nuevos en el filo Cnidaria, sin embargo, la mayoría de ellos no han llegado a una fase de investigación clínica.

De acuerdo con el número de moléculas reportadas, los compuestos aislados de cnidarios en orden descendente, se pueden enlistar como terpenoides, esteroides, eicosanoides, policétidos, alcaloides, piridinas, péptidos, dialquilaminas y lípidos (Figura 7).



**Figura 7.** Distribución de los principales productos naturales aislados de cnidarios (Rocha *et al.*, 2011).

De las actividades biológicas mayormente estudiadas en estas moléculas, destacan el efecto antitumoral, antimicrobial y antiinflamatorio (Figura 8); sin embargo, muy pocas investigaciones se han enfocado en la caracterización del comportamiento y acción de estos nuevos compuestos, frente enfermedades como la diabetes.



**Figura 8.** Actividad biológica reportada para productos naturales de cnidarios (Rocha *et al.*, 2011).

## 2.5 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus representa uno de los principales problemas de salud a nivel mundial y afecta a la población de todas las edades. Esta enfermedad se caracteriza por hiperglucemia persistente y metabolismo alterado de carbohidratos, lípidos y proteínas, causado por insuficiencia total o parcial de la secreción de insulina. La diabetes se puede asociar a diversas complicaciones de salud, que pueden ser agudas o crónicas y, estas a su vez, pueden ser micro o macrovasculares, causantes de morbilidad, incapacidad y muerte a nivel mundial (Conget, 2002; Olokoba *et al.*, 2012).

La Federación Internacional de Diabetes dice que en el año 2015 existía una población de 415 millones de personas (entre 20 y 79 años) que presentaban esta enfermedad y, estiman que para el 2040 habrá 200 millones de personas más. Estas cifras van cada vez en aumento debido a los hábitos alimenticios de la población, junto con un estilo de vida sedentario, provocando que cada vez, tengamos mayores índices de obesidad que se traducen en mayor riesgo de adquirir la enfermedad (Galicia-García *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2018).

En México, la situación de diabetes mellitus tiene un comportamiento similar al del resto del mundo. Recientemente se ha reportado que el país cuenta con 9.17 % de la población adulta diagnosticada con algún tipo de diabetes, lo que representa 6.4 millones de personas. Los análisis estadísticos infieren que este número aumentará considerablemente, dado que hay un alto índice de obesidad en la población, presentándose cada vez con mayor frecuencia a menor edad y, es un factor de riesgo importante para desarrollar la enfermedad (Basto-Abreu *et al.*, 2020).

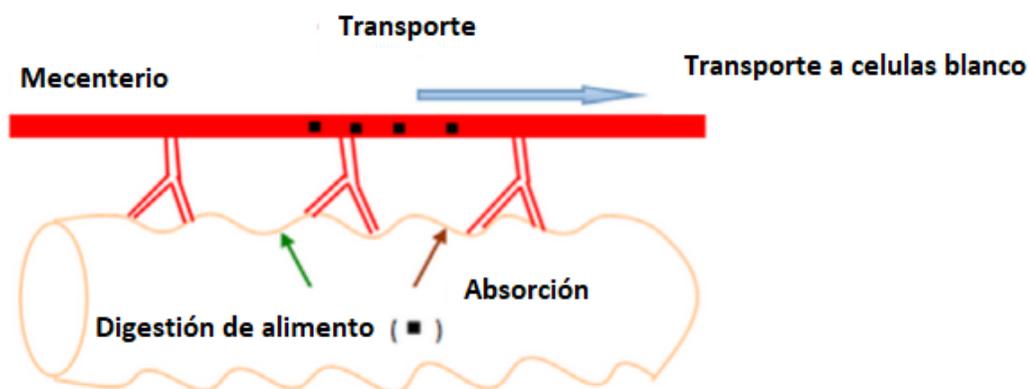
La diabetes mellitus se clasifica de manera general en tres tipos: diabetes tipo 1 (DM1), diabetes tipo 2 (DM2) y diabetes gestacional (Goyal y Jialal, 2020). La DM2 es la más común en la población que padece esta enfermedad, representa hasta un 90 % de todos los casos de diabetes. La DM2 es una condición de resistencia a la insulina, es decir, inicialmente hay un aumento en la segregación de insulina proveniente de las células beta pancreáticas, para mantener la homeostasis de glucosa en sangre, a medida que la enfermedad avanza, las células beta pancreáticas cambian y la insulina ya no puede mantener la homeostasis (Wu *et al.*, 2014), consecuentemente se produce la hiperglucemia, caracterizada por concentraciones anormalmente altas de glucosa en sangre (>200 mg/dL).

Actualmente se usan diferentes fármacos y combinaciones de ellos, para el tratamiento de la diabetes, tales como biguanidas (metformina), sulfonilureas (gliburida), meglitinidas, tiazolinedionas, inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa (acarbosa, voglibosa y miglitol), insulina y sus análogos, entre otros. Es por ello, que se continúan desarrollando nuevos tratamientos y se buscan nuevos compuestos, para contrarrestar esta enfermedad, ya que no todos los pacientes presentan las mismas condiciones, y no se puede hablar de un tratamiento único para la población diabética (Olokoba *et al.*, 2012).

### 2.5.1 Fisiopatología

La concentración de glucosa en el torrente sanguíneo está determinada por tres factores principales: la absorción de glucosa en el intestino delgado, la glucogenolisis (ruptura del glucógeno a glucosa en condiciones de ayuno) y la gluconeogénesis (formación de glucosa a partir de lactato y aminoácidos en condiciones de ayuno prolongado). El factor más importante que contribuye a la presencia del azúcar en la sangre, es la glucosa que se absorbe en el tracto digestivo inmediatamente después de ingerir alimentos, denominada glucosa postprandial (Aronoff *et al.*, 2004) (Figura 9). La absorción de glucosa postprandial, junto con anomalías en la regulación de su metabolismo, producen la hiperglucemia (Malunga *et al.*, 2016).

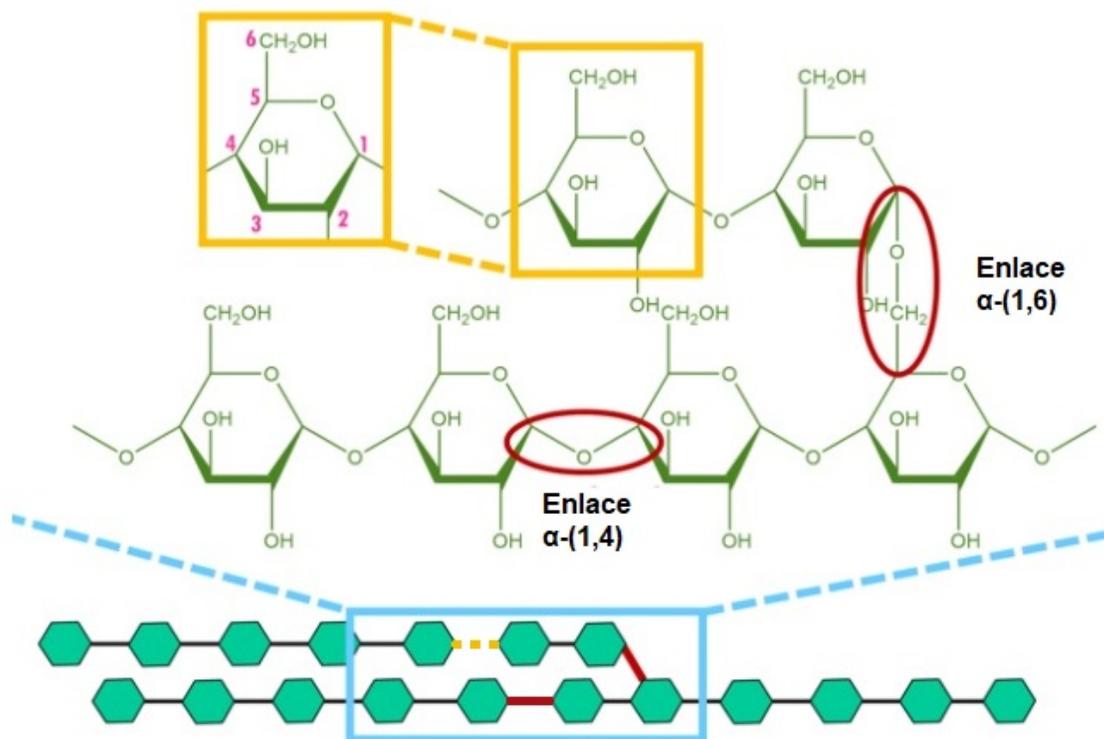
La enzima clave encargada de la degradación de carbohidratos a glucosa, para su posterior absorción hacia el torrente sanguíneo, son las  $\alpha$ -glucosidasas (Umamaheswari y Sridevi, 2019).



**Figura 9.** Digestión y absorción de los carbohidratos en el intestino delgado. Los carbohidratos presentes en los alimentos que llegan hasta el intestino delgado, son hidrolizados a monosacáridos como la glucosa, este azúcar es absorbido en las microvellosidades del intestino a la sangre para llegar a los músculos que lo requieran donde se terminarán de metabolizar hasta ser convertidos en energía (modificado de Chen *et al.* 2016).

Las  $\alpha$ -glucosidasas se encuentran en el borde de los enterocitos del intestino delgado, donde se realiza la absorción de nutrientes (Lee *et al.*, 2016). Estas enzimas se encargan de la degradación de almidón a glucosa, que posteriormente se absorbe y es usada como fuente de carbono y energía en humanos (Lin *et al.*, 2016).

La degradación de los carbohidratos a azúcares simples como la glucosa, es realizada principalmente por dos  $\alpha$ -glucosidasas: la maltasa glucoamilasa (MGAM) y la sucrosa isomaltasa (SI). Ambas enzimas (MGAM y SI), tienen doble sitio catalítico, el dominio N-terminal escinde el enlace  $\alpha$ -1,6 glucosídico y el dominio C-terminal escinde el enlace  $\alpha$ -1,4 glucosídico (Figura 10). Sin embargo, la SI tiene mayor afinidad por el enlace  $\alpha$ -1,4 glucosídico (Lin *et al.*, 2016).



**Figura 10.** Esquema de los sitios de corte de las  $\alpha$ -glucosidasas en una molécula de almidón. Las unidades de glucosa se muestran en hexágonos verdes, los sitios de corte de las alfa glucosidasa se muestra en rojo y en amarillo un enlace  $\alpha$ -1,4 glucosídico hidrolizado. Modificado de Jiang y Ghosh, 2019.

### 2.5.2 Regulación del metabolismo de la glucosa en sangre

La concentración de glucosa en sangre está determinada por la cantidad que ingresa (vía ingesta) y la cantidad que sale, de acuerdo con las necesidades de un organismo. Como se dijo anteriormente hay tres factores principales que la regulan: glucólisis, gluconeogénesis y glucogenólisis (Figura 11). La gluconeogénesis y la glucogenólisis están regulados por el glucagón: una hormona producida en las células alfa pancreáticas que favorece la aparición de glucosa proveniente del hígado. La hormona con la función antagonista es la insulina, que favorece el transporte de glucosa de la sangre a las células (Scheen, 2003).

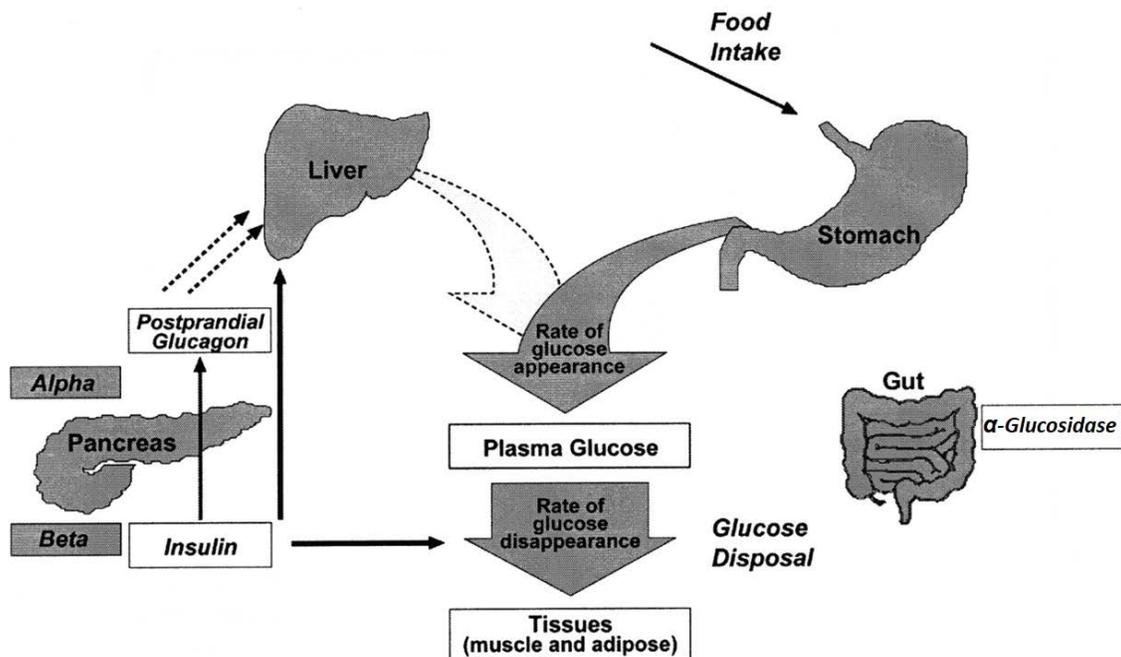
La insulina se libera de las células  $\beta$  pancreáticas al detectar una alta concentración de glucosa en la sangre después de cada comida. La glucosa es detectada por un transportador facilitador de glucosa denominado GLUT2, la glucosa dentro de la célula entra en glucólisis y modifica la relación ATP/ADP intracelular, cerrando los canales de  $K^+$  sensibles a ATP, con la consecuente despolarización de la membrana. Esta despolarización abre los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, y la alta concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular desencadena la fusión de gránulos de insulina a la membrana celular, para finalmente ser liberada por exocitosis (Fu *et al.*, 2012; Röder *et al.*, 2016).

La insulina liberada al torrente sanguíneo, estimula a las proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (GLUT) del músculo esquelético (responsable de absorber entre 70-90 % de la glucosa en sangre), las GLUT se encuentran en la superficie celular y en mayor medida almacenadas en vesículas dentro de la célula. El estímulo por la insulina en las GLUT de la superficie celular, favorece la translocación de GLUT intracelulares a la superficie celular, aumentando la absorción de glucosa disponible en el torrente sanguíneo favoreciendo la homeostasis (Evans *et al.*, 2019).

La hipoglucemia por otra parte, inhibe la concentración de insulina y promueve la liberación de glucagón al estimular las células alfa pancreáticas. El glucagón como hormona contra reguladora de la insulina, aumenta los niveles de glucosa

plasmática en respuesta a la hipoglucemia inducida por insulina. Este aumento en la concentración de glucosa se debe principalmente a que el glucagón potencia el proceso de gluconeogénesis y glucogenólisis e inhibe la glucólisis (Jiang y Zhang, 2003).

En general las señalizaciones por glucagón promueven la glucogenólisis e inhibe la síntesis de glucógeno en el hígado. Esto se debe a que el glucagón activa la cascada proteína quinasa A (PKA)-glucógeno (iniciación del proceso de degradación del glucógeno) y disminuye la producción de Glucógeno Sintasa en el hígado, consecuentemente la síntesis de glucógeno a partir de glucosa disminuye a niveles mínimos (Hædersdal *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).



**Figura 11.** Puntos de regulación en el metabolismo de la glucosa. El principal factor de ingreso de la glucosa posprandial es el intestino con ayuda de las  $\alpha$ -glucosidasas, incrementando la concentración de la glucosa en plasma. En presencia de concentraciones altas de glucosa en plasma, la insulina se encarga de que sea absorbida por los músculos que lo requieren, esta insulina es secretada por las células beta del páncreas, estimulada por la concentración de glucosa. Un tercer punto de control lo conforma la hormona glucagón, secretado por las células alfa pancreáticas, esta inhibe la secreción de la insulina y promueve la liberación de glucosa a partir del glucógeno en el hígado, además estimula la síntesis de glucosa a partir de lactato y otros aminoácidos (Modificado de Aronoff *et al.*, 2004).

La insulina y el glucagón son las principales hormonas reguladoras del aumento y disminución de glucosa en la sangre, sin embargo, no son las únicas. Las células  $\beta$  pancreáticas secretan amilina, una hormona auxiliar secretada con la insulina en una relación 1:100 (amilina:insulina) cuya función, al igual que la insulina, es movilizar la glucosa de la sangre hacia el tejido muscular; esta hormona se encuentra en el organismo sólo en presencia de diabetes o insulinoma. Las hormonas incretinas por su parte, son secretadas por la sección proximal del intestino y estimulan la secreción de insulina ayudando de manera indirecta al mantenimiento de la homeostasis de glucosa, además, son encargadas de regular la motilidad intestinal (Aronoff *et al.*, 2004).

### 2.5.3 *Tratamientos para el control glucémico*

El control de la glucemia en pacientes diabéticos es muy importante para mantener la funcionalidad fisiológica y una buena calidad de vida. Cuando las modificaciones en el estilo de vida son insuficientes, o no son factibles para un paciente, el tratamiento farmacológico se convierte en la principal herramienta para controlar la enfermedad.

El tratamiento de la DM1 está restringido a la insulina exógena, es decir, se administra esta hormona a pacientes que tienen nula secreción por consecuencia del deterioro de las células  $\beta$ -pancreáticas. La insulina cumple la función de movilización de la glucosa presente en la sangre, sin embargo, el tratamiento con insulina no siempre es suficiente. La insulino terapia suele acompañarse de otros fármacos tales como: análogos de amilina, inhibidores de GLUT 2 (proteínas facilitadoras del transporte de glucosa) e incretinas, son algunas terapias coadyuvantes (Otto-Buczowska y Jainta, 2018).

El tratamiento combinado de estos fármacos no solo ayuda a movilizar la glucosa sanguínea, se ha reportado que también brinda protección a las células  $\beta$ -pancreáticas deterioradas, hay un efecto positivo en el perfil de lípidos y se presenta reducción de complicaciones de la enfermedad, por ejemplo, control sobre la

pérdida de peso y ayuda en la reducción de la presión arterial alta (Cheng *et al.*, 2016; Cherney *et al.*, 2014; Tamez *et al.*, 2015).

El manejo de la DM2 requiere de tratamientos prolongados para lograr el control glucémico y los riesgos que conlleva. El fármaco de primera línea para este padecimiento es la metformina, una molécula descubierta en la planta *Gallega officinalis* usado desde la década de los 50's, cuando se descubrió su utilidad clínica. La metformina actúa en el hígado, inhibe la gluconeogénesis además de aumentar la absorción de glucosa en los tejidos periféricos (Aguayo y Brito, 2013).

Se ha reportado que la monoterapia con metformina no siempre funciona en todos los pacientes y se necesitan medicamentos que coadyuven en el tratamiento de la DM2, los medicamentos de elección en estos casos, son algunos inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas; actualmente existen tres medicamentos preferentemente utilizados, pertenecientes a esta familia: voglibosa, acarbosa y miglitol (Dabhi *et al.*, 2013).

La voglibosa actúa a nivel de intestino delgado, bloquea de manera reversible las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas reduciendo la absorción de monosacáridos, e impidiendo su paso hacia el torrente sanguíneo. En el hígado tiene acción inhibitoria de la glucogenólisis, reduciendo la liberación de glucosa endógena, sin embargo, como efectos secundarios, hay reportes de hepatitis con colestasis grave, relacionados a la hipersensibilidad a la voglibosa, además de náuseas, vómito y otros efectos sobre el tracto intestinal (Dabhi *et al.*, 2013).

La acarbosa, es un oligosacárido complejo que funciona como un inhibidor competitivo y reversible de  $\alpha$ -glucosidasas del intestino. Ayuda a mantener bajos los niveles de glucosa postprandial al ralentizar la absorción de carbohidratos y, en personas con prediabetes ayuda a retrasar la progresión a DM2, además, recupera de manera gradual la tolerancia a la glucosa en las células. Este medicamento, sólo es recomendado como monoterapia en el control glucémico, ya que combinado con fármacos antidiabéticos como la insulina, aumenta el riesgo de producir hipoglucemia. Su uso está contraindicado en personas con problemas de cirrosis

hepática, enfermedad inflamatoria intestinal o ulceración del colon (Chiasson *et al.*, 2002).

La búsqueda de medicamentos para el control glucémico no solo se ha centrado en el metabolismo de la glucosa, sino en uno de los principales factores de riesgo para desarrollar la enfermedad: la obesidad. El miglitol es un fármaco que se aprobó en México para su uso como agente para el control glucémico en 1996, es un inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasas del intestino delgado, que ayuda a controlar la concentración de glucosa postprandial y se ha demostrado que también ayuda en la pérdida de peso (Sugimoto *et al.*, 2015).

Actualmente el tratamiento para pacientes con DM, con frecuencia incluye varios fármacos, cuyos efectos secundarios muchas veces terminan por mermar el bienestar y la calidad de vida de quienes padecen esta enfermedad; por ello, es necesaria la búsqueda de nuevos principios activos que reduzcan la posibilidad de presentar efectos secundarios y sean lo suficientemente selectivos, eficaces y efectivos para el tratamiento de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus.

### III Antecedentes

Los organismos marinos han sido el origen para el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad biológica, las cuales, tienen un enorme potencial para ser usadas en el tratamiento de múltiples enfermedades. En el filo Cnidaria por ejemplo, en el año de 1960, se describió una prostaglandina. Este hallazgo llamó la atención de varios grupos de investigación y aumentaron los estudios sobre las moléculas provenientes de los organismos de este filo que pudieran ser aprovechadas. El interés desde entonces, se ha incrementado de tal manera que sólo en la última década, se han descrito más de 3000 moléculas bioactivas en cnidarios (Becerra-Amezcuca *et al.*, 2016).

Aunque gran parte de los trabajos han estado enfocados en las proteínas bioactivas del veneno contenido en los cnidocistos, también existen estudios enfocados en las moléculas no proteicas (metabolitos secundarios), generados por la relación entre el comensal, sus simbioses y bacterias, asociación a la cual, se le denomina *holobionte*. Dicha asociación es de particular importancia para el género *Palythoa* *sp.*, porque la palitoxina reportada por Moore y Scheuer (1971) en *P. toxica* (Figura 6), resultó ser producida por el dinoflagelado *Ostreopsis siamensis* (Rhodes *et al.*, 2000), lo cual le confería variabilidad estacional y regional (Usami *et al.*, 1995). Posteriormente, la palitoxina también se encontró en algas, crustáceos y peces herbívoros, por lo que se concluyó que es movilizada a través de la red trófica y es producida en el holobionte de los organismos donde fue descubierta.

A partir de estos descubrimientos sobre el origen de la palitoxina y el holobionte, comenzaron a ser estudiadas de distinta forma las toxinas presentes en los cnidarios. Particularmente, hay pocos estudios sobre productos del holobionte en zoantídeos. Uno de ellos es de Castillo *et al.* (2001), en el que analizaron el extracto del holobionte de *P. caribaeorum*, y reportaron compuestos que inhiben el crecimiento bacteriano, concluyendo que dichas moléculas provienen de las colonias bacterianas asociadas al mucus del que extrajeron los compuestos (Castillo *et al.* 2001). Adicionalmente en especies del género *Zoanthus*, se ha

descrito la presencia de alcaloides con actividad analgésica y antiinflamatoria (Lakshmi *et al.*, 2004).

De igual forma, se han evaluado una serie de compuestos con actividad antibiótica presentes en el mucus del coral *Acropora palmata*. Estos estudios concluyen que el mucus asociado al holobionte de las colonias de coral, posee moléculas que inhiben el crecimiento de bacterias a las que se les atribuye la enfermedad de la “viruela blanca”. La capacidad antibacteriana observada en *A. palmata* varía estacionalmente y está estrechamente relacionada a la temperatura del agua (Ritchie, 2006). Alagely *et al.* (2011), reportaron la actividad inhibitoria de extractos acuosos y metanólicos del mucus de coral, en la capacidad de colonización de la bacteria *Serratia marcescens* (una bacteria causante de la viruela blanca en algunas especies de coral). Sin embargo, no determinaron el origen específico dentro del holobionte, de las moléculas de bajo peso molecular reportadas (Alagely *et al.*, 2011)

Investigaciones posteriores se centraron en el mecanismo de acción por el cual algunas fracciones de los extractos obtenidos de corales, consiguen inhibir el desarrollo bacteriano. En ese sentido los experimentos realizados por Krediet *et al.*, (2013), determinaron que la capacidad antibacteriana del holobionte de *A. palmata*, se debe a la presencia de compuestos que bloquean la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa que usa *S. marcescens* para invadir el coral.

Por otra parte, Diaz-Garcia *et al.*, (2012) describieron que la fracción de bajo peso molecular (<6 kDa) del extracto de *Zoanthus sociatus*, afecta la secreción de insulina de las células  $\beta$ -pancreáticas de rata (*in vitro*), y aun con el estímulo de glucosa en ensayos *in vivo*. Sin embargo, no se determinó la naturaleza química de los compuestos presentes en la fracción.

## IV Justificación

Los organismos de la especie *Palythoa caribaeorum*, son animales sésiles, sometidos a una gran cantidad de interacciones dentro de los arrecifes. Dicho entorno ecológico, los ha llevado a desarrollar mecanismos especializados que les permitan sobrevivir en ambientes no siempre favorables y altamente competitivos. Por ello, se han especializado en la producción y almacenamiento de moléculas específicas, que les permitan contender por espacio y alimento, y además han desarrollado su asociación con otros organismos, con los que mantienen distintos niveles de simbiosis, a tal grado, que se llegan a considerar un microsistema denominado *holobionte*.

Actualmente se desconocen los compuestos que produce el holobionte para impedir la colonización de su tejido por los patógenos, por lo que, es importante llevar a cabo estudios que nos permitan dimensionar el efecto de las moléculas usadas por el holobionte para defenderse. Esto permitirá ampliar el conocimiento de la especie y sus simbioses, para visualizar su uso potencial en la Industria Farmacéutica como alternativas terapéuticas a mediano y largo plazo, en enfermedades de alto impacto en la sociedad.

Los estudios recientes sugieren que hay compuestos producidos por el holobionte, que impiden que los patógenos degraden las proteínas glicosiladas del mucus que lo recubre, por lo que esta investigación, se orientará al estudio del efecto sobre la degradación de carbohidratos, que tiene el extracto del holobionte de *P. caribaeorum*, en la búsqueda por aislar y caracterizar alguna fracción que sea de potencial interés para brindar una alternativa en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el metabolismo de azúcares, como la diabetes.

## V Hipótesis

El holobionte de *Palythoa caribaeorum*, produce múltiples compuestos químicos capaces de impedir que los patógenos degraden las glicoproteínas presentes en el mucus de la Capa Mucosa Superficial, por lo que se espera que algunos de los compuestos presentes en el extracto muestren actividad inhibitoria en la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

## VI Objetivos

### *General*

Separar y purificar componentes del extracto del holobionte de *Palythoa caribaeorum* con actividad inhibitoria del catabolismo de azúcares

### *Específicos*

- Fraccionar el extracto del holobionte de *P. caribaeorum*, para determinar la presencia de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa y aislar las fracciones activas.
- Determinar la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, de la fracción activa del extracto del holobionte de *P. caribaeorum*.
- Aislar y caracterizar los compuestos con actividad inhibitoria sobre la  $\alpha$ -glucosidasa.

## VII Metodología

### 7.1. *Obtención del extracto crudo*

*Palythoa caribaeorum*, se recolectó mediante buceo libre en el arrecife de coral La Gallega, en el estado de Veracruz, México. La colonia se separó de la roca con ayuda de cincel y martillo, posteriormente las muestras húmedas, fueron transportadas al laboratorio y sometidas a ultracongelación (-70 °C) hasta su manipulación para obtener el extracto. Para la colecta del extracto del holobionte, los organismos ultracongelados, se dejaron a temperatura ambiente hasta que se descongelaron y recobraron flexibilidad; posteriormente se procedió a extender cuidadosamente los tentáculos de cada pólipo, para sumergir las muestras en contenedores con agua desionizada. Finalmente para obtener el mucus que recubre al holobionte y descargar mecánicamente los nematocistos de los tentáculos, se cepillaron cuidadosamente cada uno de los pólipos de cada colonia, verificando que la mayor cantidad de mucus fuera liberada al medio de agua desionizada en la que los organismos fueron sumergidos (Lazcano-Pérez *et al.*, 2014). El extracto acuoso se congeló a -70 °C y liofilizó en un equipo Freeze Dryer LGJ-12 Liofilizador para cuantificar el peso seco y posteriormente poder calcular el rendimiento.

### 7.2. *Purificación mediante ultrafiltración y por precipitación con sulfato de amonio*

Como primer paso de purificación, se tomó 1 g del extracto crudo y se disolvió en 50 mL de agua desionizada, para posteriormente separar esta disolución en dos fracciones (menor a 1 kDa y mayor a 1 kDa), se utilizó una membrana de 1 kDa de tamaño de poro, en un equipo *Amicon*® de 400 mL, marca Merck modelo 5124. La fracción de interés se limitó a aquella menor a 1 kDa. El proceso de ultrafiltración se llevó a cabo aplicando una presión de 40 kPa con atmósfera de nitrógeno en el dispositivo de ultrafiltración.

Las fracciones menor a un 1 kDa y entre 1 kDa - 3 kDa, se colectaron y se congelaron en tubos cónicos de centrifuga Falcon de 50 mL. Posteriormente se liofilizaron en un equipo Freeze Dryer LGJ-12 Liofilizador. La cantidad de extracto en la fracción de interés se determinó por gravimetría, usando una balanza analítica OHAUS Explorer E11140.

Simultáneamente se disolvieron 2 g de extracto crudo en 50 mL de agua desionizada a 10 °C y se realizó una precipitación con sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en concentraciones al 30 %, 60 % y 90 %. La precipitación se realizó con una ultracentrifuga Beckman Coulter XL-80 a 30000 rpm y 4 °C durante 30 minutos. El precipitado en cada paso se recuperó por separado, se congeló y se liofilizó en el equipo Freeze Dryer LGJ-12 Liofilizador.

El sobrenadante del último proceso de precipitación con solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 90 % se separó, congeló y liofilizó, obteniéndose un sólido (no precipitado en el proceso de ultracentrifugación) consistente en sales de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en su gran mayoría, el cual se extrajo por maceración, usando 50 mL de acetona para obtener los compuestos menos polares presentes en el extracto. Después de tres días de macerado con acetona, se retiró el sobrenadante por decantación, se llevó a sequedad por destilación al vacío y se cuantificó la muestra por gravimetría. Finalmente se realizó la prueba cuantitativa de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa con este extracto.

### 7.3. *Ensayo de inhibición de la $\alpha$ -glucosidasa de levadura*

Se determinó la presencia de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa provenientes de la fracción menor a 1 kDa del extracto de *P. caribaeorum*, utilizando la enzima  $\alpha$ -glucosidasa proveniente de levadura y de intestino de rata.

Para la prueba de inhibición, se preparó una solución con 1 mg de cada fracción obtenida del ensayo de precipitación con distintas concentraciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (30 %, 60 % y 90 %) y se disolvió en 60  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfatos (PBS, Anexo I). El ensayo de actividad se realizó en una placa de 96 pozos (fondo plano), donde,

para cada pozo de prueba, se usó un volumen de 60  $\mu\text{L}$  de PBS, 10  $\mu\text{L}$  de la solución de cada una de las fracciones disueltas y 20  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (0.9 unidades/mL, previamente disuelta en una solución 100  $\mu\text{M}$  de PBS). La placa de ensayo se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos. Posteriormente se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de sustrato pNPG (*p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido) 5 mM y se incubó por 35 minutos a 37 °C en un lector de microplacas ELISA ACCU READER. Finalmente se midió la absorbancia en los pozos de ensayo a 415 nm en el mismo equipo. Las pruebas se hicieron por triplicado y se utilizó una solución de acarbossa como control positivo (Escandón-Rivera *et al.*, 2012).

#### 7.4. *IC<sub>50</sub> en $\alpha$ -glucosidasa*

En una microplaca ELISA se colocaron 0, 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu\text{L}$  de solución de la muestra que tuvo actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -glucosidasa, a una concentración de 17  $\mu\text{g/mL}$  y acarbossa como control positivo. Se completó el volumen de los pozos a 70  $\mu\text{L}$  con amortiguador PBS y se dejó reposar durante cinco minutos. Posteriormente se agregaron a todos los pozos, 20  $\mu\text{L}$  de solución de reserva enzimática (0,9 unidades/mL de  $\alpha$ -glucosidasa de levadura en solución 100  $\mu\text{M}$  de amortiguador PBS) y se dejó reposar por diez minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de sustrato [pNPG, 5 mM] y se incubó durante 35 minutos a 37 °C; pasado este tiempo, se determinaron las absorbancias a 415 nm en un lector de microplacas ELISA ACCU READER. La concentración requerida para inhibir la actividad enzimática en un 50 % ( $IC_{50}$ ) se calculó mediante análisis de regresión lineal. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### 7.5. *Purificación del compuesto activo por cromatografía*

Después de haber confirmado la presencia de inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa, las fracciones con actividad se sometieron a un proceso de separación dirigida de la molécula de interés, para lo cual, se utilizaron dispositivos *Spin column*® con gel de

exclusión molecular y un amortiguador de fosfatos como fase móvil. En este experimento, la separación selectiva de las moléculas activas, se basa en la formación del complejo enzima- inhibidor ( $\alpha$ -glucosidasa - inhibidor), el cual se forma en el dispositivo, y posteriormente es separado por exclusión molecular de las moléculas no afines a la enzima como se describe a continuación. Se preparó una solución de 3 mg de la muestra activa en 195  $\mu$ L de agua [15.4  $\mu$ g/ $\mu$ L]. En la *spin column*<sup>®</sup> se vertieron 15  $\mu$ L de la solución, 30  $\mu$ L de  $\alpha$ -glucosidasa [0.7 unidades/mL] y 55  $\mu$ L del amortiguador PBS y se centrifugó por 5 minutos a 11000 rpm en un equipo Thermo Heraeus Primo R para eluir el complejo. Posteriormente el complejo enzima-inhibidor se disoció utilizando una solución de acetonitrilo [ $\geq$ 99 %]. Una vez separada la fracción activa, se concentró en un equipo SpeedVac Concentrator<sup>®</sup> Savant ISS110-115.

#### 7.6. *Purificación del inhibidor por HPLC fase reversa*

La fracción activa se separó y purificó por cromatografía en fase reversa en un equipo de HPLC SHIMADZU<sup>®</sup> liquid chromatograph SIL-10A, usando una columna C18 BECKMAN<sup>®</sup> 5  $\mu$  4.6x250 mm, para separar los analitos del extracto acuerdo a su polaridad. Como fase móvil se usó ácido trifluoroacético (TFA) 0.1 % en agua desionizada como disolvente A, metanol con 0.1 % de TFA grado HPLC como disolvente B y acetonitrilo con 0.1 % de TFA como disolvente C y se monitoreó la absorbancia a 254 nm y 275 nm durante 15 minutos a un flujo de 1 mL/ min.

El método que se usó para la elución es el siguiente:

| Tiempo (min) | % Disolvente A | % Disolvente B | % Disolvente C |
|--------------|----------------|----------------|----------------|
| 0            | 98             | 0              | 2              |
| 3            | 75             | 5              | 20             |
| 10           | 0              | 5              | 95             |
| 11           | 5              | 0              | 95             |
| 15           | 98             | 0              | 2              |

### 7.7 Análisis por cromatografía de capa fina

El analito aislado por *spin column*®, se analizó por cromatografía en capa fina de sílica 60 ALUGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>, utilizando como fase móvil una mezcla 80 % acetato de etilo, 10 % metanol, 5 % ácido acético, 5 % agua y como revelador una mezcla de vainillina-ácido sulfúrico (1:100). La longitud de las placas fue de 10 cm. En simultáneo, se comparó ésta muestra con la fracción menor a 1 kDa antes del procedimiento de purificación con *spin column*®. Con esta prueba, se evidenció la diferencia en la complejidad de las muestras provenientes de los distintos pasos de purificación y algunas características químicas de las moléculas presentes en cada muestra, dada su reacción con el revelador de vainillina-ácido sulfúrico.

### 7.8 Espectrometría de masas

Las fracciones de interés se analizaron mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS) en un equipo Agilent MS Q-TOF dual AJS ESI G36530B en modo positivo y negativo, usando una columna C18 BECKMAN® 5µ 4.6x250 mm. Se usó nitrógeno como gas de nebulización y de secado. Los espectros de masas se adquirieron en el intervalo de 50-2000 m/z.

### 7.9 Ensayo de Shinoda

En un tubo de ensayo se adicionó una alícuota de 0.5 mL de muestra activa a una concentración de 5 mg/ mL en metanol, se agregó 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y una cinta de magnesio metálico y se dejó reaccionar por 5 minutos. El ensayo se considera positivo para flavonoides si después de la reacción, la solución se colorea de amarillo, naranja, marrón o rojo, todos en tonos intensos (Bermejo De Zaa *et al.*, 2014) . Como control positivo, se usó un extracto metanólico de té verde reconocido por su alto contenido de flavonoides. Este experimento se utilizó para elucidar si naturaleza química de los compuestos activos en la fracción de interés, correspondía con flavonoides.

## VIII Resultados

### 8.1 *Extracto total del veneno de P. caribaeorum*

De una colonia de organismos de *P. caribaeorum*, con aproximadamente 20 cm de diámetro y peso húmedo total de 637.15 g, se extrajo el veneno y mucílago de los pólipos, de acuerdo con el método descrito en el apartado 7.1; obteniendo 4.11 g en peso seco de extracto total.

### 8.2 *Fraccionamiento del extracto de P. caribaeorum*

Mediante el proceso de ultrafiltración: por cada gramo en seco del extracto de mucílago, se obtuvieron 426.6 mg de la fracción con peso molecular menor a 1 kDa, lo que representa el 42.6 % del extracto total.

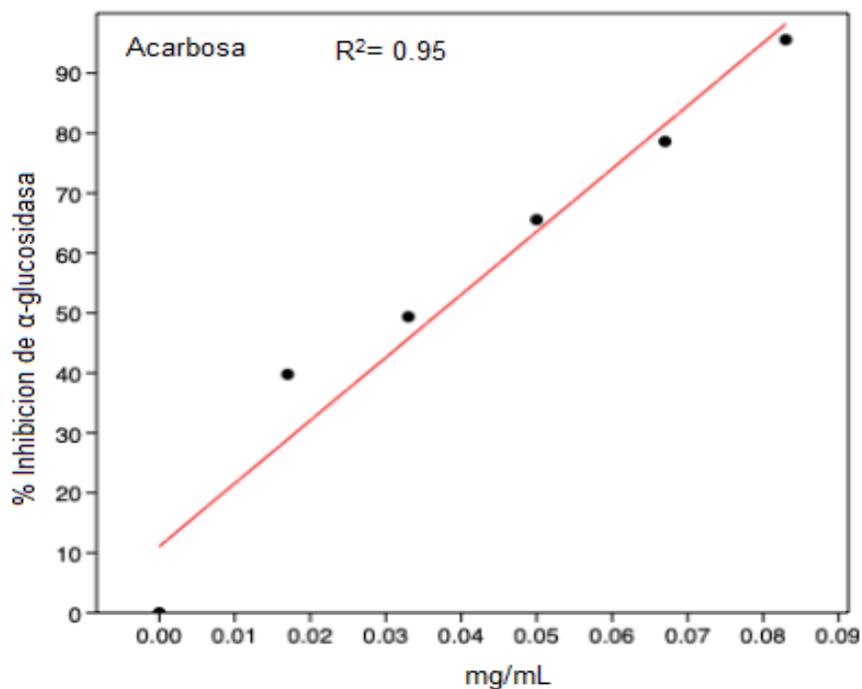
De las fracciones precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , no fue posible realizar el cálculo del rendimiento para cada una, ya que, estas fracciones contienen una cantidad de sales desconocida, derivada del método de precipitación. Sin embargo, el liofilizado de la fracción que no precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , es decir, el sólido consistente en sales de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en su gran mayoría (descrito en el apartado 7.2), fue macerado en acetona y se obtuvieron 14.1 mg de muestra en peso seco; lo que representa el 0.7 % del total de muestra fraccionada por precipitación con sulfato de amonio.

### 8.3 *Inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura*

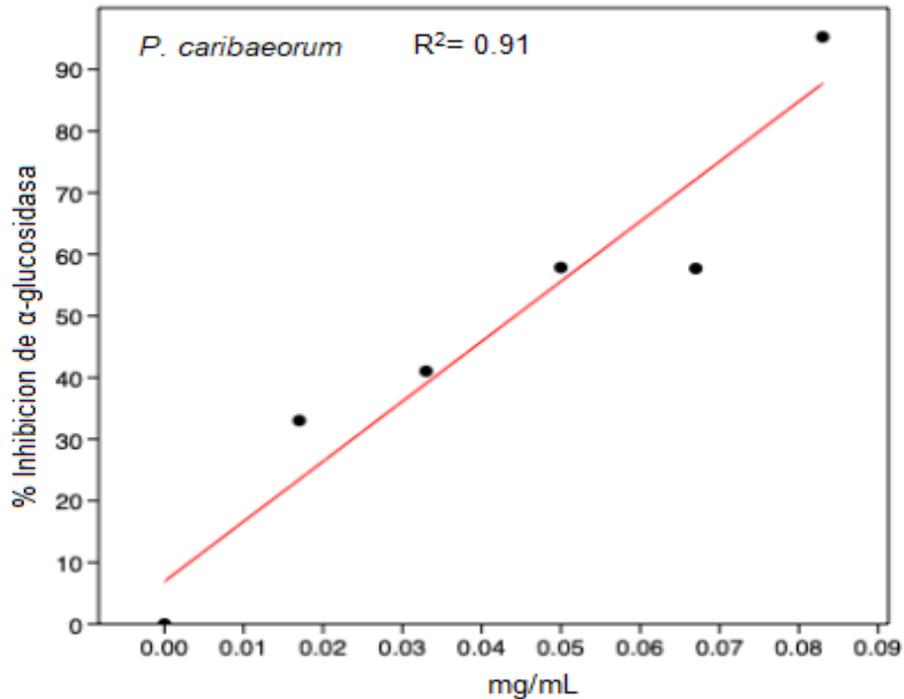
El ensayo colorimétrico realizado para determinar la actividad inhibitoria sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, de las distintas fracciones obtenidas del proceso de precipitación con sales, mostró que la fracción precipitada con 90 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , fue la única que presentó actividad inhibitoria de la enzima. Aunado a ello, el ensayo colorimétrico permitió observar que la actividad inhibitoria de la fracción estudiada, es reversible; por lo cual, se estima que dentro de esta fracción podrían encontrarse

una o varias moléculas, con potencial para usarse en el tratamiento de regulación sobre la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

Con el objetivo de tener un parámetro de comparación de la actividad inhibitoria del extracto de *P. caribaeorum*, se utilizó como control positivo la acarbosa en todos los ensayos realizados (Figuras 12 y 13).

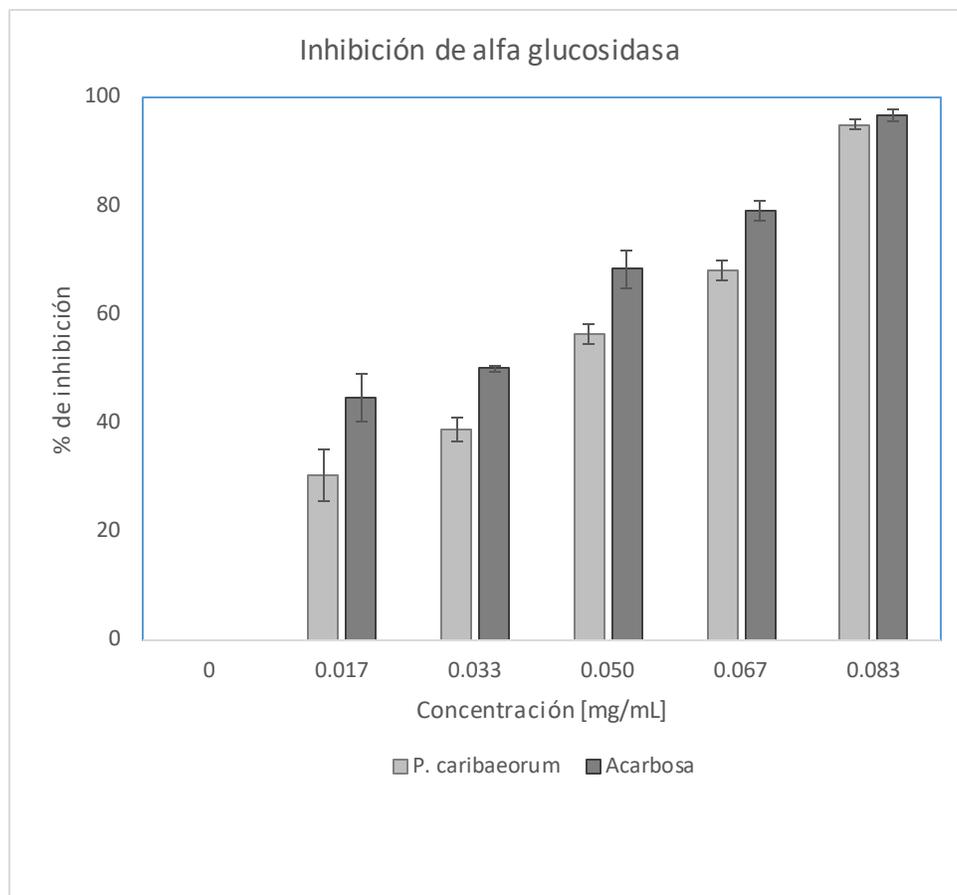


**Figura 12.** Curva de inhibición de la acarbosa a diferentes concentraciones para inhibir la  $\alpha$ -glucosidasa de levadura,  $IC_{50}$ :  $36.53 \pm 4.8 \mu\text{g/mL}$



**Figura 13.** Curva de inhibición del extracto de *P. caribaeorum* a diferentes concentraciones para inhibir la α-glucosidasa de levadura,  $IC_{50}$ :  $53.76 \pm 5.3 \mu\text{g/mL}$ .

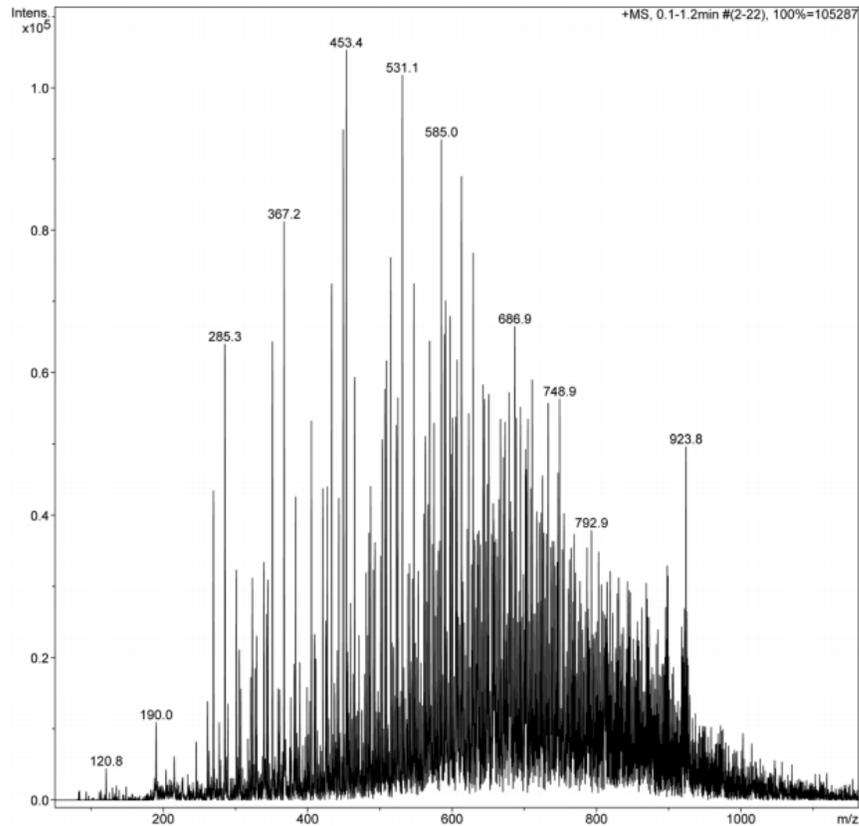
Al realizar la comparación del efecto inhibitorio de ambos ensayos (Figura 14), se puede observar que el extracto de *P. caribaeorum* tiene un comportamiento similar al de la acarbosa con las concentraciones evaluadas en el experimento. Sin embargo, es importante considerar que, el extracto es una mezcla compleja de compuestos, lo cual sugiere que, la o las moléculas responsables de la inhibición enzimática, tienen una efectividad equiparable o incluso superior a la de la acarbosa que se encuentra pura.



**Figura 14.** La actividad inhibitoria sobre la  $\alpha$ -glucosidasa de la fracción del extracto de *P. caribaeorum* (barras claras) que precipitó con el 90 % de sulfato de amonio, a diferentes concentraciones es similar al de la acarbosa (barras oscuras). La concentración 0.083 mg/mL probada en este experimento para ambas muestras nos indican que los compuestos de *P. caribaeorum* son equiparables en la actividad inhibitoria.

#### 8.4 Espectrometría de masas y cromatografía HPLC-fase reversa.

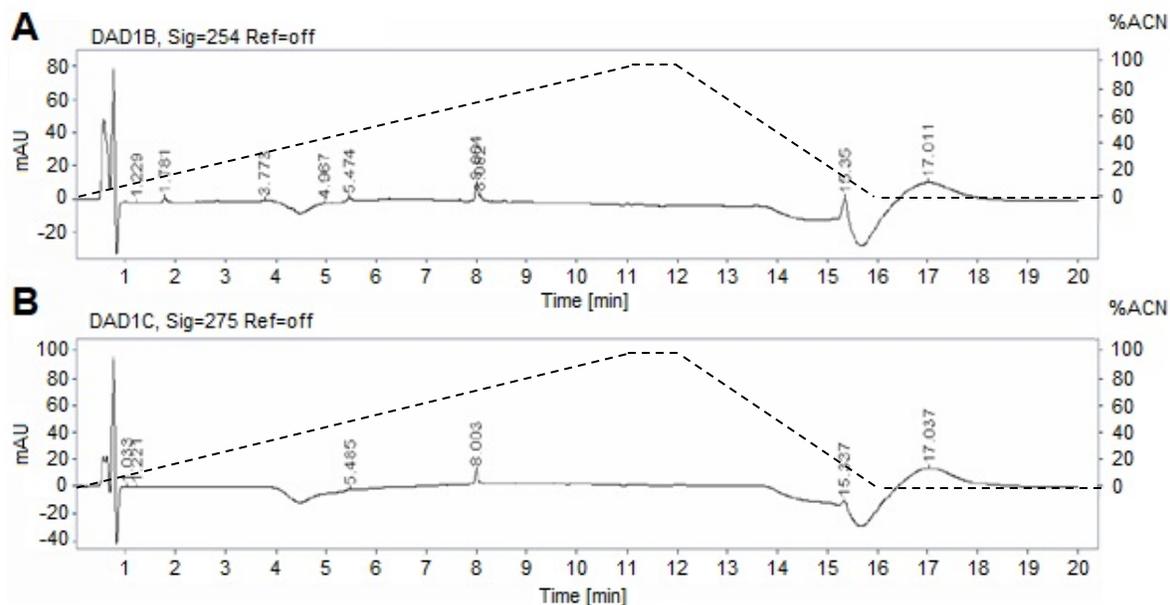
La fracción activa del extracto de *P. caribaeorum*, obtenida de la precipitación con 90 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , fue analizada por espectrometría de masas con la técnica de ionización por electro spray (ESI-MS) (Figura 15).



**Figura 15.** Espectro de masas (ESI) de la fracción recuperada por precipitación con sulfato de amonio al 90 %. Se observan indicadas las masas moleculares mayoritarias, menores a 1 kDa.

La muestra derivada de la precipitación con 90 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (muestra activa), se separó mediante HPLC-fase reversa, con la finalidad de obtener la cantidad suficiente de muestras menos complejas, para realizar su análisis por espectrometría de masas.

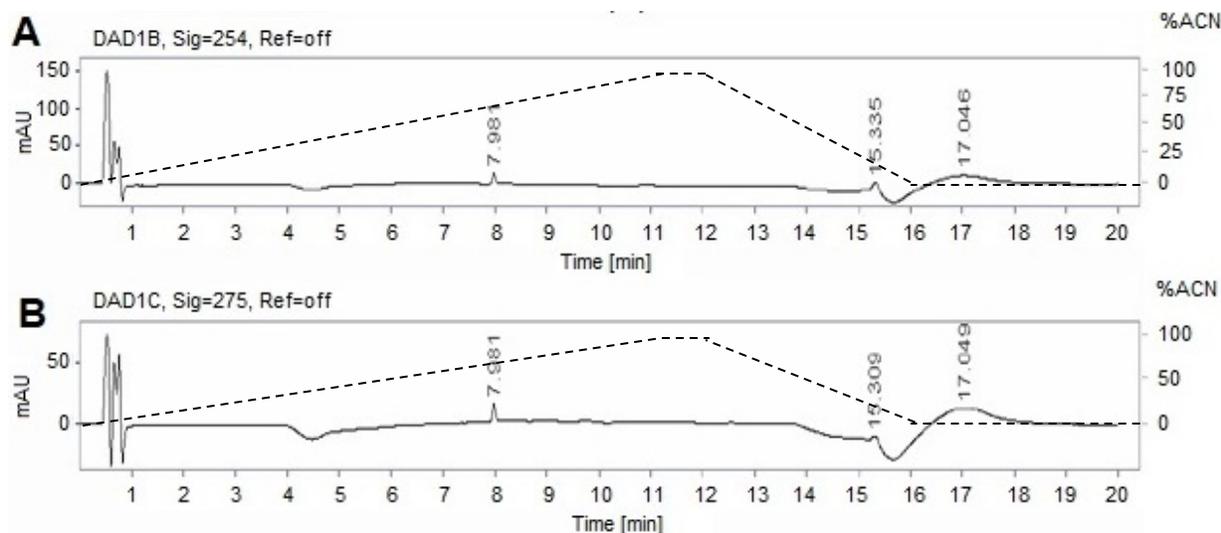
Los primeros ensayos de HPLC- fase reversa se obtuvieron inyectando 10  $\mu\text{L}$  de la muestra activa [10 mg/mL] en una columna C18, siguiendo el método de elución descrito anteriormente (Metodología 7.6). El proceso fue monitoreado siguiendo la absorbancia a 254 y 275 nm (Figura 16).



**Figura 16.** Cromatogramas del precipitado con 90 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  del extracto de *P. caribaeorum* con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa. A) Fracciones monitoreadas a 254 nm. B) Fracciones monitoreadas a 275 nm.

En el cromatograma se pueden observar al menos 8 picos al realizar la detección a 254 nm y 4 picos al realizarla a 275 nm. Para descartar las señales que no representan fracciones con actividad inhibitoria sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, se formó un complejo de la enzima y la muestra activa, posteriormente el complejo fue sometido a un proceso de cromatografía de exclusión molecular en dispositivos *spin column*®.

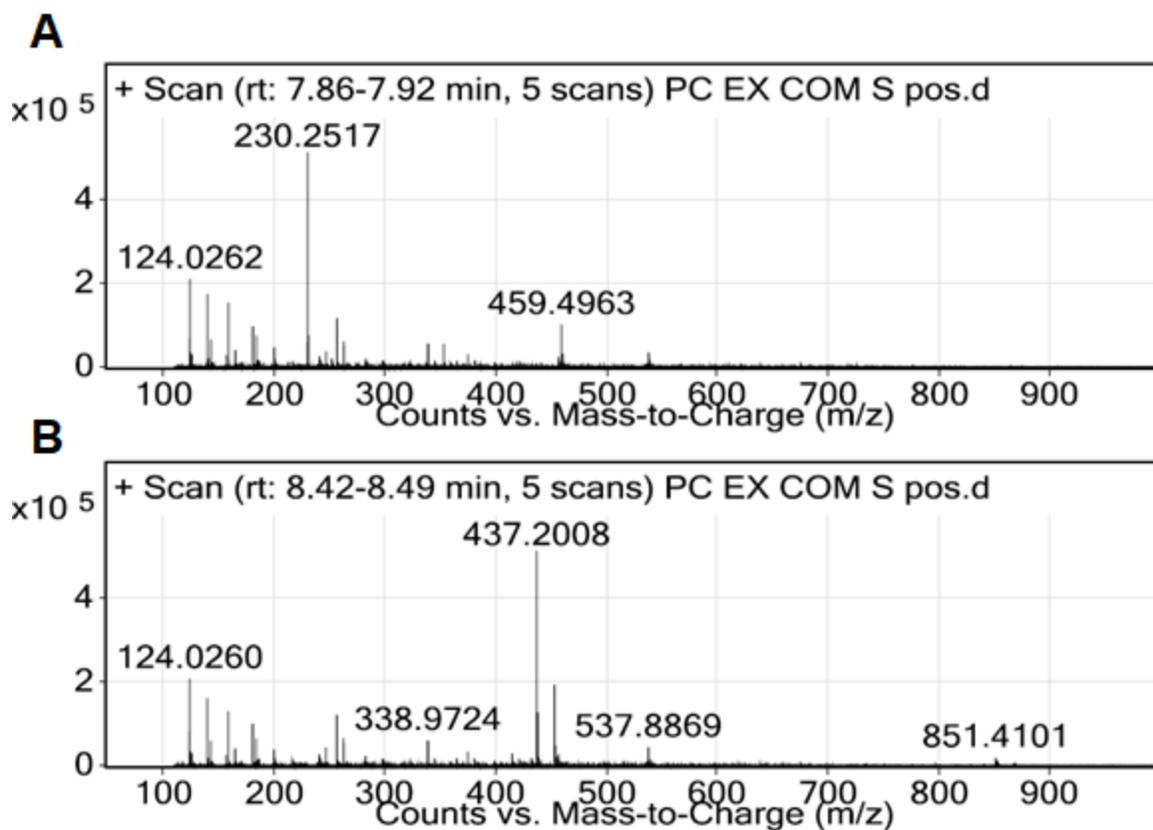
El procedimiento comprendió la formación del complejo enzima-inhibidor usando la  $\alpha$ -glucosidasa y la fracción activa del extracto de *P. caribaeorum* obtenida de la precipitación con 90 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; el complejo, se eluyó a través del gel de exclusión molecular contenido en los dispositivos *spin column*® y fue recuperado. Posteriormente el complejo enzima-inhibidor fue disgregado. Con la disolución resultante de enzima e inhibidor separados, se llevaron a cabo varios experimentos de HPLC-fase reversa utilizando el mismo método de elución y la columna C18 del procedimiento anterior. Los cromatogramas siguientes muestran el monitoreo del proceso, siguiendo la absorbancia a 254 nm y 275 nm (Figura 17).



**Figura 17.** Cromatogramas de la separación en fase reversa de la muestra obtenida del *spin column*®. La separación con *spin column*® fue efectiva ya que se redujeron de ocho a tres, las señales que pudieran representar inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. A) Picos detectados a 254 nm y B) Picos detectados a 275 nm.

### 8.5 Cromatografía acoplada a espectrometría de masas.

Las fracciones seleccionadas de los experimentos de HPLC-fase reversa, representadas por las señales concordantes entre los cromatogramas de la muestra activa y los cromatogramas de la muestra eluida por *spin column*®, se analizaron por espectrometría de masas utilizando la técnica de ionización por electrospray (Figura 18). El análisis se realizó en modo positivo y negativo, con el fin de detectar la mayor cantidad de analitos ionizados. Sin embargo, los resultados del modo negativo no fueron significativos por la intensidad de los iones detectados (anexo II)

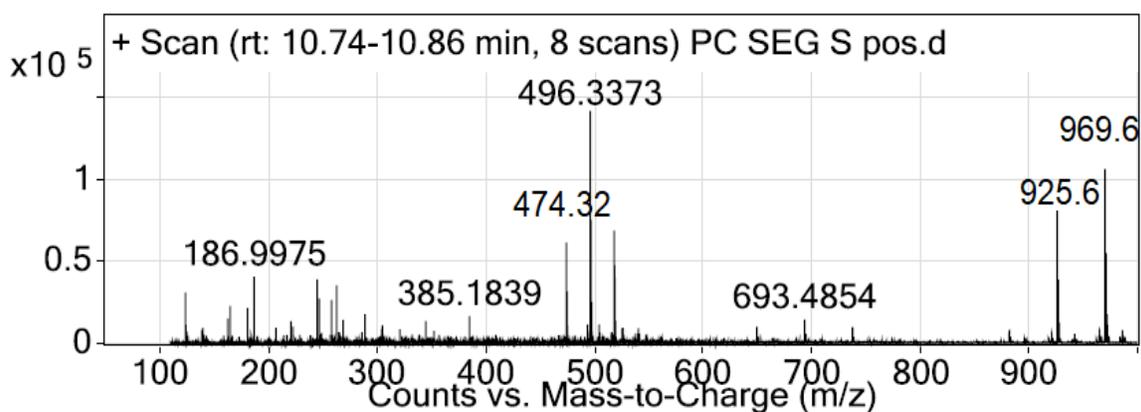


**Figura 18.** Espectros de masas (ESI) en modo positivo de la fracción activa después de eluirla en el *spin column*®. A) Fracción detectada en HPLC en el minuto 7.86-7.92 de elución. B) Fracción detectada en HPLC en el minuto 8.42-8.49 de elución de la Figura 17.

Los resultados obtenidos por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a masas (ESI-MS), permiten analizar los iones que componen las señales observadas en los cromatogramas. El pico del minuto 7.9 de elución en los cromatogramas de la figura 17, le corresponde el espectro de masas A de la figura 18.

Por otra parte, el espectro de masas B de la figura 18, permite analizar que, aunque en los cromatogramas no hay señal alguna entre el minuto 8.42 y 8.49 del tiempo de elución (figura 17), es posible detectar la masa de varios iones en la muestra. Lo anterior seguramente se debe a las limitantes gráficas del análisis cromatográfico, por lo que es probable que señales con intensidad mínima pasen desapercibidas. De igual forma ocurre con el espectro de masas de la figura 19, el cual, muestra los

iones provenientes del minuto 10.74-10.86 y en el cromatograma aparentemente no se detecta ningún pico (figura 17).



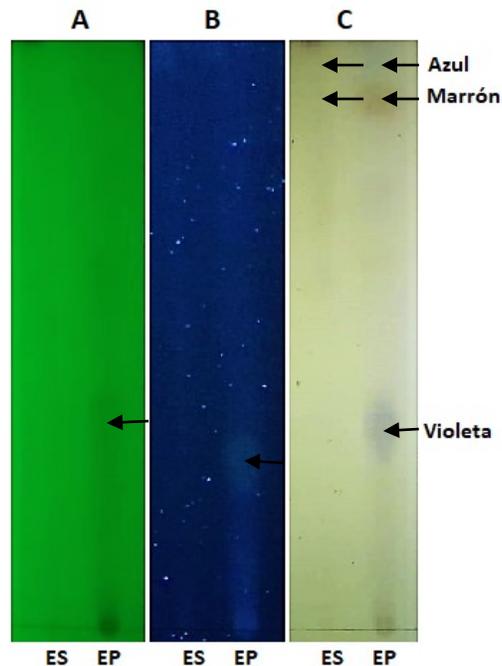
**Figura 19.** Espectro de masas en modo positivo de la fracción activa obtenida por *spin column*® (componentes no visibles en el cromatograma).

### 8.6. Cromatografía acoplada a espectrómetro UV-visible

En la búsqueda por elucidar características estructurales de las moléculas presentes en cada uno de los de los picos que se observan en los cromatogramas (Figuras 16 y 17), se llevaron a cabo barridos de cada pico con un espectrómetro UV-visible. Los perfiles de absorbancia entre 200 nm y 450 nm, podrían orientar la caracterización estructural de los analitos, sin embargo, los resultados obtenidos no presentaron la suficiente información para ser analizados (Anexo III).

### 8.7 Cromatografía en capa fina

Con el fin de esclarecer la naturaleza química de los componentes de la fracción activa evaluada como inhibidora de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, esta se analizó por cromatografía en capa fina de sílica, empleando vainillina como revelador. Este es un revelador genérico para fenoles y esteroides (Figura 20).

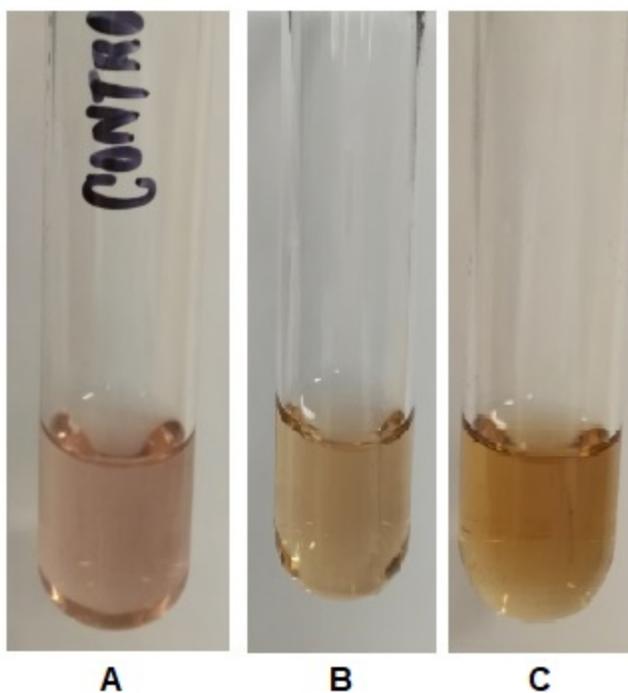


**Figura 20.** Cromatografía en capa fina de la muestra activa: **(EP)** Extracto obtenido por precipitación con el 90 % de saturación de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . **(ES)** Extracto obtenido del *Spin column*®. **(A)** Revelado a 254 nm, **(B)** Revelado a 365 nm y **(C)** Revelado con vainillina.

La cromatografía en capa fina evidenció la diferencia entre la fracción activa precipitada con 90 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (EP) y esta después de su tratamiento con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y la separación en columnas de exclusión molecular *spin column*® (ES). En la cromatografía en capa fina de la primera fracción separada por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , se observaron varias marcas (señaladas por flechas) que, en el proceso de revelado con vainillina, pudieron identificarse con los colores violeta, azul y marrón (figura 20-C, EP). Mientras que, en la muestra obtenida tras la elución en los dispositivos de exclusión molecular *spin column*®, se observaron únicamente las marcas superiores azul y marrón (figura 20-C, ES); lo que indica que la marca violeta y las de menor corrimiento a ésta, son compuestos sin capacidad de unirse a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, por lo que quedan excluidos como potenciales inhibidores de dicha enzima.

### 8.8 Ensayo de Shinoda

El ensayo de Shinoda es una prueba colorimétrica cualitativa que lleva a cabo con magnesio metálico en medio fuertemente ácido y que aporta información sobre la presencia de flavonoides (flavona, flavonoles, flavononas, etc.). La prueba con la fracción activa (obtenida por precipitación con 90 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), fue positiva al tornarse a un color marrón que indicó la presencia de flavonoides (Figura 21).



**Figura 21.** Prueba colorimétrica de Shinoda para flavonoides de la muestra activa. A) Control positivo (extracto de té verde). B) Muestra activa de *P. caribaeorum* sin reactivos y C) muestra activa después de reaccionar con magnesio metálico. Se aprecia una diferencia en la intensidad de coloración marrón de la muestra antes y después de reaccionar por lo que se interpretó como resultado positivo.

### 8.9 Ensayos de inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa con extracto macerado en acetona

A partir del extracto total de *P. caribaeorum* se llevó a cabo la precipitación de componentes con distintas concentraciones de sulfato de amonio; sin embargo, hubo compuestos que no se separaron en este proceso. Los compuestos que no se pudieron separar en la precipitación, fueron liofilizados hasta obtener un sólido compuesto por sales de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en su mayoría y moléculas que no precipitaron, se recuperó este sólido y se obtuvo las moléculas presentes mediante maceración con acetona.

La muestra resultante de la extracción con acetona fue llevada a sequedad obteniéndose 14.1 mg. Posteriormente fueron preparadas disoluciones metanólicas con concentraciones de 17, 33, 50, 67 y 83  $\mu\text{g/mL}$ , para realizar con ellas la evaluación de su actividad inhibitoria sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. Los resultados de este experimento no permitieron el trazo de una curva de comportamiento, dado que todas las concentraciones evaluadas consiguieron el 100 % de inhibición.

Ante estos resultados se decidió evaluar nuevas y menores concentraciones del extracto en acetona: 7.2, 14.5, 21.8, 29 y 36.3  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados nuevamente mostraron para todas las concentraciones, inhibición del 100 % de la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, por lo que no fue posible calcular la cantidad inhibitoria media ( $\text{IC}_{50}$ ) de este extracto; sin embargo, se observó que el efecto inhibitorio sobre la enzima es reversible, ya que, tras una noche de incubación en las condiciones para evaluar la actividad inhibitoria, la enzima recupero su actividad y degradó el sustrato disponible. Este resultado revela una característica deseada en los potenciales nuevos tratamientos para diabetes mellitus, sin embargo, dada la respuesta inhibitoria inicial del 100 % para todas las concentraciones, fue imposible evaluar cuantitativamente el tiempo de efectividad y por lo tanto determinar la temporalidad del efecto inhibitorio. Anexo IV.

## IX Discusión

La capa mucosa superficial (CMS) de los cnidarios es un nicho en constante amenaza de invasión por múltiples patógenos; sin embargo, todos los organismos que conforman el holobionte, han evolucionado para defender su entorno evitando su colonización por agentes extraños. Una de las estrategias desarrolladas consiste en producir metabolitos secundarios que evitan el aprovechamiento del mucus como fuente de carbono, consiguiendo así limitar o eliminar el crecimiento bacteriano. (Shnit-Orland y Kushmaro, 2009).

*Palythoa caribaeorum* es una de las especies más abundantes en los arrecifes del Atlántico Occidental. Compite constantemente con múltiples depredadores, patógenos y con otras especies en el arrecife. La CMS de esta especie produce sustancias con actividad antibacteriana, cuya actividad específica se desconoce hasta el momento (Castillo *et al.*, 2001). Es por ello que en este trabajo se analizó la actividad inhibitoria que presenta la CMS que recubre al holobionte de *P. caribaeorum*, sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, ya que, probablemente esta sea una vía de defensa por la que el holobionte interfiere con el aprovechamiento de fuentes de carbono de los patógenos, y por lo tanto evita su asentamiento.

El procedimiento realizado para obtener el extracto total del holobionte de *P. caribaeorum*, se describió previamente por: Lazcano-Pérez *et al.*, 2018; Moreels *et al.*, 2017; Sánchez-Rodríguez y Cruz-Vazquez, 2006). En esta investigación, constatamos que el seguimiento de cualquiera de las metodologías de extracción reportadas, es útil para obtener fracciones con actividad biológica, y no se restringen a la obtención de toxinas de origen proteico, sino que también son útiles para extraer péptidos y moléculas más pequeñas presentes en el veneno de los cnidarios.

Un ejemplo de lo anterior es la metodología de precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , normalmente utilizada para purificar proteínas, sin saturar más allá del 60 % la disolución de la muestra y procurando no rebasar las 20000 rpm (Albarracín *et al.*, 2012). Sin embargo, al modificar las condiciones experimentales, llevando la

saturación al 90 % y centrifugando a 30000 rpm, se permitió obtener un intervalo más amplio de moléculas pequeñas (<10 kDa). Por otra parte, el método definido en el segundo reporte (extracción con acetona), resultó ser finalmente, el más efectivo para la obtención de metabolitos secundarios que pudieran tener actividad inhibitoria sobre diversas enzimas; en este caso siendo de particular interés el aislamiento de potenciales inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. (Alagely *et al.*, 2011; Bruhn *et al.*, 2001).

De las fracciones obtenidas por el método de precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , la fracción precipitada con 90 %, fue la única que presentó actividad inhibitoria enzimática sobre la degradación de enlaces glucosídicos de los azúcares, específicamente sobre la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. Lo anterior es evidencia de la presencia de metabolitos secundarios (típicamente menores a 2 kDa) en la CMS del holobionte, tal como lo describió Elyakov *et al.*, (1991), quien afirmó que éstos compuestos impiden que los patógenos usen los azúcares como D-arabinosa, D-manosa y D-galactosa (componentes principales del mucílago), como fuente de carbono (Krediet *et al.*, 2013)

En este sentido, al realizar los ensayos de inhibición sobre la  $\alpha$ -glucosidasa, de las fracciones obtenidas por ultrafiltración y las fracciones obtenidas por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , se observó en ambos casos que, sólo las muestras enriquecidas con moléculas de masas menores a 10 kDa, fueron las que presentaron actividad inhibitoria.

La metodología para determinar la actividad inhibitoria sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de los extractos, solo había sido utilizada para extractos acuosos y alcohólicos de plantas (Escandón-Rivera *et al.*, 2012) por lo que, en esta investigación se utilizó de forma novedosa, adaptándola para estudiar el extracto de *P. caribaeorum*.

En el experimento para evaluar la capacidad inhibitoria enzimática sobre la  $\alpha$ -glucosidasa, de la fracción precipitada con el 90 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figuras 12 y 13), se determinó que la concentración inhibitoria media ( $\text{IC}_{50}$ ) se alcanza a los  $53.76 \pm$

5.3 µg/mL. Este valor es mayor en 36 % al de la acarbosa ( $IC_{50}:36.53 \pm 4.8$  µg/mL) reportado también en este experimento como control positivo.

Al analizar con mayor detenimiento la gráfica de la figura 14, se observó que tanto el control positivo (acarbosa) como la muestra de *P. caribaeorum*, presentan actividad inhibitoria directamente proporcional a su concentración, es decir, a mayor concentración mayor inhibición sobre la  $\alpha$ -glucosidasa; inclusive llegan a tener respuestas con valores similares a concentraciones iguales; por ejemplo, con concentraciones superiores a (83 µg/mL) de acarbosa y *P. caribaeorum* se observa una similitud en el porcentaje de inhibición de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa, 96 % y 94 % respectivamente.

Adicionalmente, es importante resaltar que la actividad de la fracción evaluada de *P. caribaeorum*, no se debe a un solo componente, como es el caso del control positivo (acarbosa pura); en este caso la actividad inhibitoria sobre la  $\alpha$ -glucosidasa se debe a uno o varios compuestos presentes en una mezcla, o de sinergismo en componentes de esta fracción.

En este sentido, cabe mencionar que el descubrimiento de la presencia de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas en cnidarios es muy reciente. El único trabajo al respecto fue publicado por Tysoe y Withers (2018), en el que reportaron un péptido de 44 residuos de aminoácidos aislado de la anémona *Stichodactyla helianthus*, el cual inhibe la actividad de  $\alpha$ -amilasa humana (Tysoe y Withers 2018). No obstante, a diferencia de esa investigación, este trabajo se centra en moléculas no peptídicas, con masas moleculares menores a la del péptido señalado por Tysoe y Withers (2018). Esto permite afirmar que *P. caribaeorum* es una fuente de moléculas novedosas con actividad hipoglucemiante.

Dentro de las moléculas con pesos inferiores a 2 kDa para las que se ha reportado actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas, los flavonoides son una de las familias de compuestos más estudiadas; sin embargo, la mayoría de los reportes son en plantas, verduras, granos, corteza, raíces, flores, tallos, té y vino (Panche *et al.*, 2016; Proença *et al.*, 2017; Rincon Silva *et al.*, 2019)

La existencia de flavonoides de origen marino no está bien estudiada; sin embargo, se han reportado flavonoides en algas rojas (Zeng *et al.*, 2001), pastos marinos, algas verdes, hongos, moluscos y corales (Martins *et al.*, 2018), cuya función principal es la protección contra la radiación UV y también contra la invasión de patógenos.

En el espectro de masas (ESI-MS) de la Figura 15, se observó un importante número de iones en la región comprendida entre 400 y 800 m/z. Con base en los reportes de compuestos con actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -glucosidasas, las señales observadas en el espectro de espectro de masas, pudieran corresponder a flavonoides, sin embargo, para aseverarlo fue necesario conjuntar más pruebas con otros experimentos.

En la búsqueda por aislar el o los componentes responsables de la actividad inhibitoria sobre la  $\alpha$ -glucosidasa, de las fracciones identificadas con dicho efecto, fueron utilizados dos métodos cromatográficos: HPLC- fase reversa y cromatografía de exclusión molecular en *spin column*®.

La figura 16, muestra los cromatogramas de HPLC- fase reversa, de la fracción activa precipitada con 90 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . En ellos, podemos identificar al menos siete compuestos detectados a 254 nm y cuatro a 275 nm, con diferentes tiempos de retención. En cambio, los cromatogramas de HPLC-fase reversa de la muestra obtenida después de la separación por exclusión molecular en *spin column*® (Figura 17), únicamente muestran tres componentes detectados.

Aunado a lo anterior, los experimentos de cromatografía con HPLC- fase reversa de ambas muestras (precipitada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y después de la exclusión molecular en *spin column*®), facilitaron la identificación de los compuestos afines a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, ya que, el procedimiento de cromatografía de exclusión molecular previo a HPLC-fase reversa, requiere la formación del complejo enzima-inhibidor para ser eluido; de manera que, el cromatograma de la muestra eluida por *spin column*®, muestra únicamente aquellos analitos que se unieron a la enzima  $\alpha$ -

glucosidasa, restringiendo la búsqueda a los compuestos que presentan la actividad inhibitoria.

De acuerdo con lo anterior, en los cromatogramas de la figura 17, correspondientes a la muestra después de la separación en *spin column*® se observa dos picos. El primero con tiempo de retención 7.9 min, utilizando como fase móvil acetonitrilo:metanol:agua (63:5:32), el segundo pico con tiempo de retención 15.3 min, en proporción 43:0:57 de la fase móvil. Basados en lo anterior se concluye que estos compuestos tienen características medianamente polares lo que sugiere la presencia de metabolitos con estructuras orgánicas.

Por otra parte, sobre la muestra con el tiempo de retención de 7.9 minutos, pudiera presentar similitudes con algunas compuestos aisladas del coral *Acropora palmata* que presentaron actividad antibacteriana (compuestos no caracterizados), las cuales fueron aisladas mediante extracción metanólica (Alagely *et al.*, 2011).

Respecto a los espectros de masas, obtenidos de la fracción activa eluida en *spin column*® (Figuras 17 y 18), se observó que el pico con tiempo de retención entre 7.86-7.92 minutos, muestra picos de m/z 230.25, 459.5 y varias menores a 200 m/z. Mientras que entre los 8.42-8.49 minutos del tiempo de elución, en los cromatogramas no es posible distinguir alguna señal, sin embargo, en el espectro de masas, es posible notar la presencia de picos m/z 437.2, 851.4, 537.9, 459.5, 338.9 y varios inferiores a 200 m/z, intervalos de masas moleculares entre las que se encuentran los flavonoides, cuya actividad inhibitoria de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas, ha sido reportada previamente en los trabajos de Ghani *et al.* (2019) y Rincon Silva *et al.* (2019).

Por otra parte, las masas moleculares de los componentes con tiempos de retención entre 10.74- 10.86 minutos (Figura 19), como los picos m/z 925.1 y 969.1 se encuentran en el intervalo de compuestos del tipo de las saponinas como la rarasaponina I y la goyasaponina III respectivamente (PubChem., 2021-1 y PubChem., 2021-2). Al respecto, existen trabajos que han descrito la actividad inhibitoria de saponinas sobre  $\alpha$ -glucosidasas de levaduras y mamíferos, principalmente en los géneros *Polyscias*, *Panax*, *Panacis* y *Astragalus* (Dou *et al.*,

2013 y Hanh *et al.*, 2016). Y aunque dichas saponinas fueron aisladas de la planta *Sapindus rarak* (Shi *et al.*, 2002), existen reportes sobre saponinas en cnidarios, por ejemplo en la especie *Eunicea pinta*, un octocoral perteneciente a la familia Gorgoniidae; lo que pudiera sugerir que en la muestra analizada se encuentran saponinas y posiblemente sean responsables de parte de actividad enzimática del extracto de *P. caribaeorum*.

La cromatografía en capa fina es una técnica ampliamente utilizada en el estudio de metabolitos secundarios (Agatonovic-Kustrin y Morton, 2020). Este método ayuda a visualizar la complejidad de una mezcla y puede ayudar en la separación de algunos componentes. Además, de acuerdo con el revelador, puede orientar su clasificación en: alcaloides, saponinas, flavonoides, terpenoides, fenoles y taninos, por lo que su uso se ha generalizado en el estudio nuevos compuestos bioactivos (Biradar, 2013). El uso de vainillina como revelador en este trabajo, mostró la presencia de componentes que revelaron de color violeta y de color marrón, que pudiera deberse a compuestos de tipo de los terpenos (Lorenzo *et al.*, 2006 y Pino *et al.*, 2017) y compuestos fenólicos (Rey y Vargas, 2009). En este aspecto, se conocen aproximadamente 8000 compuestos fenólicos diferentes y de estos, la mitad son flavonoides, muchos de ellos con actividad antibacteriana (Rincon Silva *et al.*, 2019 y Tungmunthum *et al.*, 2018). Lo que sugiere que en la CMS de *P. caribaeorum*, pueden existir flavonoides a los cuales se deba la actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa y antibacteriana del mucus del holobionte.

El ensayo de Shinoda es una prueba colorimétrica cualitativa, que aporta información sobre la presencia de flavonoides como flavonas, flavonoles, flavononas, etc., (Bermejo De Zaa *et al.*, 2014; Saptarini *et al.*, 2016). El cambio a marrón en la coloración del extracto en presencia de ácido clorhídrico y magnesio metálico, indicó un resultado positivo. Actualmente se conocen solo dos reportes de flavonoides en cnidarios, ambas moléculas presentes en el gorgónido *Anthogorgia ochracea*, cuya actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa. El primer compuesto tiene una  $IC_{50}$  de 244  $\mu$ g/mL y el segundo inhibe el 30% de la actividad enzimática con

100 µg/mL (Martins *et al.*, 2018). En contraste con estos resultados, este trabajo registra una actividad superior a los anteriores con una IC<sub>50</sub> de 53.76±5.3 µg/mL.

Finalmente, la muestra obtenida por maceración con acetona descrita en el apartado 7.2, presentó actividad enzimática potenciada en la α-glucosidasa. Las concentraciones de muestra estandarizadas en el experimento de inhibición de la α-glucosidasa, inhibieron completamente la actividad enzimática por un tiempo más prolongado respecto al control positivo (acarbose). Lo anterior impidió determinar la concentración inhibitoria media de la muestra, aun cuando se redujeron las concentraciones de muestra a evaluar, se observó una mayor inhibición que el control positivo. Lo cual indica que ésta fracción se encuentra enriquecida con compuestos inhibidores de α-glucosidasa. Estos resultados son similares a los reportados en extractos metanólicos del coral *Acropora palmata* (Alagely *et al.*, 2011).

La inhibición enzimática de la fracción extraída con acetona, permitió identificar que la inhibición sobre la α-glucosidasa es reversible. Calidad que resulta importante para el diseño de nuevos tratamientos relacionados con problemas en el metabolismo de carbohidratos. La inhibición permanente de las enzimas catabólicas resulta contraproducente, ya que lo que se busca es la regulación en la asimilación de glucosa y no la anulación del sistema de degradación de carbohidratos (Galasko, 2017).

## X Conclusión

En el extracto de la capa mucosa superficial que recubre al holobionte de *Palythoa caribaeorum*, se encontraron fracciones con metabolitos secundarios capaces de inhibir la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de manera reversible. Los experimentos cromatográficos, de espectrometría de masas y colorimétricos sugieren que dichos metabolitos secundarios pueden ser flavonoides y saponinas con actividad equiparable a la acarbosa, por lo que, de ser aislados pudieran resultar relevantes como alternativas terapéuticas para el tratamiento de diabetes mellitus.

### Perspectivas

Aislar y caracterizar las moléculas presentes en las fracciones identificadas con actividad inhibitoria sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, optimizando el método de extracción con acetona, la cromatografía de exclusión molecular del complejo enzima-inhibidor y la metodología de HPLC. Para posteriormente hacer análisis de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y bioinformática para elucidar la estructura de los metabolitos.

## XI Literatura citada

- Acosta, A., Sammarco, P. W., & Duarte, L. F. (2005). New fission processes in the zoanthid *Palythoa caribaeorum*: Description and quantitative aspects. *Bulletin of Marine Science*, 76(1), 1–26.
- Agatonovic-Kustrin, S., & Morton, D. W. (2020). Hyphenated TLC as a tool in the effect-directed discovery of bioactive natural products. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(3), 1–5.
- Aguayo, L. B., & Brito, M. (2013). Metformin: An old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 5(1), 1–15.
- Alagely, A., Krediet, C. J., Ritchie, K. B., & Teplitski, M. (2011). Signaling-mediated cross-talk modulates swarming and biofilm formation in a coral pathogen *Serratia marcescens*. *ISME Journal*, 5, 1609–1620.
- Albarracín C., S. L., Rodríguez L, E. A., Gerardo Pérez, G., & Reyes, E. A. (2012). Interacción de la glutamina sintetasa (GS) y el péptido  $\beta$  -amiloide como una estrategia de purificación. *Revista Colombiana de Química*, 41(2), 179–194.
- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B., & Want, L. (2004). Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*, 17(3), 183–190.
- Bandyopadhyay, Anupam JGao, I. (2016). Targeting Biomolecules with Reversible Covalent Chemistry Anupam. *Curr. Opin. Chem.Biol*, 34, 110–116.
- Bansil, R., & Turner, B. S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11(2–3), 164–170.
- Basto-Abreu, A., Barrientos-Gutiérrez, T., Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C. A., López-Olmedo, N., De la Cruz-Góngora, V., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Romero-Martínez, M., Barquera, S., López-Ridaura, R., Hernández-Ávila, M., & Villalpando, S. (2020). Prevalencia de diabetes y descontrol

- glucemico en Mexico: Resultados de la Ensanut 2016. *Salud Publica de Mexico*, 62(1), 50–59. <https://doi.org/10.21149/10752>
- Becerra-Amezcu, M., González-Mñarquez, H., Gúzman-García, X., & Guerrero-Legarreta, I. (2016). Medusas como fuente de productos naturales y sustancias bioactivas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47(2), 7–21.
- Beckmann, A., & Özbek, S. (2012). The nematocyst: A molecular map of the cnidarian stinging organelle. *International Journal of Developmental Biology*, 56(6–8), 577–582.
- Bermejo De Zaa, A. D. L. Á., Cabrera, S. P., Cintra Jorge, M. L., & Torres, G. M. (2014). Determinación de parámetros químico-físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de *Melia azedarach* L (Pursiana). *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 13(5), 670–680.
- Bhakuni, D. S., & Rawat, D. S. (2005). Bioactive marine natural products. In *Bioactive Marine Natural Products* (Issue October).
- Biradar, S. R. (2013). Extraction of Some Secondary Metabolites & Thin Layer Chromatography from Different Parts of *Centella Asiatica* L. (URB). *American Journal of Life Sciences*, 1(6), 243.
- Bishara, A., Rudi, A., Goldberg, I., Benayahu, Y., & Kashman, Y. (2006). Novaxenicins A-D and xeniolides I-K, seven new diterpenes from the soft coral *Xenia novaebritanniae*. *Tetrahedron*, 62(51), 12092–12097.
- Brown, B. E., & Bythell, J. C. (2005). Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Marine Ecology Progress Series*, 296, 291–309.
- Bruhn, T., Schaller, C., Schulze, C., Sanchez-Rodriguez, J., Dannmeier, C., & Ravens, U. (2001). *Isolation and characterisation of five neurotoxic and cardiotoxic.pdf*. 39, 693–702.
- Brusca, R. C., Moore, W., & Shuster, S. M. (2016). Invertebrates. Third Edition . In *Invertebrates*.
- Bythell, J. C., & Wild, C. (2011). Biology and ecology of coral mucus release. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 408(1–2), 88–93.
- Cannon, Q., & Wagner, E. (2003). Comparison of discharge mechanisms of Cnidarian cnidae and Myxozoan polar capsules. *Reviews in Fisheries Science*,

11(3), 185–219.

- Carpenter, Kent E., Abrar, M., Aeby, G., Aronson, R. B., Banks, S., Bruckner, A., Chiriboga, A., Cortés, J., Delbee, J. C., DeVantier, L., Edgar, G. J., Edwards, A. J., Fenner, D., Guzmán, H. M., Hoeksema, B. W., Hodgson, G., Johan, O., Licuanan, W. Y., Livingstone, S. R., Lovell, E. R., ... Wallace, Carden., Weil, Ernesto., Wood, E. (2008). One-Third of Reef-Building Corals Face Elevated Extinction Risk from Climate Change and Local Impacts. *Science*, *321*, 560–563.
- Castillo, Isabel; Lodeiros, César; Núñez, Maximiliano; Campos, I. (2001). In vitro study of antibacterial substances produced by bacteria associated with various marine organisms. *Rev Biol Trop*, *49*(3–4), 1213–1221.
- Cheng, S. T. W., Chen, L., Li, S. Y. T., Mayoux, E., & Leung, P. S. (2016). The effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on pancreatic  $\beta$ -cell mass and glucose homeostasis in type 1 diabetes. *PLoS ONE*, *11*(1), 1–12.
- Cherney, D. Z. I., Perkins, B. A., Soleymanlou, N., Har, R., Fagan, N., Johansen, O. E., Woerle, H. J., von Eynatten, M., & Broedl, U. C. (2014). The effect of empagliflozin on arterial stiffness and heart rate variability in subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology*, *13*(1), 1–8.
- Chiasson, J.-L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., & Laakso, M. (2002). Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: The STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*, *359*, 2072–2077.
- Conget, I. (2002). Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Revista Española de Cardiología*, *55*(5), 528–535.
- Coval, S. J., Patton, R. W., Petrin, J. M., James, L., Rothofsky, M. L., Lin, S. L., Patel, M., Reed, J. K., McPhail, A. T., & Bishop, W. R. (1996). A cembranolide diterpene farnesyl protein transferase inhibitor from the marine soft coral *Lobophytum cristagalli*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *6*(7), 909–912.
- D'Ambra, I., & Lauritano, C. (2020). A Review of toxins from cnidaria. *Marine Drugs*, *18*(10), 1–28.

- Dabhi, A. S., Bhatt, N. R., & Shah, M. J. (2013). Voglibose: An alpha glucosidase inhibitor. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(12), 3023–3027.
- De Santana, E. F. C., Alves, A. L., Santos, A. D. M., Cunha, M. D. G. G. S., Perez, C. D., & Gomes, P. B. (2015). Trophic ecology of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) on tropical reefs. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95(2), 301–309.
- Diaz-Garcia, C. M., Sanchez-Soto, C., Fuentes-Silva, D., Leon-Pinzon, C., Dominguez-Perez, D., Varela, C., Rodriguez-Romero, A., Castañeda, O., & Hiriart, M. (2012). Low molecular weight compounds from *Zoanthus sociatus* impair insulin secretion via  $Ca^{+2}$  influx blockade and cause glucose intolerance in vivo. *Toxicon*, 59(2), 306–314.
- Dou, F., Xi, M., Wang, J., Tian, X., Hong, L., Tang, H., & Wen, A. (2013).  $\alpha$  Glucosidase and  $\alpha$  amylase inhibitory activities of saponins from traditional Chinese medicines in the treatment of diabetes mellitus. *Pharmazie*, 68(4), 300–304.
- Elyakov, G. B., Kuznetsova, T., Mikhailov, V. V., Maltsev, I. I., Voinov, V. G., & Fedoreyev, S. A. (1991). Brominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. *Experientia*, 47(6), 632–633.
- Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., & Mata, R. (2012).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. *Journal of Natural Products*, 75(5), 968–974.
- Evans, P. L., McMillin, S. L., Weyrauch, L. A., & Witczak, C. A. (2019). Regulation of skeletal muscle glucose transport and glucose metabolism by exercise training. *Nutrients*, 11(10), 1–24.
- Fautin, D. G. (2009). Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon*, 54(8), 1054–1064.
- Fu, Z., R. Gilbert, E., & Liu, D. (2012). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 9(1), 25–53.
- Galasko, G. T. (2017). Insulin, Oral Hypoglycemics, and Glucagon. In *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry: Seventh Edition* (Seventh Edition). Elsevier Inc.

- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 1–34.
- Ghani, U., Nur-e-Alam, M., Yousaf, M., Ul-Haq, Z., Noman, O. M., & Al-Rehaily, A. J. (2019). Natural flavonoid  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Retama raetam*: Enzyme inhibition and molecular docking reveal important interactions with the enzyme active site. *Bioorganic Chemistry*, *87*, 736–742.
- Glasl, B., Herndl, G. J., & Frade, P. R. (2016). The microbiome of coral surface mucus has a key role in mediating holobiont health and survival upon disturbance. *ISME Journal*, *10*(9), 2280–2292.
- Gleibs, S., Mebs, D., & Werding, B. (1995). Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicon*, *33*(11), 1531–1537.
- Goyal, R. & Jialal, I. (2020). Diabetes mellitus type 2. In. StatPearls Publishing.
- Hædersdal, S., Lund, A., Knop, F. K., & Vilsbøll, T. (2017). The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes. *Mayo Clinic Proceedings*, *93*(2), 217–239.
- Hanh, T. T. H., Dang, N. H., & Dat, N. T. (2016).  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Saponins from *Polyscias fruticosa* Leaves. *Journal of Chemistry*, *2016*, 3–8.
- Hooper, G. J., & Davies-Coleman, M. T. (1995). New Metabolites from the South African soft coral *Capnella thyrsoidea*. *Tetrahedron*, *51*(36), 9973–9984.
- Hoorens, M. W. H., & Szymanski, W. (2018). Reversible, Spatial and Temporal Control over Protein Activity Using Light. *Trends in Biochemical Sciences*, *43*(8), 567–575.
- Jatkar, A. A., Brown, B. E., Bythell, J. C., Guppy, R., & Morris, N. J. (2010). *Bm9012106.Pdf*. 883–888.
- Jiang, G., & Zhang, B. B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *284*(4 47-4).
- Jouiaei, M., Yanagihara, A. A., Madio, B., Nevalainen, T. J., Alewood, P. F., & Fry, B. G. (2015). Ancient venom systems: A review on cnidaria toxins. *Toxins*, *7*(6), 2251–2271.

- Kass-Simon, G., & Scappaticci, Jr., A. A. (2002). The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Canadian Journal of Zoology*, *80*(10), 1772–1794.
- Kooperman, N., Ben-Dov, E., Kramarsky-Winter, E., Barak, Z., & Kushmaro, A. (2007). Coral mucus-associated bacterial communities from natural and aquarium environments. *FEMS Microbiology Letters*, *276*(1), 106–113.
- Koren, O., & Rosenberg, E. (2006). Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(8), 5254–5259.
- Krediet, C. J., Ritchie, K. B., Alagely, A., & Teplitski, M. (2013). Members of native coral microbiota inhibit glycosidases and thwart colonization of coral mucus by an opportunistic pathogen. *ISME Journal*, *7*, 980–990.
- Lakshmi, V., Saxena, A., Pandey, K., Bajpai, P., & Misra-Bhattacharya, S. (2004). Antifilarial activity of *Zoanthus* species (Phylum Coelenterata, Class Anthzoa) against human lymphatic filaria, *Brugia malayi*. *Parasitology Research*, *93*(4), 268–273.
- Lazcano-Pérez, F., Vivas, O., Román-González, S. A., Rodríguez-Bustamante, E., Castro, H., Arenas, I., García, D. E., Sánchez-Puig, N., & Arreguín-Espinosa, R. (2014). A purified *Palythoa* venom fraction delays sodium current inactivation in sympathetic neurons. *Toxicon*, *82*, 112–116.
- Lazcano-Pérez, F., Zavala-Moreno, A., Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., García-Arredondo, A., Cuevas-Cruz, M., Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., & Arreguín-Espinosa, R. (2018). Hemolytic, anticancer and anti-giardial activity of *Palythoa caribaeorum* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *24*(1), 1–7.
- Leclère, L., & Röttinger, E. (2017). Diversity of cnidarian muscles: Function, anatomy, development and regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *4*(JAN), 1–22.
- Lee, B. H., Rose, D. R., Lin, A. H. M., Quezada-Calvillo, R., Nichols, B. L., & Hamaker, B. R. (2016). Contribution of the Individual Small Intestinal  $\alpha$ -Glucosidases to Digestion of Unusual  $\alpha$ -Linked Glycemic Disaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(33), 6487–6494.

- Lin, A. H. M., Lee, B. H., & Chang, W. J. (2016). Small intestine mucosal  $\alpha$ -glucosidase: A missing feature of in vitro starch digestibility. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 53). Elsevier Ltd.
- Lorenzo, M., Frías, A., Villa, P., & del Valle, M. (2006). Detección por cromatografía de capa fina (CCF) de metabolitos antifúngicos producidos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, XL(1), 27–30.
- Malunga, L. N., Eck, P., & Beta, T. (2016). Inhibition of Intestinal  $\alpha$ -Glucosidase and Glucose Absorption by Feruloylated Arabinoxylan Mono- and Oligosaccharides from Corn Bran and Wheat Aleurone. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 1–9.
- Martins, B. T., Correia da Silva, M., Pinto, M., Cidade, H., & Kijjoa, A. (2018). Marine natural flavonoids: chemistry and biological activities. *Natural Product Research*, 33(22), 3260–3272.
- Meikle, P., Richards, G. N., & Yellowlees, D. (1988). Structural investigations on the mucus from six species of coral. *Marine Biology*, 99(2), 187–193.
- Michalek, K., & Bowden, B. F. (1997). A natural algacide from soft coral *Sinularia flexibilis* (Coelenterata, octocorallia, alcyonacea). *Journal of Chemical Ecology*, 23(2), 259–273.
- Moore, R. E. (1985). Structure of palytoxin. *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe*, VOL. 48(3), 81–202.
- Moore, Richard E., & Scheuer, P. J. (1971). Palytoxin: A new marine toxin from a coelenterate. *Science*, 172(172), 495–498.
- Moreels, L., Peigneur, S., Galan, D. T., De Pauw, E., Béress, L., Waelkens, E., Pardo, L. A., Quinton, L. C., & Tytgat, J. (2017). APETx4, a novel sea anemone toxin and a modulator of the cancer-relevant potassium channel KV10.1. *Marine Drugs*, 15(9), 1–17.
- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., & Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends. *Oman Medical Journal*, 27(4), 269–273.
- Ospina, C. A., Rodríguez, A. D., Sánchez, J. A., Ortega-Barria, E., Capson, T. L., & Mayer, A. M. S. (2005). Caucanolides A-F, unusual antiplasmodial constituents from a Colombian collection of the gorgonian coral *Pseudopterogorgia*

- bipinnata. *Journal of Natural Products*, 68(10), 1519–1526.
- Otto-Buczowska, E., & Jainta, N. (2018). Pharmacological treatment in diabetes mellitus type 1 - insulin and what else? *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16(1), 1–7.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5.
- Pino, N., Álvarez, R., & Prado, G. (2017). Determinación De Metabolitos Secundarios Por Cromatografia En Capa Delgada a Especies Con Uso Etnomedicinal Como Estrategia Pedagógica En El Aula De Clase Determination of Secondary Metabolites By Thin Layer Chromatography on Species With Ethnomedicinal U. *Rev. Asoc. Col. Cienc.(Col)*, 29, 30–37.
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E. F. T., Sousa, J. L. C., Tomé, S. M., Ramos, M. J., Silva, A. M. S., Fernandes, P. A., & Fernandes, E. (2017).  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure–activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1216–1228.
- PubChem. (2021-1). Compound Summary for CID 44250225, Rarasaponin I. En <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rarasaponin-I>.
- PubChem. (2021-2). Compound Summary for CID 85212362, Goyasaponin III. En <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Goyasaponin-III>.
- Ramos, V., & Vasconcelos, V. (2010). Palytoxin and analogs: Biological and ecological effects. *Marine Drugs*, 8(7), 2021–2037.
- Rey Cantor, D. C., & Vargas Vargas, C. A. (2009). Caracterizacion quimica y evaluacion de la actividad antifungica de extractos Amanita muscaria. *PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA*, 38.
- Rhodes, L., Adamson, J., Suzuki, T., Briggs, L., & Garthwaite, I. (2000). Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 34, 371–383.
- Rincon Silva, N. G., David, J., & Silva, R. (2019). Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa mediante flavonoides de origen natural como vía de control en el desarrollo de

- diabetes mellitus Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by naturally flavonoids as a control way in the development of diabetes mellitus. *Biociencias*, 14(2), 161–181.
- Ritchie, K. B. (2006). Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 322(June), 1–14.
- Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N. C. M., & Calado, R. (2011). Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds - An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Marine Drugs*, 9(10), 1860–1886.
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(December 2015), e219.
- Sánchez-Rodríguez, J., & Cruz-Vazquez, K. (2006). Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860). *Archives of Toxicology*, 80(7), 436–441.
- Saptarini, N. M., Herawati, I. E., & Permatasari, U. Y. (2016). Total flavonoids content in acidified extract of flowers and leaves of gardenia (*Gardenia Jasminoides* Ellis). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(1 ml), 213–215.
- Scheen, A. J. (2003). Is there a role for  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in the prevention of type 2 diabetes mellitus? *Drugs*, 63(10), 933–951.
- Shi, Y. P., Rodríguez, A. D., Barnes, C. L., Sánchez, J. A., Raptis, R. G., & Baran, P. (2002). New terpenoid constituents from *Eunicea pinta*. *Journal of Natural Products*, 65(9), 1232–1241.
- Shnit-Orland, M., & Kushmaro, A. (2009). Coral mucus-associated bacteria: A possible first line of defense. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(3), 371–380.
- Suchanek, T. H., & Green, D. J. (1981). Interspecific competition between *Palythoa caribaeorum* and other sessile invertebrates on St. Croix reefs, U.S. Virgin Islands. *Proceedings of the 4th International Coral Reef Symposium*, 2(June 1981), 679–684.
- Sugimoto, S., Nakajima, H., Kosaka, K., & Hosoi, H. (2015). Review: Miglitol has potential as a therapeutic drug against obesity. *Nutrition and Metabolism*, 12(1).
- Tamez, H. E., Tamez, A. L., Garza, L. A., Hernandez, M. I., & Polanco, A. C. (2015).

- Dapagliflozin as an adjunct therapy to insulin in the treatment of patients with type 1 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 14(1), 10–12.
- Tardent, P. (1995). The cnidarian cnidocyte, a high-tech cellular weaponry. My favourite cell. 17(4):351-362.
- Tysoe, C.R. & Withers S.G. (2018). Structural dissection of helianthamide reveals the basis of its potent inhibition of human pancreatic-amylase. *Biochemistry*. 57(37):5384-5387.
- Tomono, Y., Hirota, H., & Fusetani, N. (1999). Isogosterones A-D, antifouling 13,17-secosteroids from an octocoral *Dendronephthya* sp. *Journal of Organic Chemistry*, 64(7), 2272–2275.
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, 5(3), 93.
- Umamaheswari, S., & Sridevi Sangeetha, K. S. (2019). Inhibitory action against alpha glucosidase by selected dihydroxy flavones. *International Journal of Current Research and Review*, 11(7), 5–8.
- Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Yasumoto, T., Oue, A., & Kan, Y. (1995). Palytoxin Analogs from the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Journal of the American Chemical Society*, 117(19), 5389–5390.
- Voss, G.L., (1976). *Seashore life of Florida of the Caribbean.*, Dover Publications. New York. 207p.
- Warrell, D. A. (2012). Poisonous Plants and Aquatic Animals: Poisonous Aquatic Animals. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease: Ninth Edition*, 923–924.
- Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2014). Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *International Journal of Medical Sciences*, 11(11), 1185–1200.
- Zeng, L. M., Wang, C. J., Su, J. Y., Li, D., Owen, N. L., Lu, Y., Lu, N., & Zheng, Q. T. (2001). Flavonoids from the red alga *Acanthophora spicifera*. *Chinese Journal of Chemistry*, 19(11), 1097–1100.

- Zhang, X., Yang, S., Chen, J., & Su, Z. (2019). Unraveling the regulation of hepatic gluconeogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, *10*(JAN), 1–17.
- Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*, *14*(2), 88–98.

## Anexos

I. Para preparar directamente un litro de buffer fosfato salino PBS 1X pesar:

8,06 g de NaCl

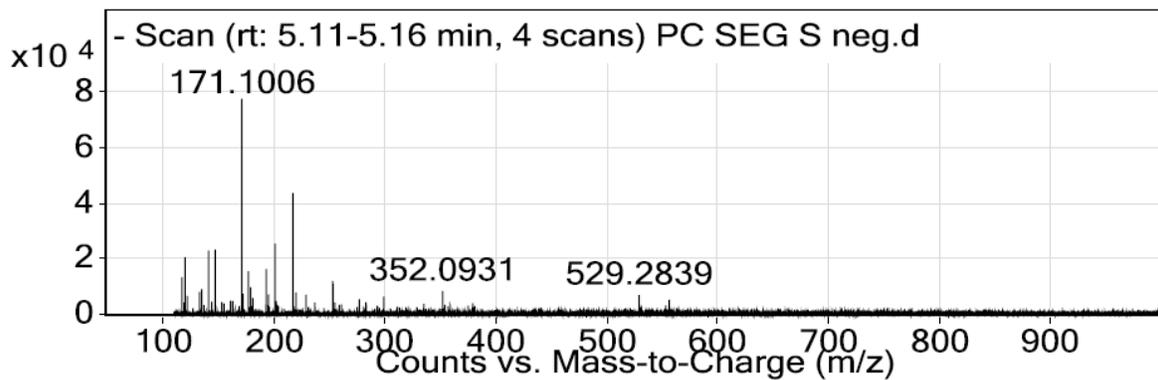
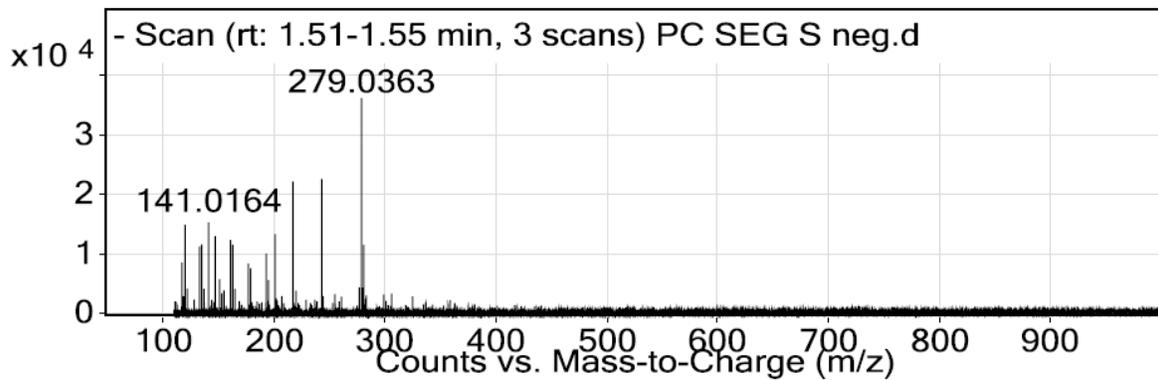
0,22 g de KCl

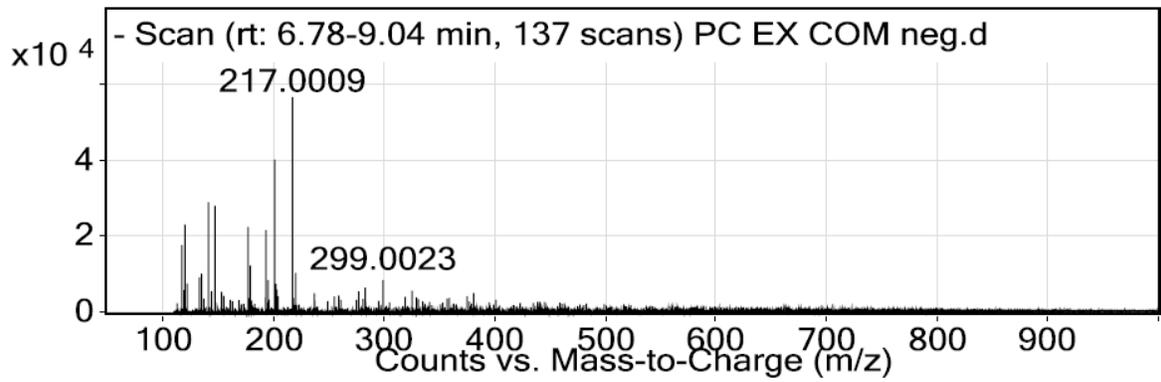
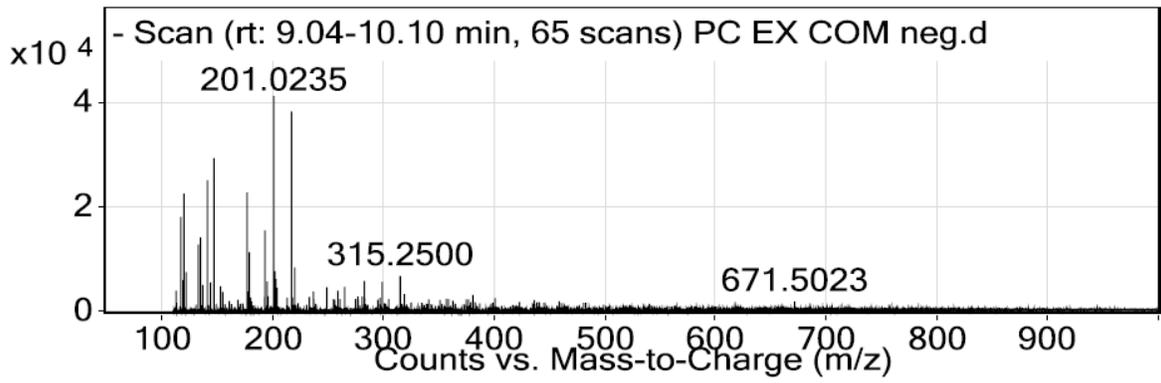
1,15 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0,20 g de  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$

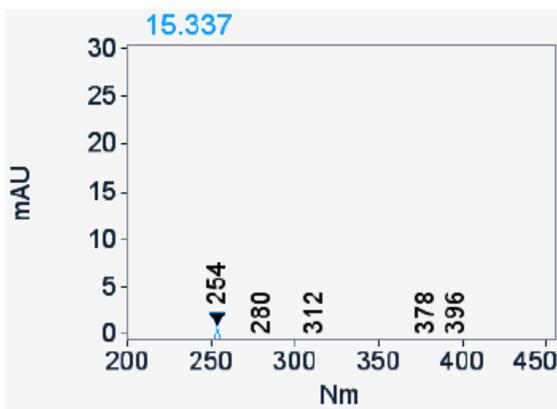
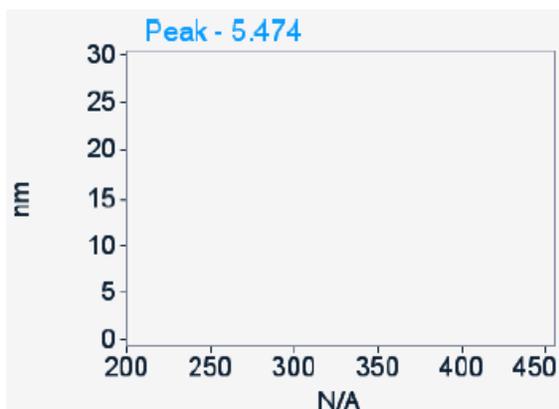
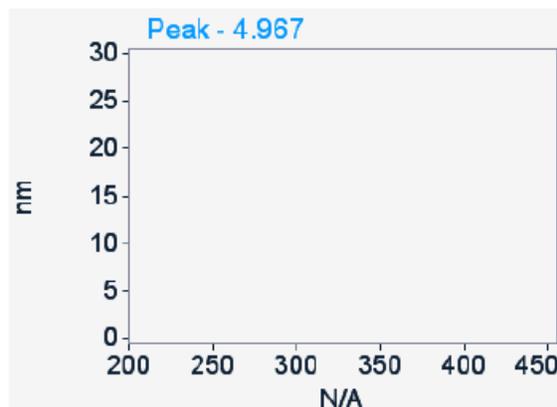
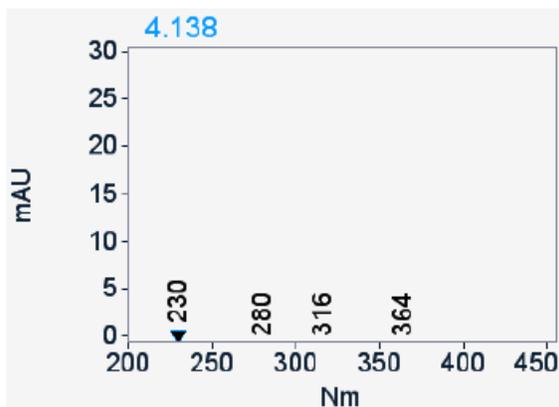
Disolver todos los reactivos perfectamente y ajustar la solución a pH 7.4

II. Espectros ionizados por ESI en modo negativo, los resultados no son significativos por la intensidad de las señales.

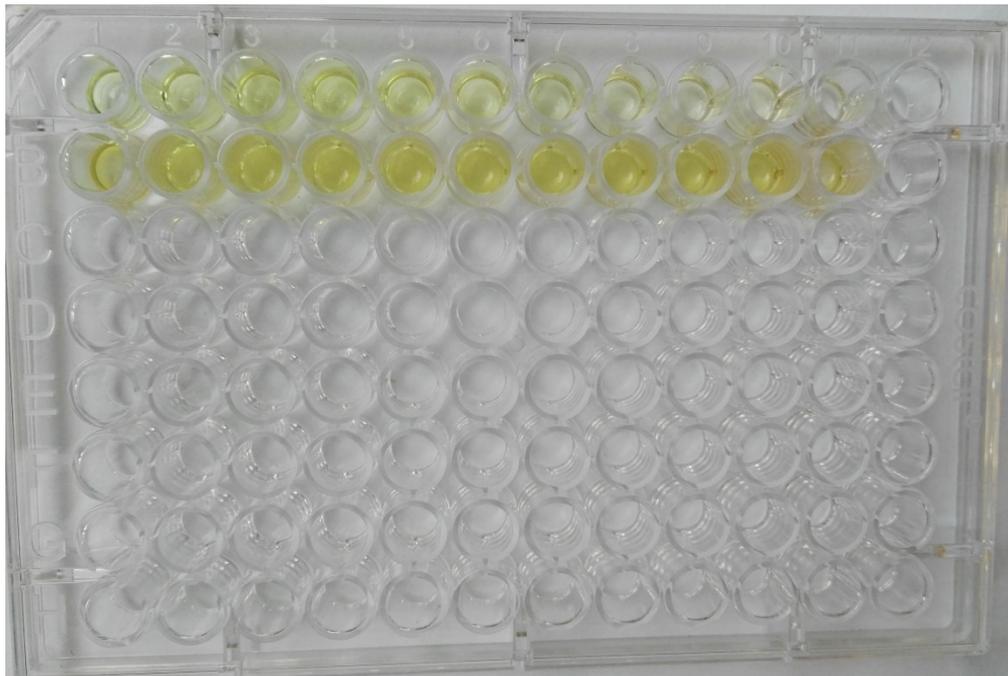




- III. Experimentos del barridos en el espectro UV de las fracciones detectadas en la cromatografía HPLC fase reversa en la muestra completa de *P. caribaeorum* activa. Los tiempos que aparecen en azul, son los tiempos de la corrida de la Figura 16 A.



IV. Experimento de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa de la segunda extracción (macerado con acetona), la actividad inhibitoria fue reversible después de toda la noche en incubación. Se observó inhibición del 100 % de la actividad enzimática con concentraciones de 7.2  $\mu\text{g/mL}$ . La intensidad en la coloración es proporcional a la degradación del sustrato.



En la Figura se muestra en la parte superior (fila A) las concentraciones de muestra de *P. caribaeorum* de manera ascendente de izquierda a derecha. La fila B contiene el control positivo con concentraciones similares a la muestra problema. Se puede notar una clara diferencia entre el control y la muestra después de una noche de incubación, en el control positivo hay una completa degradación del sustrato (color homogéneo en todas las concentraciones usadas) y la muestra de *P. caribaeorum* presenta mayor degradación de sustrato a bajas concentraciones de muestra pero las concentraciones más altas usadas (pozos 10 y 11), aun presentan una inhibición considerable respecto al control.