



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Separación de un derivado proteico bioactivo  
presente en la saliva del pulpo rojo de Yucatán**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

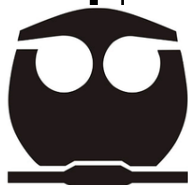
**Química Farmacéutica Biológica**

P R E S E N T A

Kenia Adriana Sánchez Morales

Director de Tesis

Dr. Miguel Ángel Flores Ramos



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	<b>Profesor: Gutiérrez Venegas Gloria</b>
VOCAL:	<b>Profesor: Pedraza Chaverri José</b>
SECRETARIO:	<b>Profesor: Flores Ramos Miguel Ángel</b>
1er. SUPLENTE:	<b>Profesor: Ovalle Magallanes Berenice</b>
2º SUPLENTE:	<b>Profesor: Cuevas Velázquez Cesar Luis</b>

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Unidad de Química en  
Sisal, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema: Dr. Miguel Ángel Ramos Flores

X

---

Dr. Miguel Angel Flores Ramos  
Asesor de Tesis

Supervisor técnico: Dr. Sergio Rodríguez Morales

X

---

Dr. Sergio Rodríguez Morales  
Supervisor técnico

Sustentante: Kenia Adriana Sánchez Morales

X

---

Kenia A. Sánchez Morales  
Sustentante

**AGRADECIMIENTOS**

*A mi madre....*

*Existe una cita, aún sin hora ni fecha, para encontrarnos, yo ahí estaré puntual..*

*-Julio Cortázar.*

---

Después de esperar tanto este momento...

Esta tesis representa todo el esfuerzo de 5 años de carrera en la Facultad de Química de la UNAM y 26 años de mi vida, que no hubiera sido posible sin el apoyo y acompañamiento de cada una de las personas que, a la distancia, cercanía o en alma estuvieron a lo largo de este sueño académico y algunas desde mucho antes que esto sucediera.

A mi tía, Ana Morales, a mis hermanos, Samantha y Mauricio Morales y sobre todo a mi mamá, Elsa Morales que sin su ayuda y apoyo infinito esto no sería posible, madre te extraño y siempre me harás mucha falta.

A mi amiga Ari, que desde hace 13 años ha estado presente en mi vida y a pesar de todo, seguimos con esta maravillosa hermandad. Te quiero mucho.

A mis amigos Pandy, Gabriel y Yess, chicos, no tengo palabras para agradecerles su hermosa amistad y su apoyo incondicional, la preparatoria y mi vida no sería la misma sin ustedes en ella. Los quiero tanto.

A mi compañera de aventuras por "Sisalito beach", Daisy, por la compañía, las pláticas, el ejercicio, las risas y los consejos.

A la maestra Susy y al profesor Guillermo que fueron una luz en mi camino en los momentos más oscuros, gracias por creer en mí.

A Cass y Tania porque a pesar de no vernos tan seguido o no coincidir fueron las primeras en brindarme su hermosa amistad, su apoyo y saber que es posible encontrar verdaderas compañeras y amigas en la FQ.

A mi novio por estar y su apoyo incondicional. Te quiero y amo mucho Ernesto.

A mis asesores de Tesis: El Dr. Miguel y el Dr. Sergio, que sin su hospitalidad, bondad, vocación y amistad esto no hubiera sido posible.

Y finalmente, un agradecimiento especial para mí, por llegar a este punto de mi vida y cumplir uno de los muchos logros que me faltan.

¡Felicidades, Kenia, lo lograste!

---

**ÍNDICE GENERAL**

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>2. ANTECEDENTES GENERALES.....</b>	<b>5</b>
2.1 PRODUCTOS NATURALES .....	5
2.2 EL OCEANO: HISTORIA DE UNA FUENTE POTENCIAL DE PRODUCTOS NATURALES MARINOS .....	6
2.3 CEFALÓPODOS.....	8
2.4 OCTÓPODOS .....	9
2.4.1 <i>Glándulas Salivales Posteriores (GSP)</i> .....	11
2.4.1.1 Sustancias de importancia en las glándulas salivales.....	12
2.5 PÉPTIDOS MARINOS.....	14
2.5.1 <i>Neuropéptidos</i> .....	15
2.5.2 <i>Taquicininas</i> .....	17
2.5.3 <i>Taquicininas de invertebrados: Octópodos</i> .....	18
2.6 <i>OCTOPUS MAYA</i> .....	19
2.6.1 <i>Importancia del Octopus maya, en Yucatán</i> .....	22
2.6.2 <i>Estudio de GSP en Octopus maya</i> .....	22
2.7 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN .....	26
2.7.1 <i>Extracción de neuropéptidos</i> .....	27
2.7.6.1 Ionización por electrospray en CL-EM e identificación de biomoléculas .....	31
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
4.1 HIPÓTESIS .....	36
4.2 OBJETIVO GENERAL.....	36
4.3 OBJETIVOS PARTICULARES .....	36
<b>5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>37</b>
5.1 MATERIALES.....	38
5.2 INSTRUMENTACIÓN, MÉTODOS DESARROLLADOS PARA EL ANÁLISIS Y AISLAMIENTO CROMATOGRÁFICO .....	38
5.2.1 <i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución</i> .....	38
5.2.2 <i>Cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrometría de Masas (CL-EM)</i> .....	38
5.3 ÁREA DE COLECTA.....	38
5.4 PRESERVACIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS.....	39
5.5 EXTRACCIÓN SELECTIVA MEDIANTE EL USO DE METANOL ACIDIFICADO .....	39
5.5.1 <i>Preparación del metanol acidificado</i> .....	39
5.5.2 <i>Extracción de los compuestos bioactivos a partir de las GSP liofilizadas</i> .....	39
5.6 BIOENSAYOS .....	40
5.6.1 <i>Bioensayo sobre Ocypode quadrata</i> .....	40
5.6.2 <i>Bioensayo sobre Artemia salina</i> .....	40
5.7 PREFRACCIONAMIENTO Y DESALADO MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS) EN FASE REVERSA ...	41
5.8 ANÁLISIS POR CLAR FASE REVERSA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR EFS.....	42
5.9 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN GEL PERMEABLE DE LA FRACCIÓN FN-1 (95:5).....	42
5.10 ANÁLISIS POR CLAR FASE REVERSA DE LAS FRACCIONES FN-1.1, FN-1.2 Y FN-1.3 .....	43
5.11 ANÁLISIS POR GEL PERMEABLE DE LA FRACCIÓN FN-1.1 Y DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR .....	43

---

5.11.1 Calibración rápida de la columna Yarra SEC-2000 .....	43
5.12 ANÁLISIS DE LA ANOTACIÓN ESTRUCTURAL DE LA FRACCIÓN FN-1.1 Y DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR POR CL-EMAR .....	44
<b>6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
6.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE LAS GSP DE <i>OCTOPUS MAYA</i> .....	47
6.2 BIOENSAYO DEL EXTRACTO CRUDO EN <i>OCYPODE QUADRATA</i> .....	50
6.3 ANÁLISIS POR CLAR FASE REVERSA DEL EXTRACTO CRUDO.....	51
6.4 SEPARACIÓN BIODIRIGIDA POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS) FASE REVERSA .....	52
6.5 SEPARACIÓN POR GEL PERMEABLE DE LA FRACCIÓN FN-1 (95:5).....	58
6.6 ANÁLISIS POR CLAR FASE REVERSA C18 DE FN-1.1, FN-1.2 Y FN-1.3.....	60
6.7 ANÁLISIS POR GEL PERMEABLE DE FN-1.1 Y DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR .....	62
6.8 ESTUDIO DE DEREPLICACIÓN DE FN-1.1 MEDIANTE CL-EMAR .....	63
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>68</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>69</b>
<b>9. APÉNDICE I.....</b>	<b>78</b>

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.	Evidencia de los primeros registros de productos naturales.....	6
Figura 2.	Ejemplos de moléculas bioactivas de origen marino.....	8
Figura 3.	Anatomía del pulpo .....	10
Figura 4.	Glándulas salivales de los octópodos .....	11
Figura 5.	Tracto digestivo de los octópodos.....	12
Figura 6.	Biomoléculas encontradas en la saliva de cefalópodos.....	13
Figura 7.	Pulpo rojo, <i>Octopus maya</i> .....	21
Figura 8.	Distribución del pulpo rojo, <i>Octopus maya</i> .....	21
Figura 9.	Representación de la pesca del pulpo rojo por el método artesanal de “jimba y gareteo” .....	23
Figura 10.	Efectos de la saliva de <i>O. maya</i> en el cangrejo fantasma.....	24
Figura 11.	Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de la fracción paralizante .....	25
Figura 12.	Perfil de aminoácidos de la fracción paralizante.....	25
Figura 13.	Cromatografía por Extracción en Fase Sólida.....	27
Figura 14.	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, Polaris 211 (Varian, Inc).....	29
Figura 15.	Cromatografía en Gel Permeable.....	29
Figura 16.	Cromatografía por Intercambio iónico.....	30
Figura 17.	Equipo CL-EMAR Agilent 6545 QTOF (UJAT-C.I.T.A.T).....	31
Figura 18.	Mecanismo de ionización electrospray.....	32
Figura 19.	Esquema general de la metodología de investigación.....	37
Figura 20.	GSP de <i>Octopus maya</i> antes y después de ser trituradas.....	46
Figura 21.	Extracción selectiva para neuropéptidos.....	49
Figura 22.	Concentrado del extracto crudo antes de liofilizar.....	49
Figura 23.	Imagen del bioensayo en cangrejo fantasma.....	50
Figura 24.	Cromatogramas de la fracción neurotóxica (Extracto crudo).....	51
Figura 25.	Cromatograma de la fracción 95:5 (FN-1) que se obtuvo por EFS.....	54
Figura 26.	Cromatograma de la fracción 95:5 obtenida por MCV (EFS).....	54
Figura 27.	Cromatograma de la fracción 90:10 (FN-2) que se obtuvo por EFS.....	56
Figura 28.	Cromatograma de la fracción 90:10 obtenida por MCV (EFS).....	56
Figura 29.	Cromatograma de la fracción 90:10 obtenido por DPP.....	57
Figura 30.	Cromatograma de la fracción 80:20 (FN-3) que se obtuvo por EFS.....	57
Figura 31.	Cromatograma por Gel permeable de FN-1, distribución de masas moleculares de los componentes. ..	58
Figura 32.	Cromatograma por Gel permeable semipreparativo.....	59
Figura 33.	Cromatograma de la fracción FN-1.1 por CLAR fase reversa C18.....	60



Figura 34. Cromatograma de la fracción FN-1.2 por CLAR fase reversa C18.....	61
Figura 35. Cromatograma de la fracción FN-1.3 por CLAR fase reversa C18.....	61
Figura 36. Cromatograma del análisis de la fracción FN-1.1.....	62
Figura 37. Cromatograma de la curva de calibración para la determinación de las masas moleculares de FN-1.1..	63
Figura 38. Cromatograma de la fracción FN-1.1 analizada por CL-EM fase reversa.....	64
Figura 39. Compuestos encontrados en la base de datos Met-Lin.....	65
Figura 40. Cromatograma y espectro de la Tridecanamida.....	66
Figura 41. Cromatograma y espectro de la Esfinganina.....	78
Figura 42. Cromatograma y espectro del 1-Tridecanol.....	79
Figura 43. Cromatograma y espectro del 1-Tetradecanol.....	80
Figura 44. Cromatograma y espectro del 1,2,4-Nonadecanetriol.....	81
Figura 45. Cromatograma y espectro del Xestoaminol C.....	82

---

*ÍNDICE DE TABLAS*

<b>Tabla 1.</b>	<b>Principales compuestos obtenidos, técnicas de purificación e identificación en cefalópodos .....</b>	<b>13</b>
<b>Tabla 2.</b>	<b>Péptidos marinos bioactivos y su secuencia de aminoácidos y/o estructuras .....</b>	<b>16</b>
<b>Tabla 3.</b>	<b>Familia de neuropéptidos .....</b>	<b>17</b>
<b>Tabla 4.</b>	<b>Taquicininas de Octópodos .....</b>	<b>20</b>
<b>Tabla 5.</b>	<b>Estándares utilizados para la curva de calibración.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 6.</b>	<b>Fracciones y rendimientos obtenidos del extracto crudo .....</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 7.</b>	<b>Rendimiento de las fracciones obtenidas de la colecta de FN-1 .....</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 8.</b>	<b>Resultados de la actividad de neurotoxicidad de las fracciones FN-1.1, FN-1.2 y FN-1.3 .....</b>	<b>60</b>
<b>Tabla 9.</b>	<b>Compuestos anotados previamente identificados en animales marinos .....</b>	<b>66</b>

---

---

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>GSP</b>	Glándula(s) Salivales Posteriores	<b>g</b>	Gramos
<b>TK(s)</b>	Taquicinina(s)	<b>µg</b>	Microgramos
<b>inv-TKs</b>	Taquicininas de invertebrados	<b>h</b>	Horas
<b>EFS</b>	Extracción en Fase Sólida	<b>M</b>	Molar
<b>CLAR</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución	<b>M<sup>+</sup></b>	Ion Molecular
<b>CL-EMAR</b>	Cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrómetro de Masas de Alta Resolución	<b>mL</b>	Mililitros
<b>MeOH</b>	Metanol	<b>µL</b>	Microlitros
<b>UV</b>	Ultravioleta	<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	Acetonitrilo	<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno	<b>HCOOH</b>	Ácido fórmico
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético	<b>m/z</b>	Relación masa/carga
<b>IES</b>	Ionización Electrospray	<b>MM</b>	Masa Molecular
<b>EM</b>	Espectrometría de Masas	<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México
<b>EMAR</b>	Espectrometría de Masas de Alta de Resolución	<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>EM/ESI</b>	Espectrometría de Masas Electrospray	<b>kg</b>	Kilogramos
<b>Rf</b>	Factor de retención		

---

**RESUMEN**

Las Glándulas Salivales Posteriores (GSP) de los octópodos, han sido una fuente interesante de biomoléculas que poseen actividad relevante e importancia biológica. En este trabajo se realizó el análisis de las GSP del pulpo rojo, *Octopus maya*, endémico de la península de Yucatán. Las GSP de *O. maya* se obtuvieron a partir de los desechos de la pesca ribereña y tratadas para su posterior análisis.

Se realizó la extracción selectiva de péptidos empleando metanol acidificado para la obtención del extracto crudo, el cual resultó ser activo en el modelo biológico (*O. quadrata* o cangrejo fantasma) para evaluar el efecto neurotóxico, observando movimientos descoordinados e involuntarios y parálisis. El extracto crudo se logró desalar y fraccionar en función de la polaridad empleando extracción en fase sólida (EFS) mediante un gradiente de H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (5, 10, 20, 40, 60 y 100 % de CH<sub>3</sub>CN, 5 mL). Las fracciones obtenidas fueron sometidas al bioensayo sobre cangrejo fantasma observando el efecto en las fracciones 95:5, 90:10 y 80:20 H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN. En investigaciones previas, se llevó a cabo la separación y elucidación estructural de serotonina en la fracción 90:10,<sup>1,2</sup> por lo que, en este proyecto se estudió la fracción 95:5 (**FN-1**). En esta fracción **FN-1** se observó actividad biológica de interés para la identificación de biomoléculas activas, luego, se analizó perfil cromatográfico utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Posteriormente, se separó a través de cromatografía en gel permeable dando como resultado tres fracciones con actividad biológica en los bioensayos sobre cangrejo fantasma y *Artemia salina*, **FN-1.1**, **FN-1.2** y **FN-1.3**. Debido al rendimiento de las fracciones y los resultados del bioensayo, se optó por utilizar la fracción **FN-1.1**. El análisis por CLAR de Fase Reversa y Gel Permeable reveló que el constituyente principal es probablemente un péptido con masa molecular de 3.89 kDa. Consecutivamente, se le realizó el análisis por CL-EMAR para la identificación de los componentes en la fracción, en el que se anotaron 26 compuestos encontrados por la base de datos Met-Lin, de los cuales solo 6 habían sido reportados previamente en animales marinos de acuerdo con la base de datos SciFinder.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los recursos pesqueros representan un sector importante de nuestra economía; de acuerdo con estimaciones, en 2018, la producción mundial de las pesquerías fue de 179 millones de toneladas, donde el pulpo representa el 7% de los principales grupos de especies en la pesquería comercial.<sup>3</sup> En la industria pesquera, cuando se producen filetes, entre el 40-60% del peso total se clasifica como subproductos (vísceras, cabezas, tripas, piel, etc.) los cuales son desechados.<sup>4</sup> De hecho, los descartes pesqueros implican problemas de gestión, ya que son altamente perecederos debido al alto contenido de lípidos poliinsaturados y enzimas proteolíticas, los cuales deben eliminarse como subproductos certificados. Sin embargo, los organismos marinos y sus subproductos han sido reconocidos como un recurso extraordinario de nuevos metabolitos bioactivos. La enorme biodiversidad de los organismos vivos que se encuentran en los hábitats marinos, representa aproximadamente la mitad de la biodiversidad mundial total, dando como resultado, una amplia gama de componentes biofuncionales estructuralmente diversos.<sup>5</sup>

El interés en las sustancias biológicamente activas, derivadas de los organismos marinos se ha incrementado cada año. Estos compuestos son usados como base para el diseño o la creación de nuevos medicamentos, biopreparados que son aplicados en la industria alimentaria y agricultura, así como para la producción de alimentos funcionales, suplementos dietéticos biológicamente activos y cosméticos.<sup>6</sup> Entre los subproductos marinos, encontramos que las principales biomoléculas activas son: proteínas, aminoácidos, péptidos, enzimas, colágenos, gelatina, grasas, entre los cuales se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados, ácido palmítico, ácido oleico, cenizas, quitina, vitaminas y otros compuestos de gran interés por su alto valor en el mercado.<sup>5</sup>

Los cefalópodos son una clase de moluscos morfológicamente diversa que incluye pulpos, sepias, calamares y nautilus. De las ~800 especies de cefalópodos conocidas, los pulpos comprenden más de 150 especies en todo el mundo. Muchos pulpos exhiben un comportamiento depredador altamente especializado, en el que una presa de caparazón duro es perforada o mordida en partes vulnerables como los tallos de los ojos. La presa es paralizada mediante la inyección de saliva venenosa.

El veneno del pulpo se produce en las glándulas salivales posteriores (GSP) y se administra a la presa a través del conducto común y es esparcido por la rádula. Este comportamiento se ha observado en al menos siete especies de pulpos en una amplia variedad de presas, incluidos crustáceos, bivalvos, gasterópodos e incluso en nautilus.

Los pulpos secretan una variedad de moléculas bioactivas de sus GSP para alimentarse de presas tanto vertebradas como invertebradas.<sup>7,8,9</sup> Tras el envenenamiento, se observa en los crustáceos una rápida inmovilización debido a los efectos hipotensores, así como una parálisis flácida, irreversible y completa.<sup>10,11</sup> La consiguiente presión de selección evolutiva ha dado como resultado una amplia diversidad de sustancias bioactivas presentes en pulpos, incluidas moléculas pequeñas como acetilcolina, histamina, octopamina, serotonina, taurina, tetrodotoxina, tiramina,<sup>12,13,22,23,14–21</sup> y proteínas<sup>24,25,34–37,26–33</sup>. Dentro de esta gran biodiversidad molecular están los péptidos de taquicinina Oct-TK-I y Oct-TK-II de *Octopus vulgaris*,<sup>38</sup> Oct-TK-III de *Octopus kaurna*<sup>27</sup> y eledoisina de *Eledone cirrhosa*.<sup>24,29</sup> A pesar de este potencial, se sabe sorprendentemente poco sobre la composición molecular de los venenos en este grupo diverso y poco estudiado, y en términos generales, los pulpos se han identificado como un área de investigación de venenos notoriamente descuidada.

En México, el pulpo rojo, *Octopus maya*, es una especie endémica de la península de Yucatán con un alto valor económico en el mercado y es aprovechada principalmente por la flota menor artesanal de la región.<sup>39</sup> Entre el 2001 y 2015 la captura promedio superó las 25 mil toneladas. Con respecto a su comercialización, el 85% se destina al consumo humano y el 15% corresponde a subproductos (cerebro, estómago, pico, ojos, glándulas salivales, etc.), los cuales son desechados al mar o confinados al basurero durante su evisceración.<sup>40</sup> Las GSP se encuentran dentro de estos subproductos, donde se produce una secreción venenosa, que es una mezcla de varias sustancias biológicamente activas. Nuestro grupo de investigación reportó por primera vez la composición química de las GSP de *O. maya* y el efecto sobre crustáceos. Estos estudios se centraron en el extracto acuoso, el cual se fraccionó mediante ultrafiltración de

membrana con una masa molecular de corte de 3 kDa que condujo a una fase metabólica (>3 kDa) y una fracción neurotóxica (<3 kDa).

La fracción neurotóxica inyectada en cangrejos es capaz de ocasionar un efecto relajante-paralizante sin ocasionar la muerte. La separación biodirigida de la fracción neurotóxica por cromatografía, condujo a una fracción de efecto paralizante y una fracción de efecto relajante. Estudios previos sugieren que el efecto paralizante es provocado por los aminoácidos presentes en la saliva, mientras que el efecto relajante es inducido por la presencia de serotonina.<sup>2</sup> Sin embargo, los péptidos presentes en estas fracciones, no se han logrado secuenciar ni dilucidar molecularmente.

Por lo anterior, este trabajo se realizó para 1) optimizar el aprovechamiento de los desechos (subproductos) y proporcionar valor agregado a los recursos obtenidos de la pesca del pulpo rojo, *O. maya*; 2) realizar un estudio de las GSP del pulpo rojo, *O. maya*, para el descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos mediante una separación biodirigida, empleando diferentes métodos cromatográficos y extracción de biomoléculas.

## 2. ANTECEDENTES GENERALES

### 2.1 Productos Naturales

Los productos naturales son una entidad química formada por un organismo vivo de origen natural que poseen propiedades farmacológicas, esto puede contribuir al descubrimiento y diseño de nuevos fármacos. El extracto crudo que se extrae de las plantas medicinales, animales, microbios o cultivos de microorganismos, contiene componentes químicos únicos y estructuralmente diversos.<sup>41</sup>

Los primeros registros de productos naturales se plasmaron en tablillas de arcilla en cuneiforme de Mesopotamia (2600 a.C.) estos documentaban aceites de las especies *Cupressus sempervirens* (ciprés) y *Commiphora* (mirra) que aún se utilizan para tratar la tos, los resfriados y las inflamaciones. El Papiro de Ebers [Fig. 1-A] (2900 a.C.) es un registro farmacéutico egipcio que documenta más de 700 medicamentos a base de plantas, desde gárgaras, píldoras e infusiones hasta ungüentos. La Materia Médica China [Fig. 1-B] (1100 a.C.) (Wu Shi Er Bing Fang, contiene 52 recetas), la Herbal Shennong (~100 a.C., 365 medicamentos) y la Herbal Tang (659 d.C., 850 medicamentos) son registros documentados de los usos de productos naturales. El médico griego Dioscórides (100 d.C.) registró la recolección, el almacenamiento y los usos de las hierbas medicinales, mientras que el filósofo y científico natural griego Teofrasto (~300 a.C.) se ocupó de las hierbas medicinales. Durante la Edad Media, los monasterios de Inglaterra, Irlanda, Francia y Alemania conservaron estos conocimientos occidentales, mientras que los árabes conservaron los conocimientos grecorromanos y ampliaron los usos de sus propios recursos, junto con hierbas chinas e indias desconocidas. Los árabes fueron los primeros en disponer de farmacias privadas (siglo VIII), y Avicenna, farmacéutico, médico, filósofo y poeta persa, contribuyó en gran medida a las ciencias de la farmacia y la medicina con obras como el *Canon Medicinae* [Fig. 1-C].<sup>42</sup>

Como se puede notar, los productos naturales han sido vitales a lo largo de la historia hasta llegar a nuestros días, por lo que son de gran importancia en la actualidad en industrias como la farmacéutica y biotecnológica, ya que una amplia gama de medicamentos modernos se basan en moléculas naturales o en derivados de las mismas.<sup>41</sup>





Figura 1. Evidencia de los primeros registros de productos naturales A,<sup>43</sup> B,<sup>44</sup> C.<sup>45</sup>

## 2.2 El océano: historia de una fuente potencial de productos naturales marinos

Los océanos contienen más del 80% de diversas especies de plantas y animales en el mundo,<sup>46</sup> dentro de toda esta diversidad, encontramos diferentes condiciones que han permitido a estos organismos adaptarse al medio. Con ello, una oportunidad para el descubrimiento de nuevas moléculas con posible bioactividad para el tratamiento de diversas enfermedades. Estudios realizados en organismos marinos han llevado al aislamiento de una gran cantidad de metabolitos secundarios estructuralmente novedosos, que son desconocidos en el hábitat terrestre y por lo tanto constituyen una biblioteca potencial para el descubrimiento de compuestos líderes que puede derivar en el desarrollo de nuevos fármacos.<sup>47</sup>

Hasta el 2012, los productos farmacéuticos marinos constan de tres fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (por sus siglas en inglés, FDA), un fármaco registrado en la Unión Europea (UE), 13 productos naturales (o derivados de ellos) en diferentes fases clínicas y un gran número de productos químicos marinos en fase preclínica. Algunos ejemplos son el Ziconotide (Prialt®, Elan Corporation), un péptido descubierto por primera vez en un caracol tropical, que fue aprobado en diciembre de 2004 para el tratamiento del dolor. La plitidepsina (Aplidin®, PharmaMa), un depsipéptido, aislado del tunicado mediterráneo *Aplidium albicans*. La plitidepsina es eficaz en el tratamiento de varios tipos de cáncer, como el melanoma,

células pequeñas y no pequeñas del pulmón, la vejiga, así como el linfoma no-Hodgkin y la leucemia linfoblástica aguda. **[Fig. 2]**.

La ecteinascidina 743 (también conocida como trabectedina o ET743; Yondelis®) se aisló a partir del ascidiano *Ecteinascidia turbinata* con muy bajos rendimientos. Las cantidades de ET743 necesarias para los estudios preclínicos y clínicos avanzados se consiguieron mediante la adopción de acuicultura a gran escala de *E. turbinata* en estanques abiertos, sin embargo, la semisíntesis de ET743 se encuentra bien establecida. En octubre de 2007, este compuesto (Yondelis, PharmaMar) se convirtió en el primer fármaco marino contra el cáncer aprobado en la Unión Europea. La Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos ha aprobado la trabectedina y está completando los estudios de fase III en Estados Unidos para su aprobación. La episulosina, aislada de la almeja marina *Spisula polynyma*, mostró una actividad selectiva sustancial contra las células tumorales en comparación con las células normales. Avanzó hasta la fase I de los ensayos clínicos contra tumores sólidos, pero se retiró a finales de 2006. La criptoficina fue seleccionada para los ensayos clínicos a mediados de la década de 1990 y luego avanzó hasta los ensayos de fase II, pero se suspendió en 2002 debido a la toxicidad y la falta de eficacia.<sup>42</sup> En 1962, la primer taquicinina aislada fue la eledoisina **[Fig. 2]**, a partir de las glándulas salivales posteriores (GSP) del pulpo mediterráneo *Eledone moschata*,<sup>48</sup> este fármaco se utiliza como tratamiento para la enfermedad del ojo rojo, esta afección es multifactorial que daña a las lágrimas y a la superficie ocular y conlleva síntomas de incomodidad, trastornos visuales, inestabilidad de la película lagrimal con posibles daños en la superficie ocular, junto con un aumento de la osmolaridad de la película lagrimal y la inflamación de la superficie ocular.<sup>49</sup>

Cabe mencionar, que los organismos marinos como esponjas, peces, corales, moluscos, camarones, pulpos, conchas, babosas marinas, microorganismos marinos, entre otros, son fuentes de compuestos bioactivos, dichos compuestos poseen características estructurales y químicas que generalmente no se encuentran en los productos naturales terrestres. De esta forma, los organismos marinos también proporcionan una rica fuente de nutraceuticos y son candidatos potenciales para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos.<sup>46</sup>

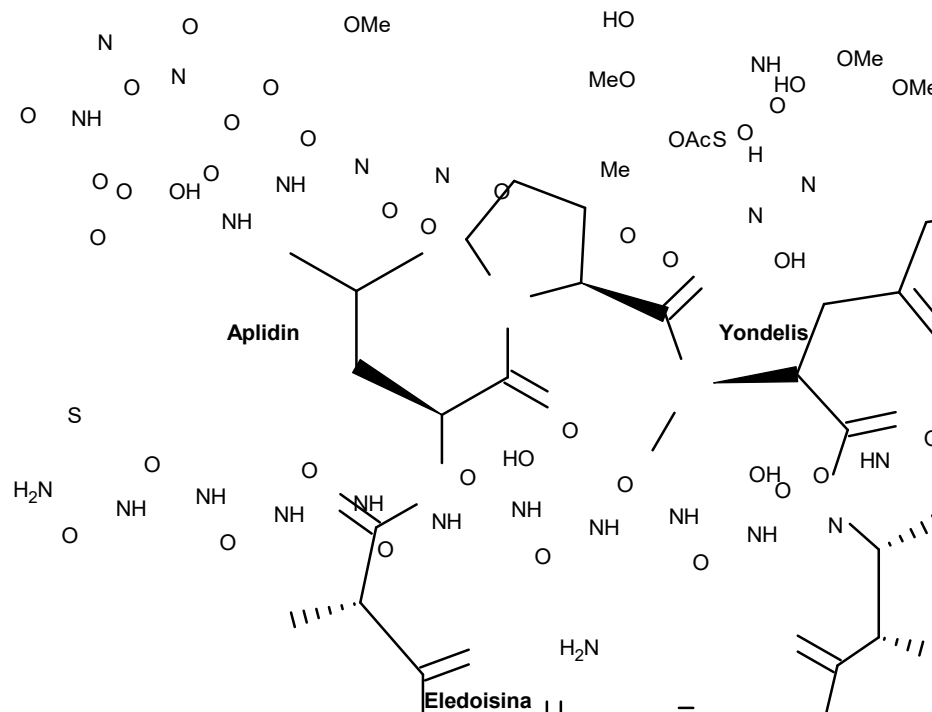


Figura 2. Ejemplos de moléculas bioactivas de origen marino. Aplidin,<sup>50</sup> Yondelis,<sup>51</sup> Eledoisina.<sup>52</sup>

### 2.3 Cefalópodos

Los cefalópodos (pulpos, sepias y calamares) son organismos depredadores de cuerpo blando, que han perdido la protección de la concha como una adaptación a un estilo de vida pelágico activo. Tienen un comportamiento altamente evolucionado, el camuflaje y la capacidad de rápidos movimientos, por ser depredadores activos, se ven en la necesidad de poseer glándulas de veneno para poder someter a sus presas.<sup>53</sup>

El veneno de los cefalópodos se ha estudiado desde la década de 1900<sup>54</sup> y las proteínas de la toxina se han caracterizado a partir de las glándulas del veneno de una variedad de especies.<sup>2,27,34,36–38,55,56</sup> Gran parte de las primeras investigaciones sobre la composición del veneno de los cefalópodos emplearon bioensayos y técnicas de fraccionamiento biodirigidas.<sup>10,25,30,54</sup> Estas técnicas proporcionaron la capacidad de asociar una fracción con su actividad específica. Posteriormente, estos estudios observaron una amplia gama de actividades bioquímicas del veneno de cefalópodos, incluida la parálisis flácida,<sup>11,54</sup> la inhibición de la coagulación sanguínea,<sup>10</sup> la digestión

externa,<sup>57</sup> la hemólisis<sup>37,58</sup> y el desprendimiento del músculo del exoesqueleto<sup>30,57</sup> o caparazón.<sup>59</sup>

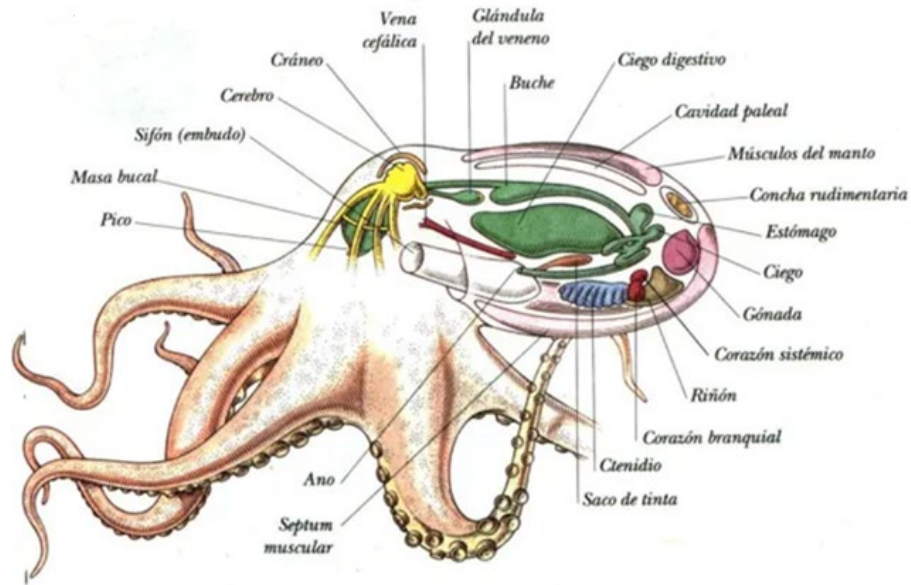
En conjunto, esto demostró que el veneno de cefalópodos incluye componentes para efectuar la captura, el manejo y la digestión de las presas. Además, implica que debería haber una amplia variedad de moléculas altamente bioactivas para cumplir estas funciones. Los primeros esfuerzos para identificar estos componentes condujeron al descubrimiento de aminas biogénicas como la serotonina.<sup>14</sup> y la octopamina.<sup>15</sup> Si bien se descubrió que estos tenían funciones neurológicas importantes,<sup>2,60</sup> no tuvieron en cuenta los potentes efectos tóxicos del veneno de cefalópodo, como la parálisis<sup>54</sup> y el desprendimiento muscular,<sup>30,57</sup> que fueron causados por componentes proteicos. La caracterización molecular de las proteínas en los primeros estudios a menudo se limitaba a informar la masa molecular, el punto isoeléctrico de una fracción<sup>25,30</sup> o simplemente la composición de aminoácidos en general.<sup>35</sup> Como resultado, muy pocas proteínas dentro del arsenal de veneno de cefalópodos han sido funcionalmente caracterizadas y secuenciadas. Las excepciones notables incluyen dos clases importantes de neurotoxinas: SE-cefalotoxina,<sup>36</sup> que parece estar restringida a los decapodiformes,<sup>61,62</sup> y péptidos similares a la taquicinina que se han aislado de las glándulas salivales posteriores (GSP) de varias especies de octópodos.<sup>27,38,56,63</sup>

## **2.4 Octópodos**

De las ~800 especies de cefalópodos conocidas, los octópodos comprenden más de 150 especies en todo el mundo.<sup>64</sup> Todos poseen la misma anatomía: ocho brazos conectados a una cabeza que contiene ojos, piezas bucales y un cerebro en forma de rosquilla, seguidos de un manto ovoide que encierra a los órganos internos **[Fig. 3].**<sup>65</sup>

Muchos octópodos exhiben un comportamiento depredador altamente especializado, en el que una presa de caparazón duro es penetrada perforando con la rádula, o en las partes vulnerables como las membranas de los tallos de los ojos. Luego, el animal que está dentro es paralizado y depredado mediante una inyección de saliva venenosa.<sup>7</sup> El veneno del pulpo se produce en las glándulas salivales posteriores (GSP) y se administra a la presa a través de las papilas salivales.<sup>67</sup> Esto se ha observado en al menos siete

especies de octópodos en una amplia variedad de presas, incluidos crustáceos, bivalvos, gasterópodos<sup>7</sup> e incluso nautilus.<sup>68</sup>



**Figura 3.** Anatomía del pulpo.<sup>66</sup>

Los primeros estudios en octópodos del género *Eledone* demostraron que un péptido similar a la taquicinina (Eledoisina) es responsable de los efectos neurotóxicos sobre el cangrejo contenidos en la saliva de esas especies.<sup>69,70</sup> En un estudio anterior sobre la saliva de *Octopus vulgaris* se demostró que induce una parálisis similar en los cangrejos,<sup>10</sup> pero se descubrió que la molécula responsable tiene un masa molecular mucho mayor.<sup>54</sup> Desafortunadamente, no se obtuvo una secuencia de aminoácidos en este estudio, por lo que no está claro si esto es similar a la gran proteína tóxica, la SE-cefalotoxina, descubierta más tarde en la sepia.<sup>25</sup> Ensayos adicionales en la saliva de *O. vulgaris* y *Eledone cirrhosa* han demostrado una variedad de efectos potentes que incluyen parálisis rápida,<sup>71</sup> hemólisis<sup>58</sup> y actividad proteolítica que conduce al desprendimiento muscular.<sup>30</sup> Recientemente, un estudio de extractos de GSP de cuatro especies antárticas encontró actividades hemolíticas, proteolíticas, fosfatasa alcalina, acetilcolinesterasa y fosfolipasa similares a las de la SE-cefalotoxina.<sup>37</sup> Juntos, estos estudios demuestran una variedad potencialmente diversa de proteínas tóxicas que se encuentran en todas las especies. A pesar de este potencial, se sabe sorprendentemente poco sobre la composición molecular de los venenos en este grupo diverso y poco

estudiado y, en términos generales, los pulpos, las sepias y los calamares se han identificado como un área de investigación de venenos notoriamente descuidada.<sup>27</sup>

Una de las especies de pulpo más notorias y comparativamente mejor estudiadas es el pulpo de anillos azules del sur, *Hapalochlaena maculosa*, que contiene la potente neurotoxina tetrodotoxina (TTX) en su saliva.<sup>23,72-76</sup> TTX es responsable de muertes humanas resultantes de *Hapalochlaena sp.* por envenenamiento.<sup>77</sup> Se cree que el origen de TTX en *H. maculosa* es una bacteria endosimbiótica, debido a la aparición convergente de TTX entre filos no relacionados.<sup>78,79</sup> A pesar de la atención prestada a la toxicidad de esta especie, sus toxinas proteicas se han descuidado en gran medida, y hasta la fecha no se ha llevado a cabo ninguna secuenciación a nivel de proteína. De manera similar, el pulpo de arena del sur, *Octopus kaurna*, también contiene al menos una molécula, una taquicina, Oct-TkIII, que puede actuar como una neurotoxina en su GSP.<sup>27,56</sup> Aunque menos potentes que la TTX, las taquicinas son neurotoxinas proteicas eficaces capaces de actuar sobre tejidos tanto de vertebrados como de invertebrados y se cree que son el principal componente paralizante de varios venenos de pulpo.<sup>31,38,56</sup>

#### 2.4.1 Glándulas Salivales Posteriores (GSP)

En los octópodos existen tres tipos de glándulas salivales que se encuentran asociadas con la masa bucal: la glándula submandibular y las glándulas salivales anterior y posterior, estas glándulas salivales se encuentran en pares [Fig. 4].

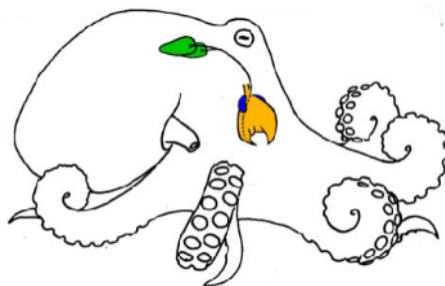


Figura 4. Glándulas salivales de los octópodos; en verde las glándulas salivales posteriores y en azul las anteriores.<sup>27</sup>

La glándula salival posterior (GSP) se encuentra detrás de la masa bucal en los octópodos. Consiste en numerosos lóbulos formados por túbulos que producen

secreciones viscosas, las cuales son transportadas por un ducto muscular hacia un canal terminal en común, que se encuentra abierto dentro de la cavidad bucal anterior, cerca del ápice de la papila salival, [Fig. 5].

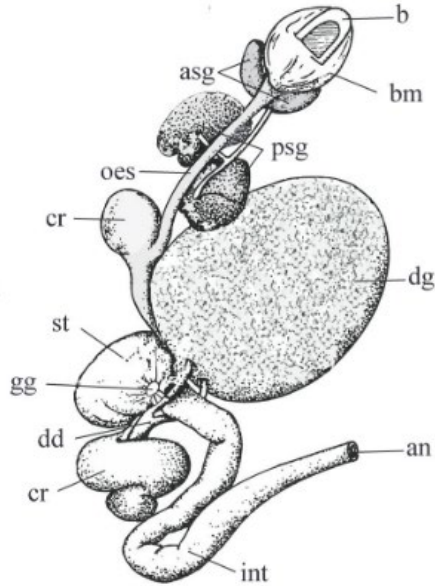


Figura 5. Tracto digestivo de los octópodos.

Los términos y abreviaturas siguen las descripciones originales y, a pesar de las analogías, no son sinónimos aquí.; an, ano; asg, glándula salival anterior; b, pico; bm, masa bucal; cr, buche; dd, conducto digestivo; dg, glándula digestiva; gg, ganglio gástrico; int, intestino; psg, glándula salival posterior; st, estómago; oes, esófago.<sup>80</sup>

#### 2.4.1.1 Sustancias de importancia en las glándulas salivales

A pesar de que las tres glándulas salivales juegan un rol importante en la alimentación del pulpo, el moco secretado por las glándulas salivales anteriores y constituido por glicoproteínas neutras, ácido siálico, dipeptidasa e hialuronidasa, es el vehículo de entrega de los compuestos bioactivos secretados por las glándulas salivales posteriores.<sup>81</sup> Las glándulas salivales posteriores (GSP), producen una secreción que es usada para paralizar a las presas unos segundos después de su captura. Las GSP son responsables de la producción de diferentes sustancias biológicamente activas, los efectos tóxicos de la secreción de las glándulas, se atribuye a numerosas aminas biogénicas, como tiramina, histamina, acetilcolina, octopamina y serotonina. Adicionalmente, se han identificado componentes hipotensivos (p.e., taquicininas), algunas enzimas que han sido identificadas en numerosas especies de cefalópodos,

como la S1 peptidasa, la carboxipeptidasa, fosfolipasa A2, hialuronidasa, entre otros [Figura 6].<sup>80</sup>

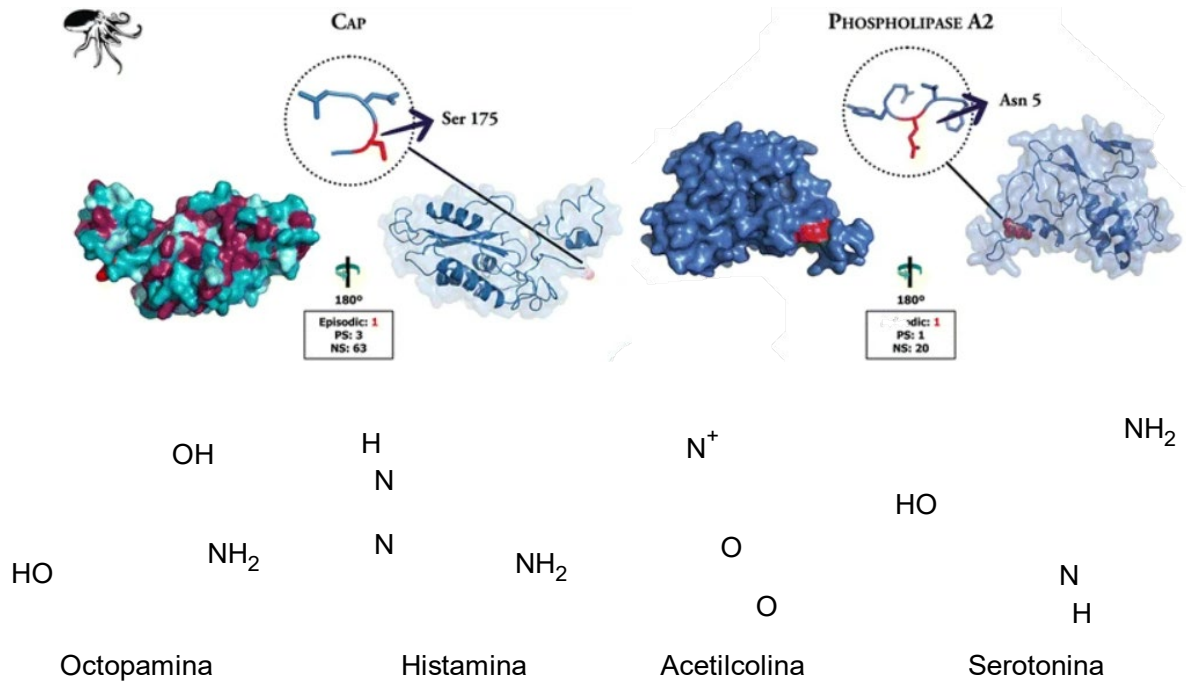


Figura 6. Biomoléculas encontradas en la saliva de cefalópodos.<sup>34,1</sup>

Tabla 1. Principales compuestos obtenidos, técnicas de purificación e identificación en cefalópodos.<sup>40</sup> Modificada.

Especie	Compuesto(s) aislado(s)	Purificación	Identificación
<i>Eledone moschata</i>	Eledoisina <sup>69</sup>	-Cromatografía de intercambio iónico.	- Cromatografía en papel. - Electroforesis. - Digestión enzimática.
<i>Eledone cirrhosa</i>			
<i>Octopus vulgaris</i>	Cefalotoxina <sup>54</sup>	- Extracción ácida.	- Reacción positiva de biuret y ninhidrina. - Electroforesis
	$\alpha$ - y $\beta$ -Cefalotoxina <sup>25</sup>	- Filtración en Gel.	- Filtración en Gel. - Electroforesis.
	Enzimas digestivas <sup>10</sup>	- Extracción básica.	- Electroforesis.
	Taquicininas <sup>38</sup> (OctTK-I, OctTK-II)	- Cromatografía de intercambio iónico. - Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	- nano ESI-TOF-EM.
	Aminas biogénicas <sup>14</sup> (Tiramina, Histamina, Serotonina, Acetilcolina, Octopamina y Taurina)	- Extracción con acetona y alcohol.	-Reacción de fluorescencia. - Reacción de GEBAUER-FULNEGG.



	<u>Histonas H2A, H2B</u> <sup>82</sup>	- Digestión enzimática. - Fase reversa C-18. - CLAR-EM/EM.	-Replicación. -Secuenciación nanoCLAR-EM/EM.
<i>Sepia esculenta</i>	<u>SE-cefalotoxina</u> <sup>36</sup>	- CLAR- Filtración en Gel. - CLAR-Hidroxiapatita.	- Digestión enzimática. - CLAR fase reversa. - Método de Lowry <i>et al.</i> - CLAR-Filtración en Gel. - SDS-PAGE.
<i>Sepia latimanus</i>	<u>Proteína PLA2</u> <sup>27</sup>	- RNeasy® Kits QIAGEN. - Oligotex Direct Mrna Midi Kit QIAGEN.	- Electroforesis. - Secuenciación.
<i>Hapalochlaena fasciata</i> <i>Hapalochlaena lunulata</i>	<u>Tetrodotoxina</u> <sup>23</sup>	- Filtración en gel. - Cromatografía de intercambio iónico.	- LKB Multiphor instrument. - Resonancia magnética.
<i>Hapalochlaena maculosa</i>	<u>Proteína CAP</u> <sup>27</sup>	- RNeasy® Kits QIAGEN. - Oligotex Direct Mrna Midi Kit QIAGEN.	- Electroforesis. - Secuenciación.
<i>Octopus kaurma</i>	<u>Quitinasa</u> <sup>27</sup> <u>Taquicinina</u> <sup>27</sup> (OctTK-III)	- RNeasy® Kits QIAGEN. - Oligotex Direct Mrna Midi Kit QIAGEN.	- Electroforesis. - Secuenciación.
<i>Sepia pharaonis</i>	<u>Agente antibacteriano</u> <sup>83</sup>	- Extracción básica. - Cromatografía de filtración en Gel.	- CLAR fase reversa. - SDS-PAGE. - Espectroscopía de infrarrojo (IR) y de dicroísmo circular (CD).
<i>Sepia prashadi</i>	<u>Agente potencial antibacteriano y antiviral</u> <sup>84</sup>	- Extracción básica. - Cromatografía de filtración en Gel.	- CLAR fase reversa. - Ensayo de Bradford. - SDS-PAGE. Espectroscopía de fluorescencia. - Espectroscopia de Infrarrojo por la transformada de Fourier. - Espectroscopía de dicroísmo circular (CD). - MALDI-TOF-EM.
<i>Sepia pharaonis</i>	<u>Agente potencial anti metastático</u> <sup>85</sup>	- Extracción básica. - Cromatografía de filtración en Gel.	- CLAR fase reversa. - SDS-PAGE. - Espectroscopía de infrarrojo (IR) y de dicroísmo circular (CD).

## 2.5 Péptidos Marinos

Los péptidos son importantes productos naturales bioactivos, los cuales se encuentran presentes en una gran variedad de especies marinas, en muchos casos los orígenes y los roles que ocupan son desconocidos.

Las neurotoxinas fueron los primeros péptidos descubiertos y aislados en las especies marinas. El amplio espectro de bioactividad de los péptidos marinos tiene un

alto valor nutracéutico y médico, llamando la atención de la industria farmacéutica y nutracéutica, esperando que pueda ser utilizado como tratamiento y/o prevención de algunas enfermedades.

Existen dos productos farmacéuticos representativos que son derivados de los péptidos marinos, la ziconotida y el brentuximab vedotin **[Tabla 2]**, el primero es un péptido marino natural y el segundo un derivado peptídico, ambos actualmente son fabricados a partir de síntesis química.

El actual interés de los péptidos marinos y su avance a través de nuevas tecnologías y colaboraciones entre investigadores institucionales e industriales ha generado grandes expectativas en los péptidos marinos para su uso en nuevas terapias para el tratamiento de diversos padecimientos.<sup>86</sup>

### **2.5.1 Neuropéptidos**

Los neuropéptidos son pequeñas sustancias proteicas producidas y liberadas por las neuronas a través de la ruta secretora regulada y actúan sobre sustratos neurales. Son sintetizados y utilizados por una neurona. Puede actuar cerca como agentes autocrinos y paracrinos y a distancia como agentes endocrinos. De hecho, casi todos los neuropéptidos se encuentran como hormonas peptídicas y viceversa. Es importante tener en cuenta que los neuropéptidos no están solo en el sistema nervioso, sino que actúan dentro y fuera del SNC.

Todos los neuropéptidos actúan como transductores de señales a través de receptores de superficie celular. La mayoría de los neuropéptidos actúan en receptores acoplados a proteínas G. Esta es una distinción importante para los receptores acoplados a canales iónicos, ya que la señalización acoplada a proteína G es consistente con los neuropéptidos que inducen una respuesta más lenta u moduladora en comparación con el neurotransmisor, **[Tabla 3]**.<sup>87</sup> En el caso de los pulpos el Neuropéptido Y (NPY), es una molécula neurosecretora evolutivamente conservada que está implicada en una serie de funciones en todos los taxones y en la regulación del comportamiento alimentario y la maduración reproductiva en Octópodos. Sin embargo, se sabe poco sobre el circuito molecular preciso de los comportamientos y procesos fisiológicos mediado por el NPY,

que probablemente implican una compleja interacción de múltiples moléculas de señalización en regiones específicas del cerebro.<sup>88</sup>

Tabla 2. Péptidos marinos bioactivos y su secuencia de aminoácidos y/o estructuras<sup>86</sup>

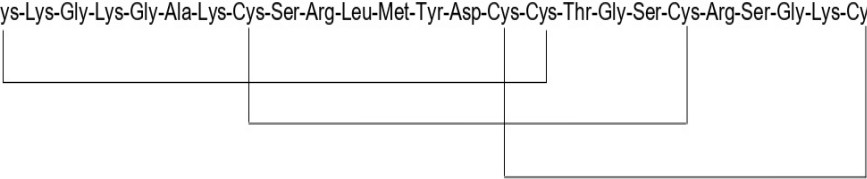
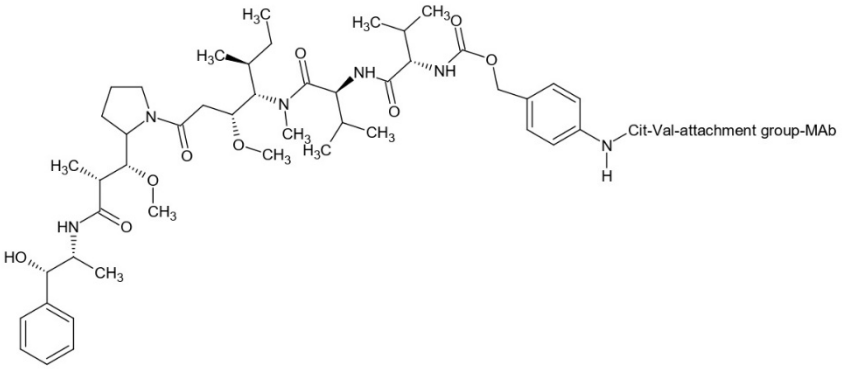
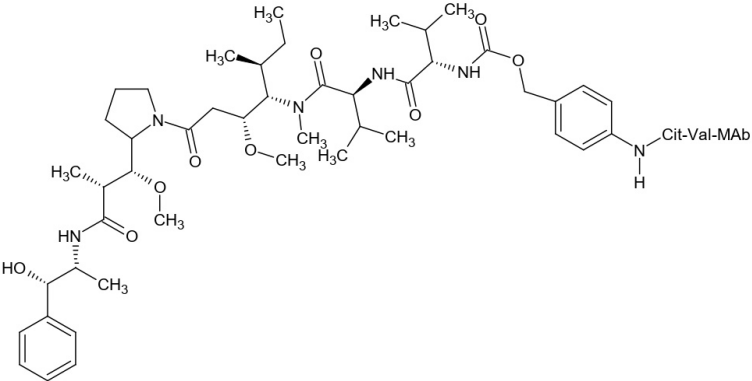
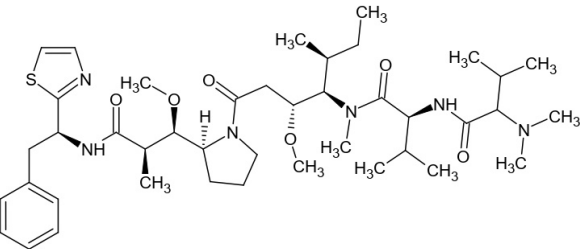
Péptidos	IUPAC/Secuencia de aminoácidos
<b>Ziconotida</b>	<p>Cys-Lys-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Cys-Ser-Arg-Leu-Met-Tyr-Asp-Cys-Cys-Thr-Gly-Ser-Cys-Arg-Ser-Gly-Lys-Cys</p> 
<b>Brentuximab vedotin</b>	
<b>Glembatumumab vedotin</b>	
<b>Dolastatina 10</b>	

Tabla 3. Familia de neuropéptidos. Modificado<sup>87</sup>

<b>Familia</b>	<b>Neuropéptidos activos</b>
<b>CGRP</b>	CGRP ( $\alpha$ , $\beta$ ), calcitonina, amilina, adrenomedulina (AM1,2)
<b>Glucagón/Secretina</b>	PACAP, VIP, glucagón, secretina, GHRH, GIP
<b>Vasopresina/oxitocina</b>	Vasopresina, oxitocina
<b>Gastrina</b>	Gastrina, CCK
<b>Somatostatina</b>	SS, cortistatina
<b>F- y Y- amidas</b>	NPY, PPY, NPF
<b>Taquicininas</b>	Sustancia P, neuroquinina A, neuropéptido K, neuropéptido gamma
<b>Tensinas</b>	Angiotensinas, neurotensinas, bradiquinina
<b>Neuropéptidos relacionados con CRH</b>	CRH, urocortinas, urotensinas
<b>Neuropéptidos de adiposa</b>	Leptina, adiponectina, resistinas

CGRP: Gen relacionado al péptido de la Calcitonina; PACAP: Polipéptido del adenilato ciclasa de la pituitaria; VIP: Polipéptido Intestinal Vasoactivo; GHRH: Hormona Liberadora de la Hormona del Crecimiento; GIP: Polipéptido inhibidor gástrico; CCK: Colecistoquinina; NPY: Neuropéptido Y; PPY: Polipéptido pancreático; NPF: Neuropéptido FF.

Otro ejemplo de neuropéptidos encontrados en los pulpos son la Sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), así como la proteína del neurofilamento y la proteína ácida fibrilar glial también se localizaron en la retina del pulpo medio inmunocitoquímica.<sup>89</sup>

### 2.5.2 Taquicininas

Las taquicininas (TKs) son neuropéptidos antiguos y conservados. La taquicinina más conocida es la sustancia P, la cual junto a otras taquicininas en mamíferos está implicada en la salud y enfermedad con roles importantes en el dolor, inflamación, cáncer, depresión, sistema inmune, función gastrointestinal, hematopoyesis, proceso sensorial y en la regulación hormonal. En los invertebrados, poseen diversas funciones en el Sistema Nervioso Central e Intestinal. Poseen funciones aferentes y eferentes, participación en la regulación de diferentes procesos fisiológicos, incluyendo los mecanismos sensoriales periféricos, tales como la nocicepción y la inflamación, así como funciones autónomas como la contracción del músculo liso en el sistema vascular, gastrointestinal y genitourinario. Además, se encuentran involucradas en las vías del sistema nervioso central que median el dolor, la ansiedad, la coordinación motora y la cognición.

Las taquicininas han sido identificadas en mamíferos y otros vertebrados, así como invertebrados; la primera TK identificada fue la eledoisina, aislada de las glándulas salivales del cefalópodo *Eledone moschata* y se observó que tenía el mismo efecto en músculo liso que la sustancia P. La sustancia P es la taquicinina prototípica, siendo el primer neuropéptido aislado de tejido cerebral en 1931, y siendo reconocido desde un inicio que se producía en el cerebro e intestino.<sup>90</sup>

Hasta la fecha se han descrito tres subtipos de receptores en vertebrados, conocidos como receptor de neuroquinina 1 (NK1R), receptor de neuroquinina 2 (NK2R) y receptor de neuroquinina 3 (NK3R). Los receptores de neuroquinina actúan a través de proteínas acopladas a proteínas G/11, incrementando los niveles de inositol trifosfato y diacilglicerol (DAG) dentro de las células que están unidas por un agonista. Asimismo, se ha descubierto que varios fragmentos característicos de aminoácidos de las taquicininas son cruciales para las relaciones de estructura-actividad de las TKs.<sup>56</sup>

### 2.5.3 Taquicininas de invertebrados: Octópodos

Los pulpos secretan una gran variedad de biomoléculas activas que provienen de sus GSP para alimentarse de presas vertebradas como invertebradas. El mecanismo de las taquicininas están mediadas por uno o más receptores que actúan en los receptores de su presa y no en los endógenos.<sup>56</sup>

Las TKs con un carboxilo terminal FXGLM-amida, son producidas en las glándulas salivales de los cefalópodos, eledoisina y las pulpo-taquicininas. Estas taquicininas son liberadas a la presa y están destinadas a actuar sobre los receptores exógenos.<sup>90</sup> Los péptidos que tienen la secuencia -Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> en su carbono terminal, han sido identificadas como “taquicininas de invertebrados (*inv*-TK)”.<sup>91</sup>

La primera *inv*-TK fue la eledoisina, la cual fue caracterizada de las glándulas salivales del octópodo *Eledone moschata*, como un componente estructuralmente no identificado que inducía la reducción de la presión arterial en perros y conejos, y estimulaba el tejido liso intestinal en perros y ratas.

En 1962, la estructura completa de la eledoisina fue dilucidada, siendo pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>; posteriormente se encontró que compartía la secuencia terminal con las taquicininas de los vertebrados (-Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>).

Las *inv*-TKs, que muestran grandes similitudes con las taquicininas de los vertebrados, parecen haber evolucionado por separado en las glándulas salivales de algunos invertebrados que utilizan la saliva en sus interacciones con sus presas (vertebrados). Por lo cual, las *inv*-TK pudieron haber evolucionado por mimetismo para causar vasodilatación u otras acciones en sus presas vertebradas.<sup>92</sup>

Por otra parte, se descubrieron algunos péptidos *inv*-TK con el fragmento terminal característico de las taquicininas, la Oct-TK I y II, estos fueron caracterizados a partir de la glándula salival posterior de *Octopus vulgaris* y la Oct-TK III aislada de *Octopus kurna* [Tabla 4].<sup>91</sup>

## 2.6 *Octopus maya*

El pulpo rojo, *Octopus maya* [Fig. 7], es una especie endémica de la plataforma continental de la Península de Yucatán. *O. maya* habita en fondos de roca caliza y sedimento arenoso-limoso cubierto por praderas de *Thalassia testudinum*, también se pueden encontrar en conchas vacías de moluscos gasterópodos y cuevas existentes en la loza cárstica del fondo, o entre rocas coralinas a una profundidad máxima de 50 m. Su distribución espacial abarca desde las aguas adyacentes a la Isla del Carmen en Campeche hasta Isla Mujeres, Quintana Roo, [Fig. 8].<sup>95</sup>

La reproducción de *O. maya* es continua, con dos picos anuales de madurez y desove que ocurren, uno en primavera y otro de mayor intensidad en otoño. *O. maya* es una especie semélpara, ya que las hembras realizan un único desove anual, periodo en el que se dedica exclusivamente al cuidado de los huevecillos.

Tabla 4. Taquicininas de Octópodos


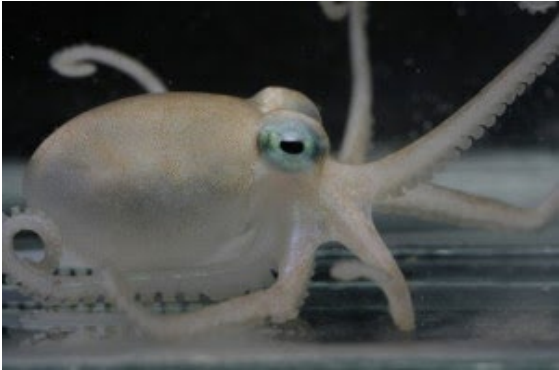

Pulpo	Taquicininas
<p><i>Octopus vulgaris</i><sup>93</sup></p> 	<p>Oct-TK I: Lys-Pro-Pro-Ser-Ser-Ser-Glu-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub></p> <hr/> <p>Oct-TK II: Lys-Pro-Pro-Ser-Ser-Ser-Glu-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub></p>
<p><i>Octopus karna</i><sup>56</sup></p> 	<p>Oct-TK III: Asp-Pro-Pro-Ser-Asp-Asp-Glu-Phe-Val-Ser-Leu-Met-NH<sub>2</sub></p>
<p><i>Eledone cirrhosa</i><sup>94</sup></p> 	<p>Eleloisina: Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub></p>



Figura 7. Pulpo rojo, *Octopus maya*.

Durante cerca de dos meses la hembra los limpia y protege con ayuda de sus tentáculos y sifón hasta la eclosión, para morir posteriormente por inanición. Las crías son de desarrollo directo, ya que al eclosionar poseen todas las características anatómicas y conductuales propias de un pulpo adulto e incluso responden a los estímulos de coloración, textura de piel y expulsión de tinta. *O. maya* es una especie con crecimiento rápido y ciclo de vida corto, la edad máxima se ha estimado en alrededor de 12-18 meses.<sup>98</sup>



Figura 8. Distribución del pulpo rojo, *Octopus maya*.<sup>96,97</sup>



Las crías son de desarrollo directo, ya que al eclosionar poseen todas las características anatómicas y conductuales propias de un pulpo adulto e incluso responden a los estímulos de coloración, textura de piel y expulsión de la tinta. *O. maya* es una especie con crecimiento rápido y ciclo de vida corto, la edad máxima se ha estimado en alrededor de 12 a 18 meses. En estudios recientes se ha encontrado que el pulpo rojo es un organismo ectotérmico, lo que indica que su temperatura corporal depende de la temperatura del medio exterior.<sup>98</sup>

### **2.6.1 Importancia del *Octopus maya*, en Yucatán**

La pesca en Yucatán se ha concentrado por largo tiempo en la explotación de los recursos demersales (peces que se encuentran cerca de la plataforma continental y superficie) y bentónicos (organismos que se encuentran en las profundidades, cerca del fondo litoral). A pesar de las descargas comerciales pesqueras, las cuales comprenden un gran número de especies, solo 24 de ellas aportan los mayores volúmenes de captura. Sobresalen el pulpo (52%) y el complejo mero-pargos (17%) que son el grupo de especies más importantes para la flota menor, así como para la mayor. La pesca del pulpo genera un total de 15 000 empleos directos y una derrama económica anual de aproximadamente 360 millones de pesos. En la actualidad, el pulpo es el recurso pesquero más importante de Yucatán y en el puerto de Sisal, se extrae el 5% de las capturas de *O. maya*.<sup>99</sup>

La pesca de este pulpo, *O. maya*, se realiza por el método del “gareteo” que consiste en colocar en la popa y la proa de la embarcación al menos una vara (generalmente mangle) llamada “jimba”, de las cuales cuelgan líneas con carnada y un plomo [Fig. 9]. Dicho método de pesca es sustentable, debido a que permite hacer una selección de las presas con talla legal y así las que no estén aptas, devolverlas a su hábitat.

### **2.6.2 Estudio de GSP en *Octopus maya***

Nuestro grupo de investigación reportó el primer estudio sobre la composición química de las GSP de *O. maya* y el efecto sobre sus presas naturales (crustáceos). Las GSP recolectadas de los subproductos de la pesca se extrajeron con agua destilada, generando un extracto acuoso.

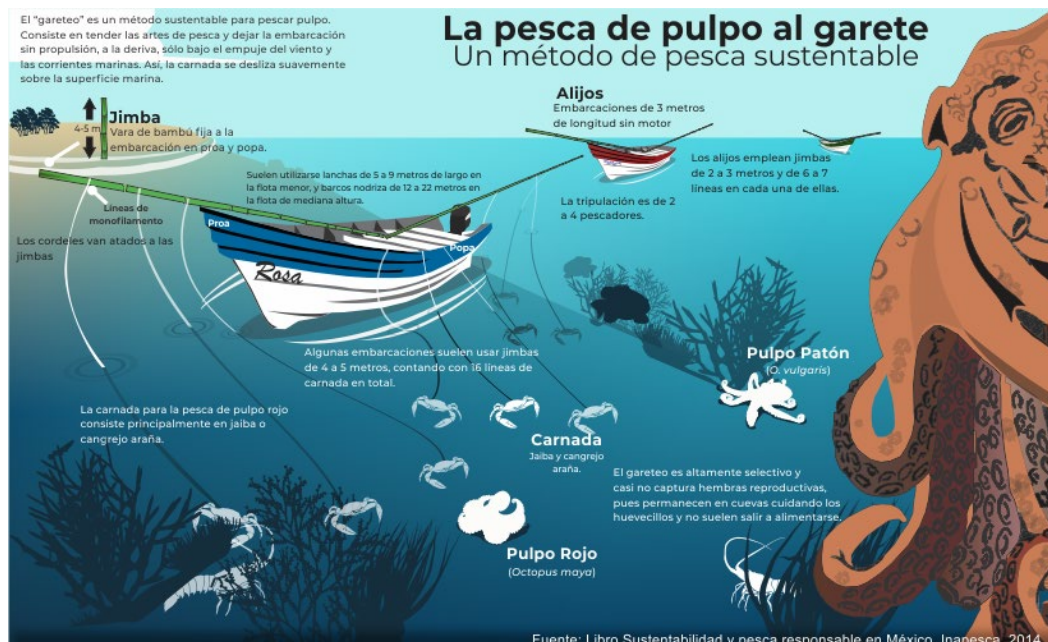


Figura 9. Representación de la pesca del pulpo rojo por el método artesanal de "jimba y gareteo".<sup>97</sup>

Este extracto se separó por masa molecular a través de una membrana de ultrafiltración (3 kDa), generando dos fracciones diferentes: 1) metabólica, PM > 3 kDa, que indujo la muerte del cangrejo fantasma, *Ocypode quadrata*, después de 20 min, y 2) neurotóxica, PM < 3kDa, que provocó movimientos involuntarios, temblores y cambios posturales.

La fracción neurotóxica se separó mediante una técnica de fase reversa (extracción en fase sólida, por sus siglas en inglés SPE) C18-U, dando lugar a una fracción paralizante y una fracción relajante (90:10 H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN). El rendimiento de extracto crudo fue superior al esperado dado que el pulpo genera saliva *in situ*, pero el tejido de las GSP se extrajo con agua; por lo tanto, también se extrajeron sales, carbohidratos y proteínas que pueden haber estado presentes en la saliva. No obstante, el extracto fue activo y capaz de inducir la parálisis del cangrejo después de 5 min y la muerte después de 20 min (4 mg/mL, 100 µL).

La separación por ultrafiltración (3 kDa) ayudó a aislar la fracción metabólica (que comprende principalmente tripsina y quimotripsina con PM ~24 y 25 kDa, respectivamente) de la fracción neurotóxica.<sup>27</sup> La fracción neurotóxica indujo parálisis,

relajación muscular y cambios posturales en el cangrejo fantasma en menos de un minuto.

Los efectos neurotóxicos duraron 2 h seguidos de la recuperación del cangrejo. La fracción metabólica causó la muerte después de 20 min, pero no hubo evidencia de efectos neurotóxicos; la disección después de 1 h de estos cangrejos reveló daño ejercido por las enzimas proteolíticas en la fase metabólica [Fig.10A], mientras que esto no se observó con la fracción neurotóxica.

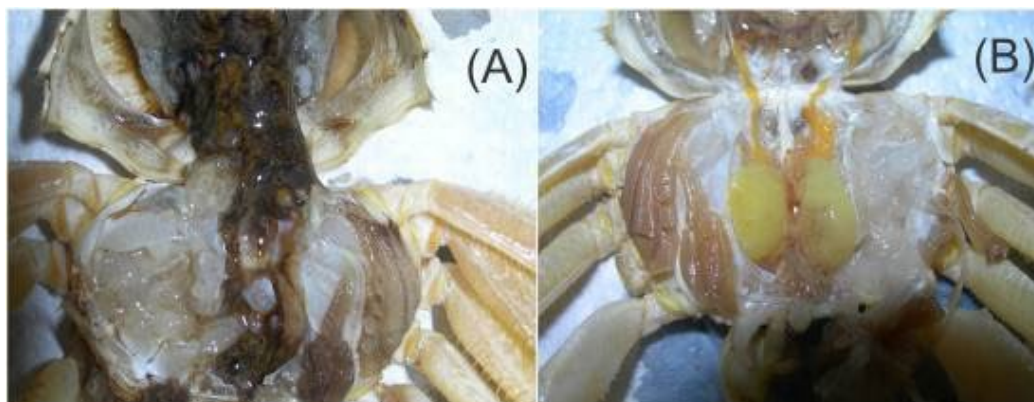


Figura 10. Efectos de la saliva de *O. maya* en el cangrejo fantasma: (A) hidrólisis tisular y muerte causada por la fracción metabólica (> 3 kDa); (B) órganos aún intactos después de que el cangrejo se recuperara de la parálisis y relajación inducida por la fracción neurotóxica (< 3 kDa).

### 2.6.2.1 Fracción paralizante

La elución con agua de la fracción neurotóxica aplicada en un cartucho C18-U SPE dio como resultado una fracción que provocó la parálisis total del cangrejo. Sin embargo, las dosis de la fracción paralizante (25 mg) fueron superiores a las de la fracción neurotóxica (4 mg). La cromatografía en capa fina en fase normal mostró que la fracción neurotóxica era polar con los compuestos revelados con ninhidrina, lo que sugería un origen peptídico o de amina primaria. La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en fase reversa usando el detector evaporativo de dispersión de luz (DEDL o ELSD en inglés) mostró dos picos en el intervalo de 3 a 4.8 min [Fig. 11], como se esperaba, ya que los compuestos se eluyeron del cartucho SPE con agua.

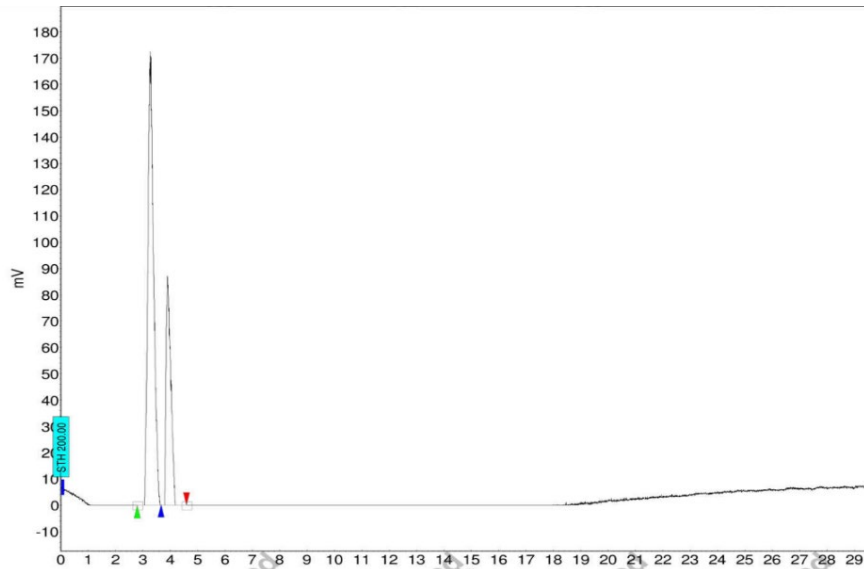


Figura 11. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de la fracción paralizante. Análisis de la fracción paralizante mediante CLAR de fase reversa.

El análisis reveló 17 aminoácidos en la fracción paralizante [Fig. 12], incluidas la alanina y la glutamina, que se encuentran en el sistema nervioso central de los cangrejos y las langostas.<sup>100</sup> Algunos de estos aminoácidos están implicados en la inhibición muscular, por ejemplo, el ácido glutámico, que puede transformarse en ácido gamma-aminobutírico, un inhibidor de la función de las motoneuronas en los pereiópodos de los cangrejos.<sup>101</sup>

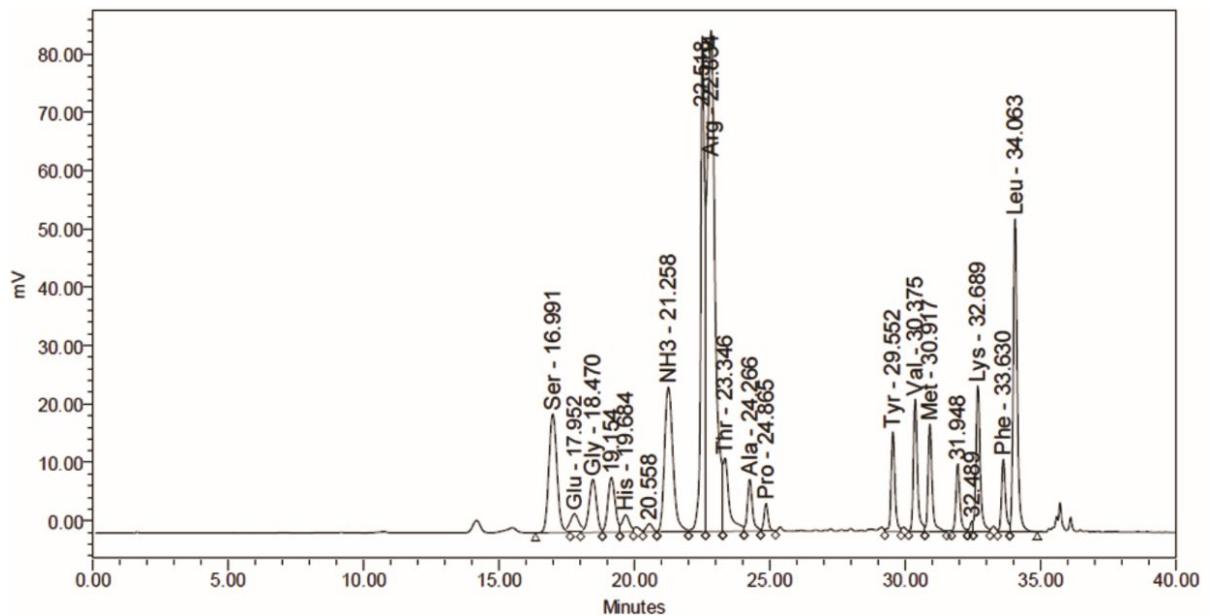


Figura 12. Perfil de aminoácidos de la fracción paralizante.

### **2.6.2.2 Fracción relajante**

Después de la separación de la fracción paralizante, el cartucho C18-U se eluyó en gradiente con H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (95:5, 90:10, 80:20 y 50:50). Todas las fracciones fueron evaluadas en el ensayo neurotóxico; solo las fracciones 95:5 (baja actividad) y 90:10 (F2, 2 mg/mL, 100 µL) causaron relajación en el cangrejo fantasma. Ambas fracciones indujeron una relajación reversible y el cangrejo se recuperó y no presentó síntomas después de dos horas. Dos días después, ningún cangrejo había muerto.

La separación de la fracción relajante (F2) con el cartucho SCX-SPE condujo a una fracción con fuerte actividad sobre el cangrejo (F3, 2% NH<sub>4</sub>OH en MeOH, dosis de 1 mg/mL, 100 µL); el cangrejo se relajó después de 10 s. El análisis CLAR de fase reversa reveló un pico único principal, que a su vez se separó mediante una ejecución de CLAR semipreparativa (5 mg/25 µL) y se recogió el pico principal. El análisis estructural indicó que se aisló serotonina, confirmando la identidad mediante la inyección de un estándar de serotonina (2 mg/mL, Sigma Aldrich H9523) en el sistema CLAR. El tiempo de retención fue idéntico al pico aislado en la fracción F3. Además, la evaluación de serotonina en el bioensayo neurotóxico (2 mg/mL) indujo relajación en el cangrejo con el mismo tiempo e intensidad.

Por otra parte, se observó que la fracción 95:5 obtenida de la fracción relajante, tenía actividad en menor medida a comparación de la fracción 90:10, sin embargo, al tener actividad es posible su estudio para la búsqueda de algún compuesto de valor biológico.

## **2.7 Técnicas de extracción y separación**

La separación de biomoléculas se basa en las diferencias fisicoquímicas de las moléculas de interés; asimismo, en caso de los neuropéptidos y otras biomoléculas, la secuencia de aminoácidos al ser la única, determina su naturaleza. Por dicha razón existen diversas técnicas para realizar una separación y extracción eficiente aplicando a nuestro favor las características de la biomolécula a estudiar.

### 2.7.1 Extracción de neuropéptidos

Existen tres métodos de extracción de neuropéptidos de un tejido descritos por Conlon;<sup>102</sup> el primero consiste en la extracción con agua en ebullición/1 M de ácido acético, el segundo es la extracción con etanol acidificado y por último, la extracción con hidrocloreuro de guanidina/solución inhibidora de proteasas.

Anteriormente, se han reportado dos de los métodos de extracción de neuropéptidos<sup>1</sup> en la cual se hizo una pequeña variación del método de etanol acidificado utilizando metanol; sin embargo, este último se describe como uno de los mejores métodos para la extracción de neuropéptidos al ser selectivo.

### 2.7.2 Extracción en Fase Sólida (EFS)

El procedimiento consiste en cargar una disolución en una fase sólida, un cartucho, que por lo general contiene el adsorbente que es capaz de retener a los analitos, lavar los componentes no deseados, eluir a los analitos deseados con otros disolventes. Para realizar el acondicionamiento de los materiales utilizados en fase sólida, se pasan por una columna los disolventes orgánicos y/o el agua, para incrementar el área de superficie efectiva y reducir la interferencia, [Fig. 13].<sup>103</sup>

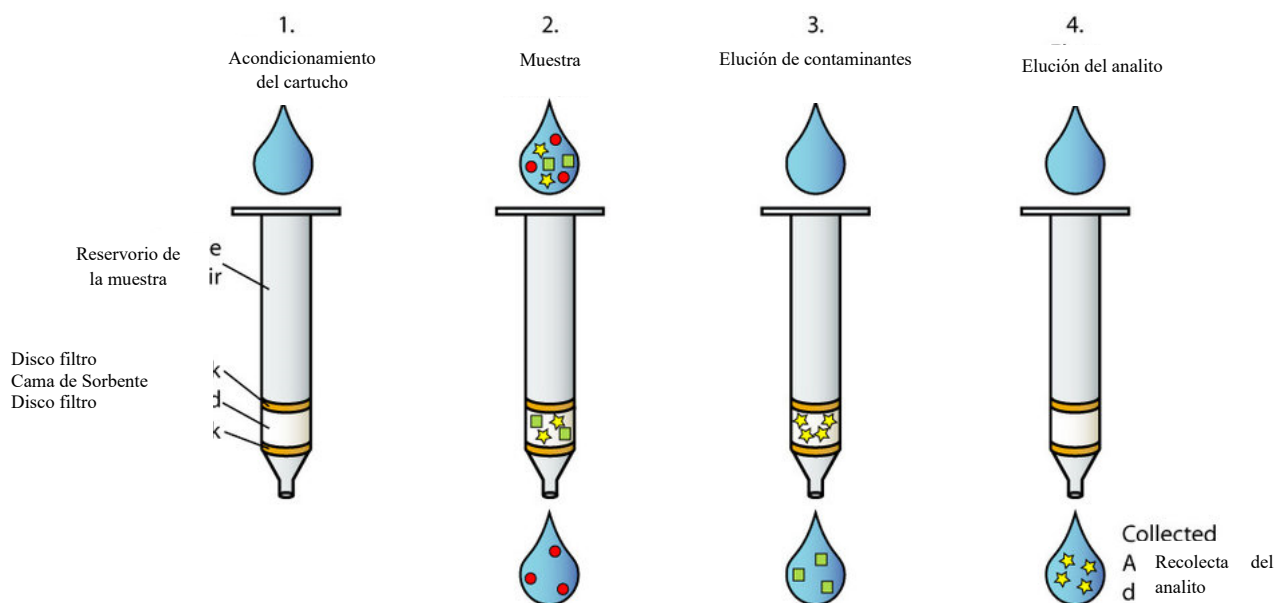


Figura 13. Cromatografía por Extracción en Fase Sólida.<sup>104</sup>

La Extracción en Fase Sólida (EFS) es una técnica útil y versátil para acoplarse a otras técnicas de análisis en la separación y aislamiento de analitos; una de las ventajas que posee la técnica es la concentración de las muestras, la superficie relativamente pequeña de la fase sólida puede soportar un gran volumen de la muestra y proporcionar una retención completa. Por otro lado, la EFS es una herramienta beneficiosa para eliminar las interferencias en las muestras y obtener señales claramente identificables en el análisis cromatográfico.<sup>105</sup>

### **2.7.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)**

Es la técnica que se usa más ampliamente para la separación, identificación y purificación de péptidos bioactivos. El análisis por CLAR, puede reflejar la información de una muestra sin ser necesario recolectar fracciones; las principales ventajas de esta tecnología incluyen la facilidad de operación, una alta resolución y sensibilidad.<sup>106</sup> De esta forma, las cantidades de material a detectar pueden variar desde picogramos y nanogramos (escala analítica) hasta microgramos y miligramos (escala semipreparativa) y multigramos (escala preparativa). Otra ventaja es su tecnología basada en su aplicabilidad a diversos tipos de analitos, desde pequeñas moléculas orgánicas e iones hasta grandes biomoléculas y polímeros, permitiendo la detección sin destrucción que permite la colecta de fracciones para su posterior análisis. La separación y la detección se producen a temperatura ambiente o ligeramente por encima de ella, este método es adecuado para compuestos de estabilidad térmica limitada. En conjunto CLAR es una técnica robusta, eficaz e ideal para la detección de diversos componentes en matrices complejas, que ofrece una amplia gama de modos de separación y la combinación de la separación cualitativa y cuantitativa.<sup>107</sup> Los principales componentes de un equipo de CLAR son los depósitos de disolventes, las bombas de alta presión, la columna a utilizar, los detectores y el equipo de cómputo (registrador) **[Fig. 14]**.<sup>108</sup>



Figura 14. Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, Polaris 211 (Varían, Inc).

#### 2.7.4 Cromatografía en Gel Permeable

También conocida como cromatografía de exclusión por tamaño; como lo indica su nombre, separa las moléculas con base a la extensión de la(s) molécula(s), su mecanismo de separación es filtrar las moléculas y retenerlas en pro de su dimensión de acuerdo al tamaño de poro del gel, las partículas con un volumen mayor podrán pasar a través del mismo fácilmente, en cambio, las que poseen un volumen pequeño, quedarán retenidas por mayor tiempo, [Fig. 15].<sup>106</sup>

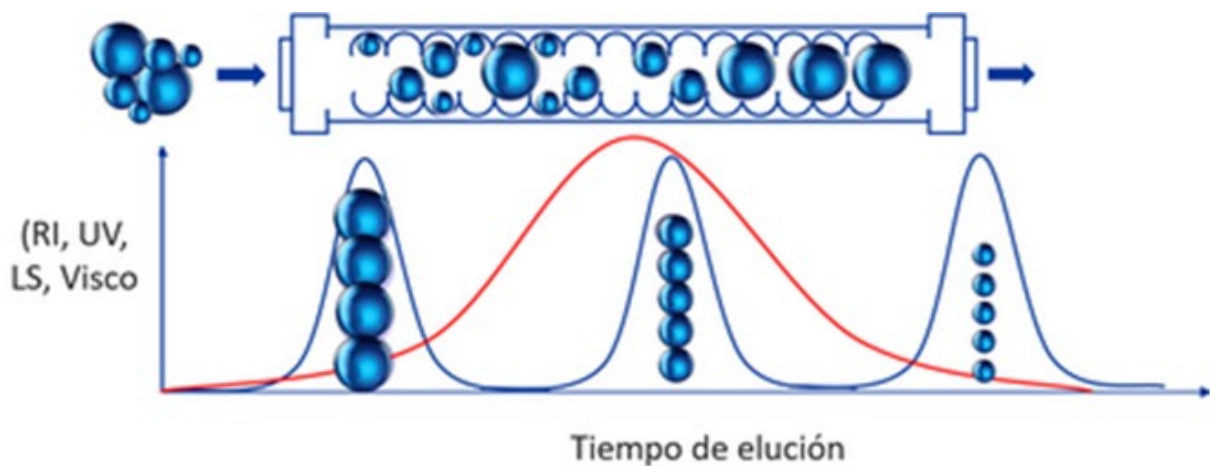


Figura 15. Cromatografía en Gel Permeable.<sup>109</sup>



La cromatografía de exclusión por tamaño es una técnica comúnmente utilizada, debido a la diversidad de las masas moleculares de péptidos y proteínas en los tejidos y extractos biológicos. La cromatografía en gel permeable se ha empleado para muchas funciones, como el intercambio de buffers (desalación), la eliminación de contaminantes no proteicos, eliminación de agregados de proteínas, el estudio de las interacciones biológicas y las condiciones de plegado de las proteínas. También tiene la importante ventaja de ser compatible con las condiciones fisiológicas y en comparación a otros procedimientos cromatográficos, la exclusión por tamaño no es una técnica de adsorción.<sup>110</sup>

### 2.7.5 Cromatografía de Intercambio Iónico

Actualmente la cromatografía de intercambio iónico ha recobrado gran importancia como técnica de separación de biomoléculas; su mecanismo de separación se basa en los grupos funcionales cargados que unen a las moléculas de carga opuesta que contiene la muestra. Las moléculas unidas son eluidas del medio por desplazamiento con la aplicación de un gradiente de concentración de una molécula cargada, Por otra parte, al ser una técnica de adsorción, puede ser usada para capturar moléculas con carga positiva o negativa, [Fig. 16].<sup>106</sup>

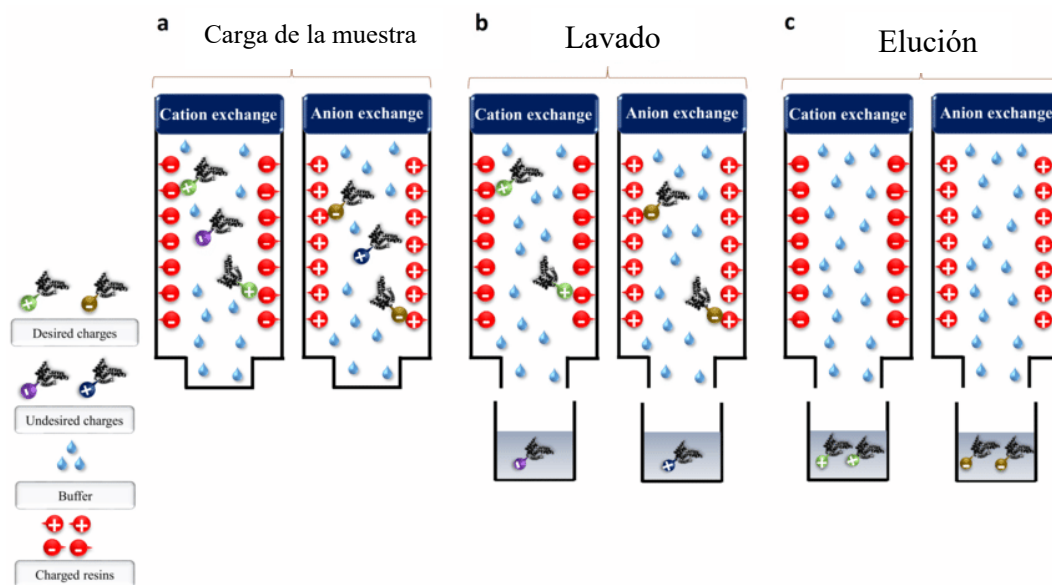


Figura 16. Cromatografía por Intercambio iónico.<sup>111</sup>

## 2.7.6 Cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrómetro de Masas

Recientemente, la Cromatografía de Líquidos es combinada con el equipo de Espectrometría de Masas (CL-EM). Esta técnica es robusta y precisa, debido a que es utilizada como método estándar para la caracterización de secuencia de péptidos en la elucidación de proteínas.<sup>106</sup> La aparición de las técnicas de ionización "suave", que comenzó en 1981 con la introducción del bombardeo de átomos rápidos (FAB), seguido de la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), ha hecho posible este tipo de análisis mediante espectrometría de masas. para proteínas y péptidos, con (0,01%) alta precisión. Los dos últimos métodos se han convertido rápidamente en herramientas importantes para la detección y caracterización de biomoléculas, debido a su sensibilidad, alto rango de masas y la capacidad de analizar mezclas complejas no separadas.<sup>112</sup> Estas técnicas poseen gran importancia debido a su aplicación en la investigación, la industria farmacéutica, agroquímica, alimentaria, entre otras [Fig. 17].<sup>113</sup>

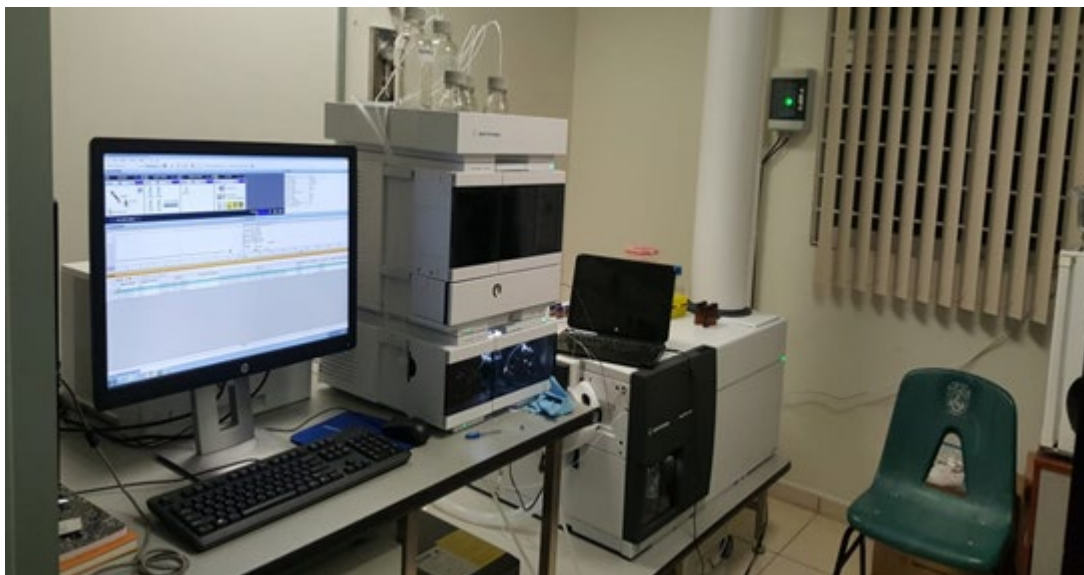


Figura 17. Equipo CL-EMAR Agilent 6545 QTOF (UJAT-C.I.T.A.T).

### 2.7.6.1 Ionización por electrospray en CL-EM e identificación de biomoléculas

En ESI, los iones se forman a partir de péptidos y proteínas al rociar una solución diluida de estos analitos a presión atmosférica desde la punta de un capilar fino. El proceso de rociado, a menudo asistido por nebulización, crea una fina niebla de gotas.

Las gotitas se forman en un campo eléctrico muy alto creado al aplicar un alto voltaje entre la punta del rociador y el contraelectrodo. En este proceso, las gotas se vuelven altamente cargadas. La evaporación del solvente es rápida a partir de estas pequeñas gotas. A medida que las gotitas se evaporan, las moléculas de péptido y proteína en las gotitas toman uno, dos o más protones del solvente para formar uno solo o, más frecuentemente, con carga múltiple (p. ej.,  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$ ) iones. El número de cargas adquiridas por una molécula es aproximadamente equivalente al número de posibles sitios de unión de protones. A medida que las gotitas continúan encogiéndose, la densidad de carga en la superficie de cada gotita aumenta hasta el punto en que la repulsión de la carga supera las fuerzas que mantienen juntas la gotita y los iones solvatados contenidos en ella. Luego, los iones son "emitidos" o "evaporados" desde la superficie de la gota a través de la repulsión culómbica. Los iones se muestrean en la región de alto vacío del espectrómetro de masas para el análisis y la detección de masas. Normalmente, se observa poca o ninguna fragmentación en los espectros de masas ESI normales de péptidos. El solvente típico para péptidos y proteínas es una mezcla de agua y un modificador orgánico como  $CH_3CN$  y hasta un pequeño porcentaje en volumen de ácido acético, fórmico u otro ácido volátil para mejorar la ionización de los componentes de la muestra, [Fig. 18].

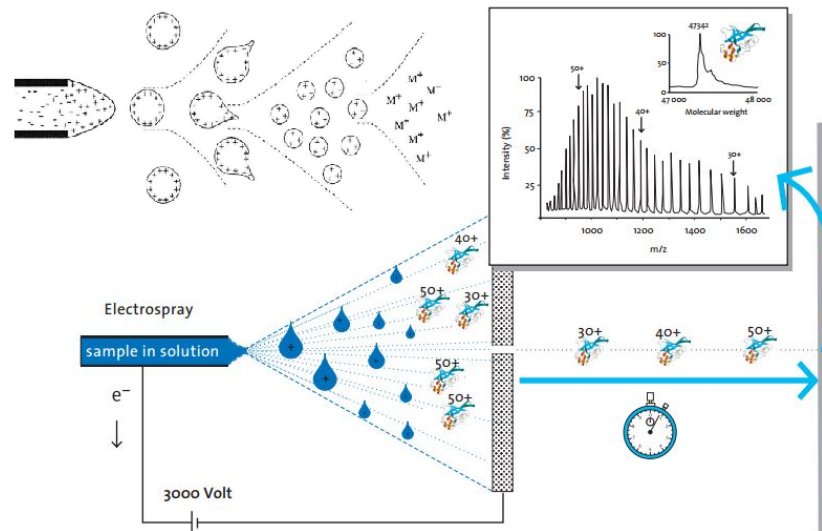


Figura 18. Mecanismo de ionización electro spray.

La ionización por electrospray ha convertido a la LC-MS en un método práctico y robusto para la introducción de muestras porque el instrumento toma muestras de iones en fase gaseosa, a diferencia de los líquidos. El entorno ideal para presentar una muestra a cualquier espectrómetro de masas, independientemente del mecanismo de ionización, es una mezcla de agua pura y disolventes orgánicos volátiles que contengan niveles bajos de ácido o base volátil. Afortunadamente, tales mezclas (p. ej., agua, acetonitrilo y ácido fórmico al 0,05% al 0,1% en volumen) también son las que proporcionan una separación óptima de péptidos y proteínas mediante cromatografía de fase reversa. Desde un punto de vista práctico, LC-MS es una forma eficiente de fraccionar mezclas complejas antes de la MS, lo que ahorra un tiempo valioso del instrumento y evita posibles pérdidas de muestras durante el fraccionamiento preparativo.<sup>114</sup>

### 3. JUSTIFICACIÓN

La industria pesquera, un segmento importante de la industria alimentaria, proporciona una gran variedad de productos marinos. En 2018, la producción mundial de productos del mar fue de 179 millones de toneladas, los cuales generan grandes volúmenes de residuos, estos incluyen desechos de procesamiento y grandes cantidades de aguas residuales. Optimizar el aprovechamiento de los residuos es fundamental para prevenir o minimizar el impacto ambiental. En los últimos años, se ha observado un gran interés por la valorización de los desechos a través del aislamiento de compuestos para uso como productos funcionales, nutracéuticos y farmacéuticos en una amplia gama de aplicaciones comerciales.

La búsqueda de nuevos productos a partir de los organismos marinos está en crecimiento, en específico el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios extraídos de cefalópodos (incluidos los pulpos, las sepias y los calamares), algunos de los cuales pueden usarse para el desarrollo de fármacos.

En México el pulpo rojo, *Octopus maya*, es una especie endémica de la península de Yucatán con un alto valor económico, actualmente constituye el quinto lugar en recursos pesqueros nacionales. Entre el 2001 y 2015 la captura promedio superó las 25 mil toneladas.<sup>39</sup> En la comercialización, el 85% se destina al consumo humano y el 15% corresponde a subproductos, los cuales son desechados al mar o confinados al basurero durante su evisceración. Dentro de estos subproductos, se encuentran las glándulas salivales posteriores (GSP), donde los pulpos secretan una variedad de moléculas bioactivas para alimentarse de sus presas. Tras el envenenamiento, se observa en los crustáceos una rápida inmovilización debido a los efectos hipotensores, así como una parálisis flácida, irreversible y completa. En diferentes cefalópodos se ha aislado una amplia diversidad de sustancias bioactivas, incluidas moléculas pequeñas como acetilcolina, histamina, octopamina, serotonina, taurina, tetrodotoxina, tiramina y proteínas. Incluidos en esta tremenda biodiversidad molecular están los péptidos de taquicinina Oct-TK-I y Oct-TK-II de *Octopus vulgaris*, Oct-TK-III de *Octopus karna* y

eledoisina de *Eledone cirrhosa*. A pesar de este potencial, se sabe sorprendentemente poco sobre la composición molecular de los venenos en este grupo diverso y poco estudiado y, en términos generales, los cefalópodos se han identificado como un área de investigación de venenos notoriamente descuidada.

Por tal motivo, nuestro grupo de investigación realizó estudios sobre la composición química de las GSP de *O. maya* y el efecto en sus presas naturales (crustáceos). Estos estudios se centraron en el extracto acuoso, el cual se fraccionó mediante ultrafiltración de membrana con una masa molecular de corte de 3 kDa que condujo a una fracción metabólica (>3 kDa) y una fracción neurotóxica (<3 kDa). La fracción neurotóxica inyectada en cangrejos es capaz de ocasionar un efecto relajante-paralizante sin ocasionar la muerte. La separación biodirigida de la fracción neurotóxica por cromatografía, condujo a una fracción de efecto paralizante y una fracción de efecto relajante. Estudios previos sugieren que el efecto paralizante es provocado por los aminoácidos presentes en la saliva, mientras que el efecto relajante es inducido por la presencia de serotonina.<sup>2</sup> Sin embargo, los péptidos presentes en estas fracciones, no se han logrado secuenciar ni dilucidar molecularmente.

Por lo tanto, el presente proyecto pretende identificar un derivado proteico bioactivo en las fracciones obtenidas de las GSP del pulpo rojo, *Octopus maya*, empleando extracciones selectivas, separaciones biodirigidas, métodos cromatográficos y detectores como el espectrómetro de masas.

## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1 Hipótesis**

Si se logró aislar la serotonina en una de las fracciones con actividad paralizante de las glándulas salivales posteriores (GSP) de *Octopus maya* y considerando que existen más fracciones activas, entonces será posible aislar e identificar un derivado proteico bioactivo.

### **4.2 Objetivo General**

Aislar, identificar y evaluar la actividad biológica de al menos un derivado proteico bioactivo presente en la fracción neurotóxica de las GSP de *Octopus maya* obtenidas de los subproductos de su pesca.

### **4.3 Objetivos Particulares**

- Colectar de la pesquería, glándulas salivales posteriores (GSP) de *Octopus maya*.
- Generar el extracto crudo de GSP de *Octopus maya* mediante extracción selectiva.
- Realizar la separación biodirigida de los compuestos bioactivos mediante el uso de técnicas cromatográficas y seguimiento del efecto neurotóxico en los modelos de *Artemia salina* y *Ocypode quadrata* (cangrejo fantasma).
- Realizar el análisis de los perfiles cromatográficos de las fracciones más prometedoras con el fin de obtener compuestos bioactivos.
- Llevar a cabo la elucidación estructural de los compuestos aislados mediante Cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (CL-EMAR).
- Realizar el estudio sistemático (dereplicación) para determinar la presencia de compuestos conocidos en fracciones bioactivas mediante CL-EMAR y bases de datos internacionales.

## 5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

A continuación, se muestra el esquema general de la metodología experimental utilizada en este proyecto de investigación.

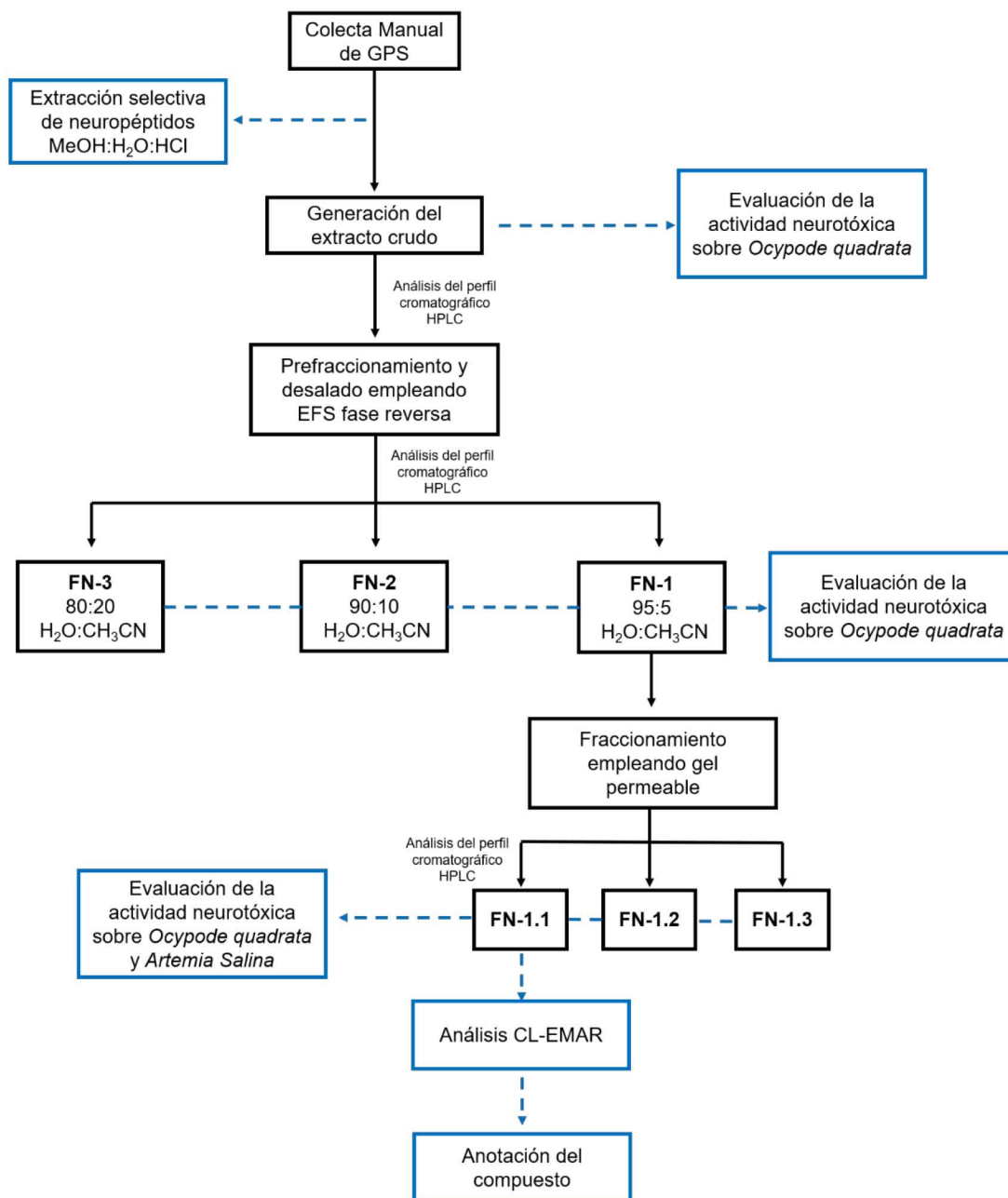


Figura 19. Esquema general de la metodología de investigación.



## 5.1 Materiales

Los disolventes y reactivos empleados en todos los casos fueron grado reactivo analítico (RA); para los métodos cromatográficos fueron grado CLAR y en algunos casos grado CL-EM.

## 5.2 Instrumentación, métodos desarrollados para el análisis y aislamiento cromatográfico

### 5.2.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución

El sistema cromatográfico Polaris 211 (Varían, Inc) empleado, cuenta con dos bombas 211, un inyector automático 410, y dos detectores: un detector evaporativo de difracción de luz Polymer ICE 2100 (DEDL o ELSD en inglés) y un detector ultravioleta 355 (UV).

### 5.2.2 Cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrometría de Masas (CL-EM)

Sistema CLAR Agilent 1260 LC acoplado a un detector de masas 6545 QTOF/HRMS de alta resolución con una fuente ionización por Electrospray (ESI) de tipo Jet [Fig. 17], operado en modo positivo (ESI+) a la fase móvil se le adicionó 0.1% de ácido fórmico a las muestras para generar la ionización de los compuestos.

## 5.3 Área de Colecta

Las glándulas salivales posteriores (GSP) se colectaron de manera manual de los pulpos que ingresaron a la Cooperativa Ribereños de Sisal de R.L. de C.V. en el puerto de abrigo de Sisal, Yucatán, resultado de la pesca en la costa de Yucatán. La zona de pesca de *Octopus maya*, abarca desde la localidad nombrada la Bocana (la carbonera) hasta Celestún. Los pulpos se capturaron mediante la pesca artesanal conocido como “jimba y gareteo”, la cual es una técnica sustentable y conservativa, puesto que las hembras en estado reproductivo no son capturadas, lo que permite la conservación de la especie.<sup>40</sup>

Por otra parte, para la preservación de la especie y su regulación en la pesca se tiene la NOM-009-PESC-1993, esta establece un periodo de veda que abarca del 16 de

diciembre al 21 de Julio.<sup>3</sup> Las muestras de GSP fueron obtenidas en los meses que opera la flota comercial de pescadores ribereños de Sisal. Las glándulas fueron preservadas hasta el día de su análisis en un ultracongelador REVCO.

#### **5.4 Preservación y Manejo de Muestras**

Las GSP se congelaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador REVCO, pesadas previamente y conservadas en paquetes con papel aluminio en bolsas ziploc debidamente etiquetadas (número de colecta, fecha, nombre de la muestra, colector, sitio de colecta, peso, apariencia); posteriormente para su tratamiento se liofilizaron a  $-54\text{ }^{\circ}\text{C}/0.200\text{ mbar}$ .

#### **5.5 Extracción selectiva mediante el uso de metanol acidificado**

##### **5.5.1 Preparación del metanol acidificado**

Se utilizaron 750 mL de metanol acidificado, mezclando MeOH:H<sub>2</sub>O:HCl (para el HCl y MeOH, grado HPLC y MiliQ para el H<sub>2</sub>O) en las siguientes proporciones: 562.5 mL:187.5 mL:13.5 mL, respectivamente. Primero mezclar H<sub>2</sub>O y MeOH en un vaso de precipitados a condicionado con un baño de hielo, y posteriormente, agregar lentamente el HCl. Ya realizada la mezcla de los disolventes y el HCl, se procedió a etiquetar correctamente el frasco y refrigerarlo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.

##### **5.5.2 Extracción de los compuestos bioactivos a partir de las GSP liofilizadas**

Una vez liofilizado el tejido, se procedió a su pulverización manual en un mortero con pistilo. Consecutivamente, el tejido se colocó en un vaso de precipitados acondicionado con baño de hielo y se agregó metanol acidificado en una relación de 8 mL/g de tejido. Para el procedimiento anterior, se utilizaron 535.5 mL de metanol acidificado y 66.94 g de tejido pulverizado, manteniendo en agitación magnética constante durante 20 min.<sup>102</sup> La mezcla obtenida se decantó y transfirió a tubos Falcon para su posterior centrifugación (5000 rpm/10 min). El sobrenadante obtenido se traspasó a un matraz bola de 1 L y se eliminó el exceso de metanol a presión reducida (30 mmHg/25 min) a través de un sistema de evaporación rotatoria (Buch; Modelo Rotavapor RE-III). Posteriormente, el extracto acuoso remanente se centrifugó y al sobrenadante

recuperado se le agregó HCOOH para obtener una disolución 0.2% v/v de HCOOH/extracto recuperado, la disolución se colocó en tubos Eppendorf previamente pesados y fueron llevados a refrigeración a -70 °C en un ultracongelador REVCO, a posteriori se procedió a liofilizar las muestras para determinar el rendimiento.

## **5.6 Bioensayos**

### **5.6.1 Bioensayo sobre *Ocypode quadrata***

Se evaluó el efecto neurotóxico del extracto y fracciones sobre cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*), el cual fue recolectado de las playas de Sisal, Yucatán.<sup>1</sup> Para la evaluación del extracto crudo, se pesaron 4.5 mg y se disolvieron en 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada obteniendo una concentración de 4.5 mg/mL, utilizando como control negativo H<sub>2</sub>O destilada. Consecutivamente, se realizó la inyección del extracto crudo diluido administrando 50 µL, mediante una jeringa para insulina, en la base del tercer pereiópodo (apéndice ambulatorio) donde se encuentra la membrana artrodial del cangrejo fantasma. Se realizó la misma metodología para el control negativo (H<sub>2</sub>O destilada, 50 µL).

Asimismo, las fracciones separadas del extracto crudo se evaluaron (actividad neurotóxica) administrando una dosis de acuerdo con el tamaño y peso de cada sujeto de experimentación. En este sentido, para cangrejos de mayor tamaño y peso mayor a 25 g, se utilizaron 50 µL de muestra y para cangrejos de menor tamaño y peso menor a 25 g, 20 µL.

### **5.6.2 Bioensayo sobre *Artemia salina***

Se implementó un ensayo de neurotoxicidad utilizando como modelo a *Artemia salina*,<sup>115</sup> a fin de minimizar la cantidad de muestra requerida. Estudios previos han utilizado este ensayo para observar el comportamiento del organismo a los segundos de su administración, resaltando la utilización de cantidades pequeñas de la sustancia de interés. Este comportamiento incluye descoordinación, parálisis, reducción de la movilidad y hasta la muerte. *Artemia salina* se obtuvo del laboratorio de Alimento vivo de la Unidad de la UNAM en Sisal. Se obtuvieron 100,000 de nauplios de *Artemia salina* en 200 mL de agua marina, manteniéndolas con flujo de aireación (2-3 burbujas por

segundo) a una temperatura de 23-25 °C a las 24 y 48 horas. Posteriormente, se colocó una luz por fuera del recipiente de los organismos con el fin de tomar alícuotas con artemias funcionales. Se tomaron 8 alícuotas con una micropipeta de los organismos para pasarlos a un matraz de 50 mL con agua de mar. De la disolución anterior, se tomaron 100 µL conteniendo 10-12 artemias, las cuales se colocaron en cada pozo de una placa de 96 pozos. Consecutivamente, las artemias se observaron durante 30 segundos mediante un microscopio estereoscópico para evaluar el comportamiento (moviendo y orientación), a continuación, se aplicó cada fracción para evaluar el efecto durante el mismo tiempo (30 segundos).

Se colocaron 50 µL del extracto a una concentración de 1.0 mg/mL a evaluar sobre 10-12 artemias y se observaron bajo el microscopio por un intervalo de 30 segundos; como blanco se utilizó agua de mar y se llevó a cabo la observación por el mismo intervalo de tiempo.

### **5.7 Prefraccionamiento y desalado mediante Extracción en Fase Sólida (EFS) en fase reversa**

En general, los extractos de organismos marinos contienen una gran cantidad de sales. En este sentido, fue necesario desalar los extractos crudos empleando EFS y lavar los cartuchos con suficiente H<sub>2</sub>O (5 mL de H<sub>2</sub>O tres veces por cartucho) para eliminar las sales, mientras que el emplear un gradiente (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN) ayuda al prefraccionamiento por polaridad del extracto crudo. Para este proceso, se usaron cartuchos de EFS (Strata C18-T, 1 g fase/6 mL; 55 µm, 140 Å, Phenomenex Inc.). Los cartuchos de EFS se lavaron y acondicionaron, eluyendo 4.5 mL de metanol y luego 4.5 mL de H<sub>2</sub>O (4.5 mL de H<sub>2</sub>O X 2 veces). Consecutivamente, se colocaron 4.5 mL del extracto crudo, con una concentración de 67 mg/ mL por cartucho. Una vez absorbida la muestra en el cartucho, se lavó el cartucho con 5 mL de H<sub>2</sub>O tres veces, y se eluyeron con un gradiente de H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (**FN-1** 95:5; **FN-2** 90:10; **FN-3** 80:20, 5 mL) colectando cada sistema por separado. Cabe mencionar, que los cartuchos se utilizaron para realizar el proceso de desalado y prefraccionamiento, reutilizándolos para efectuar en proceso dos veces por cartucho. Posteriormente, se eliminó el CH<sub>3</sub>CN al vacío mediante el uso de un sistema

de rotaevaporación (Büchi; Modelo Rotavapor RE-III), para colocar la disolución en tubos Falcon de 50 mL. Finalmente, las fracciones colectas se congelaron y se llenaron a sequedad mediante liofilización para determinar el rendimiento.

### **5.8 Análisis por CLAR fase reversa de las fracciones obtenidas por EFS**

Todas las fracciones obtenidas de EFS fueron analizadas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) en condiciones analíticas desarrollado previamente en el laboratorio.<sup>40</sup> Se utilizó una columna LUNA Omega 5 µm PS C18 (250 x 4.6 mm, 100 Å; Phenomenex, Inc; USA), detector de UV a 215 nm. Como fase móvil A se utilizó H<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>CN como fase móvil B. Se empleó un método analítico con un gradiente de 100% de A en un tiempo de 5 minutos, 100-85% de A en 7 minutos, 85-65% durante 20 minutos, de 65-50% de A en 15 minutos, para posteriormente en un tiempo de 20 minutos pasar a 100% de B. Se inyectaron 20 µL del extracto crudo o fracción con un flujo de 1.0 mL/min con un tiempo de análisis de 25 minutos.

### **5.9 Análisis por cromatografía en Gel Permeable de la fracción FN-1 (95:5)**

La fracción **FN-1** se sometió al análisis por cromatografía en Gel Permeable para separar en función de su masa molecular, utilizando una columna Yarra 2000 (300 x 7.8 mm, 0.5 a 40 kDa; Phenomenex, Inc; USA). Para las condiciones analíticas se utilizó un gradiente isocrático de 90:10 de H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN durante 17 minutos con un flujo de 1.0 mL/min.

Una vez analizado el perfil cromatográfico de Gel permeable, se procedió a la separación semipreparativa. Para esta separación se utilizó una columna TOYOPEARL HW55 (5 µm, rango de trabajo de 0.1 a 10 kDa; 10 x 3 cm, Tosoh Bioscience LLC; JAP). Se inyectó 1 mg/mL de la fracción con un flujo de 1.0 mL/min y un gradiente isocrático de 90% A (H<sub>2</sub>O) y 10% B (CH<sub>3</sub>CN), con un tiempo de análisis de 25 minutos y empleando un detector UV a 215 nm. En este análisis se colectaron tres fracciones **FN-1.1**, **FN-1.2** y **FN-1.3**.

### 5.10 Análisis por CLAR fase reversa de las fracciones FN-1.1, FN-1.2 y FN-1.3

Las fracciones colectadas **FN-1.1**, **FN-1.2** y **FN-1.3** fueron analizadas mediante CLAR de fase reversa (sección 5.8, pag 43).<sup>40</sup> Posteriormente, estas fracciones fueron sometidas al bioensayo *in vivo* sobre cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*) y *Artemia salina*, empleando este último modelo (*Artemia salina*) para las fracciones con un rendimiento menor a 1 mg.

### 5.11 Análisis por Gel permeable de la fracción FN-1.1 y determinación de la masa molecular

Posterior al análisis por CLAR fase reversa, se realizó el bioensayo correspondiente de cada una de las fracciones obtenidas, de acuerdo con el resultado del bioensayo se seleccionó la fracción **FN-1.1**, a la cual se le realizó cromatografía por Gel permeable en condiciones analíticas empleando el método y las condiciones descritas en la sección 5.2.4 de este trabajo.

Con la finalidad de determinar la presencia de compuestos de alta masa molecular (MM esperado: 8-40 kDa) o de baja masa molecular (MM esperado: 3-10 kDa), se realizó el perfil cromatográfico mediante cromatografía en gel permeable (CGP). Lo anterior, nos sirvió para separar compuestos en función del tamaño molecular. Para ello, se utilizó una columna Yarra SEC-2000 (3  $\mu$ m, 300 X 7.8 mm, Phenomenex Inc.) con rango de trabajo de 0.5-40 kDa. Para determinar la masa molecular aparente, se procedió a calibrar la columna.

#### 5.11.1 Calibración rápida de la columna Yarra SEC-2000

Se emplearon diferentes estándares con diferentes pesos moleculares: uracilo, bacitracina y albúmina con diferente masa molecular como estándares para la curva de calibración [Tabla 7].

Tabla 5. Estándares utilizados para la curva de calibración.

Estándar	Masa molecular (kDa)	[mg/mL]
Uracilo	0.132	0.5
Bacitracina	1.422	0.2
Albúmina	66.00	0.5

Cada estándar se analizó en el sistema cromatográfico Polaris de 211 Varian. Las condiciones de análisis fueron: columna Yarra 3u SEC-2000 con un flujo de 1 mL/min, con un método isocrático 90:10 de H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, una inyección de 20 µL y 17 min de análisis para cada estándar. De cada análisis, se determinó el volumen de exclusión (X) y el Log del PM (Y) de cada estándar, y se realizó la regresión lineal para obtener la ecuación de línea recta.

### 5.12 Análisis de la anotación estructural de la fracción FN-1.1 y determinación de la masa molecular por CL-EMAR

Para realizar el análisis de la fracción **FN-1.1** por CL-EMAR, las condiciones que se emplearon en CLAR se trasladaron al sistema CL-EMAR.

#### Condiciones de análisis

Se utilizó una columna Biozen XB-C18 (Phenomenex, 1.7 mm de tamaño de partícula, 110 X 2.1 mm). Como fase móvil A se utilizó H<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>CN como fase móvil B: con un gradiente de A por 3 minutos, 85% de A de 3 a 8 minutos, 50% de A de 8 a 10 minutos, 100% de B de 10 a 19 minutos, para finalmente pasar de 19 a 30 minutos a 100% de B; con un flujo de 0.200 mL/min. El voltaje de capilar 3500 V; gas para secado N<sub>2</sub>, 8 L/min, 320 °C; nebulizador 35 psi; gas de envoltura 11 L/min, 350 °C. Voltaje del nozzle 1000 V; fragmentador 175 eV/1614 kcal/mol; Skimmer 65 V; Octopole RF Peak 750 V.

Para sintonizar las masas, se utilizaron los siguientes estándares: 121.0509 m/z (purine, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>4</sub>) y 922.0098 m/z (hexakis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine, C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>F<sub>24</sub>). El detector de masas fue operado en modo 2 GHz extendido, rango dinámico, y una velocidad de adquisición de 3 s (all ions Ms/Ms).

La anotación del compuesto se realizó con la fragmentación de la fracción obtenida en la celda de colisión a una energía empleada de 20 V con nitrógeno ionizado. Para la fracción analizada se utilizaron los iones modo MS/MS. A partir de esta información y la distribución isotópica observada en los espectros, se puede tener una identificación confiable sobre los compuestos detectados en la fracción.<sup>116</sup>

A partir de los estudios en CL-EMAR de la fracción activa, se obtuvieron las masas moleculares de alta resolución y el tiempo de retención de las señales de la fracción activa. Posteriormente, se realizó un estudio sistemático para determinar la presencia de compuestos conocidos en bases de datos como Met-Lin (Metabolitos naturales, 10 000 compuestos, Base de datos Agilent implementada en el programa PCLD de MassHunter, Agilent Inc.) y bases de datos internacionales como SciFinder.



## 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las GSP se obtuvieron producto de la pesca ribereña, dichas glándulas fueron seleccionadas por su integridad y coloración, estas glándulas fueron empacadas en pequeños bultos de papel aluminio y congeladas en el ultracongelador REVCO a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La coloración de las glándulas fue de un tono amarillo ocre. Las GSP se liofilizaron y se trituraron para posteriormente realizar la extracción en metanol acidificado [Fig. 20]. Para este trabajo nos dirigiremos como “extracto crudo” a la fracción neurotóxica,<sup>2</sup> obtenida de la extracción selectiva de neuropéptidos con metanol acidificado.

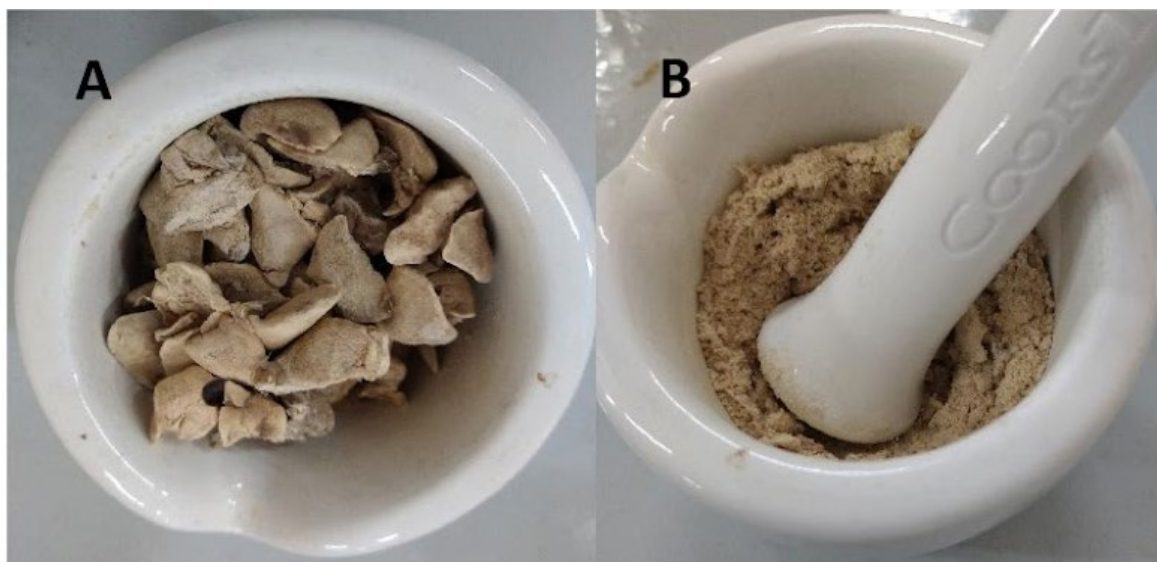


Figura 20. GSP de *Octopus maya* antes y después de ser trituradas.

En la **figura 20** se muestran las GSP obtenidas de *Octopus maya* para la realización de nuestro extracto. Para preservar las muestras y evitar que perdieran su composición bioquímica se realizó la liofilización de los tejidos. Esta práctica se usó para mantener intacta la integridad de muestras biológicas, para ello fue necesario realizar una congelación previa de las GSP. El principio de la liofilización es la sublimación, la cual facilita la eliminación de  $\text{H}_2\text{O}$  presente en las muestras empleando temperaturas y presiones bajas ( $-54\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $0.200\text{ mbar}$ , respectivamente), mientras que la estructura del tejido permanece intacta y las enzimas inactivas.

La eliminación de H<sub>2</sub>O mediante el secado por congelación al vacío de materiales biológicos es un método de conservación que produce productos finales de la más alta calidad. Las aplicaciones farmacéuticas incluyen el secado de productos farmacéuticos lábiles, la producción de formulaciones de vacunas estables a largo plazo, la conservación de productos farmacéuticos basados en ácidos nucleicos y el desarrollo de sistemas de micro y nanopartículas para la administración de fármacos, etc.<sup>117</sup>

Culminado el proceso de liofilización de las GSP, se procedió a triturarlas con la finalidad de obtener partículas pequeñas y así tener mayor área de contacto entre el disolvente (metanol acidificado) y nuestra muestra, induciendo una eficiente extracción de los derivados peptídicos presentes en las GSP de *O. maya*.

### **6.1 Obtención del extracto crudo de las GSP de *Octopus maya***

Los neuropéptidos varían apreciablemente en términos de masa molecular, carga e hidrofobicidad, por lo que no existe un único método óptimo para la extracción en diferentes matrices biológicas. Como todos los neuropéptidos se degradan rápidamente por una variedad de peptidasas relativamente inespecíficas,<sup>118</sup> el procedimiento de extracción debe liberar los péptidos de las vesículas de almacenamiento en un entorno en el que las enzimas estén inactivas. Se han utilizado varios métodos generales para inactivar las enzimas que degradan los neuropéptidos, mientras se liberan eficientemente en el medio de extracción. Estos métodos incluyen el uso de disolventes acuosos en ebullición a pH bajo o neutro; disolventes orgánicos, o una mezcla de disolventes acuosos y orgánicos, a baja temperatura; y disoluciones acuosas de agentes caotrópicos tales como clorhidrato de guanidina 6 M que contienen un cóctel de inhibidores de proteasa.

Estudios anteriores sobre venenos producidos por organismos marinos, han demostrado que algunos de los compuestos activos encontrados son péptidos. Sus principales características, como su especificidad, su potencia y rapidez al actuar, así como el hecho de ser moléculas pequeñas, hacen que estos compuestos sean de gran potencial farmacéutico.<sup>119</sup>

En el caso de los octópodos, se han aislado, a partir de las GSP, cuatro péptidos de la familia de las taquicininas entre los cuales resalta la Eledoisina, cuyas funciones farmacológicas son de relevancia médica.<sup>38,58</sup>

Adicionalmente, nuestro grupo de investigación analizó tres técnicas selectivas para la extracción de péptidos, evaluando la extracción con H<sub>2</sub>O, extracción con metanol acidificado y la extracción con H<sub>2</sub>O en ebullición/1 M CH<sub>3</sub>COOH. De cada metodología se valoró el rendimiento, manejo de muestra, pureza, tiempo de extracción y actividad biológica. Se determinó que la mejor metodología de extracción fue mediante la extracción acuosa, por lo que se utilizó esta técnica para el desarrollo del estudio. Sin embargo, se observó que el extracto aislado empleando MeOH acidificado no generó la muerte sobre *O. quadrata*, deduciendo contenido de péptidos bioactivos. Por lo anterior, en este trabajo se utilizó el protocolo de extracción con metanol acidificado para evaluar su constitución.

Una vez recolectadas las GSP, se procedió a obtener el extracto crudo a través de la metodología reportada,<sup>1</sup> utilizando la extracción selectiva para neuropéptidos en metanol acidificado.

Durante el procedimiento de extracción, se debe tener precaución con la luz a la que es expuesta el extracto crudo, debido a que dicha exposición genera la oxidación del extracto, tornando la muestra oscura. Además, se observó que, al hacer el análisis de la muestra en el cromatógrafo, las columnas retienen parte de las especies oxidadas y al recolectar las fracciones de interés salen coloridas. Asimismo, a pesar de tener los cuidados necesarios, éste tiende a presentar una ligera pigmentación. También, para el presente trabajo se utilizaron GSP que tenían aproximadamente 2 años de antigüedad, por lo que podría explicar la sobre oxidación del extracto [Fig. 21-A]. Por lo anterior, la estructura química y el rendimiento de compuestos aislados marinos mediante técnicas de extracción pueden verse afectados por varias condiciones experimentales (pH, tiempo, temperatura, presión, tamaño de partícula, disolvente, proporción de muestra y disolvente, velocidad de agitación, etc.).<sup>120</sup>

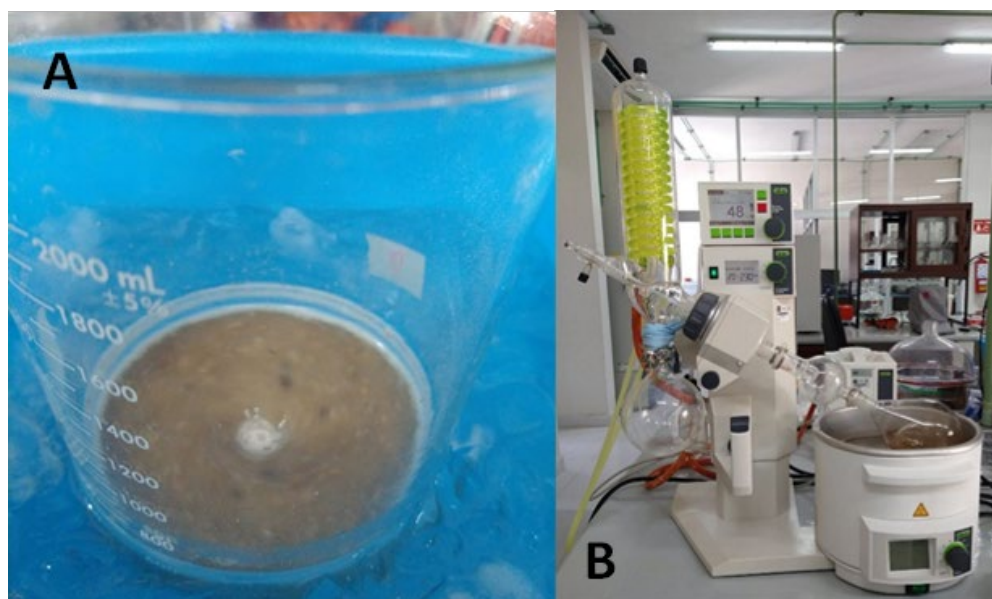


Figura 21. Extracción selectiva para neuropéptidos (A); concentración del extracto crudo (B).

Para la obtención del extracto crudo de GSP, se utilizaron 535.5 mL de MeOH acidificado y 66.94 g de tejido previamente pulverizado y liofilizado. El extracto crudo se centrifugó, el sobrenadante obtenido se separó y colocó en un matraz de fondo redondo de 250 mL y se concentró en un sistema de rotaevaporador para después agregar 0.2% v/v de HCOOH y liofilizarlo. Finalmente, se obtuvo un total de 13.5406 g de extracto liofilizado, [Fig. 22].

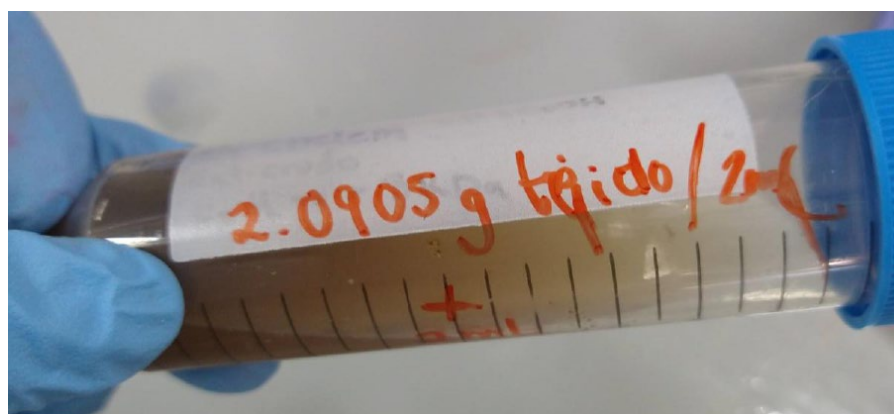


Figura 22. Concentrado del extracto crudo antes de liofilizar.

## 6.2 Bioensayo del extracto crudo en *Ocypode quadrata*

Para evaluar la actividad biológica del extracto crudo obtenido, se empleó el modelo *in vivo* sobre *Ocypode quadrata* o cangrejo fantasma, el cual se reportó con anterioridad.<sup>40</sup> Este ensayo se realizó en cangrejo fantasma debido a su asequebilidad y respuesta, siendo más evidente observar el efecto neurotóxico que en otros crustáceos. Mediante este bioensayo rápido se determinaron los efectos de la actividad neurotóxica (parálisis, temblor y descoordinación) y la metabólica (mortalidad) de manera cualitativa. En este bioensayo, se observó el comportamiento del organismo (*O. quadrata*) desde el momento de la administración y hasta las dos horas, notando a los minutos los efectos esperados del extracto (actividad neurotóxica).

Para el procedimiento, se pesaron 4.5 mg de extracto crudo liofilizado y se disolvieron en 1 mL de agua, de la disolución se inyectaron 20  $\mu$ L en la membrana artrodial del tercer pereiópodo o apéndice caminador del cangrejo [Fig. 23-A]. Al cabo de 5 minutos se observaron movimientos descoordinados e involuntarios, para posteriormente tener episodios de parálisis momentánea.

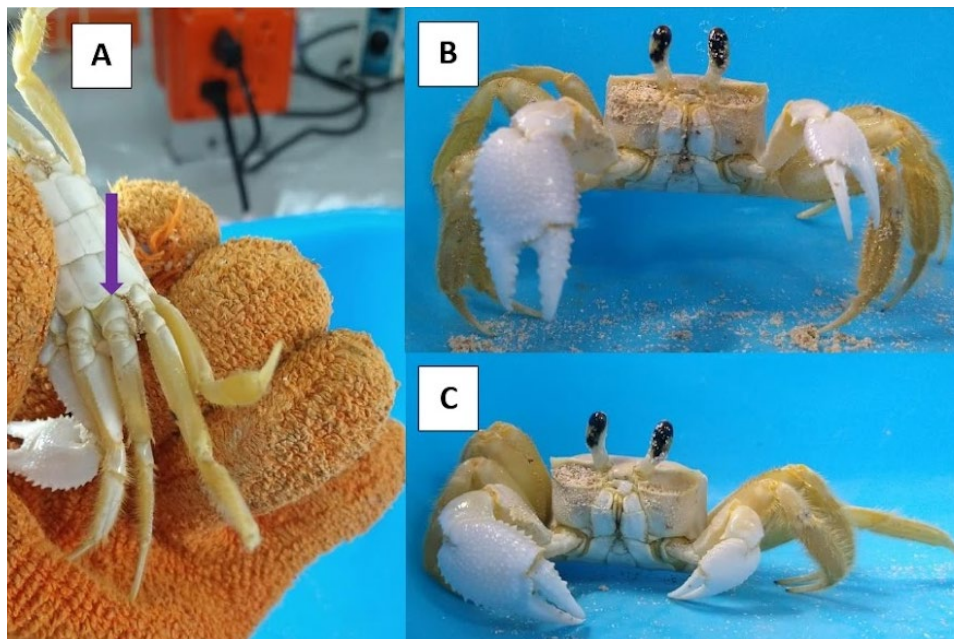


Figura 23. Imagen del bioensayo en cangrejo fantasma.

En la evaluación del extracto crudo, se logró observar el efecto neurotóxico deseado (parálisis, temblor y descoordinación). Posterior al tiempo de inyección, el sujeto de experimentación se recuperó exitosamente de la parálisis inducida por el extracto en menos de dos horas.

Es importante señalar que esta fracción neurotóxica se obtuvo directamente por medio de la extracción selectiva de neuropéptidos,<sup>102</sup> por lo cual, no fue necesario realizar un paso extra para separar la fracción neurotóxica de la metabólica, realizada en trabajos anteriores.<sup>1, 40</sup>

### 6.3 Análisis por CLAR fase reversa del extracto crudo

Se realizó el perfil del extracto crudo por CLAR fase reversa C18, para analizar la complejidad del extracto obtenido y establecer la mejor estrategia de separación. Asimismo, comparar estos resultados con lo reportado en las tesis de maestría de Maricarmen Corona Vázquez<sup>1</sup> y Dawrin Pech Puch<sup>40</sup> [Fig. 23]. En estos estudios reportados, la técnica utilizada para la obtención de la fracción neurotóxica fue por extracción con H<sub>2</sub>O y a continuación se realizó ultrafiltración para separar la fracción neurotóxica de la metabólica, y obtener el perfil por CLAR-C18

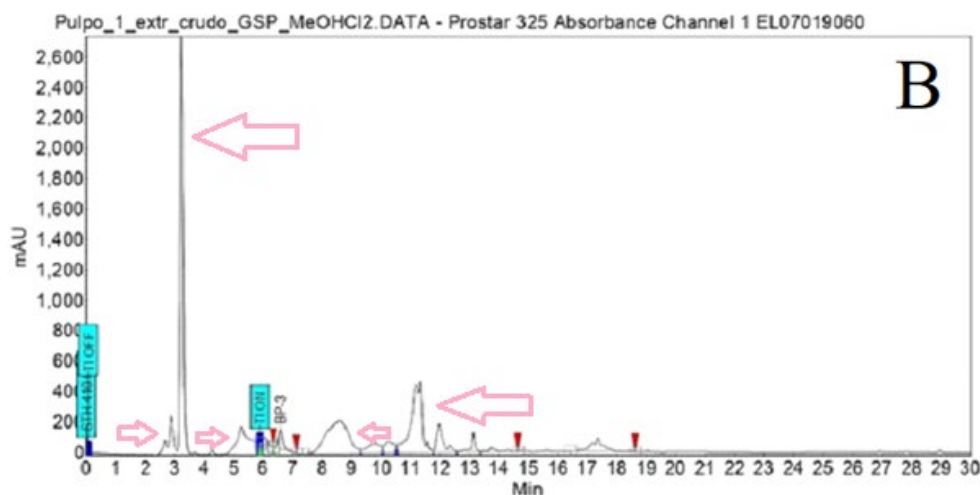


Figura 24. Análisis del extracto crudo mediante CLAR de fase reversa. Las condiciones de análisis se presentan en la sección 5.8, pag 42. Detección UV a 215 nm (péptidos).

En el cromatograma muestra una señal mayoritaria entre el tiempo de retención 3.4 min, muy parecida a la señal principal obtenida por Corona.<sup>1</sup> e inclusive el perfil es igual de complejo, pero la intensidad de las señales son menores, a pesar de utilizar la misma concentración en el análisis, lo cual es característicos de los extractos crudos marinos, los cuales presentan muchas sales.

#### **6.4 Separación biodirigida por Extracción en Fase Sólida (EFS) fase reversa**

En los últimos años, la introducción de extracción en fase sólida (EFS) con soportes de fase reversa de alta capacidad basados en perlas de octadecilsilicio han tenido un impacto importante en la separación de biomoléculas. Estos materiales están disponibles en forma de cartucho que permite velocidades de flujo rápidas y, en consecuencia, tiempos de aislamiento cortos y buenas recuperaciones de péptidos adsorbidos. El tamaño de partícula del material de relleno en los cartuchos (25–40  $\mu\text{m}$ ) es mayor que en las columnas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) convencionales, por lo que los cartuchos se pueden eluir a baja presión.<sup>121</sup> La EFS se basa en el mismo principio que la Cromatografía de Líquidos, la separación a través de la polaridad; en los péptidos marinos existe una variedad importante de péptidos con sus propiedades específicas y la EFS es una herramienta que ha mejorado a través del tiempo y nos ayuda a facilitar la búsqueda de posibles moléculas con valor biológico, siendo así un paso primordial en la caracterización, preparación y purificación de péptidos marinos bioactivos.

Posterior a la extracción, se procedió a la separación biodirigida para la obtención de las fracciones bioactivas. La separación se realizó usando la técnica de extracción en fase sólida (EFS) del extracto liofilizado, fraccionando por polaridad utilizando un gradiente de  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ . Los resultados de la separación, así como los resultados de la evaluación biológica se presentan en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Fracciones y rendimientos obtenidos del extracto crudo

Fracción	Sistema (H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> CN)	Cantidad (mg)	Rendimiento (%)	Actividad <sup>+</sup>
<b>FN-1</b>	95:5	31.6	9.4	Sí
<b>FN-2</b>	90:10	33.5	10.0	Sí
<b>FN-3</b>	80:20	39.1	11.6	Sí*
<b>FN-4</b>	60:40	20.5	6.1	No
<b>FN-5</b>	0:100	12.5	3.7	No

\* Actividad evaluada en el bioensayo de neurotoxicidad en vivo \*Los efectos inducidos por esta fracción tardaron en observarse y la duración fue menor al igual que la respuesta.

En la tabla se observa que las fracciones más polares son las más activas, como lo reportan Corona<sup>1</sup> y Pech<sup>40</sup>. La fracción 95:5 (**FN-1**) obtenida por separación biodirigida EFS [**Fig. 25**], resultó activa ante la prueba de neurotoxicidad sobre cangrejo fantasma [**Tabla 7**]. Adicionalmente, se observó que **FN-1** tuvo menor rendimiento en comparación a los perfiles 90:10 (**FN-2**) y 80:20 (**FN-3**), [**Tabla 6**]. Por otro lado, la fracción 95:5 aislada en el estudio realizado por Corona<sup>1</sup> se identificó que ocasionaban relajación, descoordinación y parálisis en cangrejo, efecto que se revirtió, identificando un comportamiento similar a nuestra fracción (**FN-1**).

Una vez evaluadas bilógicamente las fracciones, se procedió a llevar a cabo y analizar el perfil mediante CLAR fase reversa C18 de las fracciones mencionadas [**Fig. 25, 27 y 30**].

El perfil de la fracción **FN-1**, posee 3 señales mayoritarias, dos de ellas se encuentran poco resueltas entre el tiempo de retención 11 y 12 y una segunda cercana al minuto 14, [**Fig. 25**]. En el perfil cromatográfico obtenido por Corona<sup>1</sup> [**Fig. 26**] revela 4 señales importantes, de acuerdo a lo reportado para la fracción 95:5, la cual tuvo menor rendimiento en comparación al resto de las fracciones. Lo anterior, convergió con nuestro resultado, determinando que la fracción **FN-1** fue la de menor rendimiento en comparación con el resto de las fracciones obtenidas en este presente trabajo, [**Tabla 6**].



## RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Cabe mencionar, que estos estudios no se utilizaron las mismas condiciones de tratamiento de la muestra. De acuerdo a lo reportado por Corona,<sup>1</sup> se realizó una extracción acuosa y un proceso de ultrafiltración, lo cual generó diferencias entre los perfiles obtenidos. Es importante mencionar, que la antigüedad de las GSP utilizadas fue de 2 años, pudiendo afectar la bioquímica de las muestras.

Por otra parte, se puede observar que para ambos casos el perfil de la fracción 95:5 es una mezcla de biomoléculas de mediana polaridad, observando actividad neurotóxica deseada en el bioensayo sobre cangrejo fantasma.

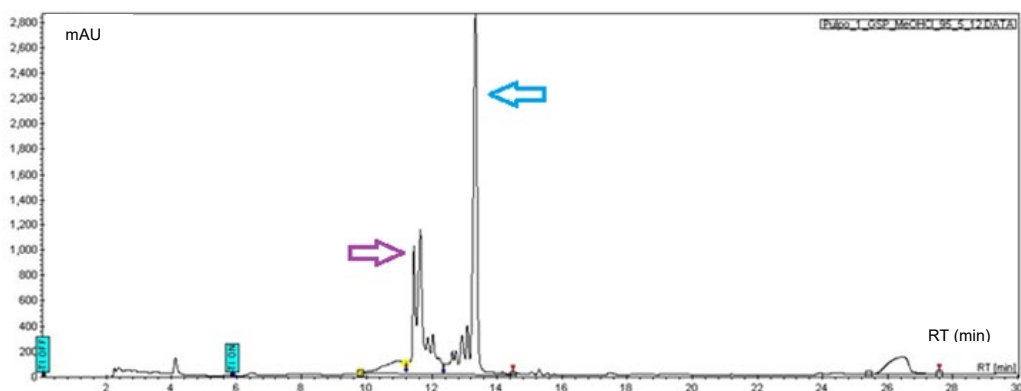


Figura 25. Cromatograma de la fracción **FN-1** (95:5) que se obtuvo por EFS.

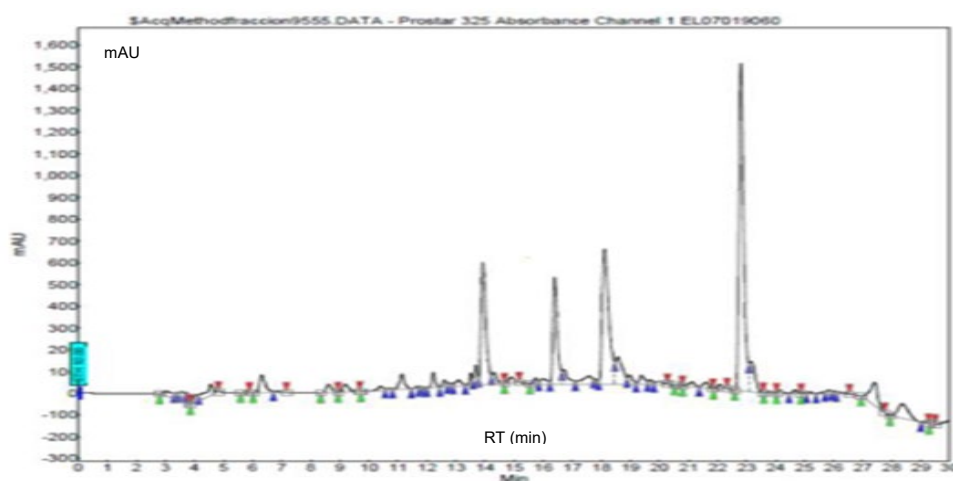


Figura 26. Cromatograma de la fracción 95:5 obtenida por Corona<sup>1</sup> (EFS).

Las siguientes fracciones que se obtuvieron fueron **FN-2**, [Fig. 27] y **FN-3**, [Fig. 30] las cuales resultaron ser biológicamente activas [Tabla 6]. Para el caso de la fracción 90:10, la cual fue aislada anteriormente por Corona<sup>1</sup> [Fig. 28] y Pech<sup>40</sup> [Fig. 29], y de acuerdo a lo reportado, se identificó que contenía un compuesto de mediana polaridad. En estos estudios, se logró el aislamiento del compuesto y la elucidación estructural mediante técnicas espectrofotométricas y espectroscópicas, dando como resultado la presencia de serotonina. La serotonina es responsable al igual que otras aminas biogénicas de los efectos neurotóxicos en moluscos, así mismo se han identificado varias toxinas salivales incluyendo a la serotonina que se dirigen a los transportadores de neurotransmisores, manipulando el sistema neuromuscular de sus presas.<sup>122</sup>

La señal correspondiente a la serotonina se encuentra entre el tiempo de retención 15 y 16, los cuales se pueden observar con mayor claridad en los perfiles obtenidos por Pech<sup>40</sup> y Corona<sup>1</sup> [Fig. 29 y 28]. También se infiere que hay serotonina en nuestro perfil cromatográfico como una señal mayoritaria, la cual se puede observar en los tres perfiles. En el perfil obtenido de la fracción **FN-2**, se infiere serotonina con una señal mayoritaria y un factor de retención entre el minuto 12 y 14. Esta señal también se encuentra en la fracción **FN-1** y en ambos cromatogramas están etiquetadas con la flecha en color azul, [Fig. 25 y 27]. En el caso de la fracción **FN-2**, se pueden observar dos señales del lado izquierdo denotadas por la flecha en color rosa que se encuentran en el perfil de la fracción **FN-1**, sin embargo, se pueden observar menos resueltas a comparación de la fracción **FN-1**. Por otra parte, se tienen dos señales pequeñas señaladas con la flecha en color morado y que no son visibles en el perfil de la fracción **FN-1**.

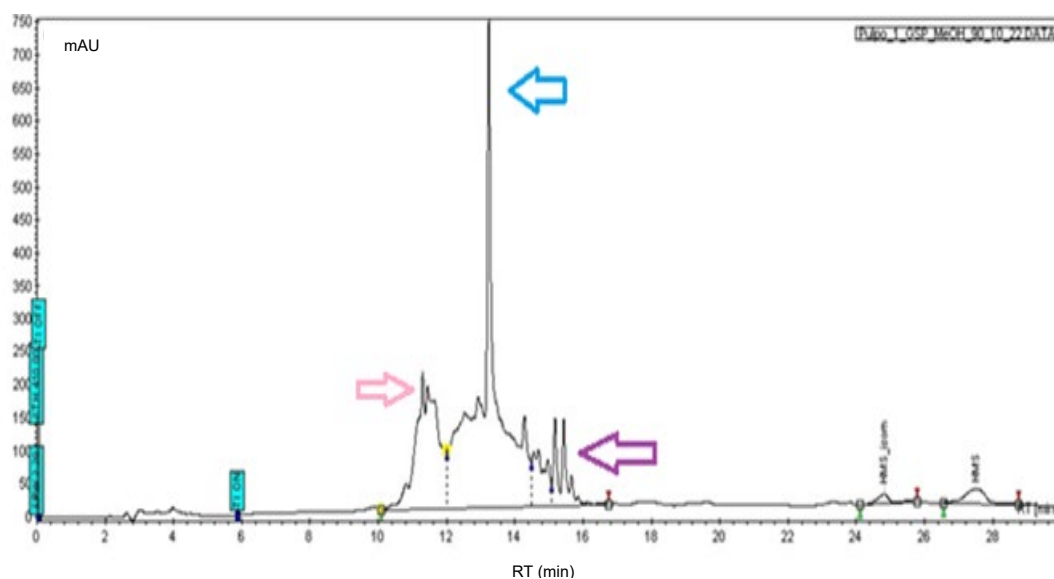


Figura 27. Cromatograma de la fracción 90:10 (FN-2) que se obtuvo por EFS.

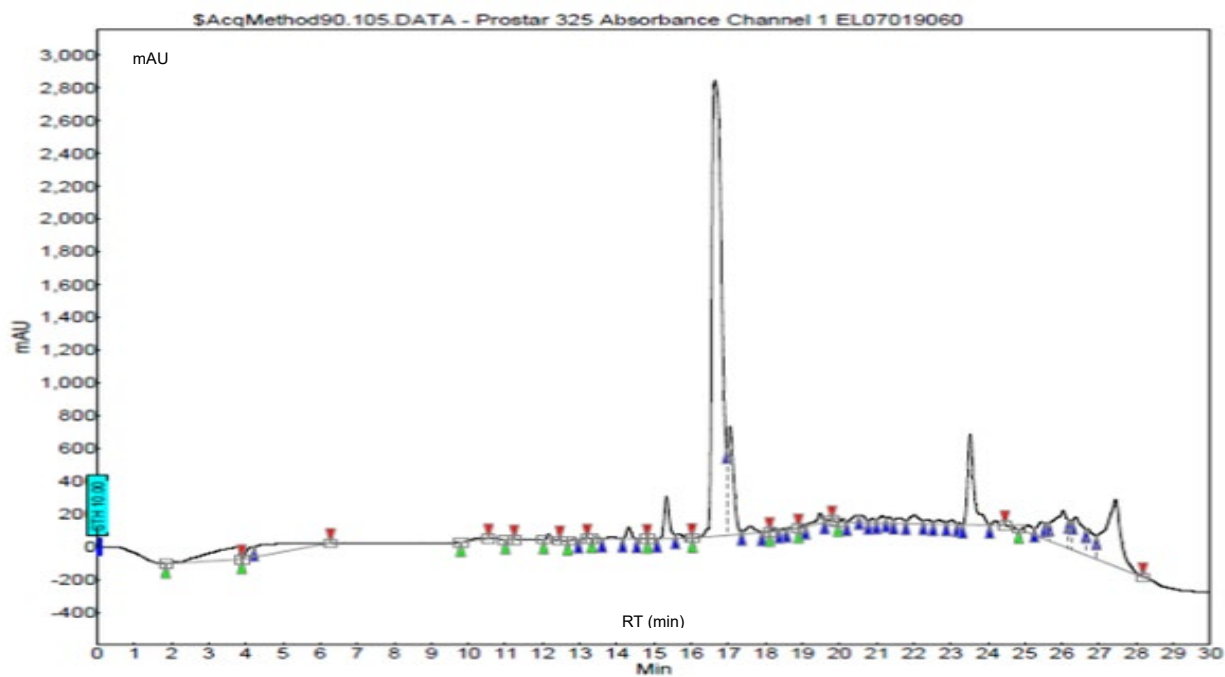


Figura 28. Cromatograma de la fracción 90:10 obtenida por Corona<sup>1</sup> (EFS).

## RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

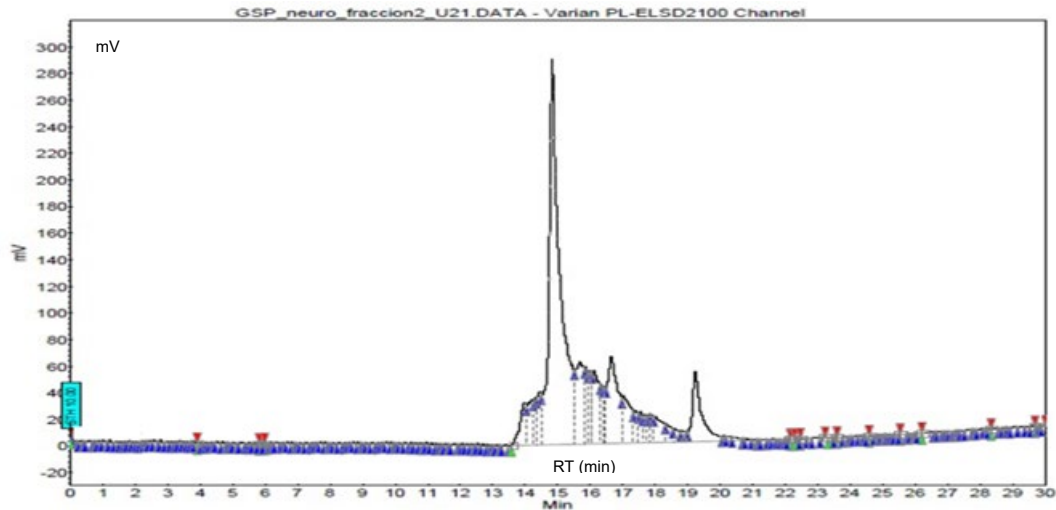


Figura 29. Cromatograma de la fracción 90:10 obtenido por Pech.<sup>40</sup>

En la **figura 30**, se presenta el perfil cromatográfico de la fracción 80:20 (**FN-3**) donde no es visible la señal, que hasta el momento se deduce que corresponde a serotonina. Por otra parte, las señales etiquetadas con flechas de color rojo y naranja que tienen tiempos de retención 16 y 18, se evaluó la actividad sobre cangrejo fantasma para la cual resultó con actividad neurotóxica. Sin embargo, el tiempo para observar el efecto neurotóxico fue más tardío y se determinó que el lapso del efecto neurotóxico fue menos prolongado.

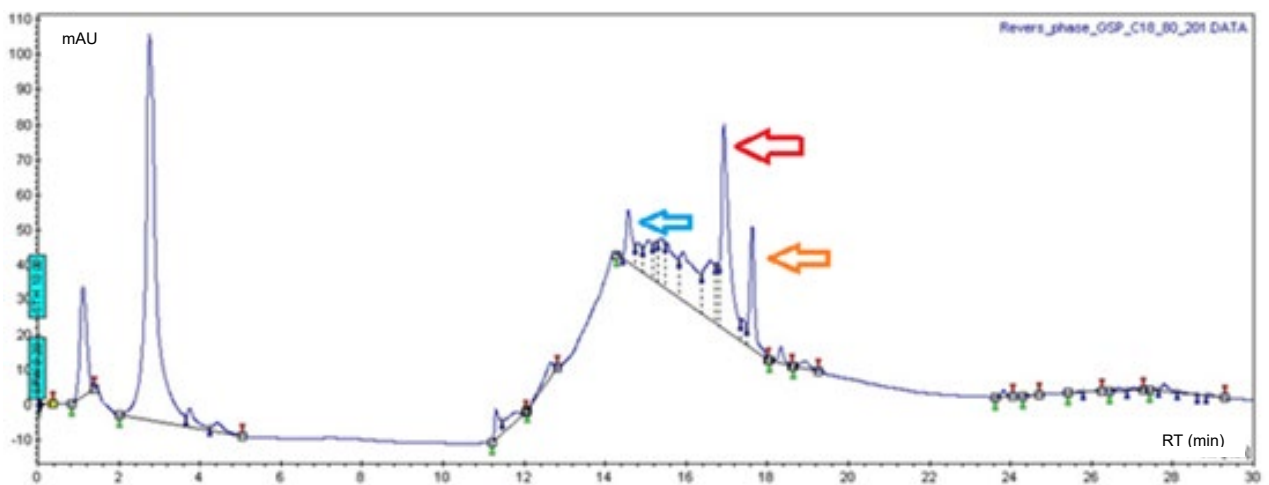


Figura 30. Cromatograma de la fracción 80:20 (**FN-3**) que se obtuvo por EFS.

Después de realizar el análisis de la separación biodirigida en SEF, se seleccionó a la fracción FN-1 para continuar con el esquema de separación, basados en la actividad principalmente y en la polaridad de la fracción, considerando que los péptidos generalmente son más polares. Descartamos a la fracción 90:10, dado que ya fue separada previamente por Pech<sup>40</sup> y Corona<sup>1</sup>.

### **6.5 Separación por Gel permeable de la fracción FN-1 (95:5)**

Después de realizar la prueba de bioactividad de las fracciones obtenidas, se procedió a realizar el análisis de la fracción **FN-1** por gel permeable para observar la distribución de los pesos moleculares de los compuestos presentes en la fracción [Fig. 31 y 32]

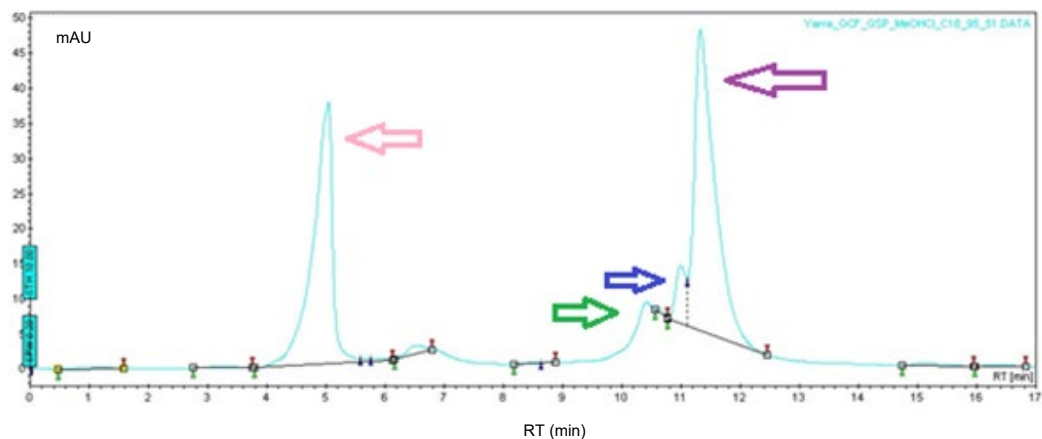


Figura 31. Cromatograma por Gel permeable de **FN-1**, distribución de masas moleculares de los componentes.

En la **figura 31** se puede observar la distribución de las masas moleculares de la fracción **FN-1**. Consecutivamente, se realizó la separación mediante Gel permeable semipreparativo [Fig. 32], para dicho procedimiento se realizó una inyección con una concentración de 5 mg/mL.

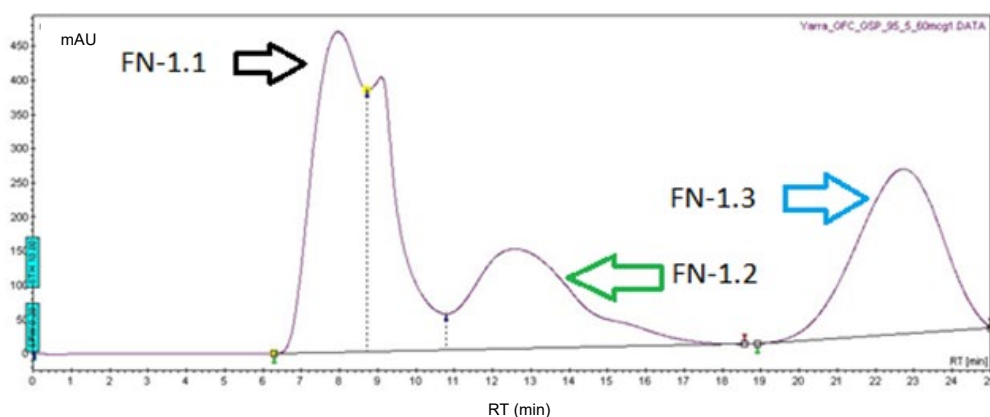


Figura 32. Cromatograma por Gel permeable semipreparativo.

Las fracciones colectadas **FN-1.1**, **FN-1.2** y **FN-1.3** producto de la separación por Gel Permeable fueron analizadas mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). Posteriormente, estas fracciones fueron sometidas al bioensayo *in vivo* sobre cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*) y movilidad en *Artemia salina*, empleando este último modelo para las fracciones con un rendimiento menor a 1 mg, [Tabla 8].

Tabla 7. Rendimiento de las fracciones obtenidas de la colecta de FN-1 (95:5)

Fracción	Cantidad (mg)	Rendimiento (%)
<b>FN-1.1</b>	2.2	44
<b>FN-1.2</b>	0.7	14
<b>FN-1.3</b>	1.2	24

Para **FN-1.1** se observaron dos señales que no se encuentran totalmente resueltas, por dicha razón se optó por recolectarlas como una sola. A continuación, se procedió a realizar el bioensayo sobre cangrejo fantasma y *Artemia salina*, resultando positivo el bioensayo para todas las fracciones colectadas [Tabla 9]. Previamente a realizar el bioensayo, las fracciones colectadas se concentraron, se liofilizaron y se obtuvieron los rendimientos que se presentan en la **Tabla 8**, debido a los rendimientos alcanzados, se realizó el bioensayo sobre *Artemia salina* de la fracción **FN-1.2**.

Tabla 8. Resultados de la actividad de neurotoxicidad de las fracciones **FN-1.1**, **FN-1.2** y **FN-1.3**

Fracción	Concentración (mg/mL)	Volumen de inyección (µL)	Respuesta (Sí/No)
<b>FN-1.1</b>	1.0	20	Sí
<b>FN-1.2*</b>	0.8	50	Sí
<b>FN-1.3</b>	1.0	20	Sí

\*Para la Fracción **FN-1.2** se realizó la prueba en *Artemia salina*, la cual se encuentra descrita en el punto 6.6.2 de este trabajo.

Cabe mencionar que la distribución de las masas nos ayudó a observar aproximadamente el tamaño molecular de o los compuestos presentes en cada una de las señales colectadas y la prueba de neurotoxicidad nos sirvió como guía y seguimiento de la presencia del compuesto de interés y su actividad biológica.

### 6.6 Análisis por CLAR fase reversa C18 de FN-1.1, FN-1.2 y FN-1.3

Posterior a la concentración, liofilización y la prueba de neurotoxicidad se procedió a realizar nuevamente el análisis por CLAR fase reversa C18 de las fracciones **FN-1.1**, **FN-1.2** y **FN-1.3**. Como se observa en el cromatograma de la fracción **FN-1.1** [Fig. 33] aún muestra una mezcla de varios componentes polares y no polares, para dicho cromatograma también se señala con la flecha en color azul una señal poco resuelta que se encuentra cercana al tiempo de retención 14.

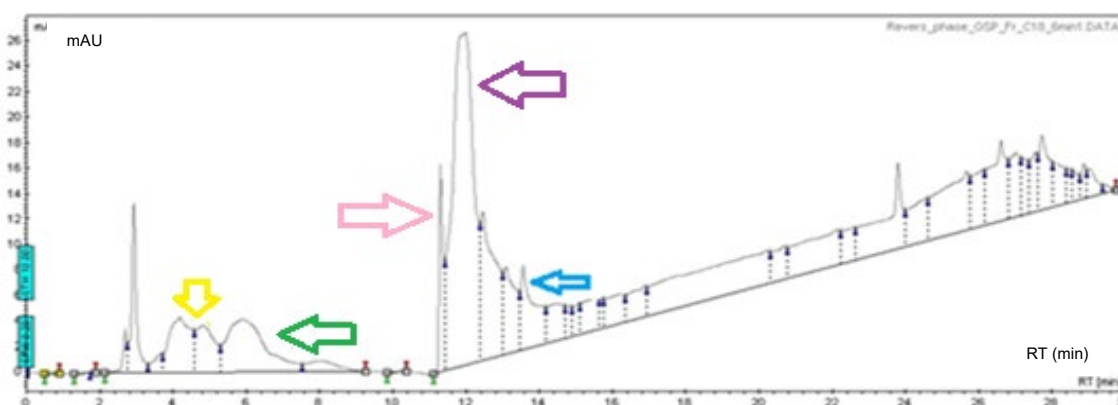


Figura 33. Cromatograma de la fracción **FN-1.1** por CLAR fase reversa C18.

## RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Es importante destacar que, para los siguientes cromatogramas se observa la misma señal marcada con la flecha en color azul [Fig. 34 y 35], y se visualizan señales que se van resolviendo y la muestra se va haciendo menos compleja.

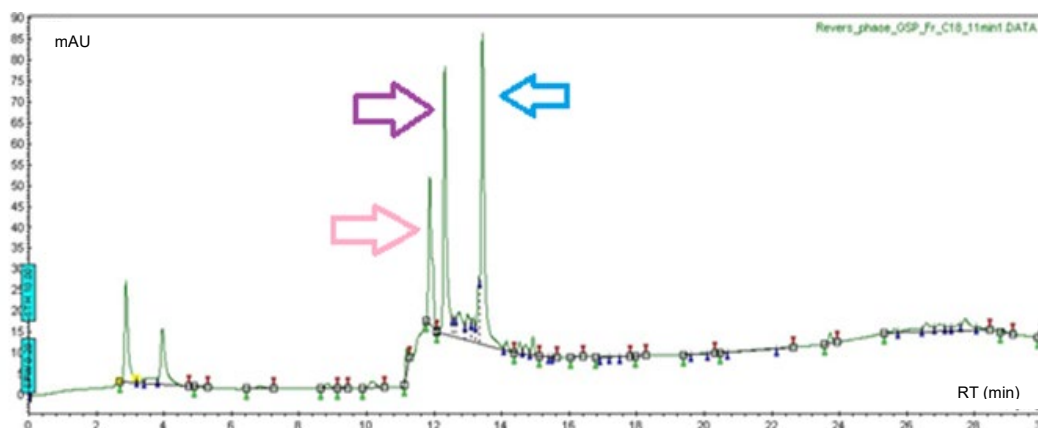


Figura 34. Cromatograma de la fracción **FN-1.2** por CLAR fase reversa C18.

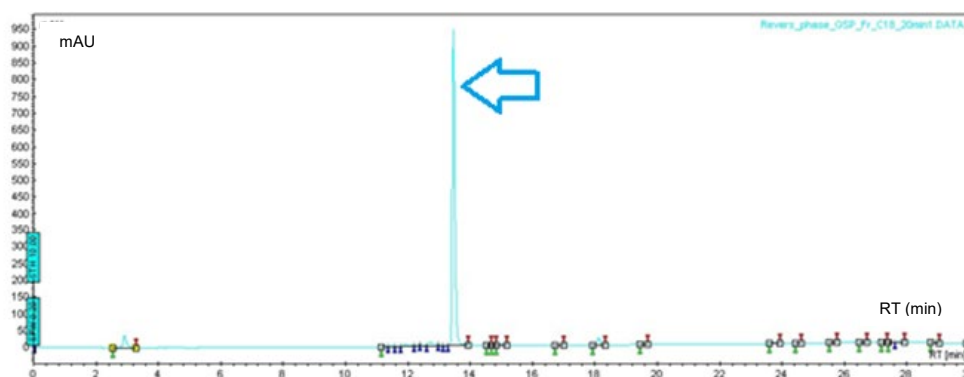


Figura 35. Cromatograma de la fracción **FN-1.3** por CLAR fase reversa C18.

Para la señal que se encuentra en todos los cromatogramas y que está marcada con la flecha azul, y mayoritaria en la fracción **FN-1.3** [Fig. 35] se deduce posiblemente de serotonina. Esta amina biogénica fue reportada en trabajos anteriores,<sup>1</sup> por tal motivo se descartaron las dos últimas fracciones y se continuó con la fracción **FN-1.1** que al igual que las fracciones anteriores tuvo actividad.



### 6.7 Análisis por Gel permeable de FN-1.1 y determinación de la masa molecular

Posterior al análisis por CLAR fase reversa, se procedió a realizar el análisis de **FN-1.1** [Fig. 36] mediante Gel Permeable, para lo cual se puede observar una sola señal con un volumen de exclusión de 7.93. En este cromatograma se observa que las moléculas que conforman a esta fracción poseen una masa molecular muy similar, cabe mencionar que no se trata de una sola biomolécula presente en la muestra, sino un conjunto de ellas con diferentes polaridades.

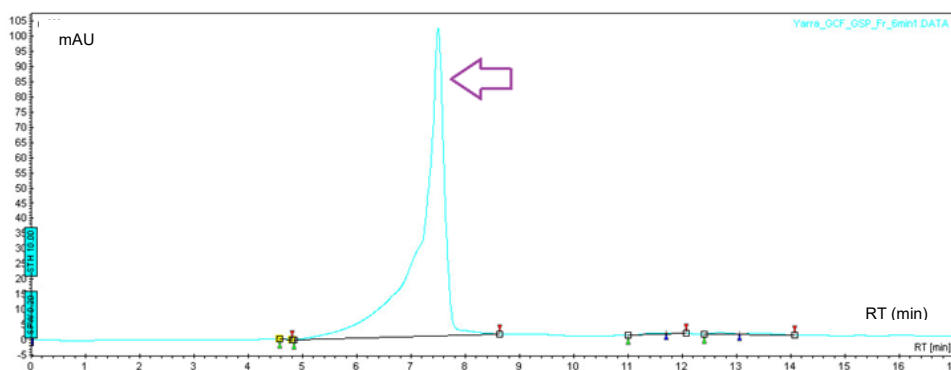


Figura 36. Cromatograma del análisis de la fracción **FN-1.1**.

Se determinó la masa molecular de la señal en la fracción **FN-1.1**, a partir de la curva de calibración descrita en el apartado 5.11.1 de este proyecto [Fig. 37]. Además, se realizó el análisis por Gel permeable de las muestras y a partir del volumen de exclusión y el logaritmo de su masa molecular se obtuvo la curva patrón para determinar la masa de la señal obtenida, el cual dio un resultado de 3.89 kDa. Por lo anterior se concluye que en la fracción FN-1.1 presenta un compuesto principal, muy probablemente un péptido bioactivo con masa molecular de 3.98 kDa.

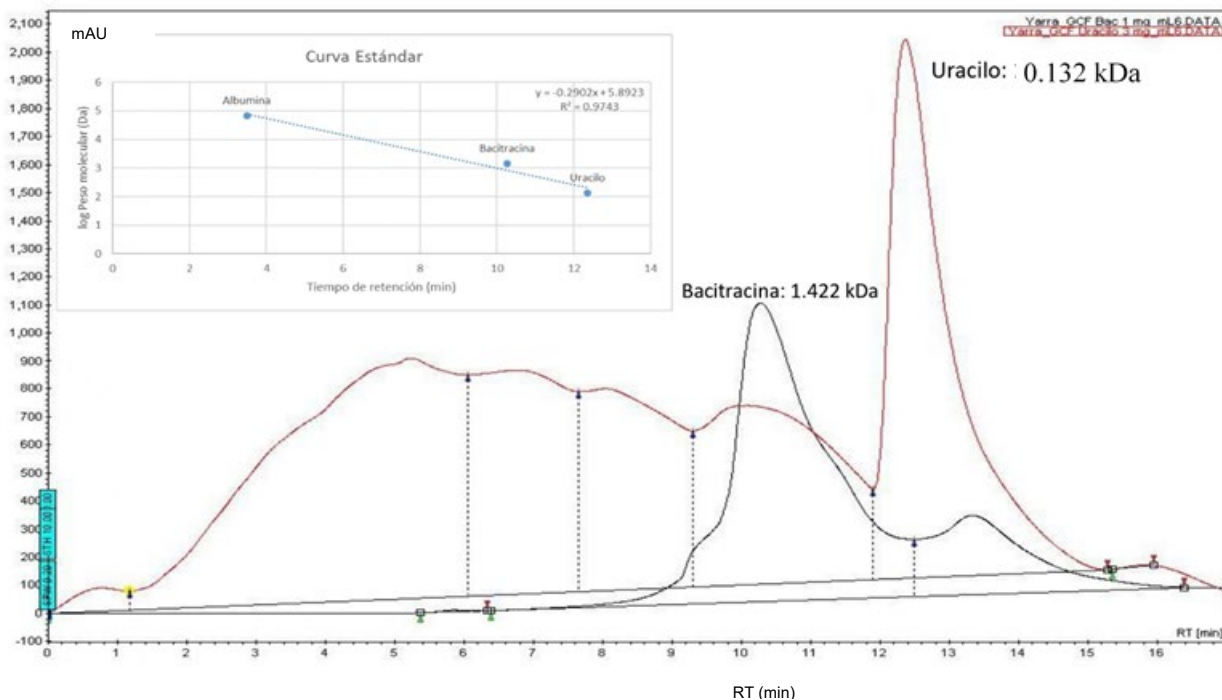


Figura 37. Cromatograma de la curva de calibración para la determinación de las masas moleculares de **FN-1.1**.

### 6.8 Estudio de dereplicación de **FN-1.1** mediante **CL-EMAR**

Con la finalidad de revelar la identidad de los compuestos presentes en la fracción **FN-1.1**, incluyendo la secuencia del péptido principal, se realizó el estudio de dereplicación en el equipo de CL-EMAR, para ello se inyectó una concentración de 100 ng/mL, para la determinación de los tiempos de retención de cada compuesto, se realizó el análisis en modo positivo, añadiendo 0.1% de ácido fórmico a la fase móvil, esta condición es de suma importancia para realizar el análisis por masas, puesto que la detección se realiza por la relación masa carga ( $m/z$ , detectando iones  $[M+H]^+$ ). El análisis se realizó en un sistema CLAR Agilent 1260 LC acoplado a un detector de masas 6545 QTOF/HRMS de alta resolución; el cromatograma obtenido se muestra en la **figura 38**. En la figura A se presenta el cromatograma de todos los iones presentes en el sistema cromatográfico, a fin de determinar la línea base de los iones detectados por el sistema en la columna y disolventes empleados. En la figura B se presentan las diferentes señales obtenidas de la fracción **FN-1.1** (Cromatograma basado en el pico base, BPC en inglés).

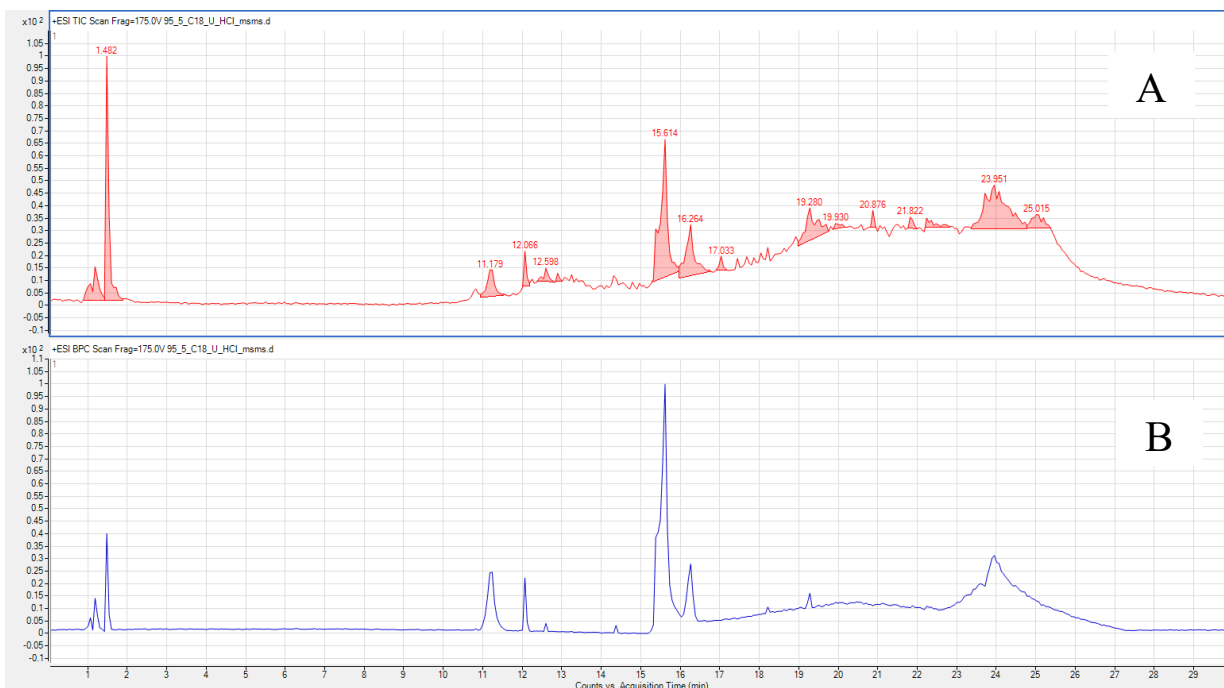


Figura 38. Cromatograma de la fracción **FN-1.1** analizada por CL-EM fase reversa.

Resalta la resolución de las señales obtenidas en el sistema CLAR-EMAR con respecto a las obtenidas en el sistema CLAR empleado para determinar el perfil cromatográfico durante las separaciones. Esto es debido a la columna empleada (1.7 micras), pero sobre todo al detector de masas, que detecta cualquier señal que se ionice, mientras que el detector de UV, solo a las moléculas que absorben en la longitud de onda del análisis (215 nm, péptidos). La identidad de las moléculas presentes en las señales del cromatograma B [Fig. 38-B] se realizó mediante la búsqueda de las masas de alta resolución (1 ppm, tres cifras significativas) en la base de datos Met-Lin, implementado en MassHunter. Los resultados se presentan en la **Figura 39**. Cabe resaltar que los compuestos con el mismo tiempo de retención, es debido a que como se puede observar aún es una mezcla de compuestos y que por tanto algunos de ellos muestran la misma polaridad.

## RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Compound Label	RT	Mass	Name	MFG Formula	MFG Diff (ppm)	DB Formula	DB Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C11 H9 N O	1.483	171.07		C11 H9 N O	-9.17			
Cpd 2: C11 H6 O8	10.806	266.0059		C11 H6 O8	1.2			
Cpd 3: Busulfan	10.807	246.0222	Busulfan	C6 H14 O6 S2	3.94	C6 H14 O6 S2	3.94	1
Cpd 4: Pirimicarb	12.068	238.1424	Pirimicarb	C11 H18 N4 O2	2.6	C11 H18 N4 O2	2.6	1
Cpd 5: Anapheline	13.246	224.1894	Anapheline	C13 H24 N2 O	-2.5	C13 H24 N2 O	-2.51	5
Cpd 6: Tridecanamide	13.457	213.2096	Tridecanamide	C13 H27 N O	-1.56	C13 H27 N O	-1.56	10
Cpd 7: C17 Sphinganine	15.583	287.2832	C17 Sphinganine	C17 H37 N O2	-2.58	C17 H37 N O2	-2.58	10
Cpd 8: Tridecan-2-ol	15.643	200.2147	Tridecan-2-ol	C13 H28 O	-3.25	C13 H28 O	-3.25	10
Cpd 9: tetradecan-1-ol	15.913	214.2306	tetradecan-1-ol	C14 H30 O	-4.57	C14 H30 O	-4.57	5
Cpd 10: 1,2,4-Nonadecanetriol	16.241	316.2988	1,2,4-Nonadecanetriol	C19 H40 O3	-3.45	C19 H40 O3	-3.45	10
Cpd 11: Xestoaminol C	16.306	229.2413	Xestoaminol C	C14 H31 N O	-2.99	C14 H31 N O	-2.99	1
Cpd 12: 2-Hydroxyhexadecanoic acid	16.462	272.236	2-Hydroxyhexadecanoic acid	C16 H32 O3	-2.99	C16 H32 O3	-2.97	10
Cpd 13: PS(P-20:0/15:0)	19.11	761.5537	PS(P-20:0/15:0)	>limit		C41 H80 N O9 P	4.37	10
Cpd 14: C31 H66 N10 O9	19.175	722.5022		C31 H66 N10 O9	-1.02	C39 H76 N O8 P		10
Cpd 15: PE(14:1(9Z)/P-18:0)	19.25	673.5013	PE(14:1(9Z)/P-18:0)	C37 H73 N2 O4 S2		C37 H72 N O7 P	4.94	8
Cpd 16: Nonoxynol-9	19.339	616.4201	Nonoxynol-9	C33 H60 O10	-2.29	C33 H60 O10	-2.29	1
Cpd 17: C32 H55 N5 O5	19.399	589.4212		C32 H55 N5 O5	-1.47			
Cpd 18: Dilauryl 3,3'-thiodipropionate	19.466	546.3777	Dilauryl 3,3'-thiodipropionate	C30 H58 O4 S2	-0.14	C30 H58 O4 S2	-0.14	1
Cpd 19: C29 H48 O15	20.878	636.2999		C29 H48 O15	-0.88			
Cpd 20: D-Glucosyldihydrosphingosine	21.056	463.3519	D-Glucosyldihydrosphingosine	C24 H49 N O7	-2.26	C24 H49 N O7	-2.26	1
Cpd 21: UCL 1608	21.821	405.2463	UCL 1608	C30 H31 N	-1.64	C30 H31 N	-1.64	7
Cpd 22: C35 H19 N11 O	22.002	609.1769		C35 H19 N11 O	0.83			
Cpd 23: C35 H62 N5 O8	22.61	680.4599		C35 H62 N5 O8	-0.12	C35 H69 O10 P		6
Cpd 24: 3 $\alpha$ ,9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic Acid	23.715	408.2882	3 $\alpha$ ,9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic Acid	C24 H40 O5	-1.61	C24 H40 O5	-1.61	10
Cpd 25: 3 $\alpha$ ,9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic Acid	23.719	408.2881	3 $\alpha$ ,9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic Acid	C24 H40 O5	-1.3	C24 H40 O5	-1.3	10
Cpd 26: C3 H2 N4 O2	24.959	126.0173		C3 H2 N4 O2	4.06			

Figura 39. Compuestos encontrados en la base de datos Met-Lin.

Met-lin realizó la anotación de 26 compuestos [Fig. 39]. Observando los compuestos identificados, resalta la característica de Met-Lin, una base de datos con más de 100,000 compuestos (curados, es decir verificados por expertos en masas) bioactivos de diferentes fuentes, no solo marinas. Así, por ejemplo, el software identifica 9-nonoxinol en **FN-1.1**, sin embargo, este compuesto es un detergente sintético con actividad bactericida y espermicida, que seguramente no se encuentra en los octópodos. Es muy probable que sea un isómero con ese peso molecular de alta resolución y fórmula molecular. Para discernir esta problemática, se realizó una búsqueda en Sci Finder (Acceso por Bidi UNAM, ir a base de datos) para identificar a los compuestos aislados de pulpos, cefalópodos o bien de fuentes marinas. Por ejemplo, la fórmula molecular del nonoxyl-9 (C<sub>33</sub>H<sub>60</sub>O<sub>10</sub>) reveló 12 isómeros, algunos derivados del nonoxinol, y 4 con estructuras diferentes. En todos los casos, dentro de Sci finder, se seleccionan todos los artículos y documentos relacionados con todas las estructuras (C<sub>33</sub>H<sub>60</sub>O<sub>10</sub>, 4756 documentos) y enseguida se excluyen aquellos que no tienen la palabra clave de octópodo, cefalópodo o marino (octopus, cephalopod, marine, en inglés para realizar la búsqueda). Los resultados revelaron que ninguna de ellas es de origen marino, por lo anterior, no se puede identificar este compuesto en la saliva del pulpo rojo de Yucatán.

## RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis realizado en Sci finder encontró que solo 6 habían sido previamente reportados en animales marinos. La búsqueda reveló los siguientes compuestos:

Tabla 9. Compuestos anotados previamente identificados en animales marinos

Compuesto anotado	Masa Molecular (MM)	MM calculado [M+H] <sup>+</sup>	MM determinado [M+H] <sup>+</sup>	Fórmula molecular	tr (min)	Referencia
Tridecanamida	213.36	214.2165	214.2063	C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> NO	13.457	Apéndice I
Esfinganina	287.48	288.2897	288.2904	C <sub>17</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>2</sub>	15.538	
1-Tridecanol	200.36	201.2212	200.2379	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O	15.643	
1-Tetradecanol	214.39	215.2369	214.2539	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O	15.913	
1,2,4-Nonadecanetriol	316.52	317.3050	316.3132	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub>	16.241	
Xestaminol C	229.40	230.2478	230.2485	C <sub>14</sub> H <sub>31</sub> NO	16.306	

Un ejemplo de estos compuestos es la Tridecanamida, un isómero que ha sido aislado de la ascidia sudafricana.<sup>123</sup> En la **Figura 40** se representan el cromatograma del compuesto.

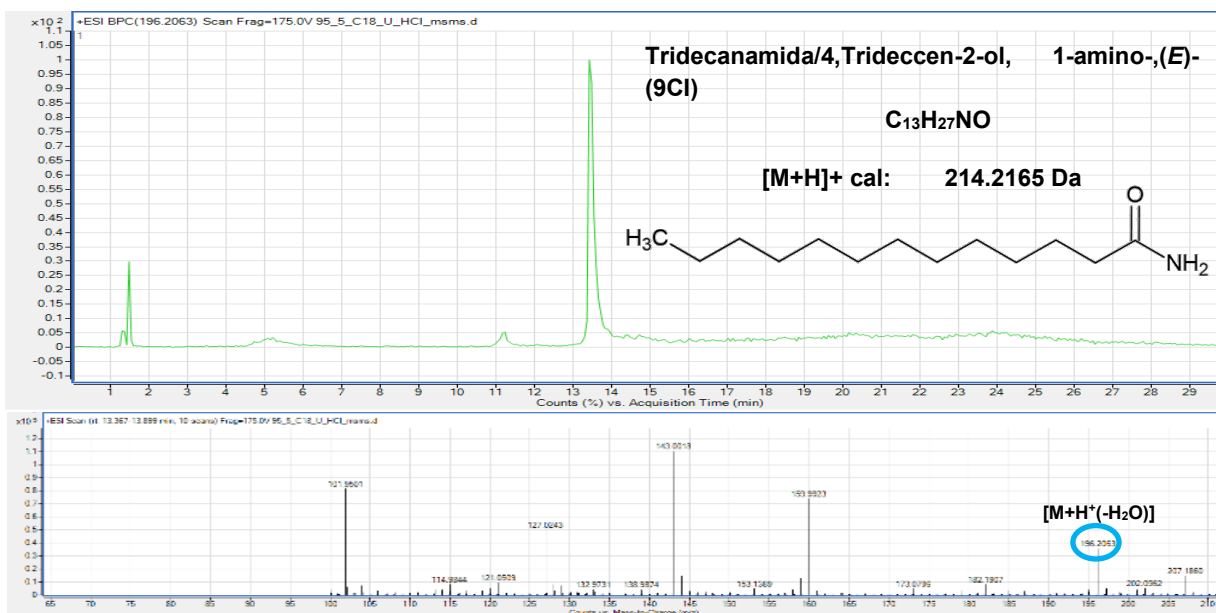


Figura 40. Cromatograma y espectro de la Tridecanamida.

---

## RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

---

La tridecanamida presentó un tiempo de retención (tr) de 13.457 min y su respectivo espectro; el  $[M+H]^+$  calculado para este compuesto es de 214.2165 Da y su  $[M+H]^+(-H_2O)$  determinado es de 196.2063 Da., lo que nos indica que hubo la pérdida de una molécula de agua derivada de la deshidratación del grupo carboxílico por las condiciones de análisis (325 °C, secado con Nitrógeno en contraflujo), la molécula de agua que se perdió es de 18 Da, que si bien, al sumarlos nos da el  $[M+H]^+$  determinado de 214.2063 Da.

Desafortunadamente, al realizar el análisis de todas las señales no se encontró un compuesto o péptido con masa Molecular de 3.84 kDa que pueden deberse a varias causas

- a) El rango de trabajo del equipo fue de 100 a 1700 umas, mientras que el valor esperado era de 3,840 umas. Ahora bien, el equipo detecta relación masa carga ( $m/z$ ) y en caso de los péptidos estos presentan más de una carga lográndose ver señales características de una proteína (distribución Gaussiana), sin embargo, no se detectó ninguna señal (con abundancias mayores a la línea base) con estas características en el tiempo de retención esperado (10 a 20 min).
- b) El análisis se realizó en una columna calibrada para péptidos (Biozen C18-XB, con tamaño de poro de 90 Å) y el péptido esperado es de casi 4 kDa, casi en el tamaño de una proteína, por tanto, podría haberse quedado en las partículas de gel de sílice.
- c) Que la proteína no se ionizó con el porcentaje de ácido fórmico añadido.

Para posteriores análisis, seguramente se cambiará la columna por una columna para proteína libre (generalmente C4) y cambiar la configuración del equipo a un equipo con baja resolución (100 a 3200 umas de rango de trabajo), dado que no es tan importante en la determinación de proteínas.

## 7. CONCLUSIONES

- La colecta manual de las glándulas salivales no se pudo realizar debido a la época, puesto que había veda para la pesca del pulpo y la actual pandemia, por lo cual se utilizaron glándulas recolectadas previamente por el equipo de trabajo en el año 2019, las cuales fueron conservadas a -80 °C.
- La extracción selectiva de las GSP de *Octopus maya*, permitió obtener fracciones menos complejas y la presencia del efecto neurotóxico en *Ocypode quadrata* (cangrejo fantasma).
- La separación biodirigida, dio lugar a las fracciones **FN-1**, **FN-2** y **FN-3** con actividad biológica en el bioensayo sobre *Ocypode quadrata* (cangrejo fantasma).
- A través de la técnica por Gel permeable se lograron aislar las fracciones **FN-1.1**, **FN-1.2** y **FN-1.3**, con actividad biológica sobre los modelos de *Artemia salina* y *Ocypode quadrata* (cangrejo fantasma), teniendo particular importancia la fracción **FN-1.1**, revelando un péptido con una masa molecular de 3.89 kDa.
- El análisis de dereplicación de la fracción **FN-1.1** mediante CL-EMAR, dio como resultado la anotación de 26 compuestos encontrados por la base de datos Met-Lin y solo 6 de ellos reportados previamente en la literatura en animales marinos de acuerdo con la base de datos SciFinder.

---

**8. BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Corona, M. Aislamiento e Identificación de Compuestos Químicos Responsables Del Efecto Paralizante En Las Glándulas Salivales Posteriores Del Pulpo Rojo Octopus Maya, Universidad Nacional Autónoma de México, 2016. <https://doi.org/132.248.9.195>.
- (2) Pech-Puch, D.; Cruz-López, H.; Canche-Ek, C.; Campos-Espinosa, G.; García, E.; Mascaró, M.; Rosas, C.; Chávez-Velasco, D.; Rodríguez-Morales, S. Chemical Tools of Octopus Maya during Crab Predation Are Also Active on Conspecifics. *PLoS One* **2016**, *11* (2), e0148922. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0148922>.
- (3) DOF - Diario Oficial de la Federación [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4675437&fecha=04/03/1994](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4675437&fecha=04/03/1994) (accessed Oct 19, 2021).
- (4) Aspevik, T.; Oterhals, Å.; Rønning, S. B.; Altintzoglou, T.; Wubshet, S. G.; Gildberg, A.; Afseth, N. K.; Whitaker, R. D.; Lindberg, D. Valorization of Proteins from Co- and By-Products from the Fish and Meat Industry. *Top. Curr. Chem.* **2017**, *375* (3), 1–28. <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0143-6>.
- (5) Caruso, G.; Floris, R.; Serangeli, C.; Paola, L. Di. Fishery Wastes as a Yet Undiscovered Treasure from the Sea: Biomolecules Sources, Extraction Methods and Valorization. *Mar. Drugs* **2020**, *Vol. 18*, Page 622 **2020**, *18* (12), 622. <https://doi.org/10.3390/MD18120622>.
- (6) Besednova, N. N.; Zaporozhets, T. S.; Kovalev, N. N.; Makarenkova, I. D.; Yakovlev, Y. M. Cephalopods: The Potential for Their Use in Medicine. *Russ. J. Mar. Biol.* **2017**, *43* (2), 101–110. <https://doi.org/10.1134/S1063074017020031>.
- (7) Fiorito, G.; Gherardi, F. Prey-Handling Behaviour of Octopus Vulgaris (Mollusca, Cephalopoda) on Bivalve Preys. *Behav. Processes* **1999**, *46* (1), 75–88. [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(99\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(99)00020-0).
- (8) Grisley, M. S.; Boyle, P. R.; Pierce, G. J.; Key, L. N. Factors Affecting Prey Handling in Lesser Octopus (Eledone Cirrhosa) Feeding on Crabs (Carcinus Maenas). *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* **1999**, *79* (6), 1085–1090. <https://doi.org/10.1017/S0025315499001332>.
- (9) Grubert, M. A.; Wadley, V. A.; White, R. W. G. Diet and Feeding Strategy of Octopus Maorum in Southeast Tasmania. *Bull. Mar. Sci.* **1999**, *65* (2), 441–451.
- (10) Ghiretti, F. TOXICITY OF OCTOPUS SALIVA AGAINST CRUSTACEA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1960**, *90* (3), 726–741. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1960.TB26417.X>.
- (11) Pilson, M. E. Q. Q.; Taylor, P. B. Hole Drilling by Octopus. *Science* (80-. ). **1961**, *134* (3487), 1366–1368. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.134.3487.1366-A>.
- (12) Croft, J. A.; Howden, M. E. H. Chemistry of Maculotoxin: A Potent Neurotoxin Isolated from Hapalochlaena Maculosa. *Toxicon* **1972**, *10* (6), 645–651. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(72\)90127-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(72)90127-4).
- (13) Crone, H. D.; Leake, B.; Jarvis, M. W.; Freeman, S. E. On the Nature of “Maculotoxin”, a Toxin from the Blue-Ringed Octopus (Hapalochlaena Maculosa). *Toxicon* **1976**, *14* (6), 423–426. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(76\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(76)90057-X).
- (14) Erspamer, V.; Erspamer V.; Erspamer, V. Active Substances in the Posterior Salivary Glands of Octopoda. I. Enteramine-like Substance. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*. **1948**, *4* (3–4), 213–



223. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0773.1948.TB03344.X>.
- (15) Erspamer V.; Erspamer, V. Active Substances in the Posterior Salivary Glands of Octopoda II Tyramine and Octopamine (Oxyoctopamine). *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*. **1948**, 4 (3–4), 224–247. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0773.1948.TB03345.X>.
- (16) Erspamer, V. Identification of Octopamine as L-p-Hydroxyphenylethanolamine. *Nat.* 1952 1694296 **1952**, 169 (4296), 375–376. <https://doi.org/10.1038/169375b0>.
- (17) ERSPAMER, V.; ASERO, B. Isolation of Enteramine from Extracts of Posterior Salivary Glands of Octopus Vulgaris and of Discoglossus Pictus Skin. *J. Biol. Chem.* **1953**, 200 (1), 311–318. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)38466-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)38466-7).
- (18) Erspamer, V.; Ghiretti, F. The Action of Enteramine on the Heart of Molluscs. *J. Physiol.* **1951**, 115 (4), 470–481. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1951.SP004682>.
- (19) Freeman, S. E. Electrophysiological Properties of Maculotoxin. *Toxicon* **1976**, 14 (5), 396–399. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(76\)90089-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(76)90089-1).
- (20) Freeman, S. E.; Turner, R. J. Maculotoxin, a Potent Toxin Secreted by Octopus Maculosus Hoyle. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1970**, 16 (3), 681–690. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(70\)90073-6](https://doi.org/10.1016/0041-008X(70)90073-6).
- (21) Gage, P. W.; Moore, J. W.; Westerfield, M. An Octopus Toxin, Maculotoxin, Selectively Blocks Sodium Current in Squid Axons. *J. Physiol.* **1976**, 259 (2), 427–443. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1976.SP011474>.
- (22) Jarvis, M. W.; Crone, H. D.; Freeman, S. E.; Turner, R. J. Chromatographic Properties of Maculotoxin, a Toxin Secreted by Octopus (Hapalochlaena) Maculosus. *Toxicon* **1975**, 13 (3), 177–181. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(75\)90142-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(75)90142-7).
- (23) Sheumack, D. D.; Howden, M. E. H.; Spence, I.; Quinn, R. J. Maculotoxin: A Neurotoxin from the Venom Glands of the Octopus Hapalochlaena Maculosa Identified as Tetrodotoxin. *Science (80- )*. **1978**, 199 (4325), 188–189. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.619451>.
- (24) ANASTASI, A.; ERSPAMER, V. OCCURRENCE AND SOME PROPERTIES OF ELEDOSIN IN EXTRACTS OF POSTERIOR SALIVARY GLANDS OF ELEDONE. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1962**, 19 (2), 326–336. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1962.TB01197.X>.
- (25) Cariello, L.; Zanetti, L.  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cephalotoxin: Two Paralyzing Proteins from Posterior Salivary Glands of Octopus Vulgaris. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* **1977**, 57 (2), 169–173. [https://doi.org/10.1016/0306-4492\(77\)90066-1](https://doi.org/10.1016/0306-4492(77)90066-1).
- (26) Fry, B. G.; Roelants, K.; Champagne, D. E.; Scheib, H.; Tyndall, J. D. A.; King, G. F.; Nevalainen, T. J.; Norman, J. A.; Lewis, R. J.; Norton, R. S.; Renjifo, C.; Rodríguez De La Vega, R. C. The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356> **2009**, 10, 483–511. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENOM.9.081307.164356>.
- (27) Fry, B. G.; Roelants, K.; Norman, J. A. Tentacles of Venom: Toxic Protein Convergence in the Kingdom Animalia. *J. Mol. Evol.* **2009**, 68 (4), 311–321. <https://doi.org/10.1007/S00239-009-9223-8>.
- (28) GHIRETTI, F.; LIBONATI, M. Research on Cephalotoxin. 1. Extraction and Purification of the Substance. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **1959**, 35, 2000–2003.
- (29) Grace, R. C. R.; Chandrashekar, I. R.; Cowsik, S. M. Solution Structure of the Tachykinin Peptide

- Eledoisin. *Biophys. J.* **2003**, *84* (1), 655–664. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74885-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74885-1).
- (30) Grisley, M. S.; Boyle, P. R. Bioassay and Proteolytic Activity of Digestive Enzymes from Octopus Saliva. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1987**, *88* (4), 1117–1123. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90014-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(87)90014-9).
- (31) Kanda, A.; Takuwa-Kuroda, K.; Aoyama, M.; Satake, H. A Novel Tachykinin-Related Peptide Receptor of Octopus Vulgaris— Evolutionary Aspects of Invertebrate Tachykinin and Tachykinin-Related Peptide. *FEBS J.* **2007**, *274* (9), 2229–2239. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2007.05760.X>.
- (32) LIBONATI, M.; GHIRETTI, F. Research on Cephalotoxin. 2. On Some Pharmacological Properties of the Substance. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **1959**, *35*, 2003–2006.
- (33) McDonald, N.; pharmacology, G. C.-C. and general; 1972, undefined. Purification and Mode of Action of Toxin from Eledone Cirrosa. *Elsevier*.
- (34) Ruder, T.; Sunagar, K.; Undheim, E. A. B.; Ali, S. A.; Wai, T. C.; Low, D. H. W.; Jackson, T. N. W.; King, G. F.; Antunes, A.; Fry, B. G. Molecular Phylogeny and Evolution of the Proteins Encoded by Coleoid (Cuttlefish, Octopus, and Squid) Posterior Venom Glands. *J. Mol. Evol.* **2013**, *76* (4), 192–204. <https://doi.org/10.1007/S00239-013-9552-5>.
- (35) Songdahl, J. H.; Shapiro, B. I. Purification and Composition of a Toxin from the Posterior Salivary Gland of Octopus Dofleini. *Toxicon* **1974**, *12* (2), 109–112. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(74\)90234-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(74)90234-7).
- (36) Ueda, A.; Nagai, H.; Ishida, M.; Nagashima, Y.; Shiomi, K. Purification and Molecular Cloning of SE-Cephalotoxin, a Novel Proteinaceous Toxin from the Posterior Salivary Gland of Cuttlefish Sepia Esculenta. *Toxicon* **2008**, *52* (4), 574–581. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2008.07.007>.
- (37) Undheim, E. A. B.; Georgieva, D. N.; Thoen, H. H.; Norman, J. A.; Mork, J.; Betzel, C.; Fry, B. G. Venom on Ice: First Insights into Antarctic Octopus Venoms. *Toxicon* **2010**, *56* (6), 897–913. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2010.06.013>.
- (38) Kanda, A.; Iwakoshi-Ukena, E.; Takuwa-Kuroda, K.; Minakata, H. Isolation and Characterization of Novel Tachykinins from the Posterior Salivary Gland of the Common Octopus Octopus Vulgaris. *Peptides* **2003**, *24* (1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(02\)00274-7](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(02)00274-7).
- (39) Blancas, J. R. Evaluación de La Pesquería de Pulpo Rojo Octopus Maya En El Puerto de Sisal, Yucatán, México., Universidad Nacional Autónoma de México, 2014. <https://doi.org/132.248.9.195>.
- (40) Pech, D. Obtención de Compuestos Bioactivos Presentes En Las Glándulas Salivales Posteriores Del Pulpo Octopus Maya., Universidad Nacional Autónoma de México, 2014. <https://doi.org/132.248.9.195>.
- (41) Mathur, S.; Hoskins, C. Drug Development: Lessons from Nature (Review). *Biomed. Reports* **2017**, *6* (6), 612–614. <https://doi.org/10.3892/BR.2017.909>.
- (42) Dias, D. A.; Urban, S.; Roessner, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites* **2012**, *2*, 303–336. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>.
- (43) The Ebers Papyrus (left image, ca. 1550 BCE) from Ancient Egypt has a... | Download Scientific Diagram [https://www.researchgate.net/figure/The-Ebers-Papyrus-left-image-ca-1550-BCE-from-Ancient-Egypt-has-a-prescription-for\\_fig1\\_290430960](https://www.researchgate.net/figure/The-Ebers-Papyrus-left-image-ca-1550-BCE-from-Ancient-Egypt-has-a-prescription-for_fig1_290430960) (accessed Nov 10, 2021).
- (44) 9740 - Biblioteca Digital Mundial <https://www.wdl.org/es/item/9740/> (accessed Nov 10, 2021).

- (45) Page from the “Canon of Medicine” by Avicenna (Ibn Sina), fifteenth... | Download Scientific Diagram [https://www.researchgate.net/figure/Page-from-the-Canon-of-Medicine-by-Avicenna-Ibn-Sina-fifteenth-century-Biblioteca\\_fig3\\_340888636](https://www.researchgate.net/figure/Page-from-the-Canon-of-Medicine-by-Avicenna-Ibn-Sina-fifteenth-century-Biblioteca_fig3_340888636) (accessed Nov 10, 2021).
- (46) Malve, H.; Malve; Malve, H. Exploring the Ocean for New Drug Developments: Marine Pharmacology. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2016**, *8* (2), 83. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.171700>.
- (47) Capon, J. R. Marine Bioprospecting – Trawling for Treasure and Pleasure. *European J. Org. Chem.* **2001**, *4*, 633–645. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1099-0690\(200102\)2001:4<633::AID-EJOC633>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1099-0690(200102)2001:4<633::AID-EJOC633>3.0.CO;2-Q).
- (48) History, H. S.; Satake, H. Tachykinin-Like Peptide Family. In *Handbook of Hormones*; Elsevier, 2016; pp 360-e44-2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00044-1>.
- (49) Nebbioso, M.; Evangelista, M.; Librando, A.; Plateroti, A. M.; Pescosolido, N. Iatrogenic Dry Eye Disease: An Eledoisin/Carnitine and Osmolyte Drops Study. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2013.07.001>.
- (50) Aplidin, plitidepsina, PM90001 | PharmaMar <https://pharmamar.com/es/productos/aplidin/> (accessed Dec 22, 2021).
- (51) Yondelis, trabectedina, ET-743l | PharmaMar <https://pharmamar.com/es/productos/yondelis/> (accessed Dec 22, 2021).
- (52) Eledoisin | CAS 69-25-0 | SCBT - Santa Cruz Biotechnology <https://www.scbt.com/es/p/eledoisin-69-25-0> (accessed Dec 22, 2021).
- (53) Alam, M.; Thomson, R. H. *Handbook of Natural Products from Marine Invertebrates: Part 1 Phylum Mollusca.*; 1998.
- (54) Ghiretti, F. Cephalotoxin: The Crab-Paralysing Agent of the Posterior Salivary Glands of Cephalopods. *Nat.* **1959**, *183* (4669), 1192–1193. <https://doi.org/10.1038/1831192b0>.
- (55) Whitelaw, B. L.; Strugnell, J. M.; Faou, P.; Da Fonseca, R. R.; Hall, N. E.; Norman, M.; Finn, J.; Cooke, I. R. Combined Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Posterior Salivary Gland from the Southern Blue-Ringed Octopus and the Southern Sand Octopus. *J. Proteome Res.* **2016**, *15* (9), 3284–3297. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.6B00452>.
- (56) Ruder, T.; Ali, S. A.; Ormerod, K.; Brust, A.; Roymanchadi, M. L.; Ventura, S.; Undheim, E. A. B.; Jackson, T. N. W.; Mercier, A. J.; King, G. F.; Alewood, P. F.; Fry, B. G.; T, R.; SA, A.; K, O.; A, B.; ML, R.; S, V.; EA, U.; TN, J.; AJ, M.; GF, K.; PF, A.; BG, F. Functional Characterization on Invertebrate and Vertebrate Tissues of Tachykinin Peptides from Octopus Venoms. *Peptides* **2013**, *47*, 71–76. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2013.07.002>.
- (57) Nixon, M. Is There External Digestion by Octopus? *J. Zool.* **1984**, *202* (3), 441–447. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7998.1984.TB05094.X>.
- (58) Key, L. N.; Boyle, P. R.; Jaspars, M. Novel Activities of Saliva from the Octopus *Eledone Cirrhosa* (Mollusca; Cephalopoda). *Toxicon* **2002**, *40* (6), 677–683. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00254-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00254-9).
- (59) Blustein, D. H.; Anderson, R. C. Localization of Octopus Drill Holes on Cowries. <https://doi.org/10.4003/006.034.0101> **2016**, *34* (1), 61–64. <https://doi.org/10.4003/006.034.0101>.
- (60) Antonsen, B. L.; Paul, D. H. Serotonin and Octopamine Elicit Stereotypical Agonistic Behaviors in

- the Squat Lobster *Munida Quadrispina* (Anomura, Galatheididae). *J Comp Physiol A* **1997**, *181*, 501–510.
- (61) Cooke, I. R.; Whitelaw, B.; Norman, M.; Caruana, N.; Strugnell, J. M. Toxicity in Cephalopods. **2017**, 125–143. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6458-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6458-3_7).
- (62) Cornet, V.; Henry, J.; Corre, E.; Le Corguille, G.; Zanuttini, B.; Zatylny-Gaudin, C. Dual Role of the Cuttlefish Salivary Proteome in Defense and Predation. *J. Proteomics* **2014**, *108*, 209–222. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2014.05.019>.
- (63) Anastasi, A.; Erspamer, V. The Isolation and Amino Acid Sequence of Eledoisin, the Active Endecapeptide of the Posterior Salivary Glands of Eledone. *Arch. Biochem. Biophys.* **1963**, *101* (1), 56–65. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(63\)90533-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(63)90533-2).
- (64) Guzik, M. T.; Norman, M. D.; Crozier, R. H. Molecular Phylogeny of the Benthic Shallow-Water Octopuses (Cephalopoda: Octopodinae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **2005**, *37* (1), 235–248. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2005.05.009>.
- (65) O'Brien, C. E.; Ponte, G.; Fiorito, G. Octopus. *Encycl. Anim. Behav.* **2019**, 142–148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90074-8>.
- (66) The Octopus - Screen 4 on FlowVella - Presentation Software for Mac iPad and iPhone <https://flowvella.com/s/15xz/F94C47A8-2178-4DDB-AEFD-19045FA89C46> (accessed Dec 23, 2021).
- (67) Gibbs, P. J.; Greenaway, P. Histological Structure of the Posterior Salivary Glands in the Blue Ringed Octopus *Hapalochlaena Maculosa* Hoyle. *Toxicon* **1978**, *16* (1), 59–70. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(78\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(78)90061-2).
- (68) Saunders WB, K. R. and B. P. Octopus Predation on Nautilus: Evidence from Papua New Guinea. *B Mar Sci.* **1991**, *49*, 280–287.
- (69) Erspamer, V.; Anastasi, A. Structure and Pharmacological Actions of Eledoisin, the Active Endecapeptide of the Posterior Salivary Glands of Eledone. *Experientia* **1962**, *18* (2), 58–59. <https://doi.org/10.1007/BF02138250>.
- (70) Grisley, M. S. Separation and Partial Characterization of Salivary Enzymes Expressed during Prey Handling in the Octopus *Eledone Cirrhosa*. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* **1993**, *105* (1), 183–192. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90186-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90186-9).
- (71) McDonald, N. M.; Cottrell, G. A. Purification and Mode of Action of Toxin from Eledone Cirrosa. *Comp. Gen. Pharmacol.* **1972**, *3* (10), 243–248. [https://doi.org/10.1016/0010-4035\(72\)90033-X](https://doi.org/10.1016/0010-4035(72)90033-X).
- (72) Crone, H. D.; Leake, B.; Jarvis, M. W.; Freeman, S. E. On the Nature of “Maculotoxin”, a Toxin from the Blue-Ringed Octopus (*Hapalochlaena Maculosa*). *Toxicon* **1976**, *14* (6), 423–426. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(76\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(76)90057-X).
- (73) Sheumack, D. D.; Howden, M. E. H.; Spence, I. Occurrence of a Tetrodotoxin-like Compound in the Eggs of the Venomous Blue-Ringed Octopus (*Hapalochlaena Maculosa*). *Toxicon* **1984**, *22* (5), 811–812. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(84\)90164-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(84)90164-8).
- (74) Williams, B. L.; Lovenburg, V.; Huffard, C. L.; Caldwell, R. L. Chemical Defense in Pelagic Octopus Paralarvae: Tetrodotoxin Alone Does Not Protect Individual Paralarvae of the Greater Blue-Ringed Octopus (*Hapalochlaena Lunulata*) from Common Reef Predators. *Chemoecology* **2011**, *21* (3), 131–141. <https://doi.org/10.1007/S00049-011-0075-5>.

- (75) Williams, B. L.; Caldwell, R. L. Intra-Organismal Distribution of Tetrodotoxin in Two Species of Blue-Ringed Octopuses (*Hapalochlaena Fasciata* and *H. Lunulata*). *Toxicon* **2009**, *54* (3), 345–353. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2009.05.019>.
- (76) Yotsu-Yamashita, M.; Mebs, D.; Flachsenberger, W. Distribution of Tetrodotoxin in the Body of the Blue-Ringed Octopus (*Hapalochlaena Maculosa*). *Toxicon* **2007**, *49* (3), 410–412. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2006.10.008>.
- (77) Currie, S. P. J. and B. J. Blue-Ringed Octopuses: A Brief Review of Their Toxicology. *North. Territ. Nat.* **2008**, *20*, 50–57.
- (78) Chau, R.; Kalaitzis, J. A.; Neilan, B. A. On the Origins and Biosynthesis of Tetrodotoxin. *Aquat. Toxicol.* **2011**, *104* (1–2), 61–72. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2011.04.001>.
- (79) Hwang, D. F.; Arakawa, O.; Saito, T.; Noguchi, T.; Simidu, U.; Tsukamoto, K.; Shida, Y.; Hashimoto, K. Tetrodotoxin-Producing Bacteria from the Blue-Ringed Octopus *Octopus Maculosus*. *Mar. Biol.* **1989**, *1003* **1989**, *100* (3), 327–332. <https://doi.org/10.1007/BF00391147>.
- (80) Ponte, G.; Modica, M. V. Salivary Glands in Predatory Mollusks: Evolutionary Considerations. *Front. Physiol.* **2017**, *0* (AUG), 580. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2017.00580>.
- (81) Gonçalves, C.; Costa, P. M. Cephalotoxins: A Hotspot for Marine Bioprospecting? *Front. Mar. Sci.* **2021**, *8*, 192. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2021.647344/BIBTEX>.
- (82) Almeida, D.; Domínguez-Pérez, D.; Matos, A.; Agüero-Chapin, G.; Osório, H.; Vasconcelos, V.; Campos, A.; Antunes, A. Putative Antimicrobial Peptides of the Posterior Salivary Glands from the Cephalopod Octopus *Vulgaris* Revealed by Exploring a Composite Protein Database. *Antibiotics* **2020**, *9* (11), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9110757>.
- (83) Karthik, R.; Saravanan, R.; Ebenezar, K. K.; Sivamalai, T. Isolation, Purification, and Characterization of Avian Antimicrobial Glycopeptide from the Posterior Salivary Gland of *Sepia Pharaonis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *175* (3), 1507–1518. <https://doi.org/10.1007/S12010-014-1370-8/FIGURES/7>.
- (84) Karthik, R.; Manigandan, V.; Ebenezar, K. K.; Kavitha, M.; Saravanan, R. Structural Characterization, Teratogenicity and in Vitro Avian Antimicrobial Activity of Posterior Salivary Gland (PSG) Toxin from Cuttlefish, *Sepia Prashadi*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *124*, 1145–1155. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.12.040>.
- (85) Karthik, R.; Manigandan, V.; Ebenezar, K. K.; Vijayashree, R.; Saravanan, R. In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Posterior Salivary Gland Toxin from the Cuttlefish *Sepia Pharaonis*, Ehrenberg (1831). *Chem. Biol. Interact.* **2017**, *272*, 10–20. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2017.04.002>.
- (86) Cheung, R. C. F.; Ng, T. B.; Wong, J. H. Marine Peptides: Bioactivities and Applications. *Mar. Drugs* **2015**, *Vol. 13, Pages 4006-4043* **2015**, *13* (7), 4006–4043. <https://doi.org/10.3390/MD13074006>.
- (87) Russo, A. F. Overview of Neuropeptides: Awakening the Senses? *Headache J. Head Face Pain* **2017**, *57*, 37–46. <https://doi.org/10.1111/HEAD.13084>.
- (88) Winters, G. C.; Polese, G.; Di Cosmo, A.; Moroz, L. L. Mapping of Neuropeptide Y Expression in Octopus Brains. *J. Morphol.* **2020**, *281* (7), 790–801. <https://doi.org/10.1002/JMOR.21141>.
- (89) Altobelli, G. G.; Van Noorden, S.; Cimini, V. Calcium-Binding Protein and Some Neuropeptides in the Retina of *Octopus Vulgaris*: A Morpho-Histochemical Study. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233* (10), 6866–6876. <https://doi.org/10.1002/JCP.26570>.

- (90) Nässel, D. R.; Zandawala, M.; Kawada, T.; Satake, H.; Hoffmann, K. H.; Schoofs, L.; Jékely, G; Tachykinins: Neuropeptides That Are Ancient, Diverse, Widespread and Functionally Pleiotropic. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 1262. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.01262/FULL>.
- (91) Satake, H.; Kawada, T.; Nomoto, K.; Minakata, H. Insight into Tachykinin-Related Peptides, Their Receptors, and Invertebrate Tachykinins: A Review. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.533> **2003**, *20* (5), 533–549. <https://doi.org/10.2108/ZSJ.20.533>.
- (92) Dick R, N. Chapter 44 - Tachykinin Peptides | Elsevier Enhanced Reader. In *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)*; 2013; pp 315–320.
- (93) Haddad Jr, V.; de Magalhães, C. A. Infiltrated Plaques Resulting from an Injury Caused by the Common Octopus (*Octopus Vulgaris*): A Case Report. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2014**, *20* (1), 1–2. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-47>.
- (94) bep\_7288.jpg (800×600) [http://www.habitas.org.uk/marinelife/mollusca/bep\\_7288.jpg](http://www.habitas.org.uk/marinelife/mollusca/bep_7288.jpg) (accessed Oct 11, 2021).
- (95) Galindo, C. G.; Hernández, F. A.; Santos, V. J. *Pulpo Del Golfo de México: Octopus Maya y Octopus Vulgaris*; 2014.
- (96) Yucatán <https://www.yucatan.gob.mx/estado/> (accessed Dec 22, 2021).
- (97) DOF-Diario Oficial de La Federación. **2018**.
- (98) Pascual, C.; Mascaró, M.; Rodríguez-Canul, R.; Gallardo, P.; Sánchez, A. A.; Rosas, C.; Cruz-López, H. Sea Surface Temperature Modulates Physiological and Immunological Condition of Octopus Maya. *Front. Physiol.* **2019**, *10* (JUN). <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.00739>.
- (99) Cas, A.; Ventura, T. Análisis de La Pesquería Del Pulpo Rojo ( Octopus Maya ) Frente a La Costa de Sisal , Yucatán Analysis of the Red Octopus ( Octopus Maya ) Fishery Off the Coast of Sisal , Yucatan Analyse de La Pêcherie de Poulpe Rouge ( Octopus Maya ) Large de La Côte De. **2011**, No. July 2014.
- (100) Gerschenfeld, H. M. Chemical Transmission in Invertebrate Central Nervous Systems and Neuromuscular Junctions. *Physiol. Rev.* **1973**, *53* (1), 1–119. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1973.53.1.1>.
- (101) Krnjević, K. When and Why Amino Acids? *J. Physiol.* **2010**, *588* (1), 33–44. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2009.176990>.
- (102) Conlon, J. M. Preparation of Neuropeptide-Containing Fractions from Biological Materials. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; Humana Press, 1997; Vol. 73, pp 1–8. <https://doi.org/10.1385/0-89603-399-6:1>.
- (103) Andrade-Eiroa, A.; Canle, M.; Leroy-Cancellieri, V.; Cerdà, V. Solid-Phase Extraction of Organic Compounds: A Critical Review (Part I). *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *80*, 641–654. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2015.08.015>.
- (104) 8: Solid Phase Extraction principles | Download Scientific Diagram [https://www.researchgate.net/figure/Solid-Phase-Extraction-principles\\_fig1\\_43492619](https://www.researchgate.net/figure/Solid-Phase-Extraction-principles_fig1_43492619) (accessed Dec 23, 2021).
- (105) Ötles, S.; Kartal, C. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2016**, *15* (1), 5–15. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2016.1.1>.

- (106) Wang, X.; Yu, H.; Xing, R.; Li, P. Characterization, Preparation, and Purification of Marine Bioactive Peptides. *Biomed Res. Int.* **2017**, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/9746720>.
- (107) Nie, Q.; Nie, S. High-Performance Liquid Chromatography for Food Quality Evaluation. *Eval. Technol. Food Qual.* **2019**, *267–299*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00013-5>.
- (108) Coskun, O. Separation Techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul* **2016**, *3 (2)*, 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>.
- (109) GPC (cromatografía de permeación en gel) - Polímeros termoplásticos, elastómeros y aditivos <https://www.mexpolimeros.com/gpc.html> (accessed Jan 4, 2022).
- (110) Cutler, P. Size-Exclusion Chromatography. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *244*, 239–252. <https://doi.org/10.1385/1-59259-655-X:239>.
- (111) Schematic illustration of ion-exchange chromatography. The... | Download Scientific Diagram [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-illustration-of-ion-exchange-chromatography-The-tag-assisted-cation\\_fig5\\_346075737](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-illustration-of-ion-exchange-chromatography-The-tag-assisted-cation_fig5_346075737) (accessed Jan 4, 2022).
- (112) Léonil, J.; Gagnaire, V.; Mollé, D.; Pezennec, S.; Bouhallab, S. Application of Chromatography and Mass Spectrometry to the Characterization of Food Proteins and Derived Peptides. *J. Chromatogr. A* **2000**, *881 (1–2)*, 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00071-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00071-6).
- (113) Pratima, N. A. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review. *Arch. Org. Inorg. Chem. Sci.* **2018**, *1 (1)*. <https://doi.org/10.32474/AOICS.2018.01.000103>.
- (114) Carr, S. A.; Annan, R. S. Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry. *Curr. Protoc. protein Sci.* **2001**, *Chapter 16*, 16.1.1-16.1.27. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PS1601S04>.
- (115) van Losenoord, W.; Krause, J.; Parker-Nance, S.; Krause, R.; Stoychev, S.; Frost, C. L. Purification and Biochemical Characterisation of a Putative Sodium Channel Agonist Secreted from the South African Knobbly Sea Anemone *Bunodosoma Capense*. *Toxicon* **2019**, *168*, 147–157. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2019.06.222>.
- (116) Munaretto, J. S.; May, M. M.; Saibt, N.; Zanella, R. Liquid Chromatography with High Resolution Mass Spectrometry for Identification of Organic Contaminants in Fish Fillet: Screening and Quantification Assessment Using Two Scan Modes for Data Acquisition. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1456*, 205–216. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2016.06.018>.
- (117) Molnar, A.; Lakat, T.; Hosszu, A.; Szebeni, B.; Balogh, A.; Orfi, L.; Szabo, A. J.; Fekete, A.; Hodrea, J. Lyophilization and Homogenization of Biological Samples Improves Reproducibility and Reduces Standard Deviation in Molecular Biology Techniques. *Amino Acids* **2021**, *53 (6)*, 917–928. <https://doi.org/10.1007/S00726-021-02994-W/FIGURES/6>.
- (118) Conlon, J. Inactivación Proteolítica de Péptidos Neurohormonales En El Tracto Gastrointestinal. *Man. Exp. Pharmacol* **1993**, *106*, 177–198.
- (119) C, J. El Papel de Los Productos Naturales En El Mercado Farmacéutico. *An Quím* **2013**, *2 (109)*, 134–141.
- (120) Dobrinčić, A.; Balbino, S.; Zorić, Z.; Pedisić, S.; Kovačević, D. B.; Garofulić, I. E.; Dragović-Uzelac, V. Advanced Technologies for the Extraction of Marine Brown Algal Polysaccharides. *Mar. Drugs* **2020**, *18 (3)*. <https://doi.org/10.3390/MD18030168>.
- (121) Conlon, J. Inactivación Proteolítica de Péptidos Neurohormonales En El Tracto Gastrointestinal.

*Exp. Pharmacol* **1993**, *106*, 177–198.

- (122) Ponte, G.; Modica, M. V.; Ariel Genta, F.; Cruz Foundation, O.; Eduardo Serrão, J.; Vittoria Modica, M.; Ponte, G.; Modica, M. V.; Ariel Genta, F.; Cruz Foundation, O.; Eduardo Serrão, J.; Vittoria Modica, M.; Ponte, G. Salivary Glands in Predatory Mollusks: Evolutionary Considerations. *Front. Physiol.* **2017**, *1* (AUG), 580. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00580>.
- (123) Hooper, Gregory J.; Davies-Coleman, Micahel T.; Coetzee, P. S. New Antimicrobial C14 and C13 Amines from a South African Marine Ascidian. *Nat. Prod. Lett.* **1995**, *1* (6), 31–35. <https://doi.org/10.1080/10575639508044084>.
- (124) Xu, J.; Guo, S.; Du, L.; Wang, Y. M.; Sugawara, T.; Hirata, T.; Xue, C. H. Isolation of Cytotoxic Glucoerebrosides and Long-Chain Bases from Sea Cucumber *Cucumaria Frondosa* Using High Speed Counter-Current Chromatography. *J. Oleo Sci.* **2013**, *62* (3), 133–142. <https://doi.org/10.5650/JOS.62.133>.
- (125) Nicholas, G.M.; Hong, T.W.; Molinski, T.F.; Lerch, M.L.; Cancilla, M.T.; Lebrilla, C. B. Oceanapiside, an Antifungal Bis-  $\alpha,\omega$ -Amino Alcohol Glycoside from the Marine Sponge *Oceanapia Phillipensis*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1678–1681.
- (126) Prasanth, R.M.; Suresh, K. P. Molecular Docking and Statiscal Assessment of Macroalge *Halimeda* Species against Marine Macro Fouler *Mytilus Galvoprovincis* (4CN8). *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2020**, *60* (1), 40–47.
- (127) Hatano, M. Lipids from the Liver of Octopus *Dofleini*. III. The Unsaponifiable Matter. *Hokkaido Daigaku Suisangakubu Kenkyu Iho* **1961**, *9*, 218–221.
- (128) Thompson, Guy A, Jr; Lee, P. The  $\alpha$ -Glyceryl Ether Lipids Occurring in Molluscan Tissues. *Biochiica Biophys. Acta, Lipids Lipid Meatbolism* **1965**, *98* (1), 151–159. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(65\)90019-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(65)90019-6).



## 9. APÉNDICE I

Cromatogramas y espectros de los compuestos anotados de la búsqueda realizada por el equipo CLAR Agilent 1260 LC acoplado a un detector de masas 6545 QTOF/HRMS de alta resolución, fue a través de su base de datos Met-Lin (Metabolitos naturales, 10 000 compuestos, Base de datos Agilent implementada en el programa PCLD de MassHunter, Agilent Inc.) y en SciFinder, se encontraron los 6 compuestos previamente reportados en animales marinos.

### 1. Esfinganina

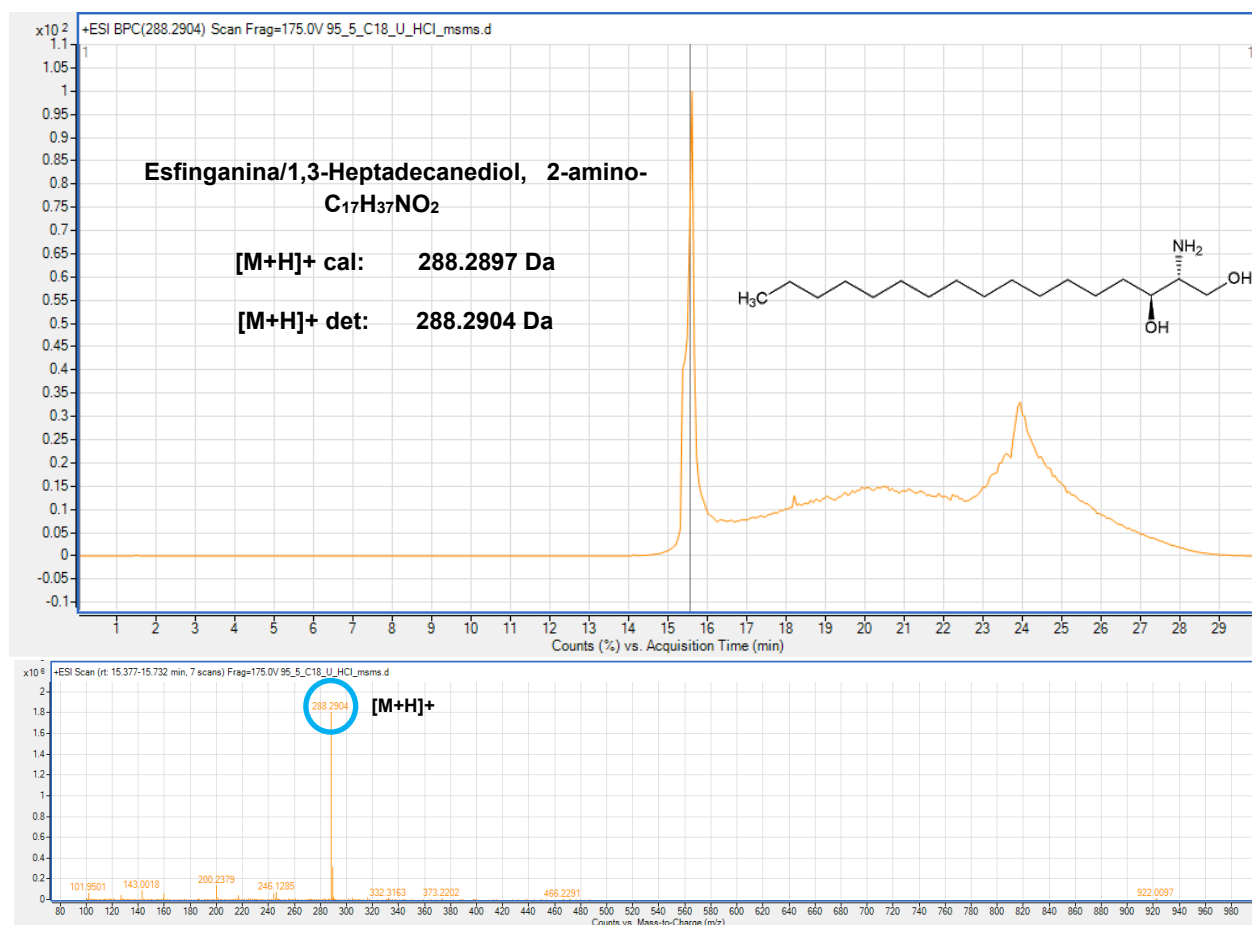


Figura 41. Cromatograma y espectro de la Esfinganina.

La Esfinganina es un isómero encontrado en organismos marinos, detectado en el pepino marino *Cucumaria frondosa*,<sup>124</sup> y en la esponja marina *Oceanapia phillipensis*.<sup>125</sup>

2. 1-Tridecanol

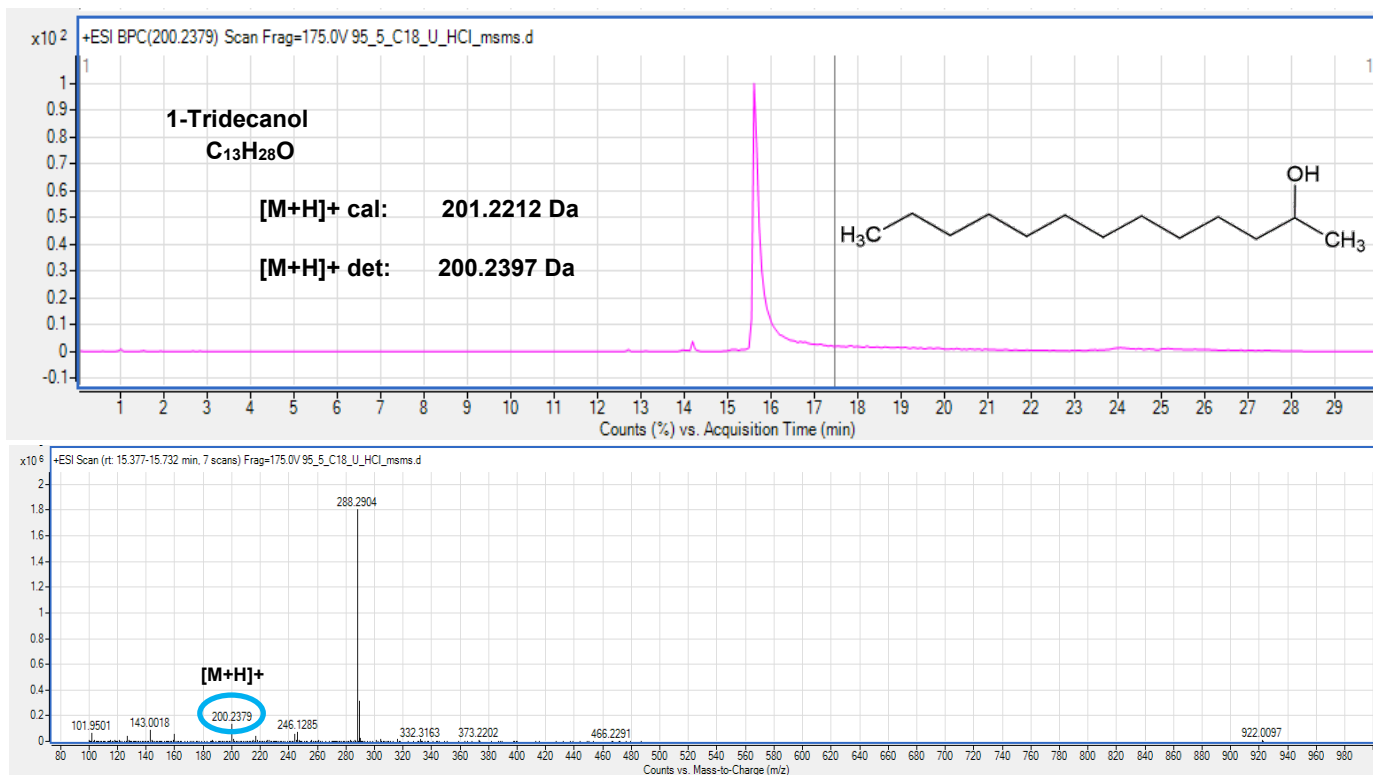


Figura 42. Cromatograma y espectro del 1-Tridecanol.

El 1-Tridecanol es un compuesto que fue encontrado en la macro alga *Halimeda* spp.<sup>126</sup>

### 3. 1-Tetradecanol

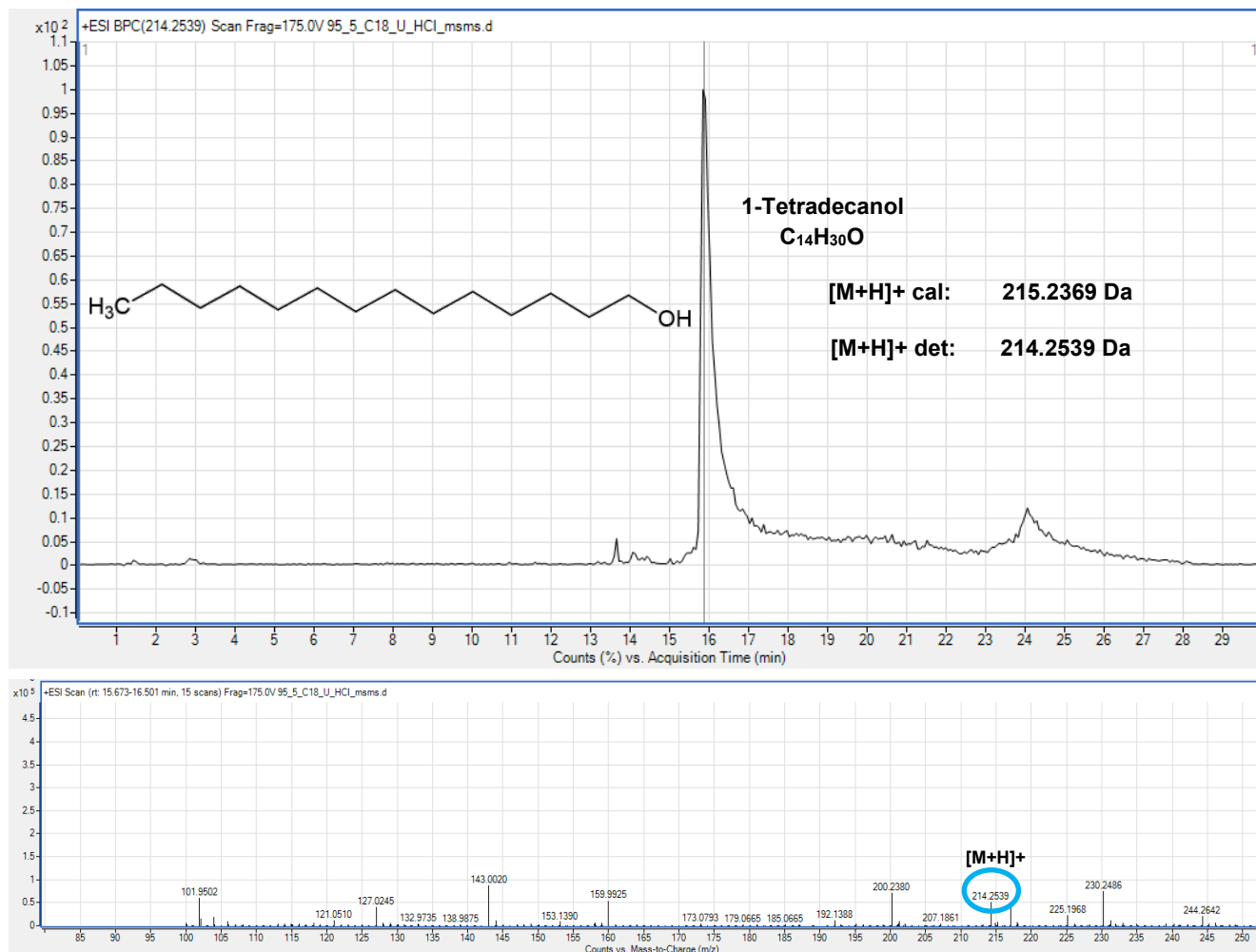


Figura 43. Cromatograma y espectro del 1-Tetradecanol.

El 1-Tetradecanol fue encontrado como un componente de la materia insaponificable de los lípidos en el hígado de *Octopus dofleini*.<sup>127</sup>

4. 1,2,4-Nonadecanetriol

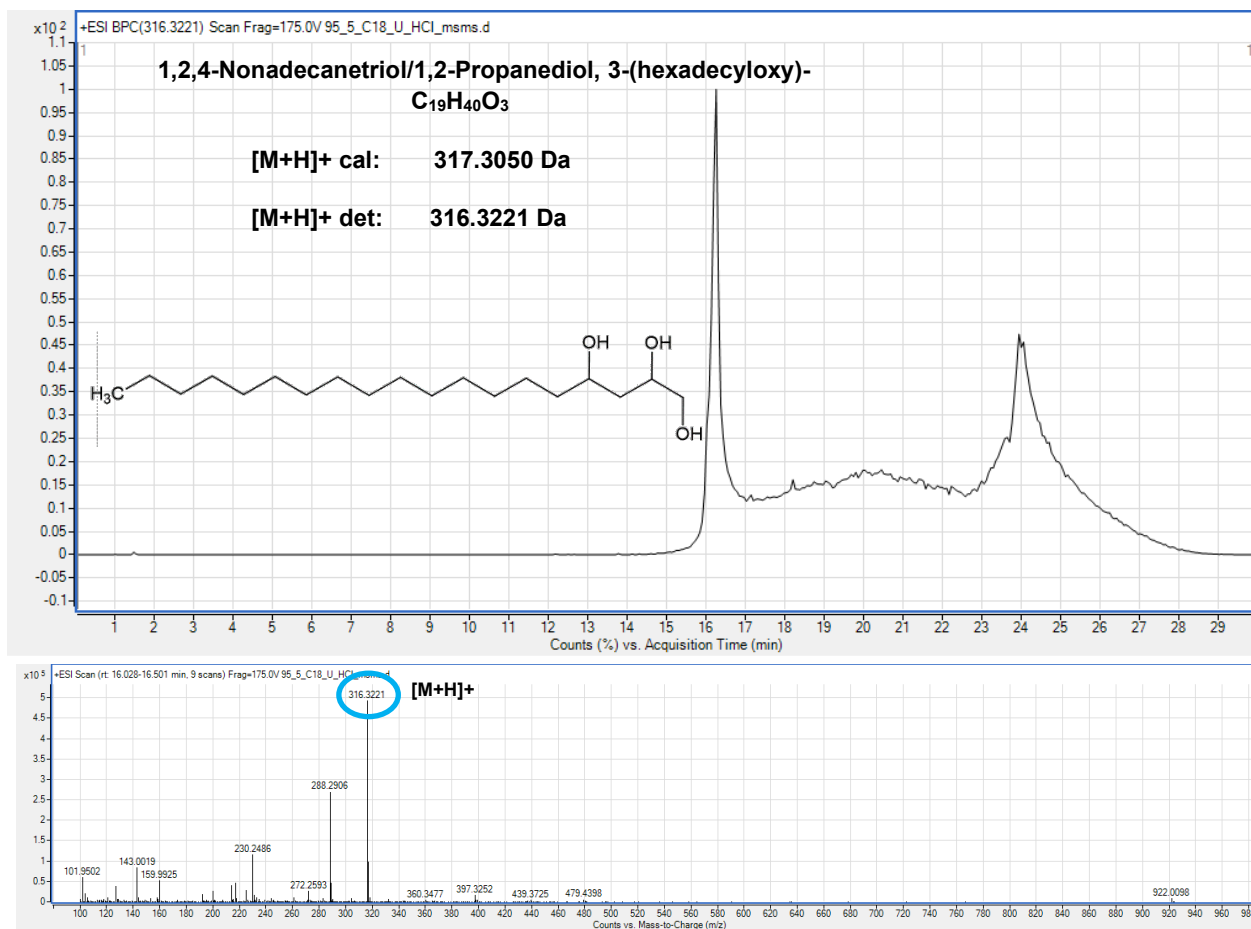


Figura 44. Cromatograma y espectro del 1,2,4-Nonadecanetriol.

Para el caso de la molécula 1,2,4-Nonadecanetriol, se encontró hallazgo de dicha molécula en los lípidos de los tejidos de moluscos.<sup>128</sup>

5. Xestoaminol C

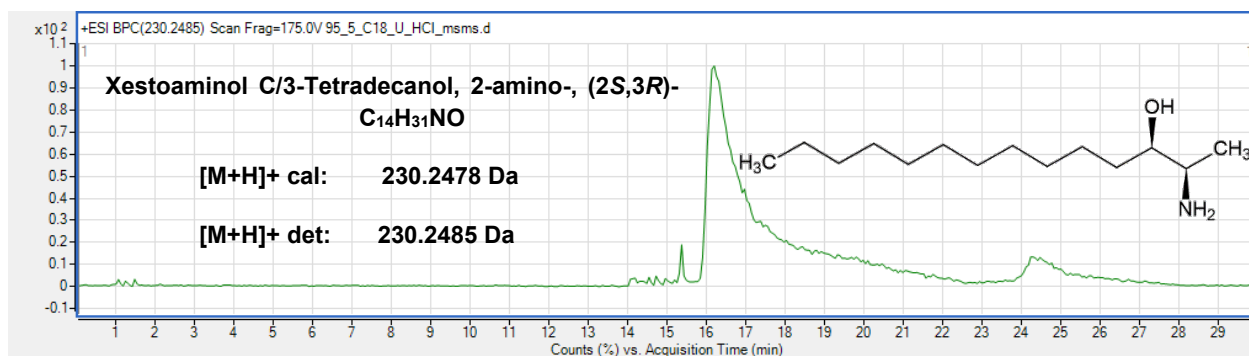


Figura 45. Cromatograma y espectro del Xestoaminol C.