



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

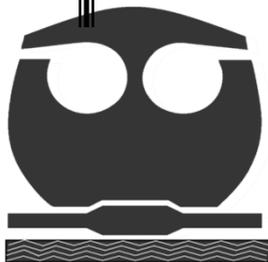
**ESTUDIO QUÍMICO DEL EFECTO PARALIZANTE DE LA
SALIVA DEL PULPO ROJO DE YUCATÁN (OCTOPUS
MAYA).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

**P R E S E N T A
GABRIELA YUNUÉN CAMPOS ESPINOSA**



MÉXICO, D.F.

2013



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: **Profesor: Eugene Athanas Bratoeff Titeff**

VOCAL: **Profesor: María Eugenia Torres Márquez**

SECRETARIO: **Profesor: Sergio Rodríguez Morales**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Vanessa Rebeca Maya Ampudia**

2° SUPLENTE: **Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE QUÍMICA EN SISAL

FACULTA DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Sergio Rodríguez Morales

SUSTENTANTE:

Gabriela Yunuén Campos Espinosa

Si se siembra la semilla con fe y se cuida con perseverancia, sólo será cuestión de tiempo recoger sus frutos.

Thomas Carlyle

ÍNDICE

I.- Índice de figuras	3
II.- Índice de tablas	5
III.- Glosario de abreviaturas	5
1.- Introducción	7
2.- Generalidades	12
3.- Justificación	30
4.- Objetivo general y objetivos particulares	30
5.- Hipótesis	31
6.- Metodología	32
7.- Resultados y discusión	47
8.-Conclusiones	70
9.- Bibliografía	71

I.-ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- La población endémica del pulpo <i>O. maya</i> abarca desde Ciudad del Carmen, Campeche hasta Isla Mujeres, Quintana roo.	7
Figura 2.- a) Fotografía de un espécimen de pulpo rojo <i>O. maya</i> b) Esquema de la fisiología de la masa bucal de los cefalópodos, donde se observan las glándulas salivales posteriores (verde) que se conectan el pico (amarillo).	9
Figura 3.- Estructura de las moléculas aisladas de las GSP de otros cefalópodos.	9
Figura 4.- Caracol <i>Conus striatus</i> que arponea a su presa.	11
Figura 5.- Estructura de la espongistatina 4.	16
Figura 6.- Fotomicrografía de la rádula de un cefalópodo.	26
Figura 7.- Aminas biogénicas aisladas de las GSP de algunos cefalópodos.	27
Figura 8.- Estructura de la Eledoisina aislada de las GSP de <i>Eledona cirrhosa</i> .	28
Figura 9.- Localización del área para la captura de pulpo <i>O. maya</i> en Sisal, Yucatán.	34
Figura 10.- Instalaciones de la cooperativa durante la venta de los pulpos capturados por los pescadores.	35
Figura 11.- a) Esquema de la localización de las glándulas salivales posteriores (GSP en rosa) en las vísceras de un pulpo <i>O. maya</i> , b) extracción de las GSP durante la pesquería.	36
Figura 12.- Esquema de identificación anatómica del pulpo rojo para la obtención de saliva <i>in vivo</i> : GSP (verde), conducto común (negro) y pico (amarillo).	46
Figura 13.- Membrana Amicon de tamaño de corte 3kDa que separa las fracciones neurotóxica y metabólica/digestiva. Las fotos muestran el efecto metabólico (>3 KDa) y neurotóxico (<3 KDa).	48

Figura 14.- Cromatograma de la fracción neurotóxica analizada mediante HPLC en fase reversa. Condiciones de separación.	49
Figura 15.- Cromatografía en capa fina de la fracción paralizante obtenida mediante EFS con el cartucho C18U. a) revelada con lámpara UV y b) revelada con ninhidrina.	50
Figura 16.- Cromatograma de la fracción paralizante analizada mediante HPLC en fase reversa. Condiciones de separación.	52
Figura 17.- Cromatogramas de la separación de la fracción paralizante mediante distintas columnas.	56
Figura 18.- CCF revelada con yodo en las que se muestra: a)Muestra paralizante, b)Fracción orgánica (acetato de etilo), c)Fracción acuosa, an) muestra paralizante revelada con ninhidrina, bn) fracción orgánica revelada con ninhidrina.	59
Figura 19.- CCF semipreparativa en fase normal de la fracción paralizante, revelada con lámpara UV. Las bandas 2 y 3 muestran actividad al realizar el bioensayo.	60
Figura 20.- CCF en fase normal revelada con lámpara UV de la fracción paralizante total (M) comparada con las bandas activas (1 y 2) obtenidas de la CCF semipreparativa.	60
Figura 21.- Cromatograma de la fracción paralizante derivatizada con BTSFA.	61
Figura 22.- Compuestos encontrados al comparar el cromatograma perteneciente a la muestra paralizante derivatizada con BTSFA con la base de datos del software del cromatógrafo de gases acoplado a masas.	67
Figura 23.- Cromatograma de la fracción paralizante obtenida del extracto de las GSP (rosa) en comparación con la obtenida de la saliva de pulpo (rojo).	69

II.- ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Esquema de elución para la extracción en fase sólida del cartucho C18U (fase reversa).	41
Tabla 2.- Dosis ensayadas para calcular la EC ₅₀ , y los resultados de la actividad paralizante determinada en el bioensayo neurotóxico. (+) activo (-) no activo	41
Tabla 3.- Dosis ensayadas para calcular la EC ₅₀ y afinar la ventana de actividad, también se muestran los resultados de la actividad paralizante determinada en el bioensayo neurotóxico. (+) activo (-) no activo.	42
Tabla 4. Esquema de purificación para la obtención de la fracción paralizante.	47
Tabla 5.- Moléculas presentes en la muestra paralizante una vez analizado el espectro de CG-EM.	62

III. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- **GSP:** Glándulas Salivales Posteriores
- **CCF:** Cromatografía en capa fina
- **SPE:** Solid Phase Extraction
- **EFS:** Extracción en fase sólida
- **MeOH:** Metanol
- **AcOet:** Acetato de etilo
- **AcCN:** Acetonitrilo
- **AcOH:** Ácido acético
- **CLAR:** Cromatografía líquida de alta resolución
- **HPLC:** High performance liquid chromatography

- **GC-MS:** Gas Chromatography- Mass Spectrometry
- **CG-EM:** Cromatografía de gases acoplado a masas
- **EC₅₀ :** Concentración efectiva del 50 %
- **SSI:** Solución salina isotónica
- **Kg:** Kilogramos
- **g:**gramos
- **p/v:** peso/ volumen
- **µg:** micro gramos
- **mL:** mililitro
- **µL:** micro litros

1.- Introducción

El pulpo rojo *Octopus maya* es una especie endémica de la Península de Yucatán (**Figura 1**) y constituye uno de los recursos pesqueros más importantes a nivel nacional y estatal por su volumen de captura y valor comercial; genera una captura anual de 10,000 toneladas (CONAPESCA, 2012). En los últimos años la población de esta especie se ha explotado a niveles muy cercanos a su máxima capacidad biológica, por lo que se ha desarrollado su acuicultura como alternativa para la preservación de la especie (Salas et al., 2006).

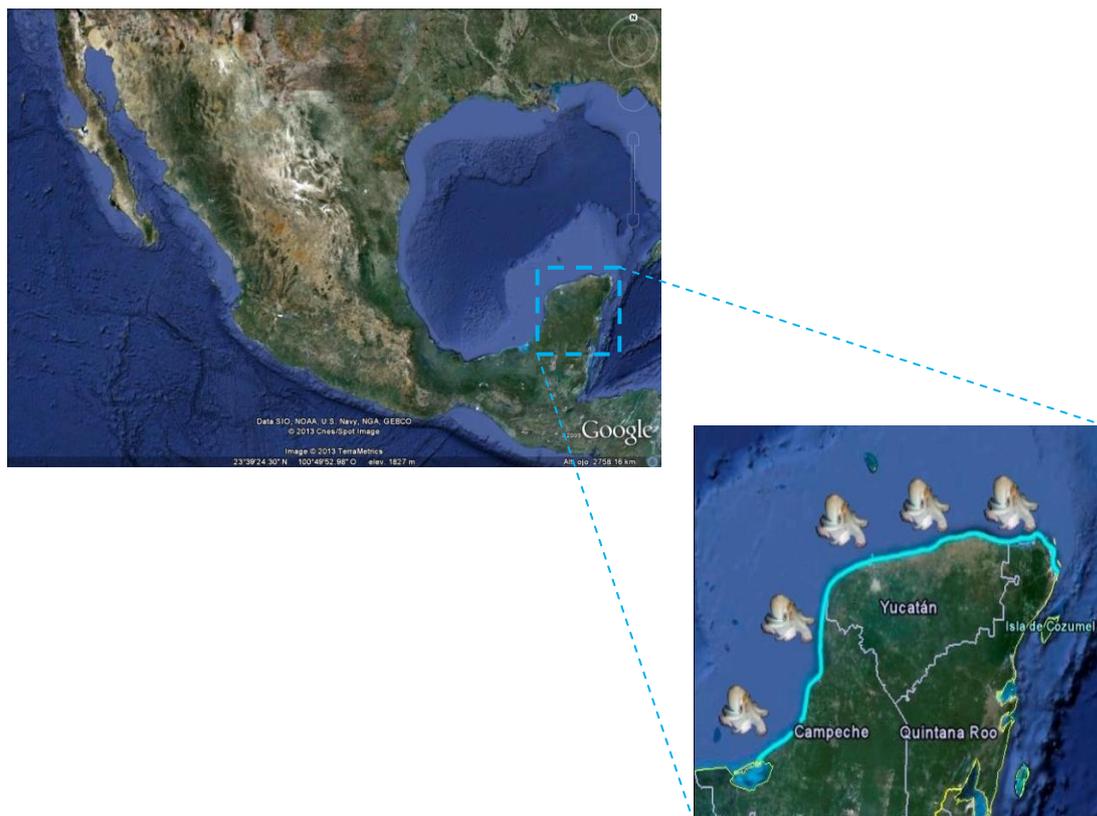


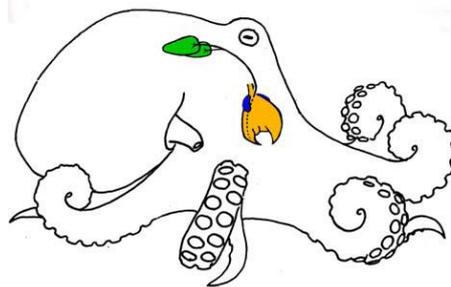
Figura 1.- La población endémica del pulpo *O. maya* abarca desde Ciudad del Carmen, Campeche hasta Isla Mujeres, Quintana Roo.

Ahora bien, en términos de capacidad pesquera hoy en día una cuestión importante de las flotas es el procesamiento de las capturas, en el caso de la pesquería del pulpo *O. maya* de lo que se captura, no todo se consume, el 85% lo constituye la carne que se comercializa, sin embargo, el 15% restante, corresponde a las vísceras, (cerebro, estómago, pico, ojos, glándulas salivales, etc.) subproductos que son desechados en altamar o en el puerto durante la evisceración; además de que este tipo de prácticas representan un desperdicio parcial del recurso; pueden también generar problemas ecológicos, ambientales y toxicológicos (Blanco et al., 2007).

Una estrategia es la utilización de estos subproductos para la elaboración de productos de valor agregado, por ejemplo la generación de fármacos (Kim et al., 2006). En los últimos años la búsqueda de nuevos medicamentos y estructuras moleculares novedosas con fines terapéuticos provenientes de organismos marinos se ha incrementado considerablemente (Garateix , 2005).

De algunos cefalópodos, se han aislado moléculas de las glándulas salivales posteriores (GSP) (**Figura 2**) para su empleo como herramientas farmacológicas o medicamentos, por ejemplo la Eledoisina (**Figura 3**) (undecapéptido aislado de *Eledona moschata* y *Eledone aldrovand*), ésta se ha utilizado por sus propiedades vasodilatadoras y estimulantes del músculo liso en mamíferos (Kanda et al., 2003). Análogamente podemos citar la SE-cefalotoxina y a las octotaquiquininas (**Figura 3**) aisladas de las GSP de *Sepia esculenta* y de *Octopus vulgaris* respectivamente, la primera se trata de una toxina de naturaleza proteica, cuyo peso molecular es de 100 kDa y que posee características neurotóxicas (Atsushi et al., 2008), mientras que las últimas implican neuropéptidos secretados como veneno y que actúan en organismos vertebrados.

Se sabe relativamente poco de las GSP del pulpo rojo de Yucatán (**Figura 2**) y de su estrategia de alimentación, sin embargo, nuestro equipo de trabajo recientemente, separó la fracción responsable de la neurotoxicidad en la saliva del pulpo *O. maya* (Reyes, 2012).



a)

b)

Figura 2.- a) Fotografía de un espécimen de pulpo rojo *O. maya* b) Esquema de la fisiología de la masa bucal de los cefalópodos, donde se observan las glándulas salivales posteriores (verde) que se conectan el pico (amarillo) a través del conducto común. (Fry et al., 2009)

PGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂

Eleoisina fármaco aislado de las GSP de *Eledona moschata* y *Eledona aldrovandi*

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

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

Taquiquininas aisladas de las GSP de *O. vulgaris*

Figura 3.- Estructura de las moléculas aisladas de las GSP de otros cefalópodos

Éstas moléculas juegan un rol adaptativo en los cefalópodos: matan, paralizan, inmovilizan, hacen una pre-digestión de la presa o bien funcionan como defensa en contra de los predadores; uno de los grupos que utiliza esta saliva para la captura de sus presas potencialmente peligrosas son los miembros del género Octopodidae, que son bien conocidos por ser predadores de moluscos, crustáceos, y peces. Muchos octópodos comienzan a hacer uso de esta saliva una vez que la fuerza física les resulta ineficiente, por lo que, en general, para crustáceos, usualmente el pulpo perfora pequeños agujeros a través de su caparazón, para posteriormente inyectar su saliva tóxica (producida en las GSP), la cual paraliza, mata, y genera el desprendimiento del tejido del exoesqueleto de la presa (Undheim et al., 2010). La secreción de las glándulas salivales es una mezcla compleja de sustancias tales como dopamina, serotonina, toxinas, enzimas proteolíticas, quitinasas, aminos biogénicas, etc. (Hanlon & Messenger, 1996).

Se persigue estudiar la saliva de las GSP del pulpo rojo de Yucatán para evaluar su potencial como fuente de moléculas bioactivas. Esto mediante la separación biodirigida de la actividad paralizante, y posteriormente realizar su elucidación estructural.

El interés en la separación e identificación de la(s) molécula(s) causantes del efecto paralizante fundamenta su importancia en la posible síntesis de un fármaco, una vez que se logra conocer la estructura molecular. Hoy en día la biodiversidad marina ha dado lugar a la creación de algunos fármacos a partir de productos naturales de origen marino como es el caso del Ziconotide o Prialt, analgésico 1000 veces más potente que la morfina proveniente del caracol *Conus magus*, el cual inyecta este péptido a través de su arpón para defenderse y paralizar a sus presas (**Figura 4**).

Una de las ventajas de éste fármaco es que su forma sintética y comercial no causa adicción ni resistencia (Bernstein & Chivian, 2008).



Figura 4.- Caracol *Conus striatus* que arponea a su presa.

2.- Marco teórico

2.1 Productos naturales

El término -productos naturales- se refiere a todas aquellas moléculas orgánicas pequeñas que frecuentemente son llamados metabolitos secundarios, los cuales son producidos por diversos organismos. La materia natural que los origina incluye varias fuentes: plantas, microorganismos, organismos marinos, insectos, anfibios.etc. Estos metabolitos comprenden numerosos compuestos químicos que a menudo son específicos de cada especie y que no son esenciales para su sobrevivencia. El interés en su estudio ha incrementado en años recientes debido a que representan un reservorio formidable para la generación de nuevos medicamentos (Seidel, 2006).

Durante miles de años la naturaleza ha sido una fuente inagotable de agentes terapéuticos. Una gran número de medicamentos actuales se han derivado de fuentes naturales; muchos de ellos basados en los usos de la medicina tradicional (Seidel, 2006). La Organización Mundial de la Salud estima que el 80% de la población mundial depende principalmente de medicamentos tradicionales como agentes de atención de salud primaria (Spainhour, 2005).

Los productos naturales pueden contribuir a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos en diferentes ámbitos: a) actuando como nuevos medicamentos que se pueden utilizar sin modificar, b) proporcionando nuevo grupos farmacofóricos que sirven como "bloques químicos de construcción" para la síntesis de nuevos fármacos y c) indicando nuevos mecanismos farmacológicos de acción que permita completar la síntesis de nuevos análogos.

Sin duda alguna, los productos naturales, seguirán siendo considerados como una de las mayores fuentes para la obtención de nuevos fármacos; no sólo porque ofrecen una diversidad estructural

incomparable y muchos de ellos poseen un tamaño relativamente pequeño (<2000Da), sino también porque prometen propiedades similares a los fármacos, es decir, pueden ser absorbidos y metabolizados. Así mismo, es importante señalar que juegan un papel crucial para satisfacer la demanda en la exploración de nuevas moléculas dado el aumento en la búsqueda de éstas (Seidel, 2006).

2.2 Productos naturales de origen marino

Como ya se ha mencionado antes, la naturaleza constituye un recurso cuantioso de nuevos compuestos bioactivos; el estudio de éstos metabolitos ha demostrado a través de la historia que implican un inmenso beneficio en el descubrimiento de agentes terapéuticos. El uso de productos naturales marinos y terrestres como tratamientos para diversos padecimientos ha existido en la humanidad desde sus primeras civilizaciones.

Si bien es cierto que aproximadamente el 70% de la biósfera del planeta está constituida por océanos y que la diversidad de flora y fauna marina excede a la terrestre, hoy en día el conocimiento acerca de organismos marinos sigue siendo escaso en comparación a otras fuentes de productos naturales que han sido exploradas (Garateix, 2005). Por otro lado, las investigaciones actuales han demostrado que representan un recurso valioso para la obtención y descubrimiento de compuestos bioactivos. Los organismos marinos han evolucionado para colonizar una gran variedad de nichos ecológicos y al mismo tiempo lo han hecho así los productos naturales bajo la presión de la selección natural para unirse a receptores específicos, por ende, representan respuestas ecológicas de los organismos hacia su ambiente.

Los organismos marinos se encuentran en competencia constante de espacio, luz, nutriente, etc. por lo que no resulta sorprendente que hayan desarrollado una gama de mecanismos de defensa: físicos, conductuales, y estrategias químicas que aseguren su sobrevivencia. Algunos roles ecológicos que se han considerado de los productos naturales de origen marino incluyen la mediación de competencia espacial, anti-depredación, prevención de la formación de biofilms, la protección contra rayos UV, el favorecimiento de la reproducción y estrategias conductuales (Stachowicz , 2001). Con el afán de adaptar su existencia en esa amplia variedad de hábitats, han desarrollado una gran diversidad de rutas metabólicas secundarias que producen un vasto número de compuestos químicos con el fin de adecuar su estilo de vida, estos incluyen una extensa gama: terpenos, péptidos, alcaloides, shikimatos, policétidos, acetogeninas y un sinnúmero de estructuras desconocidas y sin caracterizar (Seidel, 2006).

En la última década, estructuras provenientes de más de 5000 productos naturales de origen marino han sido publicadas. Muchos de estos compuestos han probado su potencial en muchos campos, particularmente como potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades (Seidel, 2006).

2.2.1 Ventajas y desventajas de los productos naturales de origen marino

Ahora bien, como ya se ha mencionado anteriormente, los organismos marinos ofrecen una amplia gama de compuestos químicos que han sido preseleccionados de manera evolutiva para modular rutas bioquímicas, razón por la cual muchos grupos académicos e industriales acceden a ésta fuente mediante el uso de plataformas de avanzada tecnología. (Stachowicz, 2001).

Si bien es cierto que actualmente existe una tendencia para obtener separaciones más rápidas y automatizadas como resultado de los avances tecnológicos que ha generado interés en las industrias farmacéuticas, también lo es que durante el aislamiento y separación hay algunos factores que pueden complicar tales procedimientos dentro de los cuales podemos encontrar:

Incertidumbre taxonómica

La información taxonómica de un organismo puede facilitar la búsqueda bibliográfica de los compuestos reportados que son producidos por algunas especies bajo estudio, así como sus métodos de purificación, sin embargo, si la identificación taxonómica resulta incorrecta o incompleta esto puede generar dificultades en las consideraciones químicas que se toman en cuenta del organismo.

Cantidades pequeñas de los metabolitos

La presencia de un metabolito muy potente a nivel traza puede complicar el proceso de extracción y aislamiento. Esto requiere una gran cantidad de los organismos en estudio para el aislamiento del metabolito activo a un nivel que permita facilitar su posterior elucidación estructural. Por ejemplo, para aislar sólo 10.7 mg del macrólido antitumoral espongiostatina (**Figura 5**), se requieren 2.5 toneladas de la esponja sudafricana *Spirastrella spinispirulifera*, el procedimiento para reducir la biomasa de la esponja resulta muy laborioso, y en un etapa dada se requirió utilizar HPLC.

Inestabilidad de los metabolitos

Los extractos marinos pueden contener compuestos extremadamente lábiles. La descomposición de éstos puede ocurrir en cualquier paso durante el proceso de purificación.

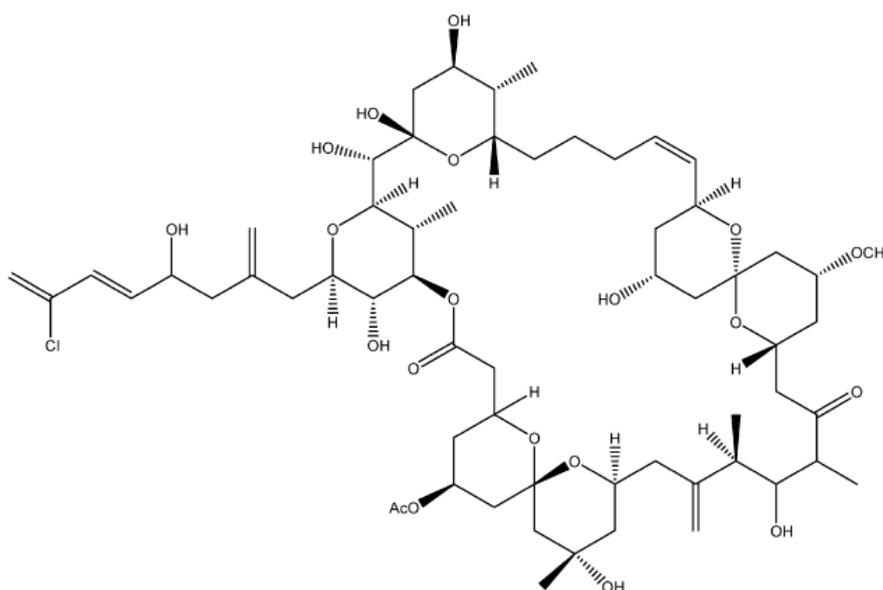


Figura 5.- Estructura de la espongistatina 4 (Seidel, 2006).

Algunos factores como el calor, la luz, el aire, pH entre otros pueden generar la degradación de los compuestos. Algunos materiales utilizados para la separación también pueden activar algún tipo de reacciones.

Purificación de compuestos solubles en agua: efectos de un alto contenido de agua y/o sales

Existen muchas dificultades asociadas con el aislamiento y purificación de los compuestos altamente solubles en agua, dado que éstos son extremadamente polares, se puede utilizar un medio acuoso o bien disolventes muy polares como el metanol para realizar la extracción. En el caso de disoluciones acuosas, un problema inevitable es el crecimiento de hongos o bacterias, el cual frecuentemente degrada los compuestos activos o bien genera falsos positivos en los bioensayos por las endotoxinas producidas por los microorganismos. La concentración de extractos acuosos también genera problemas dado que se requiere una alta temperatura para evaporar el agua.

Por otro lado, también es importante mencionar que los extractos acuosos contienen de manera frecuente agentes surfactantes, los cuales pueden causar burbujeo durante el proceso de concentración.

La abundancia de sales implicada por el agua de mar en los extractos acuosos dificulta el proceso de aislamiento, en la mayoría de los casos se requiere un buffer.

Compuestos carentes de cromóforos UV

La detección ultravioleta es la técnica preferida para el análisis de productos naturales mediante HPLC por su facilidad de uso y la alta sensibilidad que posee. Sin embargo, un aspecto desfavorable de los detectores UV es la incapacidad de detectar compuestos sin cromóforos UV. Ahora bien, el detector de índice de refracción (IR) fue hasta hace poco la única alternativa disponible a la detección UV, sin embargo, éste tipo de detectores son menos sensibles y se limitan a una elución isocrática.

Costo y efectividad de tiempo

Hasta ahora la purificación de productos naturales de origen marino resulta ser un proceso tedioso, caro y que consume tiempo (Seidel , 2006). Sin embargo, los avances tecnológicos, en las técnicas de separación cromatográficas (principalmente en HPLC y UPLC) así como en las nanosondas para los equipos de Resonancia Magnética Nuclear, han llevado a la reducción en tiempos.

2.3 Bioprospección

El término bioprospección se refiere al proceso de búsqueda de recursos genéticos y compuestos bioquímicos potencialmente valiosos en la naturaleza.

Durante varios siglos los productos naturales y el conocimiento tradicional han contribuido de manera importante en la búsqueda de fármacos, por ejemplo la aspirina obtenida de la corteza del sauce, ilustra el descubrimiento de agentes terapéuticos a partir de los productos naturales (Sampath, 2005).

Por otro lado, es importante mencionar que a pesar de todos los éxitos obtenidos, la búsqueda de nuevos fármacos continuará dado que las enfermedades y las pestes siguen evolucionando y generando resistencia a los medicamentos. Es por esto que las plantas y microorganismos constituyen fuentes valiosas para encontrar nuevos agentes bioactivos, sin embargo, resulta de mayor importancia explorar ambientes disponibles de diversidad molecular. La estrategia de buscar nuevos ecosistemas para la bioprospección trae con ello la oportunidad de descubrir estructuras moleculares sin precedentes que puedan presentar actividad biológica, con mecanismos que hasta el momento no posean resistencia (Capon, 2001).

Los océanos abarcan un porcentaje importante del planeta Tierra, por lo que se trata de un notable ecosistema rico en diversidad marina (Capon, 2001).

En años recientes, la bioprospección de productos naturales de origen marino, ha alcanzado una cantidad considerable de candidatos a fármacos. Muchas de estas moléculas aún están en desarrollo clínico o pre-clínico, sin embargo, algunas otras ya están en el mercado como es el caso de la Cytarabina, Ara-C (Haefner, 2003), compuesto semisintético desarrollado a partir de la esponja *Tethya cripta*.

La búsqueda en la ecología de productos naturales de origen marino, indican que muchos de éstos compuestos funcionan como armas químicas que han evolucionado para fungir como inhibidores potentes de procesos fisiológicos en las presas, predadores o competidores en

los organismos marinos, por otro lado, también están sometidos a condiciones únicas, lo que provoca que sintetizen moléculas que no tienen equivalencia con las terrestres (Haefner, 2003).

La existencia de un gran número de productos naturales y entidades químicas innovadoras provenientes del océano es cada vez más reconocida, las actividades biológicas que implican resultan prometedoras para la búsqueda de medicamentos eficaces y específicos para el tratamiento de enfermedades (Haefner, 2003).

2.4 Utilización de sub-productos

Las poblaciones de peces silvestres son un recurso limitado, la sobrepesca ha sido un problema en diversas zonas pesqueras, cuya severidad ha variado entre especies y regiones (Kristbergsson & Arason, 2005). Actualmente la producción de recursos pesqueros provenientes del océano es de 85 millones de toneladas, casi el 63% del la producción mundial pesquera (Blanco et al., 2007). Ésta situación ha sido generada por la modernización y el aumento en la capacidad de los buques pesqueros que han incrementado el número de oportunidades y la habilidad para encontrar y cosechar peces en el océano. Hoy en día, se conoce que la mayoría de las especies pesqueras son explotadas a su límite. La sustentabilidad de las diversas poblaciones pesqueras ha provocado el incremento en la utilización total de los peces cosechados, dado que generalmente, no todo lo que se obtiene del mar es utilizado eficientemente (Kristbergsson & Arason, 2005).

Podemos definir a los sub-productos si consideramos un pescado: la carne que conforma el cuerpo y que constituye los filetes es la parte principal. Mientras que la cabeza, huesos, piel, intestinos, etc., son lo que se conoce como sub-productos.

Algunas veces éstos son el producto principal, como el caso de la harina de pescado o el aceite de hígado (Kristbergsson & Arason, 2005).

Hoy en día, una cuestión importante en las flotas pesqueras, es el procesamiento que se le da a las capturas a bordo, es decir, la generación de subproductos (cabeza, intestino, piel, etc.) que son desechados al océano. Además de que este tipo de prácticas representan un desperdicio parcial de los recursos naturales, pueden provocar problemas ecológicos (materia orgánica arrojada al mar que puede producir cambios en el ecosistema), ambientales (mantenimiento de sustancias tóxicas derivadas de tierra: PBC, dioxinas, metales pesados, etc.), y toxicológicos (propagación de parásitos presentes en las vísceras de los pescados tales como *Anisakis*) (Blanco et al., 2007).

En el caso del pulpo *O. maya*, el 85% de las capturas representan la parte comercializable para consumo humano, mientras que el otro 15% son subproductos (vísceras, cerebro, ojos, glándulas salivales posteriores, etc.) que son desechados durante la evisceración a bordo de la flota pesquera o bien en el puerto de embarque. La generación de productos con valor agregado ha sido una técnica que se ha implementado para optimizar y aminorar la producción de desechos, por ejemplo la obtención de enzimas (tripsina, quimiotripsina, elastina y colagenasa) a partir de intestinos de pescado, las cuales poseen aplicaciones médicas, farmacéuticas, cosméticas, higiénicas e industriales (Kristbergsson & Arason, 2005).

El objetivo principal de la sustentabilidad en las reservas pesqueras es la utilización total de los productos obtenidos durante la pesquería, orientado de una forma que evite cualquier tipo de alteración ambiental o contaminación de una forma irrevocable (Kristbergsson & Arason, 2005).

2.5 Generalidades del pulpo

Los cefalópodos son organismos invertebrados pertenecientes al phylum Mollusca. Según Sweeney y Roper (1998), están clasificados en dos subclases y cinco ordenes (Figura 1.16). La subclase Nautiloidea, cuyo único orden y género es Nautilus, representa a los cefalópodos con concha externa. La subclase Coleoidea, donde están todos los demás, corresponde a aquellos con concha interna, vestigial o ausente, en ésta última se encuentra el orden Octopoda, caracterizado por tener ocho brazos, umbrela mediana a pequeña, carente de aletas, concha interna muy reducida o ausente, en éste orden se encuentra el género Octopus (Budelman et al., 1997) .

El pulpo es un molusco cefalópodo marino y carnívoro presente en aguas de climas templados y tropicales de todo el mundo. Se caracteriza por tener un cuerpo blando con un cerebro bien desarrollado y ocho brazos, cada uno de los cuales posee dos filas de ventosas. Son animales que pueden cambiar de forma muy rápida en color y textura de piel como adaptaciones morfológicas (Munguía et al., 2007).

2.6 Pulpo rojo *Octopus maya*

El pulpo rojo *O. maya* es una especie endémica bentónica que habita solamente en la plataforma continental de Yucatán, principalmente en áreas costeras de baja profundidad.

Taxonómicamente hablando son dos los caracteres distintivos más notables en esta especie:

- 1.-La presencia en todos los ejemplares de un par de manchas redondeadas oscuras (en forma de lunar) u ocelos situados por debajo de los ojos, entre éstos y la base del segundo y tercer brazos.

2.- La forma particular del hectocotilo o brazo copulador del macho, el cual presenta un surco espermatofórico a todo lo largo del brazo.

En el caso de *O. maya* la coloración que adquiere varía con las características de medio ambiente. Presentan coloración blanquecina cuando están en reposo, parda cuando se les irrita o al alimentarse.

O. maya pertenece al grupo de pulpos de desarrollo embrionario directo 60-65 días, sin fase larvaria, es decir, los juveniles presentan características morfo-fisiológicas propias de los adultos. El número de huevos por puesta oscila entre 1500-2000. Las áreas de desove se localizan en aguas de poca profundidad cercanas a la costa y los huevos son fijados en racimos (Solís, 1967).

Es una especie explotada con mayor intensidad por la flota artesanal dado su establecimiento en la costa.

Por su volumen de captura y valor comercial conforma una de las pesquerías más importantes del estado de Yucatán, siendo así el principal recurso natural generador de ingreso para la costa Yucateca (Munguía et al., 2007).

Estudios recientes han demostrado que *O. maya* posee un alto potencial para la acuicultura dadas sus características de adaptabilidad a las condiciones en cautiverio, (Zamora et al., 2011) lo cual resulta ventajoso puesto que en los últimos años la población de pulpo se ha explotado a niveles muy cercanos a su máxima capacidad biológica.

2.7 Alimentación y forrajeo de cefalópodos

Los pulpos como todos los demás cefalópodos son predadores activos. En general seleccionan su presa principalmente de crustáceos y moluscos, así como de una gran variedad de otros invertebrados y peces (Grisley et al., 1996).

Ahora bien, la elección de moluscos y crustáceos como presas representan un problema para los pulpos dado que el acceso al tejido de la presa está protegido por una concha fuertemente calcificada (moluscos), o en el caso de crustáceos un exoesqueleto quitinoso; surge así la necesidad de inmovilizar a un adversario agresivo y activo (Grisley et al., 1996).

Hoy en día la evidencia disponible sugiere que algunos invertebrados bentónicos como los cefalópodos pueden inyectar sus toxinas en sus presas para facilitar su captura. Éstas toxinas tienen diversas estructuras y mecanismos de acción, los cuales varían entre el taxa. Quizá el ejemplo más claro del rol que ejercen las toxinas en la captura de su presa es del pulpo *Eledone cirrhosa* el cual se explica más adelante (Stachowicz, 2001).

2.8 Manipulación de la presa

La estrategia de alimentación del pulpo *O. maya* con respecto a los crustáceos aún es desconocida. Sin embargo, de otras especies de octópodos se sabe que ésta involucra la manipulación de la presa, particularmente con la perforación de un agujero en la concha o en el exoesqueleto del molusco o crustáceo respectivamente.

Se ha reportado que la realización del agujero anteriormente mencionado ocurre por la acción conjunta de la rádula y la papila salival. La operación mecánica es optimizada mediante la secreción de saliva proveniente de las glándulas salivales posteriores la cuál actúa química y enzimáticamente para debilitar las conchas (véase **Figura 2**, pág 12; Fiorito & Gherardi, 1999).

Una vez que el agujero es completado, el pulpo inyecta mediante el ducto conectado a la papila salival, un cóctel de toxinas y enzimas hidrolíticas:

el agente tóxico paralizante induce la relajación de la presa, dando tiempo para que las enzimas contenidas en la saliva causen el desprendimiento de los músculos adjuntos al esqueleto, y el pulpo pueda removerlos del caparazón y así tener acceso al tejido muscular y vísceras del endoesqueleto.

En muchos casos un pulpo podría ser capaz de dominar y desmembrar un crustáceo usando la fuerza física, sin embargo, la falta de una pre-digestión realizada por la saliva, reduce la eficiencia de su alimentación (Grisley et al., 1996).

En el caso del pulpo *Eledone cirrhosa* se ha reportado que durante su mecanismo de depredación, el crustáceo muestra signos de parálisis después de un minuto; efecto que se vuelve irreversible con tres minutos acontecidos; el proceso de perforación por parte del pulpo se completa 9 minutos después del ataque, y es hasta que han transcurrido 40 minutos cuando la ingestión del tejido de la presa es comenzado por este cefalópodo.

La parálisis inicial se debe a la toxina salival inyectada, mientras que la digestión de los músculos es provocada por enzimas digestivas (Hanlon & Messenger, 1996). Se conoce también que la perforación puede realizarse en la superficie corneal del ojo o bien en el caparazón del crustáceo como vías para la entrada de la saliva (Grisley et al., 1996).

2.8.1 Sistema digestivo de los cefalópodos

Los cefalópodos son considerados carnívoros voraces y poseen adaptaciones morfológicas para la captura de su presa, las cuales pueden clasificarse como: a) brazos y tentáculos, b) boca y masa bucal, y c) intestino.

La combinación de los brazos musculosos y las fuertes ventosas permiten que el octópodo pueda aplicar fuerzas de tracción para controlar y capturar a sus presas. Por otro lado las ventosas funcionan un papel importante como un sistema quimiotáctil para la búsqueda de alimento durante sus capturas.

Otra de las adaptaciones pertenecientes a los octópodos como predadores es la masa bucal, estructura compleja que comprende el pico y sus músculos asociados, la rádula, la papila salival, las glándulas salivales y sus respectivos ductos, así como la glándula mandibular. Ésta masa está situada en la parte frontal del cerebro, justo en el centro de los tentáculos. (Hanlon & Messenger, 1996).

El pico es un órgano quitinoso de musculatura masiva que le permite a los cefalópodos morder y desgarrar sus presas, por otro lado la rádula (**Figura 6**) se trata de una cinta que comprende dientes quitinosos, ésta realiza movimientos sucesivos análogos a los de una lima, cuya forma de funcionar aún no ha sido deducido, sin embargo se sabe que en general lleva la comida a través del esófago y en algunos octópodos está involucrada en las etapas iniciales de perforación de agujeros en las conchas de moluscos o exoesqueleto en el caso de crustáceos.

Otra estructura encontrada en la masa bucal es la papila salival (segunda rádula) se sabe que la papila salival es el órgano perforador esencial, el cual lleva las secreciones de las glándulas salivales posteriores (GSP) y las inyecta en el sitio perforado (Hanlon & Messenger, 1996).

De la misma manera encontramos a las glándulas salivales posteriores, también consideradas como las glándulas venenosas; éstas contienen una mezcla de diversos compuestos tóxicos (Kanda et al., 2003). Están situadas detrás de la masa bucal y su secreción (saliva) es transportada a través de los ductos musculares hacia una canal terminal en común, que termina junto con la cavidad bucal en la papila salival.

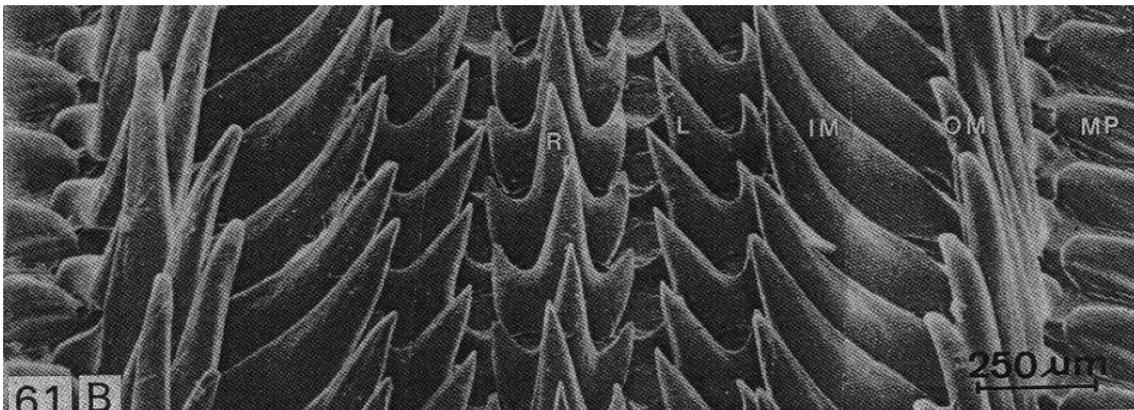


Figura 6.- Fotomicrografía de la rádula de un cefalópodo (Budelman et al., 1997).

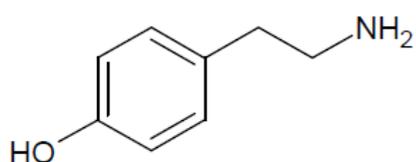
2.9 Efecto de la saliva de los cefalópodos

La saliva secretada por los pulpos es una mezcla de diferentes sustancias biológicamente activas, cuya función es inmovilizar y paralizar a la presa unos segundos después de ser capturada. Así mismo esta mucosa salival contiene enzimas hidrolíticas para realizar una pre-digestión y despegar los músculos adheridos al caparazón del molusco/crustáceo.

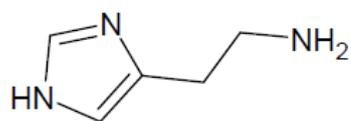
Información acerca de las propiedades de la saliva permite clasificarla como: a) venenosa –especialmente para crustáceos, b) farmacológica- con un amplio rango de compuestos químicos presentes, c) digestiva- por la presencia de proteasas y otras enzimas (Grisley & Boyle, 1987).

2.10 Moléculas presentes en la saliva de las glándulas salivales posteriores de cefalópodos

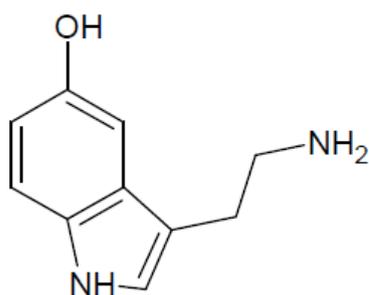
Se han encontrado algunas sustancias en las secreciones salivales de las GSP de cefalópodos: a) toxinas como recurso para la inmovilización de su presa- entre ellas podemos mencionar la eledoisina, y cefalotoxina; b) enzimas proteolíticas, c) transmisores, vasodilatadores y cardioexcitatorios, y d) algunas aminas biogénicas como por ejemplo tiramina, histamina, octopamina, acetilcolina y serotonina (**Figura 7**). Todas éstas moléculas en conjunto permiten una distribución rápida de las toxinas en el sistema circulatorio de la presa.



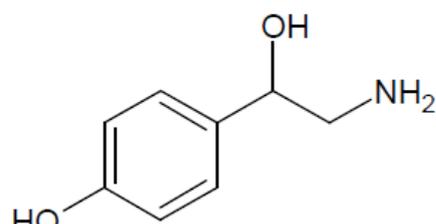
Tiramina



Histamina



Serotonina



Octopamina

Figura 7.- Aminas biogénicas aisladas de las GSP de algunos cefalópodos.

En algunas especies tales como *Sepia officinalis*, *Octopus vulgaris* y *Eledone cirrhosa* se ha reportado que su saliva contiene un coctel de compuestos tales como dopamina, serotonina, toxinas, enzimas proteolíticas y quitinasas; es probable que al menos dos de éstas últimas sean responsables de la separación del músculo adjunto al esqueleto de la presa (Hanlon & Messenger, 1996).

Las toxinas secretadas en la saliva de los cefalópodos, son un recurso para paralizar a su presa (moluscos, bivalvos, etc.) (Atsushi *et al.*, 2008).

Se han realizado una variedad de estudios acerca de los extractos obtenidos a partir de GSP de algunos cefalópodos (Key *et al.*, 2001).

Al investigar los pulpos mediterráneos *Eledone moschata* y *Eledone aldrovand*, se reportó el hallazgo de un péptido conformado por once aminoácidos, el cual posee propiedades vasodilatadoras y estimulantes del músculo liso; debido al género de las especies donde fue encontrada la sustancia, ésta fue denominada Eledoisina (**Figura 8**, Kanda *et al.*, 2003).

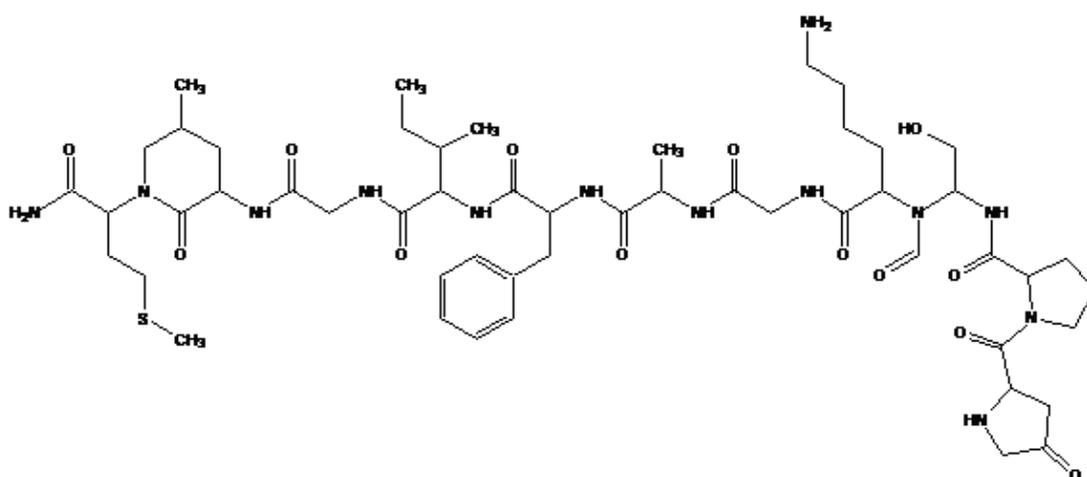


Figura 8.- Estructura de la Eledoisina aislada de las GSP de *Eledona cirrhosa*.

La literatura también reporta el aislamiento de la SE-cefalotoxina, neurotoxina de origen proteico (100kDa), proveniente del calamar *Sepia esculenta*; ésta glicoproteína tiene propiedades neurotóxicas y es capaz de provocar pérdida de movimientos espontáneos, parálisis y eventualmente muerte en cangrejos (Atsushi *et al.*, 2008).

De la misma forma se han caracterizado dos taquiquininas de las GSP del pulpo *Octopus vulgaris* (**Figura 3**), ambas son neuropéptidos.

2.11 Moléculas de efecto paralizante

Actualmente se ha aislado la SE-Cefalotoxina (mencionada anteriormente) a partir de las glándulas salivales posteriores de *Sepia esculenta*, es una glicoproteína cuyo tamaño es de 100 kDa, se ha reportado que debido a los efectos que causa en el modelo in vivo en cangrejos *Potamon dehanii* (pérdida de movimientos espontáneos, parálisis y eventualmente muerte), posee características neurotóxicas (Atsushi *et al.*, 2008).

3. - Justificación

Actualmente, la generación de subproductos (vísceras, pieles, ojos, cabezas, etc.) durante las capturas de pesquería resulta una cuestión fundamental, dado que son desechados una vez que se realiza la evisceración. Esto trae como resultado el desaprovechamiento parcial del recurso y por otro lado, puede también ocasionar impactos a nivel ambiental, toxicológico y ecológico. A pesar de que ya existen diversas aplicaciones para los subproductos, como aceites y harinas; el desarrollo tecnológico actual permitirá un uso mucho más inteligente y redituable, como la generación de fármacos a partir de subproductos marinos.

La finalidad que se persigue es la sustentabilidad de las reservas pesqueras y la utilización total de las capturas, todo esto conducido de una forma en que no se produzca contaminación o se de alguna alteración ambiental irreversible.

4.- Objetivo general

Estudiar la saliva de las GSP del pulpo rojo de Yucatán para evaluar su potencial como fuente de moléculas bioactivas; mediante la separación biodirigida de la(s) molécula(s) responsables de la actividad paralizante, conocer sus características químicas, y posteriormente realizar su elucidación estructural.

4.1.- Objetivos particulares

- 1.- Colectar las GSP en condiciones de pesquería, y generar el extracto salival.
- 2.- Realizar la separación por tamaño molecular (tamaño de corte 3kDa) de la fracción neurotóxica.

3.- Separar la fracción paralizante presente en las GSP del pulpo *O. maya*, utilizando técnicas cromatográficas.

4.- Evaluar la actividad paralizante del extracto crudo y de todas las fracciones generadas durante la separación del extracto acuoso de las GSP del pulpo rojo.

5.- Determinar la naturaleza y características químicas de los compuestos responsables de la actividad paralizante.

5.- Hipótesis

La fracción paralizante presente en la saliva del pulpo rojo *O. maya* será susceptible de ser aislada y caracterizada químicamente empleando técnicas cromatográficas.

6.- Metodología

Los disolventes y reactivos utilizados en todos los casos fueron grado RA y HPLC.

Para la cromatografía analítica en capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios con gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor en fase normal (AL SIL G Whatman) como fase estacionaria y aluminio como material de soporte, mientras que para la CCF en fase reversa se emplearon cromatofolios de gel de sílice C18 (Uniplate, Analtech 250micrómetros de espesor) como fase estacionaria y vidrio como soporte. Para la CCF semipreparativa se utilizaron cromatoplasmas con gel de Sílice (Silica Gel GF, Uniplate Analtech) 20x20cm, con 1500 micrómetros de espesor en fase normal como fase estacionaria, y vidrio como material de soporte.

Como reveladores cromatográficos se utilizaron una lámpara de Luz U.V. marca UVP, modelo UVGL-58 de longitud de onda a 254 y 365 nm, una solución de ninhidrina al 5% en metanol. En el caso de la CCF en fase normal, la fase móvil utilizada como eluyente fue en todos los casos cloroformo:metanol (80:20).

En cuanto al análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) se utilizó un sistema HPLC: Sistema binario Varian 211 (Varian Inc. USA), con inyector automático 410, colector de fracciones 701, con dos detectores: un 335 UV , y un Detector Evaporativo de Difracción de Luz (DELD,ELSD en inglés).

Para los estudios de dereplicación se empleó un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Detector de Masas (GC-MS), el sistema utilizado fue CG Agilent Technologies 6850 Network CG, con Detector de Masas 5975B-VL de Agilent Technologies.

Para la separación se utilizó una columna Zebron ZB-5MSi de Phenomenex, 30m de longitud, 0.25mm de diámetro interno y 0.25 μm de grosor de película. Las condiciones para el análisis fueron : temperatura inicial del horno 50°C, 1min, Rampa 1 15°C/min hasta 350°C durante 4min, Temperatura del inyector 350°C, Modo de inyección Split, razón de split 50:1 inyección manual, Volumen de inyección 1 μL , Gas acarreador Helio, Temperatura de la línea de transferencia 290°C. Espectrómetro de masas, modo de análisis, detección en modo de barrido total del espectro (SCAN) de 50 a 550m/z.

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

6.1 Área de colecta:

La zona de pesquería de pulpo rojo abarca todo Sisal, es decir, desde la bocana hasta las cercanías con Celestún (**Figura 9**).



Figura 9.- Localización del área para la captura de pulpo *O. maya* en Sisal, Yucatán.

6.1.2 Colecta de glándulas salivales posteriores de *O. maya* provenientes de la pesquería en el Puerto de Abrigo Sisal

Las glándulas se obtuvieron durante la temporada de pesca del pulpo rojo (Agosto-Diciembre 2012) con ayuda de la cooperativa "Tigres del mar" en Sisal, Yucatán (**Figura 10**). 2000 pares de GSP (**Figura 11**) se extrajeron de cada uno de los organismos parcialmente eviscerados contenidos en las taras de la pesquería de pulpo (**Figura 11**) y se colocaron en frascos de plástico de masa conocida.

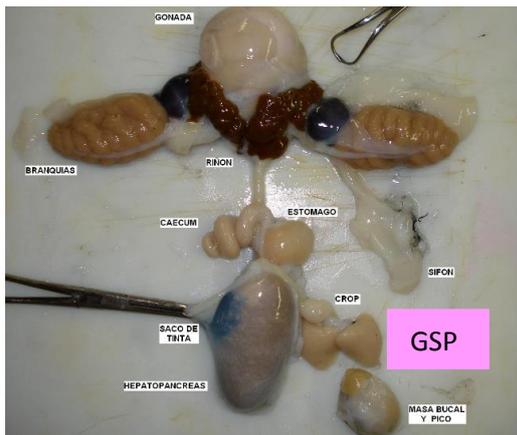
Una vez obtenidos 500g (peso húmedo) de las mismas, se congelaron a -70°C y se liofilizaron a $-45^{\circ}\text{C}/0.200\text{mBar}$.



Figura 10.- Instalaciones de la cooperativa durante la venta de los pulpos capturados por los pescadores.

6.2 Obtención del extracto crudo de las GSP de *O. maya* provenientes de la pesquería

50 g de GSP liofilizadas en condiciones de laboratorio se pulverizaron y extrajeron con agua bidestilada (1:300 p/v) hasta formar una solución mucoide manejable. La solución se transvasó a tubos Falcon, y se centrifugaron 20min/5000rpm/23°C.



a)

b)

Figura 11.- a) Esquema de la localización de las glándulas salivales posteriores (GSP en rosa) en las vísceras de un pulpo *O. maya*, b) extracción de las GSP durante la pesquería.

El sobrenadante obtenido se colectó en recipientes de plástico y se congelaron a -70°C , posteriormente se liofilizaron a $-45^{\circ}\text{C}/0.200\text{mBar}$.

6.3 Obtención de la fracción neurotóxica y digestiva a partir del extracto crudo de GSP

Una vez obtenido el extracto crudo liofilizado (19g), se pulverizó y se resuspendió en 45mL de agua bidestilada. A continuación se trasvasó en tubos Falcon y se centrifugó 20min/5000rpm. El sobrenadante se pasó a través de membranas Amicon (Millepore, Inc. 15 mL de volumen) con un tamaño de corte 3kDa y se centrifugó a 5000rpm/1h/23°C.

La fracción digestiva se concentró hasta 250µL (**Figura 12**), mientras que el filtrado (fracción neurotóxica) (**Figura 12**) se colectó en recipientes de plástico y se congeló a -70°C , posteriormente se liofilizó a -45°C y 0.200mBar. La fracción neurotóxica obtenida se evaluó mediante la prueba de actividad biológica en cangrejo fantasma.

6.4 Análisis de la fracción neurotóxica por CLAR analítico (pulpo analítico1)

Una vez obtenida la fracción neurotóxica se caracterizó mediante CLAR, el método utilizado fue pulpo analítico 1, y se utilizaron las siguientes condiciones (Reyes, 2013):

Sistema HPLC Sistema binario Varian 211.

Condiciones de separación: Columna Júpiter 4u Proteo 90A, 250x4.60mm, 5µm de partícula (Phenomenex Inc. USA).

Fase móvil: A: 0.1% TFA; B:Acetonitrilo; gradiente en 30 minutos; 0-5min 100% A, 5-8min 85% A, 8-25min 65% A, 25-30min 100% A.

Detección ELSD, Temperatura de nebulización= 40°C, Temperatura de nebulización= 80°C, flujo 1mL/min, se inyectaron 75µg de extracto.

6.5 Evaluación del efecto neurotóxico in vivo sobre cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*)

La actividad de los extractos y de las fracciones generadas se determinó con el método reportado por Sánchez & Cruz (2006).

Colecta y mantenimiento de los organismos: Para cada bioensayo realizado se utilizaron cangrejos fantasma *Ocypode quadrata* (10-30g de peso total) colectados en la playa de Sisal, Yucatán. Para su captura se buscaron agujeros en la arena de diámetro uniforme, éstos se cavaron de manera transversal con la ayuda de una guía, una vez destapado el túnel se procedió a sacar el cangrejo. Los organismos se mantuvieron en una caja de plástico hermética con arena para los ensayos experimentales en el laboratorio.

Soluciones a ensayar: Para determinar el efecto neurotóxico se pesaron 40 mg del extracto neurotóxico (menor a 3 KDa) y se diluyeron en 1 ml de agua grado HPLC.

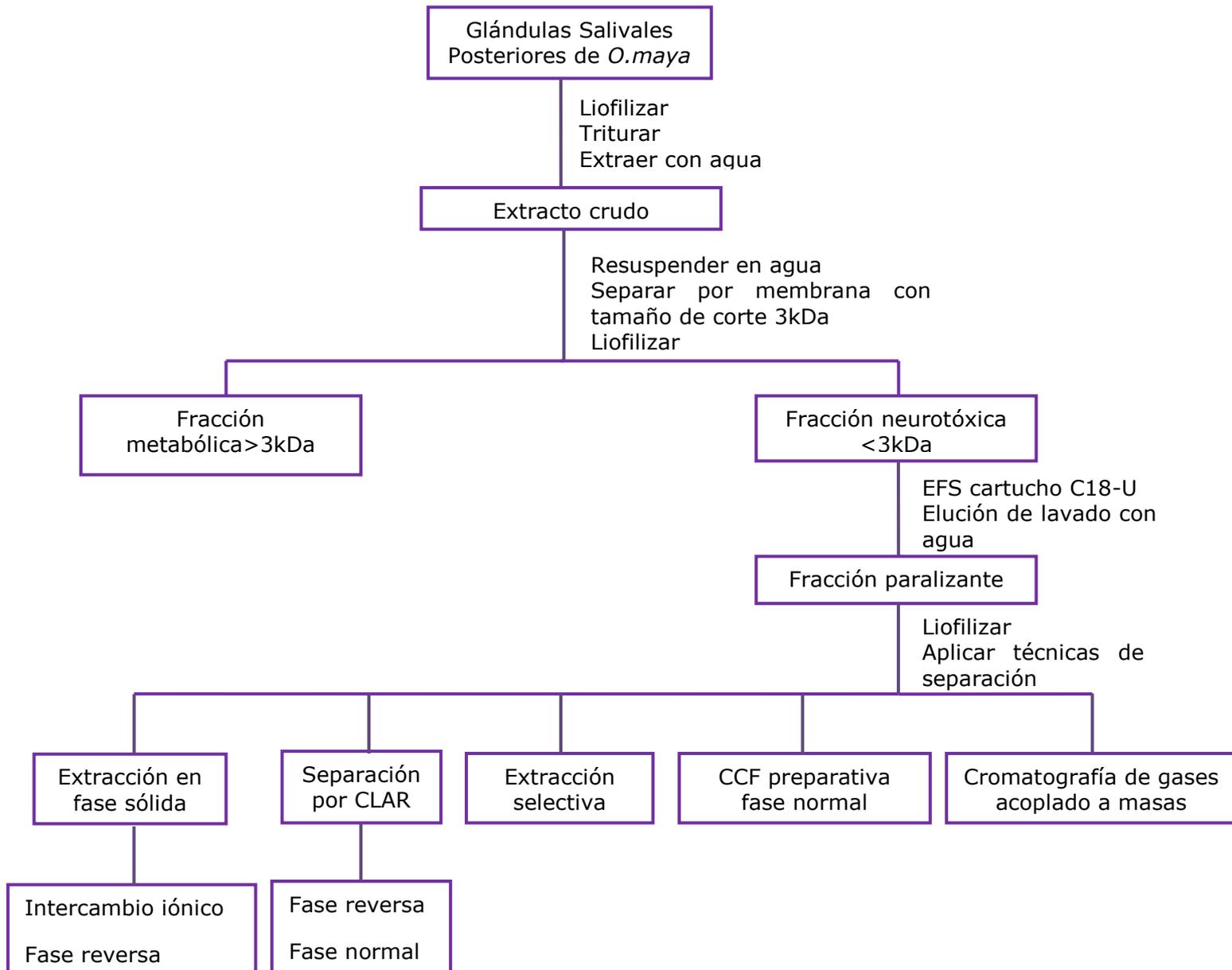
De esta solución se tomaron 100 μ L para el ensayo. Como control negativo se utilizó solución salina isotónica.

Para determinar el efecto paralizante se pesaron 25mg y se diluyeron en 100 μ L de agua grado HPLC, este volumen se inyectó para determinar la actividad biológica de la fracción. Como control negativo, también se utilizó solución salina isotónica.

Bioensayo: Se inyectaron 100 μ L de cada una de las fracciones de interés disueltas en agua HPLC, en la tercera patita caminadora (membrana artrodial) de los cangrejos con una jeringa hipodérmica; se cuantificó el tiempo en el que se observó cada uno de los efectos.

6.6 Esquema de trabajo

A manera de resumen de la separación de la fracción neurotóxica y para un mejor entendimiento del trabajo realizado, se presenta el esquema de trabajo seguido en la separación del extracto paralizante.



6.7 Obtención de la fracción paralizante mediante extracción en fase sólida (EFS)

250mg de la fracción neurotóxica se disolvieron en 2mL de agua bidestilada para ser utilizada como muestra en el cartucho Strata C-18U fase reversa (55µm, 70A, Phenomenex). La muestra se eluyó de acuerdo al esquema presentado en la tabla 1.

La fracción IV obtenida del lavado con agua se congeló a -70°C y se liofilizó en condiciones del laboratorio (0.200mBar/-45°C). Su actividad se comprobó mediante el bioensayo neurotóxico.

Una vez obtenida la fracción paralizante mediante EFS se procedió a su análisis mediante CLAR, utilizando el método pulpo analítico 1 (*vida infra*, página 30).

6.8 Determinación de Concentración efectiva 50 (EC₅₀) de la fracción paralizante

Primero se realizó una curva dosis respuesta de 0.0001 a 1mg/µL. Para ello se pesaron distintas dosis de la fracción paralizante obtenida mediante extracción en fase sólida con el cartucho C18-U, cuya actividad se probó en bioensayos (por duplicado) con cangrejos fantasma *Ocypode quadrata*; cada dosis se ajustó de acuerdo al peso de cada cangrejo.

Fracción	Disolvente (3mL) por elución	Rendimiento (mg)	Actividad
III	Muestra	43.5	-
IV	Agua	122	++ parálisis en 70 segundos
V	Acetonitrilo 95%	19.2	+ relajación muscular, descoordinación motora
VI	Acetonitrilo 90%	21	+
VII	Acetonitrilo 80%	11.1	-
VIII	Acetonitrilo 50%	1.4	-

(+) activo (-) no activo

Tabla 1.- Esquema de elución para la extracción en fase sólida del cartucho C18U (fase reversa).

La EC₅₀ inicial determinada fue entre 0.1mg/μL y 1mg/μL, sin embargo, se decidió afinar la determinación utilizando rangos definidos; las dosis seleccionadas fueron 0.25mg/μL y 0.5 mg/μl. En las tablas 2 y 3 se muestra los resultados obtenidos.

Cangrejo	Concentración aplicada (mg/μL)	Actividad	Muerte
I	0.0001	-	-
II	0.001	-	-
III	0.1	-	-
IV	1	-	+

Tabla 2.- Concentraciones ensayadas para calcular la EC₅₀, y los resultados de la actividad paralizante determinada en el bioensayo neurotóxico. (+) activo (-) no activo

Cangrejo	Concentración aplicada (mg/ μ L)	Actividad	Muerte
IV	0.1	-	-
V	0.25	+	-
VI	0.5	+	+
VII	1	+	+

Tabla 3.- Concentraciones ensayadas para calcular la EC₅₀ y afinar la ventana de actividad, también se muestran los resultados de la actividad paralizante determinada en el bioensayo neurotóxico. (+) activo (-) no activo.

6.9 Separación de la fracción paralizante:

6.9.1 Estudios de CLAR para determinar la complejidad de la fracción paralizante

La fracción paralizante se sometió a separación mediante CLAR con distintas columnas para definir la complejidad de la misma, también se determinaron las condiciones óptimas para su caracterización.

Se utilizó el sistema CLAR (ver análisis de la fracción paralizante, página 30) y las siguientes columnas:

Columna Júpiter 4u Proteo 90^a, 250x 4.60mm, 5 μ m, Phenomenex

Columna Varian C8 ,250 x 4.6mm, Microsorb -MV 100-5

Columna Varian CN, 250 x 4.6mm, Microsorb -MV 100-5

Columna Varian C18, 250 x 4.6mm, Microsorb -MV 100-5

Columna Luna 5u C8 (2) 100A, 250 x 4.6mm

Columna Aeris Peptide 3.6u XB-C18, 150 x 4.60mm

Columna Kinetex 2.6u HILIC 100A, 150 x 4.60mm

6.9.2 Separación por extracción selectiva con NaOH

Hasta este punto, el extracto paralizante mostraba señales de ser una sal orgánica, y por el resultado del revelado con ninhidrina, muy probablemente de alguna amina primaria, así que se decidió tratar de separar el extracto utilizando extracción selectiva con base (NaOH, al 10%) y extrayendo con un disolvente orgánico.

Para ello, se pesaron 150mg de fracción paralizante liofilizada y se disolvieron en 2mL de NaOH al 10%, a continuación se añadieron 2mL de agua bidestilada, posteriormente se colocó en un embudo de separación y se realizaron dos extracciones con 40mL de acetato de etilo. Las fracciones orgánicas obtenidas se llevaron a sequedad con el rotaevaporador y se registró el rendimiento obtenido. Luego, se caracterizó el comportamiento de ésta fracción mediante CCF en fase normal, la cromatoplaqueta se reveló con iodo para observar su patrón de bandeo. La fracción orgánica se llevó a estudios de dereplicación mediante GC-MS.

6.9.3 Estudios de dereplicación mediante GC-MS

Con la finalidad de obtener información acerca de moléculas presentes en la muestra, la fracción paralizante se analizó mediante la técnica de CG-MS. Se pesaron 100mg de muestra, y debido a la gran polaridad de las moléculas, fue necesario derivatizar la muestra, como se menciona en el siguiente apartado.

6.9.4 Separación del extracto paralizante mediante silanización con BTSFA (N,O-bis(trimetilsilyl)trifluoroacetamida)

La derivatización de la muestra paralizante, se llevó a cabo con BTSFA para su volatilización y análisis en el equipo de GC-MS.

Se pesaron 100 mg de la fracción paralizante liofilizada en un reacti-vial, a continuación se añadieron 100µL de acetato de etilo y 150µL de BTSFA. La reacción se calentó en una estufa a 70°C durante 1 hora y se dejó enfriar. Posteriormente se inyectó al cromatógrafo de gases acoplado a masas, utilizando las condiciones que se presentan al inicio de esta sección (pág. 30)

6.9.5 Separación del extracto paralizante mediante acetilación con anhídrido trifluoroacético

Por otro lado, se procedió a la derivatización de la fracción paralizante, primero para tratar de lograr que la fracción fuera menos polar, y así poder separar por cromatografía en fase normal, y adicionalmente serviría para logra volatilizar la muestra para análisis en GC-MS.

Se pesaron 100 mg de la fracción paralizante liofilizada en un reacti-vial, a continuación se añadieron 300µL de anhídrido trifluoroacético. La reacción se calentó en una estufa a 80°C durante 1 hora y se dejó enfriar. Posteriormente se observó su patrón de elución mediante CCF empleando Hexano: Acetato de Etilo 80:20 como fase móvil e Iodo como revelador.

6.9.6 Separación del Extracto Paralizante mediante CCF semipreparativa en fase normal

Para realizar ésta separación se pesaron 100mg de muestra y se suspendieron en 2mL de MeOH. La suspensión se centrifugó a 5000rpm/20min, el sobrenadante resultante se aplicó en una cromatoplaaca semipreparativa mediante jeringa. La cromatoplaaca se eluyó dos veces con 100mL del sistema de elución CHCl₃:MeOH 80:20 hasta que se obtuvieron bandas completamente separadas. Posteriormente se evaporó la fase móvil y las bandas se revelaron con lámpara UV, las cuales se rasparon y se colectaron en un vial. Éstas se extrajeron con agua y se filtraron con un filtro de tamaño de partícula 0.45µm, posteriormente se realizó un bioensayo con cada banda extraída para determinar su actividad. También se determinó el perfil de elución de cada una de ellas mediante CCF en fase normal, la cual se reveló con lámpara UV y se utilizó como fase móvil CHCl₃:MeOH 80:20.

6.10 Comparación de la muestra paralizante obtenida a partir del extracto crudo de GSP de pulpo *O. maya* con respecto a la fracción paralizante obtenida de la saliva del pulpo rojo

La saliva se obtuvo *in vivo* de 25 pulpos colectados mediante la técnica artesanal de "Jimba y gareteo" en la costa de Sisal. Los organismos colectados fueron colocados en un tanque de 200 L con agua de mar, con recambio de agua cada 30 minutos a fin de mantener a los organismos oxigenados. Los pulpos fueron transportados a los estanques de la UMDI-Sisal, y se mantuvieron alimentados con jaiba, en condiciones adecuadas.

Cada pulpo se colocó en hielo y se disectó para extraer las GSP en conjunto con el conducto común (**Figura 12**). La disección se hizo de distal a proximal partiendo de la masa bucal hacia las GSP.

A continuación se estimuló el conducto común mediante una pila de 9V para obtener la saliva, y ésta se colectó en un vial.

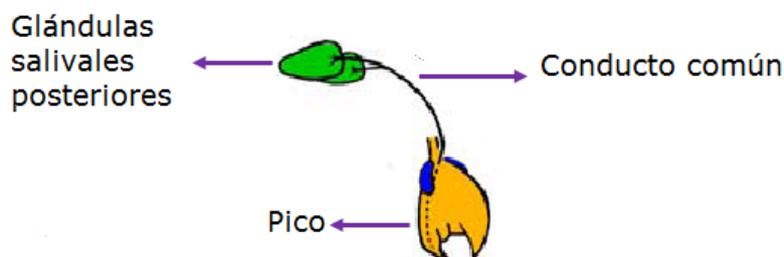


Figura 12.- Esquema de identificación anatómica del pulpo rojo para la obtención de saliva *in vivo*: GSP (verde), conducto común (negro) y pico (amarillo).

Una vez obtenidos 1800µl de la saliva de 25 pulpos, se resuspendieron en 3mL de agua HPLC y se hicieron pasar a través de una membrana Amicon de tamaño de corte 3KDa. Ésta se centrifugó a 5000rpm/1h/23°C. El filtrado se colectó y se congeló a -70°C, posteriormente se liofilizó a -45°C y 0.200mBar.

Una vez obtenidos 93mg de la fracción neurotóxica se disolvieron en 2mL de agua bidestilada para ser utilizada como muestra en el cartucho Strata C-18U fase reversa (55µm, 70A, Phenomenex). La muestra se eluyó de acuerdo al esquema de la **Tabla 1**.

La fracción IV obtenida del lavado con agua se congeló -70°C y se liofilizó (0.200mBar/ -45°C). Una vez obtenida la fracción paralizante de la saliva de pulpo mediante EFS (13.6mg) se procedió a su análisis mediante CLAR, utilizando el método pulpo analítico 1 (*vida infra*, página 30). Su perfil cromatográfico se comparó con la muestra paralizante obtenida a partir del extracto crudo de las GSP a través de CCF y CLAR.

7.- Resultados y Discusión

Las GSP colectadas (500g y de color gris) durante la temporada de pesca del pulpo *O. maya* en Sisal, fueron susceptibles de extraerse con agua bidestilada, obteniéndose así el extracto crudo. En la **tabla 4** se presentan los rendimientos obtenidos durante la separación del extracto crudo hasta la generación de la fracción paralizante.

Procedimiento	Total (g)	Rendimiento (%)	Actividad (mg/mL)
GSP peso húmedo	503	100	-
GSP liofilizadas	110	21.86	-
Extracto crudo	40.92	8.14	Nd
Fracción neurotóxica (<3kDa)	17.639	3.50	4
SPE C18-U (f.paralizante)	8.74	1.73	25

Tabla 4-Esquema de purificación para la obtención de la fracción paralizante.

La cantidad de extracto obtenida fue alta, si se considera que *O. maya* genera la saliva "*in situ*" por lo que muy probablemente el extracto presente moléculas ajenas a la saliva. No obstante, el extracto presenta la actividad biológica, ya que al inyectar 100 μ L de una solución de 4 mg/mL, causa la parálisis en 5 minutos y la muerte del cangrejo en 20 minutos.

La separación del extracto crudo mediante la membrana Amicon con tamaño de corte de 3KDa, permitió aislar la fracción metabólica/digestiva (posee enzimas digestivas, tripsina y quimotripsina >3kDa) de la neurotóxica (polipéptidos, neurotaquiquinas <3kDa) (Fry *et al.*, 2009). El bioensayo realizado demuestra el claro efecto de cada una de ellas, dado que la primera mata al cangrejo, pero no presenta el efecto neurotóxico, mientras que la menor a 3KDa, induce el efecto neurotóxico: parálisis, temblor y relajación muscular. Es importante señalar que el efecto neurotóxico es reversible, es decir, el cangrejo vuelve a su estado inicial después de 2 horas, muy característico del efecto que esta mediado por receptores. Al realizar la disección de los dos cangrejos tratados; una hora después de la inyección, es evidente el daño causado por las enzimas presentes en la fracción metabólica/digestiva, mientras que la fracción neurotóxica no presenta ningún daño aparente. (**Figura 13**)

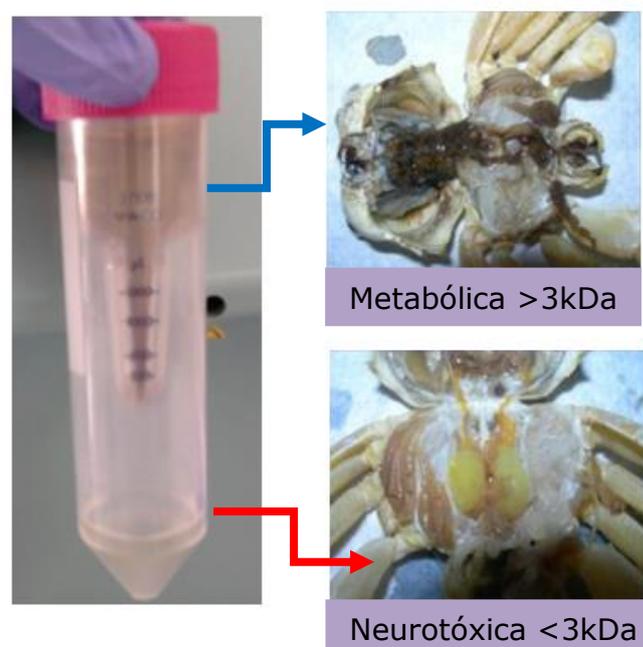


Figura 13.- Membrana Amicon con tamaño de corte 3kDa que separa las fracciones neurotóxica y metabólica/digestiva. Las fotos muestran el efecto metabólico/digestivo (>3 kDa) y neurotóxico (<3 kDa).

Al analizar la fracción neurotóxica mediante CLAR se obtiene el cromatograma que muestra la complejidad del extracto neurotóxico (**Figura 14**), en el cual se observan siete señales, de las cuales las dos primeras ($t_r = 3-6$ min) corresponden a la fracción paralizante (Reyes, 2012).

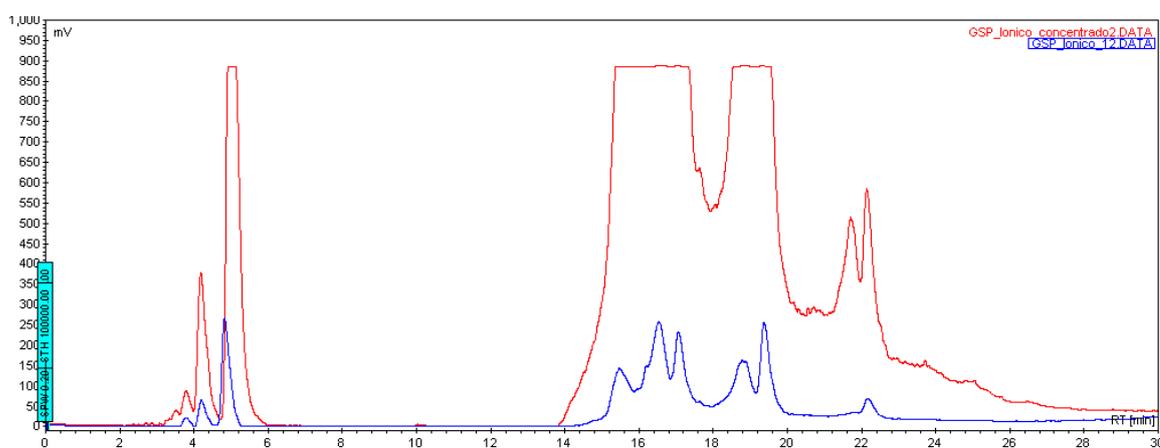


Figura 14.- Cromatograma de la fracción neurotóxica analizada mediante HPLC en fase reversa. **HPLC:** Sistema Binario Varian 211 (Varian Inc. USA), Detector Evaporativo de Difracción de Luz (DELD, ELSD en inglés). **Condiciones de separación:** Columna LUNA (C18, fase reversa, 250 X 4.6 mm, 5 μ m de partícula Phenomenex, INC. USA) Fase móvil, AcCN:Agua, 0.7% TFA, en gradiente de 0 a 50 % acetonitrilo en un tiempo de 30 minutos de corrida. Detección, ELSD, Temp. nebulización=40°C Temp. evaporación=70 °C, flujo de nitrógeno= 1.0 mL/min; U.V. a 230 nm . Columna: Júpiter Proteo (Phenomenex, 90 A, 25 X4.5, 5 μ M) Analítico: Se inyectaron 20 mL del extracto (5 mg extracto/mL, 5mg/mL). Overload: 25 mL (20 mg/mL, 20 mg/mL).

La separación de la fracción neurotóxica mediante extracción en fase sólida a partir del cartucho C-18U (fase reversa) permitió la obtención de la fracción paralizante.

Los resultados obtenidos de la **tabla 1** demuestran la naturaleza polar de la fracción paralizante (IV) al eluirse en el lavado con agua. Al analizar el extracto por cromatografía en capa fina, y revelar con ninhidrina, los compuestos eluidos presentan un color rosa, indicando muy probablemente origen peptídico o de amina primaria (**Figura 15**).

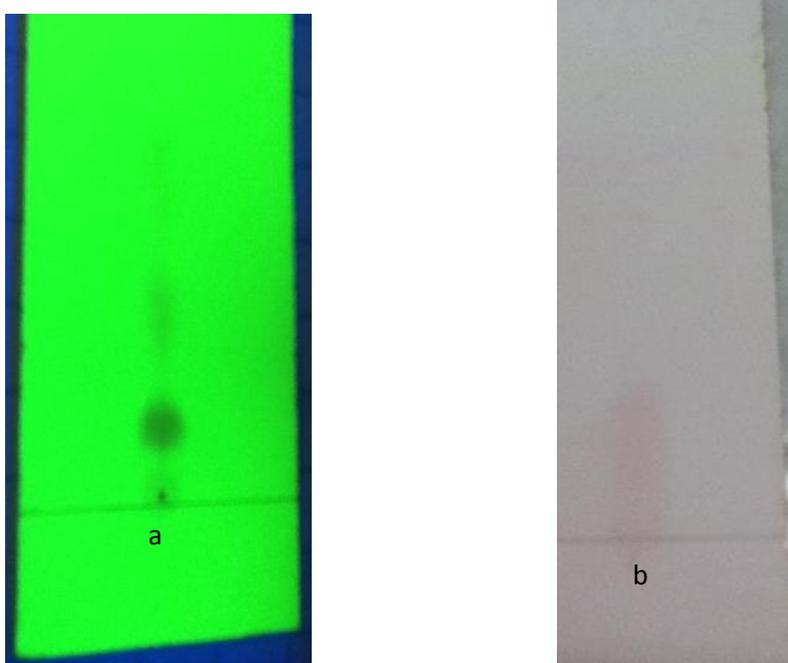


Figura 15.-Cromatografía en capa fina en fase normal de la fracción paralizante obtenida mediante EFS con el cartucho C18U. a)cromatoplaca revelada con lámpara UV y b)cromatoplaca revelada con ninhidrina.

Por otro lado la actividad de la fracción paralizante reportada (**tabla 4**) muestra ser mayor a la fracción neurotóxica obtenida una vez que se realiza la separación del extracto crudo por tamaño molecular; lo cual resulta ser, un efecto contrario a lo esperado, dado que a mayor

purificación se espera una menor cantidad requerida para causar el efecto en el bioensayo.

Hasta este punto es importante mencionar que la fracción neurotóxica implica tres efectos: parálisis, relajación y descoordinación motora, los cuales se observan antes de un minuto con la dosis reportada en la **tabla 4**, sin embargo, la fracción paralizante requiere una dosis mayor (**tabla 4**) para observar el efecto, dado que éste valor determinado, es exclusivo de ésta fracción.

En otras palabras, la cantidad requerida para observar la actividad en la fracción neurotóxica se ve influenciada por otros efectos como la relajación y la descoordinación, los cuales requieren una dosis menor, a comparación de la fracción paralizante.

7.1 Análisis de la fracción paralizante mediante HPLC

En la **Figura 16** se presenta el cromatograma obtenido del análisis por CLAR de la fracción paralizante con la columna Júpiter (C12, Fase reversa).

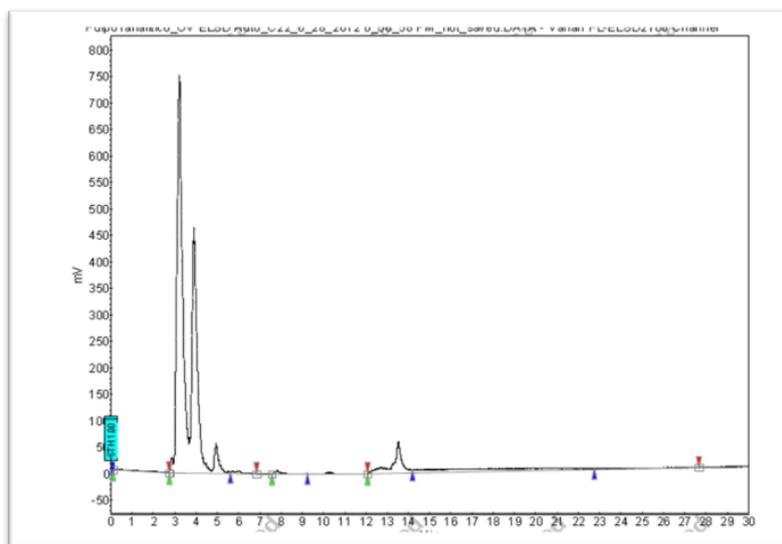


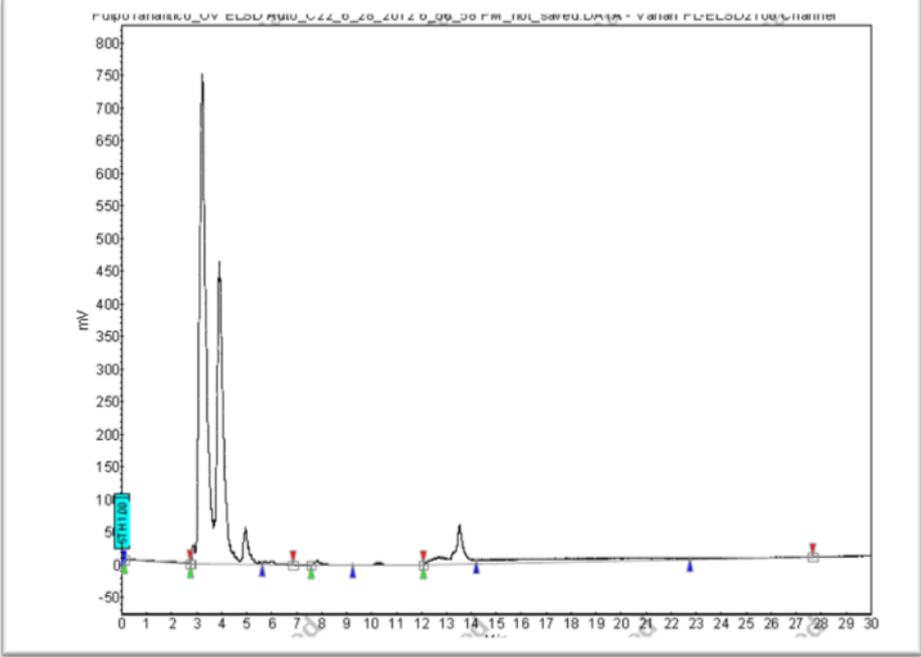
Figura 16.- Cromatograma de la fracción paralizante en fase reversa. Sistema CLAR Varian2111 (Varian Inc, USA), Columna Jupiter 4u Proteo 90A, 250x4.60mm, 5µm, Phenomenex, Fase móvil: 0.1% TFA: Acetonitrilo, gradiente en 30 minutos. Detección ELSD, Temperatura de nebulización= 40°C, Temperatura de nebulización= 80°C, flujo 1mL/min, se inyectaron 75µg de extracto.

El cromatograma (**Figura 16**) muestra dos señales principales con un tiempo retención 3-4.8min, en el que predominantemente se encuentran 2 compuestos o dos grupos de compuestos (2 picos), ambos son los de de mayor polaridad y de naturaleza similar dado que son contiguos. Uno de los picos es de mayor tamaño lo que nos indica que muy probablemente este compuesto se encuentra en una mayor concentración. Es evidente la simplificación del extracto neurotóxico al obtener la fracción responsable de la parálisis; dado que si comparamos la **Figura 14**, ésta nos muestra siete señales, mientras que la **Figura 16** sólo se observan dos.

7.2 Separación de la fracción paralizante

7.2.1 Estudios de CLAR para determinar la complejidad de la fracción paralizante

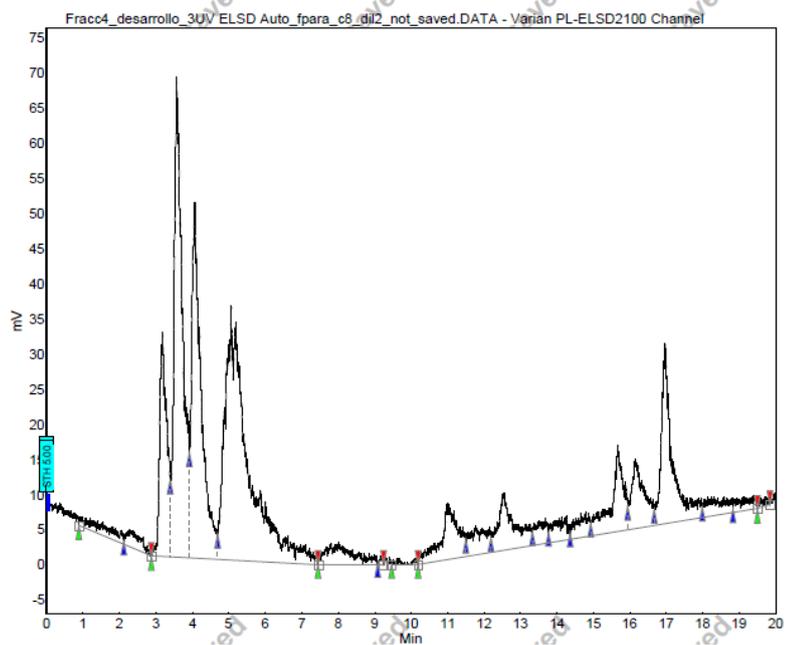
La fracción paralizante obtenida mediante EFS con la elución de agua, se liofilizó y se sometió a separación mediante CLAR con distintas columnas, con el fin de incrementar la selectividad y separa adecuadamente el extracto. A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos con cada una de ellas.

Columna	Cromatograma
Columna Júpiter 4u Proteo 90A, 250x4.60mm, 5µm , Phenomenex Fase reversa	

Columna
Varian C8

250 x 4.6mm,
Microsorb -MV
100-5

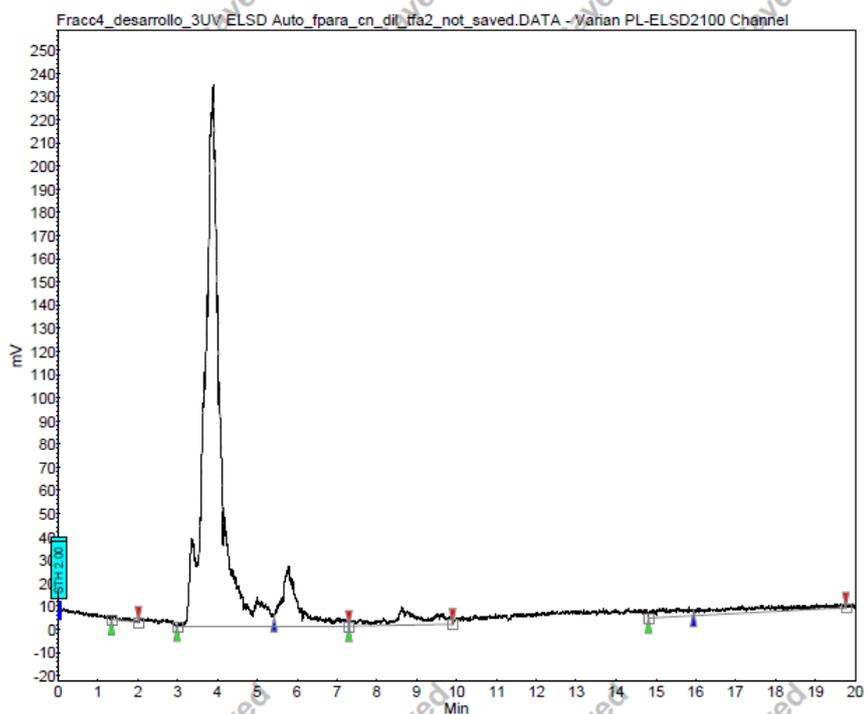
Fase reversa



Columna
Varian CN

250 x
4.6mm,
Microsorb -MV
100-5

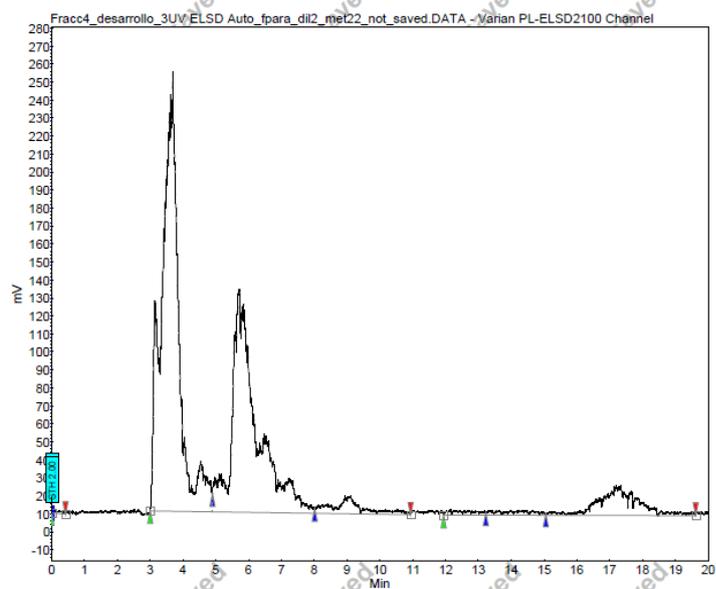
Fase reversa



Columna
Varian C18

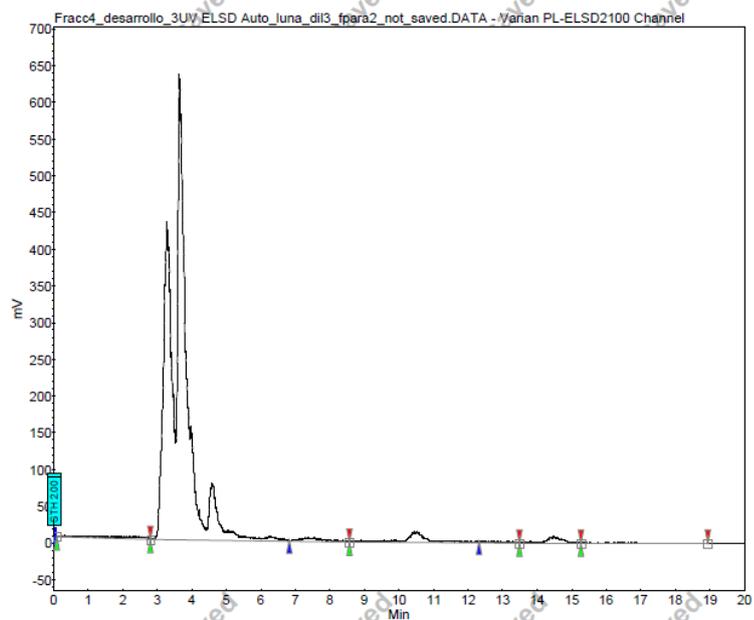
250 x
4.6mm,
Microsorb -MV
100-5

Fase reversa



Columna Luna
5u C18 (2)
100A 250 x
4.6mm,
5micron de
partícula

Fase reversa



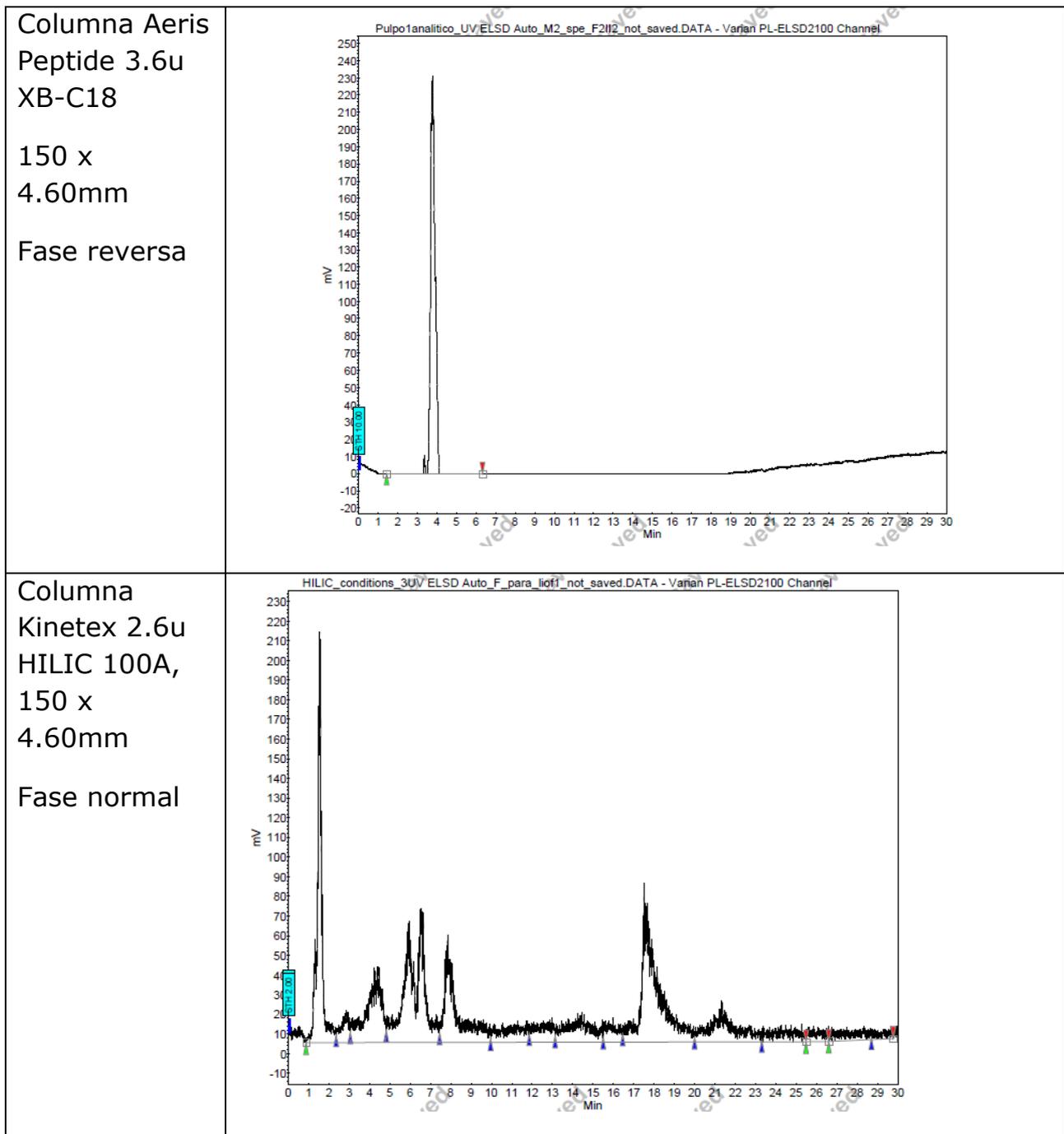


Figura 17.- Cromatogramas de la separación de la fracción paralizante mediante distintas columnas.

El objetivo principal de analizar la fracción paralizante en distintas columnas, era conocer si era factible la opción de llevar a cabo su separación mediante CLAR, si y sólo sí, existían suficiente tiempo de retención entre los picos (señales del cromatograma) y la resolución era la adecuada (mejor) al compararla con el cromatograma obtenido con la columna Júpiter Proteo. Si ambas condiciones se cumplían entonces se procedía a cortar y coleccionar las señales, hasta obtener una cantidad suficiente que permitiera realizar un bioensayo, de tal manera que se simplificara la complejidad de la fracción y se lograría trabajar con las fracciones ya separadas.

Los cromatogramas pertenecientes a las columnas CN y Aeris peptide (**Figura 17**) muestran una sola señal al analizar la fracción, esto no sólo indica una menor resolución de separación en ambas al compararla con la separación de la columna Júpiter sino también excluirlas como herramientas para la simplificación de la misma.

De manera análoga la columna Júpiter y Luna, aunque parecen aumentar su resolución y mostrar dos señales con el análisis de la muestra, no existe el suficiente tiempo de retención entre un pico y otro, por lo que también se descartan como opción para la separación y colecta mediante ésta técnica.

En el caso de la columna C8 se obtiene una mayor resolución y se obtienen 9 señales, de las cuales 4 son las principales y de concentración considerable, sin embargo, no existe suficiente tiempo de retención entre las mismas, razón por la cual no se considera viable la separación y colecta con ésta.

Después de lo anteriormente mencionado, se observa que debido a la resolución y el tiempo de retención entre los picos de las señales pertenecientes a la columna C18, ésta se puede considerar para realizar el corte y colecta de las fracciones mediante CLAR, es por

esto que se procede a realizarlo, sin embargo, se presentaron diversos inconvenientes: al inicio se dieron problemas de reproducibilidad y estabilización del equipo.

Sin embargo, una vez solucionados se presentaron otras dificultades puesto que al tratarse de una columna analítica la cantidad máxima que se puede inyectar es 1mg, lo que genera que se obtenga una menor cantidad de fracción (es) colectadas, esto implica mayor cantidad de corridas para realizar la separación de fracciones y por ende un mayor gasto de disolvente; al final la viabilidad fue nula, dado que a pesar de realizar varias corridas se obtuvo muy poca cantidad de muestra (fracciones colectadas) y no fue factible obtener la suficiente para realizar el bioensayo (25mg).

Ahora bien, el cromatograma de la columna HILIC (**Figura 17**) en fase normal resulta ser la óptima de entre todas las mostradas para llevar a cabo la separación dado que indica ocho señales con minutos de retención entre ellas, pero la fase móvil que se utiliza (Acetonitrilo: Formato de Amonio, 90:10) requiere una separación y colecta de fracciones con sales (Formato de Amonio), lo cual implica eliminarlas para su posterior análisis y por lo tanto un inconveniente para realizarlo, dado que no se cuenta con el material adecuado.

7.2.2 Separación por extracción selectiva con NaOH

La cromatoplaca (**Figura 18**) que muestra el patrón de elución obtenido en la fracción orgánica (Acetato de etilo) una vez realizada la extracción selectiva, indica que la polaridad de ésta disminuye en comparación con la muestra y con la fase acuosa, las cuales siguen muy retenidas en el origen y no eluyen. Por otro lado al ser revelada con ninhidrina torna un color rosa pálido, lo que nos sugiere una naturaleza peptídica o bien que posee aminas primarias.

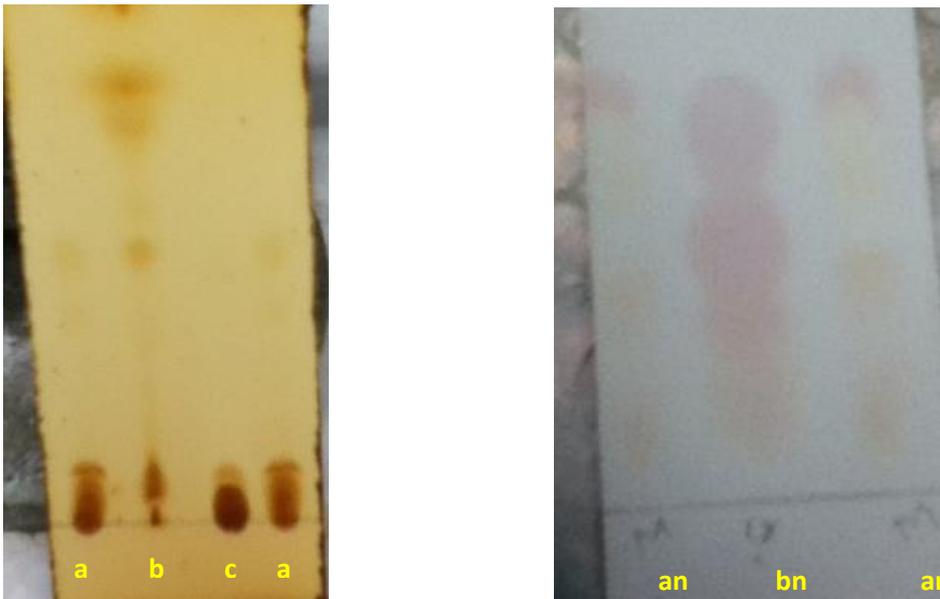


Figura 18.- CCF revelada con yodo en las que se muestra: a) Muestra paralizante, b)Fracción orgánica (acetato de etilo), c)Fracción acuosa, an) muestra paralizante revelada con ninhidrina, bn) fracción orgánica revelada con ninhidrina

La extracción selectiva permite disminuir la polaridad de la muestra, sin embargo, la fracción orgánica resulta ser inactiva al realizar el bioensayo.

7.2.3 Separación del Extracto Paralizante mediante CCF semipreparativa en fase normal

El patrón de elución obtenido con los cromatofolios mediante CCF (**Figura 15**) se corrobora en las placas semipreparativas, dado que se observan cuatro bandas que se separan de mayor a menor polaridad (**Figura 19**). La banda dos y tres (más cerca del origen) resultan ser activas, éstas se comparan mediante CCF con la muestra paralizante liofilizada. La primera banda activa corresponde a la banda más cercana al origen en la muestra, mientras que la segunda banda activa revela un patrón totalmente distinto que no se había observado en la fracción paralizante, dado que se enmascara con la banda del origen (misma que corresponde a la primera banda activa) (**Figura 20**).

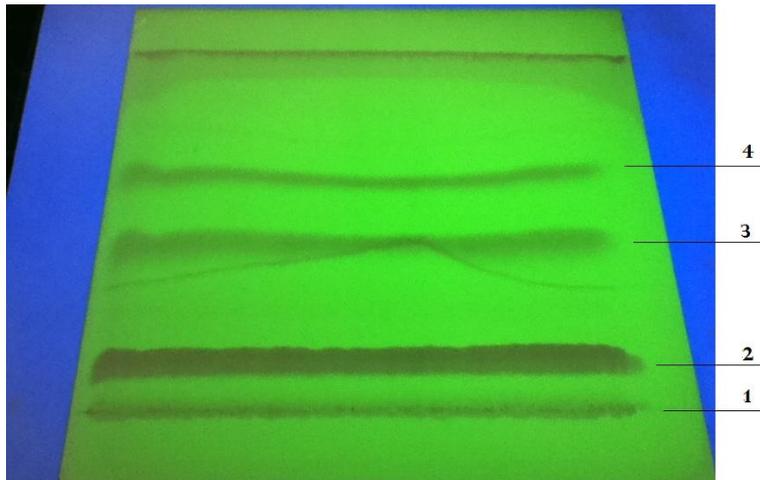


Figura 19.- CCF semipreparativa en fase normal de la fracción paralizante, revelada con lámpara UV. Las bandas 2 y 3 muestran actividad al realizar el bioensayo.

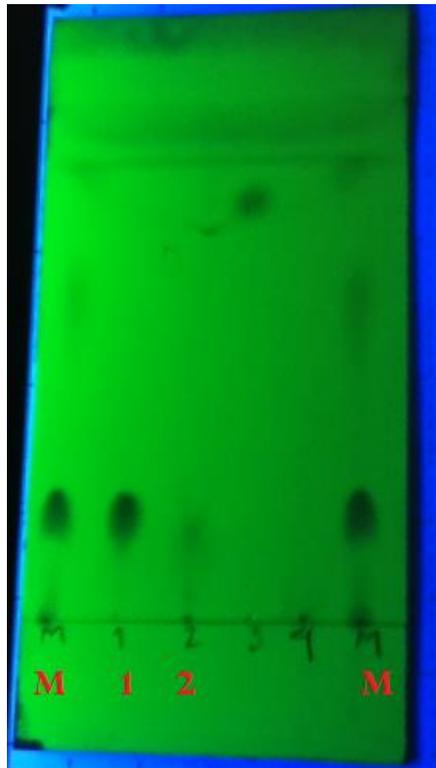


Figura 20.- CCF en fase normal revelada con lámpara UV de la fracción paralizante total (M) comparada con las bandas activas (1 y 2) obtenidas de la CCF semipreparativa.

Ésta técnica simplifica las estrategias posteriores para trabajar en la separación y elucidación estructural de las fracciones activas, dado que la complejidad de la muestra se reduce.

7.2.4 Estudios de dereplicación mediante GC-MS

En la figura **Figura 21** se presenta el cromatograma de la fracción paralizante de las GSP obtenido de los estudios realizados con la técnica de CG-EM. Todos los picos principales fueron analizados con el detector de masas, y cada espectro generado se comparo con la librería Wiley NIST 05 MS Spectra. Los resultados obtenidos así como las estructuras y su porcentaje de coincidencia con la base se reportan en la **Tabla 5**.

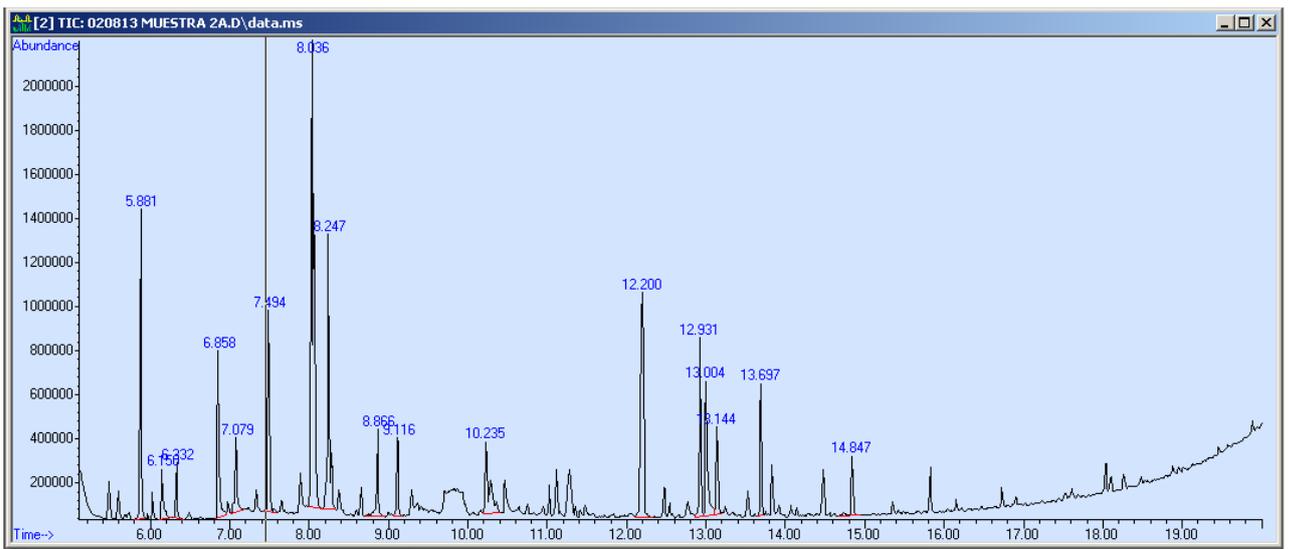


Figura 21.-Cromatograma de la fracción paralizante derivatizada con BTSFA obtenido mediante CG-EM.

Molécula	% Coincidencia en la base de datos
<u>Aminoácidos</u>	
N-(trimetilsilil)- L-prolinato de trimetilsililo	898
5-oxo-1-(trimetilsilil)-L-prolinato de trimetilsililo	906
Tris(trimetilsilil)- Glutamina	877
L-valinato de trimetil sililo	890
Isoleucina	749
N-(trimetilsilil)- L- alaninato de trimetil sililo	917
N-(trimetilsilil)- L- valinato de trimetilsililo	912
N-(trimetilsilil)- L - leucinato de trimetilsililo	952
N,O-dis(trimetilsilil)- L-serinato de trimetilsililo	893
N-(trimetilsilil)- L-metioninato de trimetilsililo	944
N,O,O,O-Tris(trimetilsilil)-L-Treonina	911
Fenil- D,L alaninato de trimetilsililo	874
O-(trimetilsilil)- tirosionato de trimetilsililo	906
Tris(trimetilsilil)- Glutamina	877
N-(trimetilsilil)]-L-isolueucinato de trimetilsililo	946
<u>Carbohidratos</u>	
2,3,4,5,6-pentacis-O-(trimetilsilil)-D-Glucosa	922
2,3,4,5,6-pentacis-O-(trimetilsilil)-Talosa	953
<u>Otras moléculas</u>	
2,4-bis[oxi(trimetilsilil)]-Pirimidina	851
4,4'-((p-Fenilen)diisopropiliden)difenol	565
2-amino-4-metil, (S)- pentanamida	799
2- [oxi(trimetilsilil)]-propanoato de trimetilsililo	970

Tabla 5.- Moléculas presentes en la muestra paralizante una vez analizado el espectro de CG-EM.

De los resultados de la **tabla 5** resalta que la mayoría de los compuestos obtenidos son aminoácidos (**Figura 22**), lo cual corrobora la evidencia presentada en la CCF (**Figura 15, inciso b**) al ser revelada con ninhidrina.

Dos de los aminoácidos identificados (alanina y glutamina, Gerschenfel, 1973) se encuentran presentes en el sistema nervioso periférico de los cangrejos y langostas, y están implicados en la inhibición muscular. Sin embargo, hasta la fecha, el neurotransmisor que inhiben la contracción muscular (parálisis) es el ácido-gama-butírico (GABA, Krnjević, 2010); el cual puede ser generado rápidamente mediante decarboxilación catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa, presente en los axones inhibitorios de los crustáceos.

Si bien es cierto que no existen reportes de la presencia de la inhibición de GABA en *Ocypode quadrata*, el sistema de inhibición muscular se ha reportado para su congénere *Ocypode cursor* y en casi todo el subfilo Crustacea, por lo que es muy probable que sea el responsable de la actividad paralizante. (Parnas, I, 1974)

Los antecedentes mencionados en la literatura y la evidencia de los aminoácidos obtenidos en la dereplicación (**Figura 22**) (Alanina, Glutamina, Prolina, Valina, Isoleucina, Leucina, Serina, Metionina, Treonina, Tirosina) sugieren que probablemente la glutamina presente en la fracción paralizante pueda dar lugar a la formación del neurotransmisor GABA, y con ello generar la parálisis (inhibición muscular) en el cangrejo. La bibliografía reporta la existencia de algunos aminoácidos libres (Alanina, Glutamina, Asparagina, Prolina, Leucina, Valina, Arginina, Taurina, Lysina, Acido γ - amino butírico) en las fibras nerviosas inhibitorias en los apéndices caminadores de cangrejos (Sorenson, 1973). Éstas fibras son estimuladas por motoneuronas que suprimen la contracción muscular mediante la

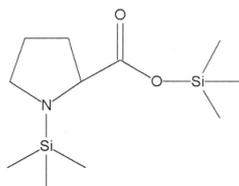
liberación de un neurotransmisor (Atwood, 1968), el GABA (Gerschenfel, 1973); cuya determinación queda como perspectiva para fundamentar la responsabilidad del ácido γ - amino butírico como neurotransmisor de inhibición.

Por otro lado, también se muestra la presencia de la tirosina, aminoácido precursor de algunas aminas biogénicas como tiramina y octopamina, las cuales se forman mediante enzimas como tirosina decarboxilasa y tiramina β -hidroxilasa respectivamente. Ambas se han reportado en la saliva de pulpo como posibles responsables de la parálisis, sin embargo, Ghiretti descartó esta posibilidad (Ghiretti, 1959).

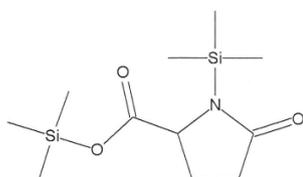
Dicho lo anterior, es posible atribuir el efecto paralizante a los aminoácidos encontrados. Sin embargo, aún se requiere realizar otros experimentos que definan de manera más específica las moléculas que ocasionan el efecto en estudio.

La presencia de los carbohidratos (talosa y glucosa) y otras moléculas reportadas en la dereplicación, pueden deberse al origen de la separación de la fracción paralizante: se parte de un extracto crudo (de las GSP) acuoso. El agua es un disolvente muy polar que solubiliza este tipo de moléculas, y dada la similitud de polaridad de las mismas con los otros compuestos presentes en la muestra paralizante, es un factor que determina su coexistencia.

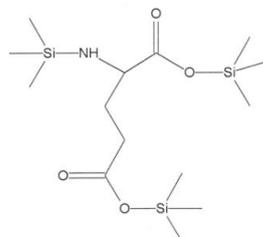
Aminoácidos



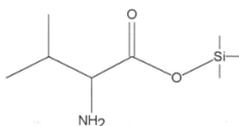
N-(trimetilsilil)-L-prolinato de trimetilsililo



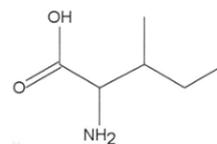
5-oxo-1-(trimetilsilil)-L-prolinato de trimetilsililo



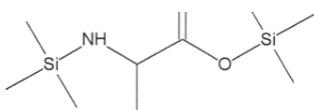
Tris (trimetilsilil)- glutamina



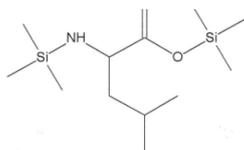
L-Valinato de trimetilsililo



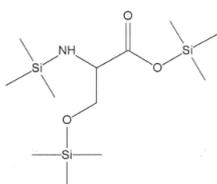
Isoleucina



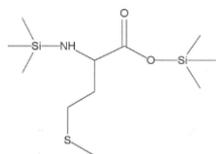
N-(trimetilsilil)-L-alaninato de trimetilsililo N-(trimetilsilil)-L-valinato de trimetilsililo



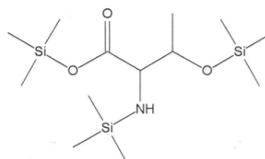
N-(trimetilsilil)-L-leucinato de trimetilsililo



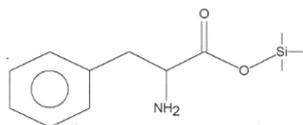
N,O-dis(trimetilsilil)-L-serinato de trimetilsililo



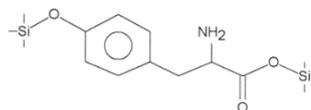
N-(trimetilsilil)-L-metioninato de trimetilsililo



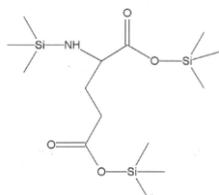
N,O,O,O-Tris(trimetilsilil)-L-Treonina



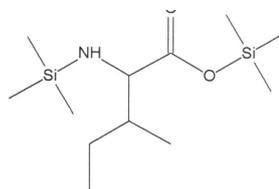
Fenil-D,L alaninato de trimetilsililo



O-(trimetilsilil)-tirosinato de trimetilsililo

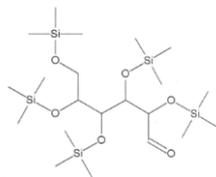


Tris(trimetilsilil)-Glutamina

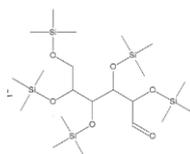


N-(trimetilsilil)-L-isooleucinato de trimetilsililo

Carbohidratos

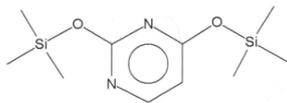


2,3,4,5,6-pentacis-O-(trimetilsilil)-D-Glucosa

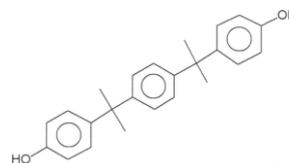


2,3,4,5,6,-pentacis-O-(trimetilsilil)-D-Talosa

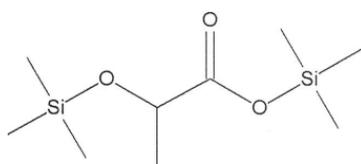
Otras moléculas presentes



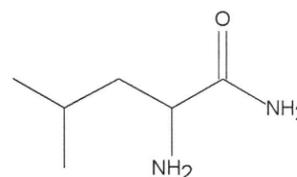
2,4-bis[oxi(trimetilsilil)]-Pirimidina



4,4' -((P-Fenilen)diisopropiliden) difenol



2-[oxi(trimetilsilil)]-propanoato de trimetilsililo



2-amino-4-metil, (S)-pentanamida

Figura 22.- Compuestos encontrados al comparar el espectro de masas perteneciente a la muestra paralizante derivatizada con BTSFA con la base de datos del software del cromatógrafo de gases acoplado a masas.

7.3 Comparación de la muestra paralizante obtenida a partir del extracto crudo de GSP de pulpo *O. maya* con respecto a la fracción paralizante obtenida de la saliva del pulpo rojo.

Hasta este punto, no era claro si los aminoácidos presentes en la fracción paralizante de las GSP era resultado de la saliva generada por el pulpo o bien una consecuencia de la degradación o autólisis que se genera con la muerte del organismo. Para ello, primero se logró coleccionar la saliva del pulpo mediante la técnica de estimulación eléctrica en el conducto común, conducto que conduce la saliva a la papila salival. Una vez obtenida la saliva "*in vivo*", se procedió a compararla con la obtenida a partir del extracto crudo de las GSP, mediante dos técnicas: CCF en fase normal revelada con UV y determinación del perfil cromatográfico mediante CLAR.

En el caso de la CCF, el patrón de elución de la fracción obtenida a partir de la saliva con respecto a la muestra generada mediante el extracto de GSP, revela únicamente la banda del origen en común (banda que muestra actividad en la CCF semipreparativa). Mientras que el perfil cromatográfico obtenido mediante el análisis con CLAR de ambas muestras, señala un solo pico, en el mismo tiempo de retención para las dos muestras **(Figura 23)**.

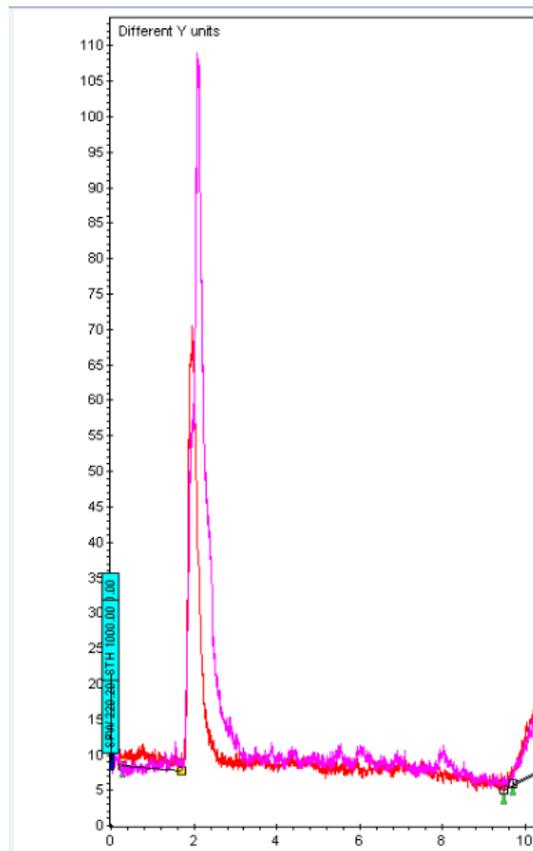


Figura 23.- Cromatograma de la fracción paralizante obtenida del extracto de las GSP (rosa) en comparación con la obtenida de la saliva de pulpo (rojo). Sistema CLAR Varian2111 (Varian Inc, USA). Columna Jupiter 4u Proteo 90A, 250x4.60mm, 5 μ m , Phenomenex,.. Fase móvil: A: 0.1% TFA; B: Acetonitrilo; gradiente en 30 minutos; 0-5min 100% A, 5-8min 85% A, 8-25min 65% A, 25-30min 100% A. Detección ELSD, Temperatura de nebulización= 40°C, Temperatura de nebulización= 80°C, flujo 1mL/min, se inyectaron 75ug de extracto.

Esto indica que la obtención y separación de la fracción paralizante a partir de la manipulación de las GSP y la generación del extracto, no se trata de un artefacto provocado por otro tipo de moléculas presentes en las glándulas. Se demuestra así que las moléculas responsables de la actividad paralizante separadas y obtenidas en éste trabajo provienen de la saliva de pulpo rojo *per se* y que por ende forman parte de una adaptación en su estrategia de alimentación.

8.-Conclusiones

Se generó el extracto crudo salival a partir de los subproductos de la pesquería de pulpo rojo de Yucatán.

Se obtuvo la fracción paralizante de la saliva de pulpo con moléculas de tamaño menor a 3kDa a partir de la separación de la fracción neurotóxica mediante extracción en fase sólida en fase reversa.

Se determinó la actividad y la EC_{50} de la fracción paralizante, las cuales resultaron ser de 0.25 mg/ μ l en el bioensayo en cangrejo playero *Ocypode quadrata*.

Las características químicas de la(s) molécula(s) pertenecientes a la fracción paralizante indican carácter polar y naturaleza proteica.

Los estudios de dereplicación revelaron que el efecto paralizante de la saliva del pulpo rojo en cangrejos está relacionado con varios aminoácidos, entre ellos el ácido- γ -butírico, la prolina y la glutamina.

Se comprobó que las moléculas responsables de la actividad paralizante; obtenidas mediante la separación biodirigida del extracto crudo de las GSP, también están contenidas en la saliva de pulpo rojo.

9.-Bibliografía

Atsushi, U., Hiroshi, N., Masami, I., Yuji, N., & Kazuo, S. (2008). Purification and molecular cloning of SE-cephalotoxin , a novel proteinaceous toxin from the posterior salivary gland of cuttlefish *Sepia esculenta*. *Toxicon*, 52, 574-581.

Atwood, H. (1968). Peripheral Inhibition in crustacean muscle. *Experientia* , 24, 753-864.

Bernstein, A. & Chivian, E. (2008) *Sustaining life how human health depends on biodiversity*; Wilson O., E., Eds.; Oxford University Press: New York,; 257-262.

Blanco, M., Sotelo, C., Chapela, M., & Pérez Martín, R. (2007). Toward sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. *Food and Science Technology*, 18, 29-36.

Budelman, U. B., Schipp, R., Von Boletzky, S.(1997); *Cephalopoda*; Wiley –Liss Inc.: Germany, 6,119-414.

Capon, R. J. (2001). Marine bioprospecting- Trawling for treasure and pleasure. *Eur.J. Org.Chem* ,4, 633-645.

CONAPESCA.http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2012_zip. (Acceso marzo, 25, 2012).

Fiorito, G., & Gherardi, F. (1999). Prey-handling behaviour of *Octopus vulgaris* (Mollusca Cephalopoda) on bivalve preys. *Behavioural processes*, 46, 75-88.

Fry, B., Roelants, K., & Norman, J. (2009). Tentacles of venom: Toxic Protein Convergence in the Kingdom Animalia. *Journal Molecular Evolution*, 68, 311-321.

Garateix, A. (2005). El mar: fuente de nuevos fármacos. *Ciencia y cultura Elementos* , 12,39-47.

Gerschenfeld H. M. (1973). Chemical transmission in invertebrate central nervous systems & neuromuscular junctions. *Physiological Review*, 53, 17-35.

Ghiretti, F. (1959). Toxicity of octopus saliva against Crustacea. *Annual N.Y. Academy Science*, 90, 726–741.

Grisley, M. S., Boyle, P. R., & Key, L. N. (1996). Eye puncture as a route of entry for saliva during predation on crabs by the octopus *Eledone cirrhosa*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 202,225-237.

Grisley, M., & Boyle, P. (1987). Bioassay and proteolytic activity of digestive enzymes from octopus saliva. *Comparative Biochemical Physiology*, 88B 4, 1117-1123.

Haefner, B. (2003). *Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates*. DDT , 3, 536-543.

Hanlon, R., & Messenger, J. (1996) *Cephalopod behaviour*; Cambridge University Press: United Kingdom,;12-29.

Kanda, A., Iwakoshi-Ukena, E., Takuwa-Kuroda, K., & Minakata, H. (2003). Isolation and characterization of novel tachykinins from the posterior salivary gland of the common octopus *Octopus vulgaris*. *Peptides*, 24, 35-43.

Key, L. N., Boyle, P. R., & Jaspars, M. (2001). Novel activities of saliva from the octopus *Eledone cirrhosa* (Mollusca; Cephalopoda). *Toxicon*, 40, 677-683.

Kim, S. K. & Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts. *Food Research International*, 39, 383-393.

Kristbergsson, K., & Arason, S. (2005) *Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry*; Oreopoulou, V., Russ, W., Eds.; Department of Food Science and Human Nutrition; Springer science: New York, 233-258.

Krnjevic K. (2010). When and why amino acids?. *Journal of Physiology*, 588 ,33-44.

Munguía Gil, A., Avilés Quintanilla, M. I., & Chan Pereyra, A. (2012) El pulpo en Yucatán. Un recurso natural para el desarrollo regional sustentable de la región costera. *Red Genómica de pesca y acuicultura para la innovación* [En línea] Abril 4, 2012. Global Biotechconsultinggroup. <http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/documentos/moluscos/pulpo/Pulpo%20en%20Yucatan%20recurso%20natural%20para%20el%20desarrollo%20regional.pdf> (acceso, junio 9, 2012).

Reyes, P. D. Estudio químico del efecto neurotóxico de la saliva de pulpo *O. maya*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM, Dic de 2013.

Salas, S., Mexicano-Cintora, G., & Cabrera, M. (2006) *¿Hacia dónde van las pesquerías en Yucatán? Tendencias, retos y perspectivas*; CINVESTAV: Mérida, Yucatán, 36-41.

Sami, I., Yuji, N., & Kazuo, S. (2008). Purification and molecular cloning of SE-cephalotoxin , a novel proteinaceous toxin from the posterior salivary gland of cuttlefish *Sepia esculenta*. *Toxicon* , 52, 574-581.

Sampath Gehl, P. (2005) *Regulating Bioprospecting: Institutions for drug research, access and benefit sharing*; United Nations University Press: New York, 1-3.

Seidel, V. (2006) *Natural Products Isolation*; Sarker D., S., Gray I., A., & Latif, Z., Eds. ; Humana Press: Totowa, New Jersey, 27-28.

Solis Ramírez, M. J. (1976) *Aspectos biológicos del pulpo Octopus maya*; Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras, SE, CONAPESCA, Dirección General de Pesca e Industrias Conexas: México, Publicación 18.

Sorenson, M. M. (1973). The free aminoacids in peripheral nerves and isolated inhibitory and excitatory nerves fibres of *Cancer magister*. *Journal of Neurochemistry* , 20, 1231-1245.

Spainhour, B. C. (2005) *Drug Discovery Handbook*; Cox Gad, S., Eds.; Wiley Interscience: New Jersey, 12-20.

Stachowicz, J. J.(2001) *Marine Chemical Ecology*; Mc Clintock, B. J., & Baker J., B., Eds.; CRC Press: Florida, EUA, 169-172.

Undheim, E., Georgieva, D., Thoen, H., Norman, J., Mork, J., Betzel, C., et al. (2010). Venom on ice: First insights into Antarctic octopus venoms. *Toxicon*, 56, 897-913.

Zamora, A. G., Viana, M. T., Rodríguez, S., Espinoza, G., & Rosas, C. (2011). Aminoacid mobilization and growth of juvenile *O.maya* (Mollusca:cephalopod) under inanition and re-feeding. *Aquaculture* , 314, 215-220.