

Uso Eficiente de los Recursos Pesqueros y Acuícolas: Extracción de Moléculas Bioactivas de los Subproductos para su Empleo en el Sector Farmacéutico

Elpidio García¹, Carlos Rosas², Sergio Rodríguez Morales*³

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. ²Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, UNAM. ³Laboratorio de Productos Naturales Marinos, Unidad de Química en Sisal, Facultad de Química, UNAM. E-mail: marvinmx@yahoo.com

Resumen

De la producción pesquera que se captura (70 %) y se cultiva (30%) aproximadamente el 25 % se desecha, ya sea al mar o en un basurero. Un caso extremo es el fileteo, solo 40 % del organismo cultivado/capturado se consume y el 60% se desecha (aletas, cabeza, esqueleto, vísceras, etc). Aunque existen desarrollos tecnológicos para utilizar estos subproductos: surimi, fertilizantes, alimentos para animales, la mayoría son desarrollos de productos con un valor más bajo que el original. Una aplicación nueva e interesante, es la extracción de moléculas de alto valor agregado con un uso potencial en el área farmacéutica. En el caso de la acuicultura y pequería del pulpo rojo de Yucatán, de los subproductos (10%) se han aislado polipéptidos con actividad neurotóxica, en los cuales se determinará su potencial farmacológico en la enfermedad de Alzheimer.

Palabras clave: *moléculas bioactivas, subproductos*

Introducción

En México, actualmente la población costera asciende a casi 25 % de la población total y posee una tasa de crecimiento cercana al 2 % anual, siendo su principal actividad económica la pesca, o alguna actividad relacionada con ella. Sin embargo, de acuerdo al último censo del INEGI, el 60 % de las pesquerías económicamente importantes están en su máximo potencial, mientras que un 20% se encuentran en deterioro. Por esto, es importante empezar a encontrar una alternativa que ayude al desarrollo sustentable de las zonas costeras de México. Una alternativa es la acuicultura, la cual genera el 30 % del alimento marino que se consume en el mundo.

Ahora bien, no todo lo que se pesca o se cultiva es utilizado, algunas estimaciones recientes revelaron que los desechos de la pesca en el mundo superan los 20 millones de toneladas equivalentes al 25% de la captura (FAOSTAT FAO, 2001).

Por ejemplo, cuando se producen filetes, generalmente se desperdicia un 60% del pescado utilizado. Además, estos desperdicios (entre los que se encuentran la cabeza, la piel, las glándulas, las vísceras, etc.), casi siempre son tirados al mar, lo cual genera problemas de contaminación si se desechan cerca de la costa (Blanco *et. al.* 2007).

En el caso de camarón, que generalmente se exporta congelado sin exoesqueleto, cerca del 45-48% en peso fresco se desecha como desperdicio, dependiendo de la especie (Kandra *et al.*, 2012). Al mismo tiempo, es importante observar que se utilizaron recursos para la captura o cultivo de los organismos; entre ellos combustibles, horas-hombre, alimento; y que gran parte del recurso se está tirando sin aprovechar. Por lo tanto, existe un gran potencial para convertir y utilizar estos subproductos.

Muchos de estos subproductos de los recursos pesqueros son transformados para producir productos como el aceite, harina y ensilado de pescado, fertilizantes y alimentos para mascotas (Kim, S.K. and Mendis, E., 2006). Sin embargo, en un inicio los productos recuperados eran vendidos en un valor menor al que les dio origen.

No obstante, de estos mismos desechos se han desarrollado productos de valor agregado con aplicaciones interesantes:

a) Industria de la moda, principalmente se curte la piel de peces (salmón, percha, entre otros) para la fabricación de zapatos, tenis, carteras, y ropa (ver sitio atlantic leather: <http://www.atlanticleather.is/en/products>)(Kristbergsson, K. and Arason, S, 2005).

b) Cosmética, investigación en la actividad de enzimas psicrófilas del bacalao llevaron al desarrollo del sistema antienvjecimiento PENZYME, que se comercializa como cosmético en Europa.

c) Biofarmacéutica, un ejemplo fascinante es la adición de ácido docosahexaenoico (DHA) en la formulación de infantiles, ya que se ha demostrado su papel central en el desarrollo del Sistema Nervioso Central, de la visión y del sistema reproductivo, (Kim., S.K. and Mendis, E., 2006) originalmente el DHA era uno de los ácidos poliinsaturados presentes en el aceite de hígado de bacalao (emulsión de Scott), y que mediante técnicas de enriquecimiento, y luego de aislamiento, llevo a la generación del DHA en polvo. (Nandakishore, 2013).

Los ejemplos anteriores son sólo una muestra de casos exitosos, en la literatura se encuentran excelentes trabajos donde se busca la extracción de compuestos con alguna actividad farmacológica de los subproductos de los recursos pesqueros (Je *et al.*, 2005 and Blunt, 2008)). Estos compuesto bioactivos pueden ser extraídos y purificados con tecnologías que van de simples a complejas, dependiendo de su estructura química: péptidos, oligosacáridos, ácidos grasos, enzimas, minerales solubles en agua y biopolímeros para su posible aplicación biotecnológica y farmacéutica.

II. Pulpo rojo de Yucatán como modelo

El pulpo rojo (*Octopus maya*) es un molusco cefalópodo marino y carnívoro y es endémico de la península de Yucatán. Tiene una importancia económica importante, ya que es la primera pesquería del estado con capturas promedio de 12,000 ton (1995-2005) (CONAPESCA e ITESM, 2004), y una derrama de 500 millones de pesos; además, se ubica en tercer lugar nacional en importancia, después del camarón y el atún (INEGI, 2006).

En el caso del pulpo rojo de Yucatán, se utiliza el 90 % de lo capturado, sin embargo, el 10% (aproximadamente 1,200 Ton de vísceras) es lanzado al mar o confinado en un basurero. Dentro de estas vísceras, se encuentran las glándulas salivales posteriores (GSP) donde se produce la saliva, que se ha demostrado ser vital en la mayoría de los octópodos, ya que muchos de ellos la utilizan para paralizar y matar a sus presas (Udheim, *et al.*, 2010). De otras especies de cefalópodos, (Nara *et al.*, 2011) se han aislado moléculas de las GSP para su empleo como herramientas farmacológicas o medicamentos, por ejemplo la eledoisina (polipéptido aislado del pulpo *Eledona moschata*), se ha utilizado como antihipertensivo o en oftalmología como agente lacrimógeno (Erspamer 1962).

La eledoisina, pertenece a un grupo de neuropéptidos conocidos como taquiquininas: neurotransmisores con actividad moduladora sobre el sistema nervioso central y el sistema nervioso entérico. Una actividad novedosa de las taquiquininas es su integración en la placa β -amiloide, induciendo su polimerización y disminuyendo de esta forma la toxicidad del oligómero que desencadena la enfermedad de Alzheimer (Pradeep & M. Samir 2012).

II. Obtención de compuestos bioactivos de los subproductos de la acuicultura del Pulpo rojo de Yucatán (*Octopus maya*)

Octopus maya es un pulpo de gran tamaño, que habita en la plataforma continental, primordialmente en aguas someras cercanas a la costa. Es un octópodo de hábitos bentónicos, que no presenta estadio larval y presenta un desarrollo embrionario directo;¹⁶

García *et al.* 2013. Uso Eficiente de los Recursos Pesqueros y Acuícolas: Extracción de Moléculas Bioactivas de los Subproductos para su Empleo en el Sector Farmacéutico. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 224-237.

por lo que es un buen candidato para desarrollar su acuicultura. En la Unidad Académica Sisal, ya existe todo un estudio biotecnológico para el cultivo de *O. maya*, que ha dado frutos interesantes (Vázquez 2013).

De las investigaciones que se llevaron a cabo en red académica del pulpo, se recolectaron en un periodo de seis meses cerca de 60 pares de GSP. Para ello, aproximadamente 60 pulpos se anestesiaron con agua helada y aeración, y se procedió a su disección para retirar a las glándulas salivales (Fig. 1 a, b). Las glándulas se liofilizaron, molieron y se maceraron con agua para extraer la saliva.



Figura 1. Obtención de las GSP mediante disección. a) Grupo de trabajo del Dr. Carlos Rosas, colaborador del proyecto. b) GSP expuestas (flecha)

Para observar el efecto de este extracto, se utilizó el modelo de neurotoxicidad en cangrejo playero (*Ocypode quadrata*) (Sánchez and Cruz, 2006), se preparó una concentración de 4 mg/mL y se le inyectaron 100 uL en la tercer apéndice caminador de un cangrejo de 20 g. Los resultados demostraron que el extracto presentó la actividad esperada, el cangrejo se paraliza en 50 s, y es notorio, ya que disminuye su actividad y baja sus quelípedos (quelas o tenazas) y en un minuto empieza a temblar, sus extremidades se relajan distendiéndose, y muere a los 10 minutos (figura 2). Es importante señalar que el extracto es una suma de varios efectos: el efecto de las enzimas (proteasas principalmente) y de los compuestos que causan la parálisis y el efecto neurotóxico.



a)



b)



c)



d)

Figura 2. Efecto del extracto crudo de las GSP. A) Colecta de cangrejos fantasma para la determinación del efecto neurotóxico. B) Inyección en la tercer apéndice caminador del crustáceo. C) Control positivo. Es notoria la posición de ataque del cangrejo, junto con las quelas. D) Efecto neurotóxico del extracto de GSP (13.5 mg de extracto/ 100 μ L solución salina), se puede observar la relajación de los músculos de los apéndices, así como la poca coordinación del crustáceo.

Considerando que la mayoría de las proteasas reportadas en la saliva de otros cefalópodos (entre ellos *O. vulgaris*) tienen un rango de 20-30 KDa, y que el efecto neurotóxico está asociado con polipéptidos, se decidió emplear una membrana que separe por peso molecular. Así, el extracto general se separó con una membrana Amicon (Millipore, Inc.) con 3KDa de corte. La fracción con peso menor a 3 KDa se liofilizó para remover el exceso de agua, y se reconstituyó en 500 μ L de SSI. En cuanto a la fracción mayor a 3 KDa, durante la separación con la membrana esta se concentra en 500 μ L, por lo que su preparación es directa.

García *et al.* 2013. Uso Eficiente de los Recursos Pesqueros y Acuícolas: Extracción de Moléculas Bioactivas de los Subproductos para su Empleo en el Sector Farmacéutico. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 224-237.

La evaluación de los extractos separados en el cangrejo fantasma reveló que la inyección del extracto menor a 3 KDa, presentó el efecto neurotóxico: movimientos rápidos de los ojos, relajación de todas sus extremidades y temblores. Es importante señalar que el efecto se manifiesta en los primeros 50 segundos, y el cangrejo se mantiene sedado por espacio de 2 horas, regresando a su estado original. El efecto del extracto con peso mayor a 3 KDa, solo provocó la muerte del cangrejo, sin presentar el efecto neurotóxico, lo cual era esperado, dado que este extracto contiene las enzimas digestivas, las cuales tienen un peso molecular mayor a 3 KDa.

III. Obtención de las glándulas salivales en condiciones de los subproductos de la pesquería del pulpo.

Desde su etapa inicial, se considero conseguir las GSP de la pesquería del pulpo para tener una mayor cantidad. Con la ayuda de la Cooperativa "Tigres del Mar" se logro la obtención de cerca de 2 Kg de GSP (figura 3), las cuales fueron tratadas de manera análoga a las GSP en condiciones de acuacultura.



a)



b)

Figura 3. Colecta de GSP mediante los desechos de la pesquería del Pulpo rojo. A) Bote con los subproductos de la pesca del pulpo. B) Colecta de las GSP de los pulpos eviscerados en el puerto de Abrigo de Sisal.

Sin embargo, la mayoría de las GSP vienen contaminadas con la tinta del pulpo, y por otra parte, al contener enzimas digestivas (proteasas y quitinasas) (Undheim *et al.*, 2010) muy probablemente el tejido y las proteínas se encuentren degradados, por lo que se procedió a la verificar que la actividad se mantenía, y compararla con las GSP en condiciones de acuicultura.

Después de someter a las GSP al proceso de extracción, es evidente el grado de degradación del tejido, ya que es necesaria una mayor cantidad de agua para homogenizar (100 g GSP/ 5 L agua) y diluir la solución de extracción, de otra forma se forma una solución muy viscosa (mucoide) que es difícil de trabajar. Estudios similares en otros cefalópodos utilizan GSP frescas las cuales son homogenizadas con buffers, (Grisley and Boyle 1990) los cuales no describen si las GSP se aglutinan.

La evaluación de la actividad *in vivo* de los extractos en el bioensayo neurotóxico mostró que existe actividad equiparable de los extractos obtenidos mediante los subproductos de la pesquería del pulpo rojo, con respecto a las glándulas conseguidas en condiciones de acuicultura.

Con los extractos generados en gran cantidad, se procedió a una búsqueda parcial de la identidad de la(s) molécula(s) causantes de la actividad, así que el extracto se sometió a prefraccionamiento mediante Extracción de Fase Sólida (SPE) utilizando cartuchos de fase reversa C18U, y de intercambio catiónico (phenomenex, Gigatube, 1g de fase) para separar los componentes activos siguiendo un esquema de separación biodirigida, (Beutler 2009), es decir, se separan los extractos, y cada fracción obtenida es sometida a la prueba de actividad, aquella fracción o fracciones que resulten activas se someten a una nueva separación. En las tablas 1 y 2 se presentan los resultados obtenidos en la separación. En la figura 4 y 5 se presentan los cromatogramas obtenidos de la fracción por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Tabla 1. Resultados del fraccionamiento por EFS en cartucho Strata C18-U de la fracción neurotóxica (F1.2, 114.5 mg)

Fracción	Elución correspondiente	Cantidad Obtenida (mg)
F2.1	100 % H ₂ O	41.2
F2.2	90/10 % H ₂ O/AcCN	12.8
F2.3	80/20 % H ₂ O/AcCN	4.7
F2.4	50/50 % H ₂ O/AcCN	-

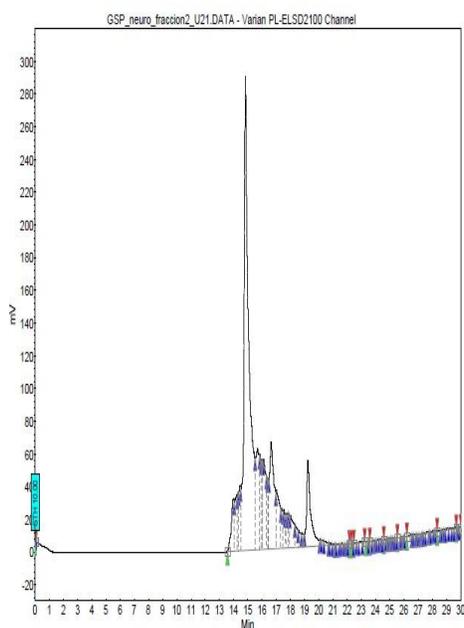


Figura 4. Cromatograma de la fracción F2.2 en CLAR analítico. Se muestra solo un pico principal. Sistema CLAR Varian 211 (Varian Inc. USA), ELSD Ice 2100. Júpiter (C12, RP, 250 X 4.6 mm, 5 μ m) 0.7% TFA: AcCN, 0 a 50 % AcCN grad. en 30 min. ELSD cond. Neb. temp=40°C Evap. Temp. =70 °C, N₂ flujo= 1.0 mL/min; 20 μ L de extracto (2.0 mg/mL).

Tabla 2. Resultados del fraccionamiento por EFS en cartucho Strata SCX
(catiónico fuerte (F1.2, 50 mg))

racción	Elución correspondiente	Cantidad Obtenida (mg)
F2_2_1	H2O:TFA 90:10	12.6
F2_2_2	HCl 0.1 N en H2O	7.5
F2_2_3	HCl 0.1 N en MeOH	7.2
F2_2_4	1% NH4OH en MeOH	3.3
F2_2_5	2% NH4OH en MeOH	1.6

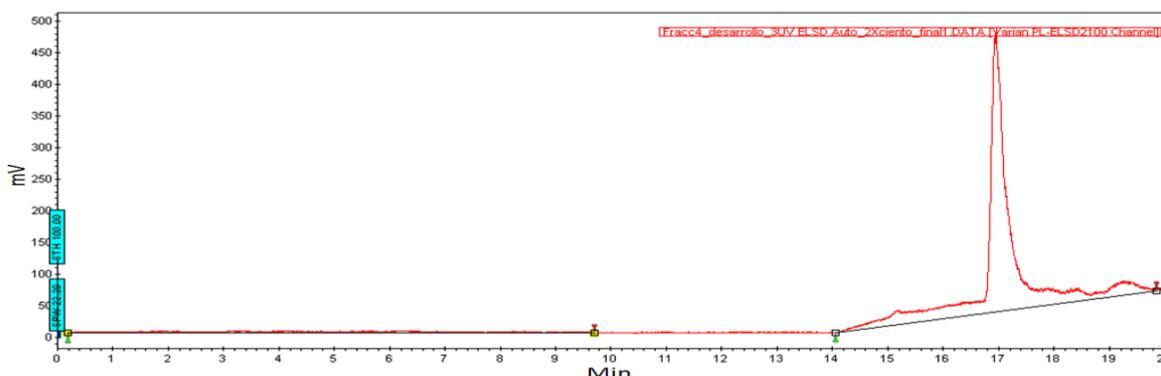


Figura 5. Cromatograma de la F2_2_5 en CLAR analítico se muestra solo una señal principal. *Sistema HPLC*: Sistema Binario Varian 211 (Varian Inc. USA), Detector Evaporativo de Difracción de Luz (DELD, ELSD en inglés). *Condiciones de separación*: Columna LUNA (C18, fase reversa, 250 X 4.6 mm, 5 μ m de partícula Phenomenex, INC. USA), Fase móvil AcCN: Agua, en gradiente de 0-18 % acetonitrilo en un tiempo de 20 minutos de corrida. Detección, ELSD, Temp. nebulización=40°C Temp. evaporación=70 °C, flujo de nitrógeno= 1.0 mL/min; U.V. a 215 nm. Se inyectaron 25 μ l de muestra (1mg/mL).

Para determinar los aminoácidos constituyentes de la señal principal colectada de la fracción (F2_2_5), se realizó la hidrólisis ácida y básica (1.0 mg de la fracción F2_2_5) a

García *et al.* 2013. Uso Eficiente de los Recursos Pesqueros y Acuícolas: Extracción de Moléculas Bioactivas de los Subproductos para su Empleo en el Sector Farmacéutico. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 224-237.

100 °C por 18h y 7h respectivamente. La muestra se limpió por filtración, se derivatizó y se inyectó en el sistema CLAR de Waters. El aminograma se presenta en la Figura 6.

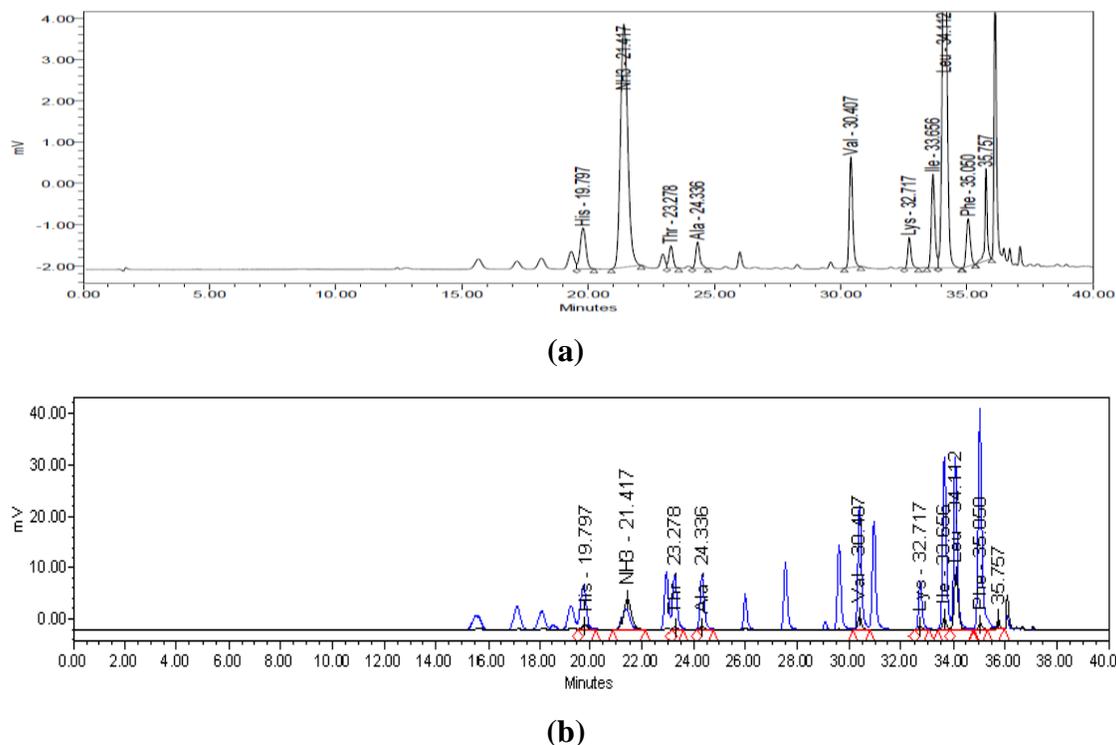


Figura 6. Aminogramas de la señal principal obtenida de la fracción F2_2_5. (a) aminograma de la señal principal. (b) integración del aminograma de la señal principal (negro), con el estándar de aminoácidos (azul) de 2.5Mm de 18 aminoácidos, y 1.25 de cisteína, y Acido 2-aminobutírico, AABA, 2.5Mm) en azul. Sistema HPLC: Sistema binario Waters 1525 (Waters inc. USA), detector de fluorescencia de onda múltiple Waters 2475, $\lambda_{exc}=250\text{nm}$ y $\lambda_{emss}=395\text{nm}$. Condiciones de separación: columna AccQ-TAG (3.9 x 150mm, 4 μm de partícula Waters Inc. USA), fase móvil A (Eluente A: agua, 1:10 v/v): fase móvil B (acetonitrilo: agua, 60:40 v/v) en un tiempo de 40 minutos de corrida. Se inyectaron 25 μL de muestra (1mg/mL).

En el aminograma es evidente que el pico mayoritario es el NH₃ (amina), que puede tener dos orígenes: alguna compuesto aminado presente en la muestra, sin embargo, en las condiciones de corrida es casi improbable, o bien que la muestra está aminada. En general esta modificación post-transduccional evita la hidrólisis por enzimas exoproteasas, condiciones que están presentes en la saliva del pulpo, ya que contiene proteasas (tripsina y quimotripsina).

Inclusive la eledoisina es un polipéptido aminado, siendo este grupo necesario para la actividad biológica sobre receptores de taquiquinina. Los aminoácidos presentes en la muestra son: glicina, treonina, alanina, fenilalanina, leucina, lisina e isoleucina. Este resultado es interesante, dado que en la literatura no hay reportada alguna taquiquinina que contenga a la treonina, por lo que muy probablemente se trate de una nueva taquiquinina. Pero será necesario realizar más experimentos para determinar la estructura de este nuevo polipéptido, principalmente secuenciación mediante la técnica de degradación de Edman, o bien por LC-MS.

Cuando se evaluó esta última fracción (F2_2_5) en el bioensayo de cangrejo playero (4 mg/mL, 100 uL de inyección), se encontró que la actividad relajante del nuevo péptido se presenta en 10 segundos y se mantiene por dos horas.

IV.- Conclusiones

Después del estudio realizado es factible obtener moléculas bioactivas de los subproductos de los recursos pesqueros, ya que ambos extractos generados con GSP de acuicultura o en condiciones de pesquería son activos en el modelo neurotóxico de cangrejo playero.

El efecto neurotóxico está relacionado moléculas pequeñas (Peso molecular menor a 3 KDa), mientras que el efecto metabólico es asociado a proteasas de alto peso moléculas (mayor a 3 KDa). Ahora sabemos que el extracto neurotóxico tiene tres componentes de la actividad: paraliza, relaja los apéndices caminadores y produce descoordinación al cangrejo, y que estos efectos son causados por un oligopéptido de 7 aminoácidos que se encuentra amidado.

Bibliografía

- INEGI, *Boletín de estadísticas vitales*. **2006**.
- FAOSTAT, FAO statistical databases, fisheries data (2001). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Available from internet: <http://www.fao.org> <http://www.fao.org>.
- Blanco, M.; Sotelo, C.; Chapela, M.; Pérez Martín, R. Toward sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. *Food and Science Technology*. **2007**, 18, 29-36.
- Kandra, P.; Challa, MM.; Jyothi, HKP. Efficient use of shrimp waste: present and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2012**, 93(1), 17-29.
- Kim, S. K. and Mendis, E., Bioactive compounds from marine processing by-products—a review, *Food Research International*, **2006**, 39, 383.
- Kristbergsson, K.; Arason, S. Utilization of by-products in the fish industry. *Department of Food Science and Human Nutrition*. **2005**, 233-258.
- Nandakishore Jeevanrao DURAGKAR, Docosahexaenoic acid (DHA) as polyunsaturated free fatty acid in its directly compressible powder form and method of isolation thereof. *Patente WO2012153345A1*, fecha publicación: 13/mayo/2013.
- Je, J., Park, P. J., and Kim, S.-K., Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolyzate, *Food Research International*, **2005**, 38, 45.
- Jung, W. K. *et al.*, Angiotensin-I lowering enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats, *Food Chemistry* **2006**, 94, 26.
- Blunt, John; Munro, Murray H. G. "Dictionary of Marine Natural Products With CD-ROM" 1st Edition Boca Raton CRC Press, **2008**, Chapter 1-4.
- CONAPESCA e ITESM. Características generales, aspectos oceánológicos y geográficos del pulpo. SAGARPA. **2004**. 175 pp.
- Undheim, EAB; Georgieva, DN; Thoen, HH. "Venom on ice: First insights into Antarctic octopus venoms" *Toxicon* : **2010**, 56 (6), 897-913.
- Nara, R.; Pillai, D.; Joseph, S.; Gomathi, P.; Senan, P.; Sherief, P.M. Cephalopod research and bioactive substances. *Indian journal of Geo-marine Sciences*, **2011**, 40(1), 13-27.
- Erspamer, V. Erspamer, G.V Pharmacological actions of an eledoisin on extravascular smooth muscle. *B. J. Pharmacol.* **1962**, 19, 337.
- Pradeep, Singh; Maji, Samir "Amyloid-like fibril formation by tachykinin neuropeptides and its relevance to amyloid B-protein Aggregation and toxicity" *Cell Biochemical Biophysic*, **2012**, 64: 29-44.
- Voss, G.L.; Solis-Ramiréz, M.J. *Octopus maya*, a new species from the Bay of Campeche. *Bulletin of Marine Science*. **1966**, 16, 615-625.
- Vázquez Quiroz, Sandra. *Octopus maya*, tras una tecnología de cultivo. *El faro: la luz de la ciencia*, CIC, UNAM, **2013**, XII, No. 133, pag6-7.

- Sanchez-Rodriguez, J; Cruz-Vazquez, K. "Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860) " *Archives of Toxicology* **2006**, *80*(7), 436-441
- Grisley, M.S.; Boyle, PR. Chitinase, a new enzyme in octopus saliva. *Comp Biochem. Physiol.* **1990**, *95B* (2), 311-316.
- Beutler J.. Natural products as a foundation for drug discovery. *Current protocols in pharmacology.* **2009**, 46: 1-30.