

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS**  
**Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos**

**Identificación y Caracterización Estructural de los Diferentes  
Tipos de Piridinolina Presentes en Fibras de Colágeno de Pulpo  
(*Octopus vulgaris*) y Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)**

**TESIS**

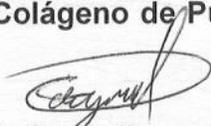
**Como requisito parcial para obtener el grado:  
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**Presenta:**

**M.C. Angel Edgardo Tapia Vasquez**

## APROBACIÓN

Identificación y Caracterización Estructural de los Diferentes Tipos de Piridinolina Presentes en Fibras de Colágeno de Pulpo (*Octopus vulgaris*) y Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*).

  
Angel Edgardo Tapia Vasquez

Autor



Dr. Wilfrido Torres Arreola

Director de Tesis



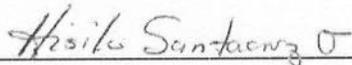
Dra. Josafat Marina Ezquerra Brauer

Secretario



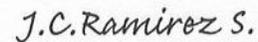
Dr. Enrique Márquez Ríos

Vocal



Dra. Hisila Santacruz Ortega

Vocal



Dr. Juan Carlos Ramírez Suarez

Vocal

Hermosillo, Sonora, México

Mayo de 2022

Hermosillo, Sonora a Mayo de 2022

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA  
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada **“Identificación y Caracterización Estructural de los Diferentes Tipos de Piridinolina Presentes en Fibras de Colágeno de Pulpo (*Octopus vulgaris*) y Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)”**, en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **Doctorado en Ciencias de los Alimentos**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

**A T E N T A M E N T E**



**LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN**  
Abogado General  
UNIVERSIDAD DE SONORA



---

**M.C. Angel Edgardo Tapia Vasquez**

## AGRADECIMENTOS

Le agradezco a cada uno de los integrantes del comité de este trabajo, para empezar al Dr. Wilfrido, mi asesor de tesis, por sus enseñanzas y amistad. A la Dra. Marina por su guía y apoyo incondicional. Al Dr. Enrique por la confianza y su disponibilidad. A la Dra. Hisila por compartir su experiencia en áreas nuevas para mí. Y por último, pero con la misma importancia, al Dr. Juan Carlos por sus observaciones y aportaciones al trabajo. Sin ustedes no se podría haber terminado de manera satisfactoria esta investigación.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos por convertirse en un segundo hogar para mí. Un sincero agradecimiento a todo el personal que aquí trabaja con tanto ánimo y dedicación. Un especial agradecimiento a los amigos que hice a lo largo de esta travesía: Sol Villalba, Raquel Márquez, Francisco Cadena, Aaron Santiaguin, Andrés Levy, Caro Gálvez, Rafael Dávila, Daniela Téllez, entre tantos más.

A mis seres queridos. A mi familia porque sin ellos no lograría nada de esto, los amo con todo mi corazón. Gracias a ustedes estoy aquí. A la compañera que elegí para que esté conmigo lo que nos queda de vida Mayra Leos Fimbres, gracias por siempre estar ahí. ¿Qué sería de mí sin tu apoyo?

Por último, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la financiación de este trabajo y por la beca con No de registro 711844.

## DEDICATORIA

A aquellos que les sea de utilidad este trabajo.

Para ustedes.

*"Las circunstancias en que uno nace no tienen importancia,  
es lo que uno hace con el don de la vida lo que nos dice quiénes somos"*

*Pokémon: la película - Meutwo contraataca*

## RESUMEN

El pulpo (*Octopus vulgaris*) y el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) son dos cefalópodos apreciados en distintas áreas como la industria, cocina, tecnología de alimentos, etc. Los brazos de estos organismos presentan en común una alta resistencia al corte, atribuida al alto contenido de proteínas del tejido conectivo, cuya principal proteína es el colágeno. El colágeno es una proteína que juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura celular y el comportamiento de la textura en los cefalópodos. Una de las principales características a considerar de esta proteína es su grado de entrecruzamiento. Uno de los principales factores que influyen en este grado de entrecruzamiento es la concentración de las piridinolinas. Dentro de este grupo de moléculas existen diferentes tipos, entre los cuales se pueden destacar las que tienen un anillo aromático piridina y los que tienen el anillo aromático pirrol. Para mejorar los potenciales usos del colágeno es necesario caracterizar e identificar el tipo de piridinolina que se encarga del entrecruzamiento en los brazos de estos cefalópodos.

Se estudió el músculo de los brazos de *O. vulgaris* y *D. gigas* utilizando la tinción tricrómica de Masson, se encontró una mayor proporción de las fibras de colágeno teñidas en pulpo. Se obtuvieron los extractos de proteínas solubles en ácido acético y pepsina, a estos se le evaluaron propiedades fisicoquímicas como la composición de aminoácidos, el perfil térmico y comportamiento reológico. La caracterización fisicoquímica indicó diferencias entre las proteínas predominantes en pulpo y calamar gigante. El perfil de aminoácidos del calamar gigante fue el característico de colágeno, alta concentración de glicina (Gly), además de la presencia de los inminoácidos prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp). El perfil de aminoácidos del pulpo también mostró características de colágeno (presencia de Hyp). Sin embargo, se encontró mayor cantidad ácido aspártico y ácido glutámico en comparación con el calamar gigante y el contenido de Gly decreció. El perfil térmico del extracto de proteínas solubles de ambos cefalópodos mostró las transiciones endotérmicas característica del colágeno. Además, en calamar gigante se encontró la transición

endotérmica de colágeno altamente entrecruzado (superior a los 120 °C). Por último, se encontró un comportamiento de fluidez del tipo pseudoplástico en ambos extractos.

El extracto de proteínas solubles fue sometido a una cromatografía de exclusión molecular (CEM) y después a una cromatografía de intercambio iónico (CII). El proceso de las cromatografías se siguió a través de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Las bandas en el perfil de electroforesis fueron eliminándose al utilizar cada cromatografía, lo cual significa un adecuado proceso de aislamiento de las proteínas. Por último, a las bandas predominantes del gel de electroforesis de la fracción de la CII se les realizó una identificación proteómica a través de cromatografía líquida acoplada a un masas/masas (LC-MS/MS) y softwares analíticos. La identificación proteómica de la muestra de pulpo confirma homología (porcentaje de identidad del 33%) a paramiosina de *Dosidicus gigas*. Mientras que la muestra de calamar gigante confirma homología (porcentaje de identidad del 4%) a colágeno tipo II de *Sepia pharaonis*.

Finalmente, para la identificación y caracterización de las moléculas entrecruzantes se les realizó una caracterización estructural a los extractos solubles en ácido acético y pepsina, utilizando resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  ( $^1\text{H}$ -RMN) y espectrometría fluorométrica. Al evaluar los espectros de fluorescencia se encontró el anillo de piridina en ambos cefalópodos. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN confirmaron la presencia de piridinolina como molécula encargada del entrecruzamiento de colágeno en los brazos de *O. vulgaris* y *D. gigas*. Los resultados obtenidos de este trabajo de investigación confirman la presencia de colágeno en los extractos de proteína soluble en ácido acético y a la piridinolina como la molécula entrecruzante de colágeno en los brazos de estos cefalópodos. Sin embargo, también se identificó la particular presencia una paramiosina insoluble en ácido acético, la cual probablemente se encontraba unida al colágeno en *O. vulgaris*.

# CONTENIDO

	Página
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
Importancia Pesquera y Comercial de los Cefalópodos .....	3
Pulpo ( <i>Octopus vulgaris</i> ) .....	5
Manejo y procesamiento de pulpo .....	8
Calamar Gigante ( <i>Dosidicus gigas</i> ) .....	10
Manejo y procesamiento de calamar gigante .....	12
Composición Proximal del Músculo de Pulpo y Calamar Gigante .	13
Proteínas del Tejido Conectivo .....	14
Colágeno .....	15
Fibras de colágeno .....	16
Piridinolinas y Pirroles .....	18
Síntesis de piridinolinas y pirroles .....	18
<b>HIPÓTESIS</b> .....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	22
Objetivo General .....	22
Objetivos Particulares .....	22
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
Obtención de la Materia Prima .....	23
Tinción Tricrómica de Masson .....	23
Extracción de Proteínas Solubles en Ácido Acético .....	23
Cromatografía de Exclusión Molecular (CEM) .....	25
Cromatografía de Intercambio Iónico (CII) .....	25
Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida .....	25
Composición de Aminoácidos .....	26
Digestión en Gel y LC-MS/MS .....	26
Identificación Proteómica .....	27
Calorimetría Diferencial de Barrido .....	27
Propiedades Viscoelásticas .....	27
Espectrometría Fluorimétrica .....	28
Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ .....	28
Análisis Estadístico .....	28
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	29
Análisis Histológico del Músculo .....	29
Rendimientos de Extracción .....	31

Análisis del Cromatograma CEM .....	33
Análisis del Cromatograma CII .....	36
Perfil de Aminoácidos .....	39
Identificación Proteómica .....	41
Resistencia Térmica .....	43
Propiedades Viscoelásticas .....	45
Fluorescencia .....	49
Análisis de <sup>1</sup> H-RMN .....	52
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>55</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>57</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Hábitat del pulpo en el Golfo de México y calamar gigante en el Océano Pacífico .....	4
2	Morfología externa de un pulpo ( <i>Octopus vulgaris</i> ) .....	6
3	Método artesanal para la pesca de pulpo .....	9
4	Morfología exterior de un calamar gigante ( <i>Dosidicus gigas</i> ) .....	11
5	Resumen de las vías de síntesis de piridinolinas .....	20
6	Diagrama de flujo general para la obtención del extracto de proteínas solubles en ácido acético de pulpo ( <i>O. vulgaris</i> ) y calamar gigante ( <i>D. gigas</i> ) .....	24
7	Análisis histológico. a) Imagen objetivo 10X del músculo pulpo ( <i>O. vulgaris</i> ). b) Imagen objetivo 10X del músculo calamar gigante ( <i>D. gigas</i> ). .....	30
8	Cromatograma obtenido de la cromatografía de exclusión molecular (CEM) de las proteínas extraídas de pulpo ( <i>O. vulgaris</i> ) y calamar gigante ( <i>D. gigas</i> ) .....	34
9	SDS-PAGE de las proteínas extraídas de pulpo y calamar gigante. Donde: A = marcador de peso molecular, B = extracto crudo de proteínas de pulpo, C = colágeno de pulpo, D = extracto crudo de proteínas de calamar gigante y E = colágeno de calamar gigante.....	35
10	Cromatograma obtenido de la cromatografía de intercambio iónico (CII) de las proteínas extraídas de pulpo ( <i>O. vulgaris</i> ) y calamar gigante ( <i>D. gigas</i> ) .....	37

11	SDS-PAGE de las proteínas extraídas de pulpo y calamar gigante. Donde: A = marcador de peso molecular, B = paramiosina de pulpo, C = colágeno de calamar gigante, a = banda para identificación proteómica de pulpo y b = banda para identificación proteómica de calamar gigante .....	38
12	Gráfica de velocidad de corte vs esfuerzo de corte del extracto de proteínas solubles de pulpo ( <i>O. vulgaris</i> ) y calamar gigante ( <i>D. gigas</i> ) .....	46
13	Gráfica de velocidad de corte vs viscosidad del extracto de proteínas solubles de pulpo ( <i>O. vulgaris</i> ) y calamar gigante ( <i>D. gigas</i> ) .....	48
14	Espectros de fluorescencia de las proteínas extraídas de pulpo ( <i>O. vulgaris</i> ) .....	50
15	Espectros de fluorescencia de las proteínas extraídas de calamar gigante ( <i>D. gigas</i> ) .....	51
16	Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de las proteínas extraídas de pulpo ( <i>O. vulgaris</i> ) .....	53
17	Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de las proteínas extraídas de calamar gigante ( <i>D. gigas</i> ) .....	54

## LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Rendimientos de extracción de la proteína soluble en ácido acético (% p/p) .....	32
2	Contenido de aminoácidos (por cada 1000 aminoácidos)	40
3	Proteínas identificadas en pulpo y calamar gigante por LC-MS/MS y análisis informáticos .....	42
4	Perfil térmico de los extractos de pulpo y calamar gigante	44

## INTRODUCCIÓN

Los pulpos y los calamares son animales cosmopolitas; las especies de pulpo (*Octopus vulgaris*) y el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) son moluscos cefalópodos que se concentran en la zona del Océano Pacífico en las costas del continente americano, donde su pesca es considerada de importante valor para la industria en los países de México y Perú, respectivamente. El calamar gigante es un cefalópodo de la familia *Ommastrephidae*, que llegaba a crecer hasta 1.9 m de longitud y pesar hasta 50 kg (Nigmatullin y col., 2001; Glaubrecht y col., 2004). El pulpo es un animal que se distribuye en aguas templadas y tropicales de todo el mundo. Estos cefalópodos son apreciados en la industria alimentaria debido a la textura de su músculo, principalmente en la cocina japonesa (cocina que en recientes años se ha expandido al resto del mundo). El músculo de estos organismos presenta dentro sus propiedades una alta concentración de proteínas, vitaminas y minerales. Las proteínas estructurales están presentes en las diferentes regiones anatómicas de estas especies y una de las más abundantes son las del tejido conectivo, donde el principal componente es el colágeno (Fujimoto y col., 1977; Morales y col., 2000). Estas proteínas tienen un papel importante en el comportamiento de la textura de los cefalópodos.

El colágeno es una familia de moléculas que tienen una conformación similar y única que forma una triple hélice. Cada cadena de colágeno tiene un peso molecular de 97 kDa en calamar gigante y de 97-115 kDa en pulpo *O. vulgaris* (Tapia-Vasquez y col., 2019; Torres-Arreola y col., 2008). Además, actualmente se han obtenido más de 20 tipos diferentes de colágeno. Los tipos de colágeno más importantes en el músculo de productos marinos son los tipos I, III y V, las cuales se caracterizan por ser moléculas lineales (con forma parecida a una “trenza”) las cuales se unen a otras moléculas de colágeno por sus extremos (de punta a punta), así como también en determinados puntos dentro (no por los extremos) de la molécula de colágeno para formar las redes de fibras de colágeno (Exposito y col., 2002).

Una enzima llamada lisil oxidasa (LOX; EC 1.4.3.13) les confiere estabilidad a los entrecruzamientos de las fibras de colágeno. Lo anterior, por medio de una agregación de las fibras de colágeno, catalizando la deaminación oxidativa de lisinas e hidroxilisinas en las moléculas de colágeno para la formación de entrecruzamientos covalentes por medio de piridinolinas o pirroles. Las piridinolinas presentan anillos aromáticos en su estructura y son capaces de entrecruzar hasta tres moléculas de colágeno cada una (Fujimoto y col., 1977). Se han realizado estudios sobre la actividad de esta enzima y su efecto en la estabilidad térmica del colágeno, donde se ha establecido una relación con el contenido y estabilidad térmica del colágeno presente en cada región anatómica del calamar gigante, influyendo a su vez en la textura del músculo (Torres-Arreola y col., 2012; Ramírez-Guerra y col., 2015b).

En estudios previos se ha informado la caracterización fisicoquímica del colágeno de distintas regiones anatómicas, así como también, se han reportado distintos comportamientos de entrecruzamiento de colágeno (Sarabia-Sainz y col., 2017; Tapia-Vasquez y col., 2019). Sin embargo, no se habían llevado a cabo estudios que determinaran el tipo de molécula entrecruzante de colágeno en *O. vulgaris*, tampoco la posible relación entre el mecanismo de entrecruzamiento (piridinolina) con las propiedades reológicas de las fibras colágeno. Por tanto, el objetivo de este estudio fue establecer la identificación de la piridinolina como molécula encargada de los entrecruzamientos de colágeno en los brazos de pulpo (*O. vulgaris*) y calamar gigante (*D. gigas*).

## REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### Pesquería e Importancia Comercial de Cefalópodos

El nombre cefalópodo deriva del griego “*kephalé*” = cabeza y “*podós*” = pie, y se trata de una clase de invertebrados marinos caracterizados por poseer una morfología singular, compuesta por una cabeza de donde provienen unas extremidades conocidas como tentáculos y/o brazos. Existen alrededor de 700 especies de cefalópodos, comúnmente llamados pulpos, calamares, sepias y nautilo, los cuales se dividen en dos subclases: Nautiloideos y Coleoideos. En la subclase Nautiloidea se conocen alrededor de 7 especies de nautilos. Los demás cefalópodos que habitan los océanos pertenecen a los Coleoideos, dentro de esta subclase se encuentra el orden de sepiídeos (Hickman y col., 1990), donde encontramos a las sepias y jibias; el orden de los tétidos con especies como el calamar gigante (*D. gigas*) y el orden de los octópodos como el pulpo (*O. vulgaris*) (Budelmann, 1994).

El grupo de los moluscos cefalópodos ha sido muy apreciado en la pesca a lo largo de los años, desde 1986 donde se capturaron más de 1 millón de toneladas a nivel mundial según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés). Estas especies marinas son tan atractivas por su abundancia y valor pesquero para ciertas regiones, como los países de México y Chile (PRODUCE, 2015; SAGARPA, 2016), y por la calidad de su carne, la cual es calificada como una fuente alimenticia altamente nutritiva debido a que el músculo de los cefalópodos presenta un alto contenido de proteína y bajo en lípidos (Cabello y col., 2004). En la Figura 1 se muestra el hábitat en el continente americano de estos cefalópodos. En la actualidad, la producción pesquera de pulpo del mundo se concentra en China (130,245 ton) seguido de cerca por México (38,010 ton) ocupando el tercer lugar a nivel mundial de producción de pulpo. La exportación de pulpo generó ingresos a México por 57.2 millones de dólares. Por otro lado, Perú se coloca como el principal suministrador mundial de calamar gigante (*D. gigas*), el cual es uno de sus recursos pesqueros más importantes, se capturan alrededor de 513,796 ton anualmente, este recurso es congelado y exportado a mercados asiáticos para su consumo (PRODUCE, 2015).



**Figura 1.** Hábitat del pulpo en el Golfo de México y calamar gigante en el Océano Pacífico.

Aunque la pesquería de estos animales en el continente latino americano ha crecido, aún existen dificultades para su correcto desarrollo y competencia a nivel mundial, la pesquería y procesamiento locales no siempre son apropiados con los procesos tecnológicos de gestión de estos recursos. Por este motivo, la pesca local se encuentra en desventaja al momento de tratar de competir por mejores mercados a nivel mundial (Luna-Raya y col., 2006). Una manera de combatir esta problemática sería llevando a cabo estudios que puedan mejorar el entendimiento del comportamiento y manejo postmortem del músculo de los recursos pesqueros. Para esto sería útil la identificación de las moléculas encargadas de los entrecruzamientos de colágeno en los brazos de pulpo (*O. vulgaris*) y calamar gigante (*D. gigas*).

### **Pulpo (*Octopus vulgaris*)**

El pulpo común (Figura 2) pertenece a la clase de los cefalópodos, es un animal marino que habita y se desarrolla en aguas tropicales y templadas a nivel cosmopolita. Viven solos, por lo que se aíslan en un área que se convierte en su territorio y realizan migraciones estacionales para reproducirse en zonas con aguas menos profundas (Wells, 1978; Boyle, 1983). El ciclo de vida del pulpo es relativamente corto, sobreviviendo entre uno y dos años en estado salvaje (Iglesias y col., 2007). La época de reproducción del pulpo común es bastante amplia y varía dependiendo de la zona geográfica donde habite (Mangold y Boletzky, 1973; Smale y Buchan, 1981). Ya que se caracteriza por presentar diferencias entre machos y hembras, es una especie gonádica, y aunque estas diferencias no son fáciles de identificar ya que el tamaño y peso corporal entre machos y hembras es muy similar, presentan un dimorfismo sexual en el comienzo de la maduración sexual.



**Figura 2.** Morfología externa de un pulpo (*Octopus vulgaris*).

Fuente: Alfredo Martin. [[http://vidamarina.synology.me/?page\\_id=2854](http://vidamarina.synology.me/?page_id=2854)].

*O. vulgaris* comparte la característica que presentan un gran número de cefalópodos al ser una especie carnívora durante el desarrollo de toda su vida. La alimentación de los pulpos comprende una gran variedad de presas (Mangold, 1983), de los cuales, peces pequeños, crustáceos y otros moluscos son las presas más comunes, siendo los cangrejos una de sus predilectas (Guerra y Nixon, 1987).

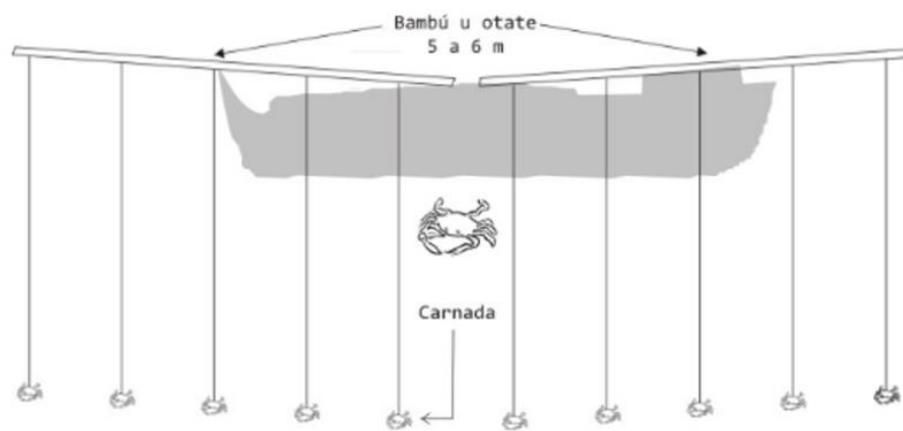
Los pulpos, debido a que su desarrollo a la etapa juvenil es principalmente en aguas someras (Hernández, 2000), son unas de las especies de los cefalópodos más accesibles a la pesca. Constituyen uno de los recursos pesqueros tradicionales más capturados por las flotas artesanales del mundo. Es común encontrarlos en zonas costeras, en profundidades de hasta 200 metros, presuntamente en zonas rocosas que ofrezcan refugios naturales, en donde puedan esconderse de posibles predadores. Al ser un animal solitario, cada individuo posee su propio refugio, aunque suelen moverse continuamente de las zonas donde habitan con la finalidad de encontrar mejor fuente de alimentación (Mather, 1993). Estos animales no suelen encontrarse en grupos, únicamente se agrupan en los periodos reproductivos, donde migran hacia aguas más someras (Tanaka, 1958; Mangold, 1983; Sierra, 1992).

Los límites geográficos donde habita el pulpo *O. vulgaris* no han sido definidos con exactitud, diversos autores supusieron que existía una clase de “complejo de especies de *O. vulgaris*” (Norman, 2000), juntando a un grupo de octópodos muy similares entre sí, de aguas templadas y tropicales por todo el globo terráqueo, tratándolos en general como *O. vulgaris*. Las técnicas genéticas han permitido separar especies, como las de Chile y Perú, donde la especie *O. mimus* (Guerra y col., 1999) era considerada como *O. vulgaris* (Guerra y col., 1999; Söller y col., 2000). Posteriormente se ha demostrado que *O. vulgaris* está presente, no sólo en aguas del Mediterráneo y el Atlántico, sino también, en aguas de Taiwán y Japón (Warnke y col., 2004). Finalmente, el pulpo posee un gran potencial para el acuocultivo, siendo uno de los cefalópodos más estudiados en distintas regiones y desde diferentes puntos de interés (Domínguez y col., 2004).

## Manejo y procesamiento de pulpo

El pulpo es una parte importante dentro de la cultura gastronómica de las regiones costeras donde habita, ya que forma parte importante de la dieta de dichos lugares. En las costas del Océano Pacífico y en la Península de Yucatán se conoce una gran variedad de recetas para su elaboración, tanto tradicionales usando los insumos endémicos de la región (como especias y chiles locales), así como con toques de elementos presentes en la cocina moderna.

Existen dos tipos de flotas pesqueras para la captura del pulpo, la más numerosa es la pesquería menor con embarcaciones de 5 hasta 9 m de eslora, denominadas comúnmente como pangas, y la flota de mediana altura con embarcaciones con eslora entre los 12 y 22 m. La pesca de este animal utiliza un método que es prácticamente exclusivo para su captura, por lo que no existe una pesca incidental durante las operaciones de captura de pulpo (DOF, 2014). La pesquería del cefalópodo se realiza durante el día, utilizando un método denominado "gareteo" también conocido como "campechano", el cual consiste en dejar la embarcación a la deriva, arrastrando líneas de redes monofilamentadas donde se sujeta la carnada, principalmente se utilizan cangrejos (*Callinectes spp.*) y (*Libinia dubia*) (Brusca y col., 2005). La carnada va atada al extremo libre de la línea, el otro extremo, no sumergido, se ata a uno de los costados de la embarcación y a dos "jimbas" (pértigas de bambú), parte de las cuales se fija a la embarcación y parte pende a proa y popa. Las embarcaciones pequeñas emplean jimbas de dos a tres metros y de seis a siete líneas, en tanto que las embarcaciones de mayor tamaño usan jimbas de 4 a 5 m y 16 líneas. (Arreguín-Sánchez y col., 1987; Solís-Ramírez, 1962, 1994; Ramírez y Ramírez 1998). En la Figura 3 se muestra un esquema del método empleado para esta pesquería.



**Figura 3.** Método artesanal para la pesca de pulpo.

Fuente: SEMARNAT, 2010.

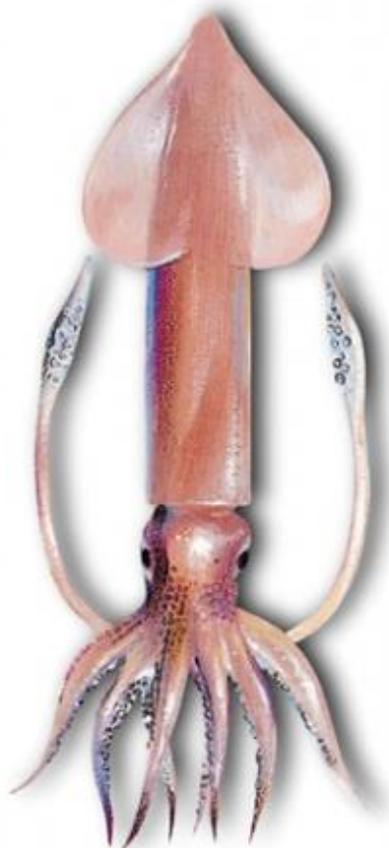
[dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi\_apps/WFServlet?IBIF\_ex=D2\_R\_PESCA04\_02&IBIC\_user=dgeia\_mce&IBIC\_pass=dgeia\_mce].

El pulpo como recurso pesquero en el Golfo de California y Golfo de México comprende principalmente dos especies: *O. vulgaris* (pulpo común) y *O. maya* (pulpo maya o rojo), los cuales después de su captura son procesados de una forma similar. La exportación a mercados internacionales de este recurso requiere de la certificación ante la Comisión Federal de Prevención de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Para la exportación a mercados extranjeros (Japón, España, Corea e Italia), el producto final es presentado en estado fresco-congelado y/o fresco-enhielado. Por otro lado, en el mercado nacional se utiliza la presentación del producto fresco-enhielado, el cual es transportado en vehículos terrestres equipados con refrigeración principalmente hacia Ciudad de México, Michoacán, Guanajuato y Sinaloa (SAGARPA, 2009).

La norma mexicana NMX-F-491-1994 establece los lineamientos para el procesamiento de pulpo congelado con el fin de obtener un producto alimenticio que resulte de un proceso adecuado de congelación que asegure su inocuidad. Los productos provenientes de la especie *Octopus sp* deben haber sido lavados, eviscerados y sometidos a un proceso de congelación rápida utilizando aditivos permitidos por la Secretaría de Salud, para ser envasados en bolsas plásticas de calidad inocua y ser almacenado de -25 a -30 °C.

### **Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)**

El calamar gigante es un cefalópodo de la familia *Ommastrephidae* que se encuentra en abundancia en las costas del Pacífico en Perú (PRODUCE, 2015). Son invertebrados marinos carnívoros que migran en cardúmenes de hasta 1,200 individuos, nadando a una velocidad de hasta 24 km/h. Sus brazos tienen entre 100 y 200 ventosas agrupadas, cada uno alineado con los dientes afilados (Markaida, 2001). Por lo general, el manto constituye aproximadamente el 40 % de la masa total del animal, las aletas aproximadamente el 12 %, los brazos y tentáculos alrededor de 14 %, la piel exterior alrededor del 3 %, la cabeza (incluyendo ojos y el pico) 5 % y el 26 % restante está compuesto por los órganos internos (Norman, 2000). El calamar gigante (Figura 4) se caracteriza por tener un cuerpo en forma cilíndrica denominada manto, el cual cumple la función de envolver y proteger los órganos internos (Moreno-Martínez, 2011).



**Figura 4.** Morfología externa de un calamar gigante (*Dosidicus gigas*).  
Fuente: [<http://mar-fish.com/exportacion-pescado/especies/pota.php>].

El manto del calamar gigante está compuesto de cinco diferentes capas de tejido, la capa dominante está formada por bandas ortogonales (Lluch y col., 2001) de fibras musculares, intercaladas entre dos túnicas de tejido conectivo. Las túnicas interna y externa están cubiertas por un revestimiento visceral y uno exterior, respectivamente. Cada fibra contiene en su periferia una determinada cantidad de miofibrillas. La túnica exterior consiste en capas de fibras de colágeno adyacentes a la capa externa, compuesta también de fibras de tejido conectivo, las cuales se ubican justo por debajo de la piel. La túnica interna, la cual tiene ligeramente ligados e interconectados agregados fibrosos, está cubierta por una capa interna no fibrosa (Otwell y Giddings, 1980). El radio del manto se reduce poco a poco, cada vez más en la región de inserción de las aletas, terminando como punta cónica. El borde de la base del manto, en su porción ventral, está ligeramente vuelto hacia afuera y hacia arriba, entre los cartílagos de unión del manto con el sifón. Contiene una estructura interna cartilaginosa llamada comúnmente pluma, la cual da soporte a los músculos del cuerpo del calamar, está compuesta principalmente de quitina y generalmente se extiende a lo largo del manto (Young, 2009).

Posee además en un extremo dos aletas laterales muy amplias de forma romboidal (Nesis, 1987) mientras que en el extremo opuesto se localiza la cabeza, boca, tentáculos y brazos. Otra característica distintiva de *D. gigas* es la foveola, que es una hendidura que cede espacio al sifón en la porción posterior de la cabeza; y el cartílago de unión del manto con la cabeza presenta una bifurcación en forma de "T" invertida característica de la familia *Ommastrephes* (Moreno-Martínez, 2011).

### **Manejo y procesamiento de calamar gigante**

Los calamares gigantes se venden normalmente en forma de manto congelado o cocido (Luna-Raya y col., 2006). Sin embargo, la congelación y la cocción pueden afectar las propiedades funcionales de las proteínas resultando en cambios en las propiedades reológicas (Ando y col., 1999; Badii y Howell, 2003; Paredi y col., 2006), que alteran la textura y calidad comestible de los organismos marinos, provocando de esta manera el desperdicio de una importante fuente de proteína

(Paredi y col., 2006). Además durante la congelación o cocción, las proteínas sufren cambios conformacionales que conducen a su agregación, haciendo así el músculo más duro, tenaz y menos succulento (Ando y col., 1999; Badii y Howell, 2003; Paredi y col., 2006). Se ha encontrado que el colágeno, componente principal del tejido conectivo (Foegeding y col. 1996) tiene una estrecha relación con la textura (Tapia-Vasquez y col., 2019).

Cuando el calamar es capturado, un número de cambios significativos ocurren en la carne, lo que resulta en modificaciones en la textura (Ramírez-Olivaz y col., 2004). Aunque, los cambios en la textura se han atribuido principalmente a proteínas miofibrilares, se producen modificaciones también en las proteínas del tejido conectivo, como el colágeno (Kagawa y col., 2002). Estos cambios posteriores a la captura podrían tener implicaciones en el producto final, si está destinado a la elaboración de alimentos, lo que afectaría a la calidad sensorial, química o microbiológica (Salinas y col., 2005). Algunos de los cambios que ocurren durante el manejo post captura del calamar gigante están relacionados con enzimas endógenas. Por esta razón es importante entender el comportamiento de las enzimas que afecten el músculo del calamar (Dublán-García y col., 2006).

### **Composición Proximal del Músculo de Pulpo y Calamar**

La composición química de los organismos marinos puede llegar a presentar diferencias aun entre individuos de la misma especie, ya que depende de una gran variedad de factores tales como el sexo, tamaño, actividad física del espécimen, madurez, incluso el estrés al cual fue sometido durante su captura (Ando y col., 2006). Dichas diferencias por lo general son atribuidas al estado de desarrollo sexual del organismo, así como a las condiciones de alimentación (Dunajski, 1980). También es sabido que se pueden presentar estas diferencias dependiendo de la localización y del tipo de músculo en el organismo. Así es el caso de los cefalópodos como el calamar gigante y el pulpo, en donde es posible encontrar diferencias en el contenido de colágeno entre el manto y los brazos (Torres-Arreola y col., 2008).

El pulpo (*O. vulgaris*) y el calamar gigante (*D. gigas*) pueden ser calificados como un alimento de alto valor nutritivo debido a que su carne presenta un contenido alto de proteína y bajo en lípidos. La composición química proximal del músculo de pulpo (*O. vulgaris*) se ha reportado en intervalos de 79.65 – 80.25 % de humedad, obteniéndose una muestra seca de 19.75 – 20.35 %. En esta fracción el porcentaje de proteína representa 75.49 – 76.86 %, lípidos 5.27 – 5.31 % y 8.10 – 8.80 % de ceniza (Schmidt-Hebbel y col., 1990; Cabello y col., 2004). Por otro lado, en la composición química del músculo del calamar gigante existen muchas variaciones de especie a especie, así como también dentro de la misma especie. Estas variaciones en la composición del músculo pueden ocasionar cambios de sabor, color, textura y apariencia (Sikorski, 1990). En general la composición química del manto de calamar y los brazos contiene 75-84 % de humedad, 13-22 % de proteína cruda, 0.1-2.7 % de lípidos y 0.9-1.9 % de minerales (Razcon-Zavala y Tapia-Vasquez, 2015).

Cabe mencionar que la mayoría de los animales marinos, como el pescado, moluscos y crustáceos, son una importante fuente de proteína para el consumo humano (Shahidi, 1994) y del total de proteína, alrededor del 10 – 20 % son proteínas que constituyen mayoritariamente el tejido conectivo (Sikorski y Kołakowska, 1994).

### **Proteínas del Tejido Conectivo**

Las proteínas estromales se localizan en el espacio extracelular y su función es la de dar soporte y mantener al músculo mediante sus componentes: perimysio, endomysio, tendones y epimysio. El tejido conectivo está conformado por diversas fibras (colágeno, elastina), diferentes tipos de células y una sustancia denominada lámina basal (Fennema, 2000). Las proteínas del tejido conectivo son insolubles en agua o soluciones salinas y están conformadas principalmente por: reticulina, elastina y colágeno. La clasificación como proteínas “insolubles” sirve para agrupar y dar un orden a las proteínas musculares. A pesar de esta clasificación pueden ser solubilizadas mediante el uso de soluciones diluidas de NaOH, CH<sub>3</sub>COOH ó HCl

(Shahidi, 1994). Este grupo conforma el tejido conectivo de los tendones y también forman parte de las proteínas de membranas y proteínas insolubles contráctiles como la desmina y conectina (Hultin, 1993). La estabilidad estructural del tejido conectivo es determinada en gran medida por el colágeno, puesto que mantiene unidas a las células y es el que da firmeza, la elastina también ayuda pero en menor grado proporcionando elasticidad para el movimiento. Por lo anterior, se supone al colágeno como uno de los principales determinantes de la firmeza de los productos de origen marino (Badui, 2005).

El músculo de los cefalópodos como el pulpo y el calamar presenta propiedades de textura con un mayor grado de firmeza, debido a la estructura única que adopta su tejido conectivo. Las fibras de tejido conectivo y de tejido muscular de los cefalópodos son más fuertes que las de músculo de pescado (Ramírez-Olivas, 2004). El colágeno es la proteína más abundante de las proteínas estromales y está constituido por distintas fracciones. Por otro lado, en el músculo de pescado las proteínas del tejido conectivo contribuyen hasta un 10 % de la proteína total (Shahidi, 1994), aun así, el contenido de colágeno en organismos marinos es menor en comparación con el contenido de colágeno presente en mamíferos (Sikorski, 1990).

## **Colágeno**

El colágeno es una proteína fibrilar y es el elemento mayoritario del tejido conectivo, así como también la proteína individual más abundante en los organismos, la firmeza del músculo de los animales está relacionada de manera significativa con esta proteína, por esta razón el nombre colágeno deriva del griego “*kolla*” que tiene como significado pegamento. Este componente es muy importante debido a que contribuye de manera significativa a la dureza del músculo. El colágeno se encuentra en gran proporción en los huesos, piel, tendones y alrededor del tejido conectivo que envuelve al músculo. Esta proteína puede alcanzar una proporción de un tercio o más del total de proteínas de un organismo. Otra característica del

colágeno es que durante su desnaturalización se obtiene la gelatina, la cual es utilizada en una gran variedad de productos alimenticios (Purslow, 2002).

En términos generales, una molécula de colágeno está constituida por tres cadenas polipeptídicas que tienen secuencias repetidas en la forma Gly-X-Y a lo largo de su longitud, donde X – Y pueden ser cualquier aminoácido, generalmente prolina e hidroxiprolina (Sikorski y Kołakowska, 1994). La glicina es el aminoácido más abundante del colágeno, alcanzando el 35 % del total de aminoácidos. La glicina al no poseer cadena lateral promueve la característica estructura helicoidal del colágeno. El colágeno aporta muy poco valor nutricional debido a que es escaso en aminoácidos esenciales, pero como se ha mencionado anteriormente afecta significativamente la integridad muscular, la fuerza tensil y las propiedades reológicas del músculo (Alberts y col., 1990). Las cadenas peptídicas del colágeno son casi todas helicoidales con excepción de unos pocos residuos en los extremos. Sin embargo, las hélices difieren de la alfa hélice típica debido a la abundancia de hidroxiprolina y prolina que interfieren con la estructura alfa helicoidal dando una mayor estabilidad.

### **Fibras de colágeno**

Se sabe que el colágeno puede presentarse de distintas maneras y que es una familia de moléculas que tienen una conformación similar. Sin embargo, todos los tipos de colágeno están formados por una triple hélice en su estructura. En la actualidad se han obtenido 23 tipos diferentes de colágeno, codificado por distintos genes, estos colágenos se diferencian en su ensamblado, longitud de hélice y tamaño de porciones no helicoidales. Los tipos de colágeno de mayor importancia en el músculo de productos marinos son el tipo I, III y V, estos están caracterizados por ser moléculas de colágeno que se unen extremo a extremo y adyacentemente para formar las fibras de colágeno (Exposito y col., 2002).

Las fibras de colágeno a veces se encuentran organizadas en paralelo para conseguir gran fuerza, como en los tendones, o pueden estar altamente ramificadas y desordenadas como en la piel. Las moléculas de colágeno están unidas entre sí

por enlaces covalentes cruzados formando las fibras de colágeno. Hay varios tipos de entrecruzamiento en el colágeno de pescado maduro (Bracho y Haard, 1990). Siendo estos entrecruzamientos los responsables de la estabilidad, la fuerza física y las propiedades funcionales del tejido conectivo. Uno de estos entrecruzamientos lo constituye la molécula piridinolina (Pyr) (Fujimoto y col., 1977). El contenido de Pyr en el colágeno influye en sus propiedades físicas (Horgan y col., 1990; Smith y Judge, 1991; Young y col., 1994). La formación de esta da origen a enlaces intermoleculares, los cuales se forman por la acción de la LOX, la cual ocasiona la deaminación oxidativa de los residuos peptídicos de lisina (Lys) e hidroxilisina (Hyl) (Gallop y col., 1972). Los aldehídos que se producen por la acción de la LOX después se condensan entre sí (por una reacción espontánea con otros grupos amino Lys e Hyl).

Por último, se explicará el comportamiento de las fibras de colágeno a medida que los cefalópodos envejecen, los enlaces cruzados de colágeno se convierten de la forma reducible a una forma no reducible más estable (Horgan y col., 1990). Aunque se supone que estos enlaces no reducibles engloben diversos grupos funcionales en una extensa red polimérica, los enlaces cruzados intermoleculares se confinan a las regiones donde se encuentra la lisina aldehído de los telopeptido de una cadena helicoidal de colágeno y la hidroxilisina de la región helicoidal de una cadena adyacente (Young y col., 1994). Esto explica por qué la carne de los animales viejos es más dura que la de los animales jóvenes, a pesar de que los músculos de los animales más jóvenes generalmente contienen más colágeno. A medida que aumentan los enlaces cruzados del colágeno, éste se hace menos soluble en diversos disolventes, como disoluciones salinas y ácidas (Hultin y col., 1993). Sin embargo, los aldehídos de Lys e Hyl no son los únicos responsables de la estabilidad de las fibras de colágeno, ya que la formación de éstos depende de la LOX, la cual, en mayor o menor, medida le confiere estabilidad al colágeno, a través del entrecruzamiento del colágeno a través de las piridinolinas (Torres-Arreola y col., 2008; Ramírez-Guerra y col., 2015b; Tapia-Vasquez y col., 2019).

## Piridinolinas y Pirroles

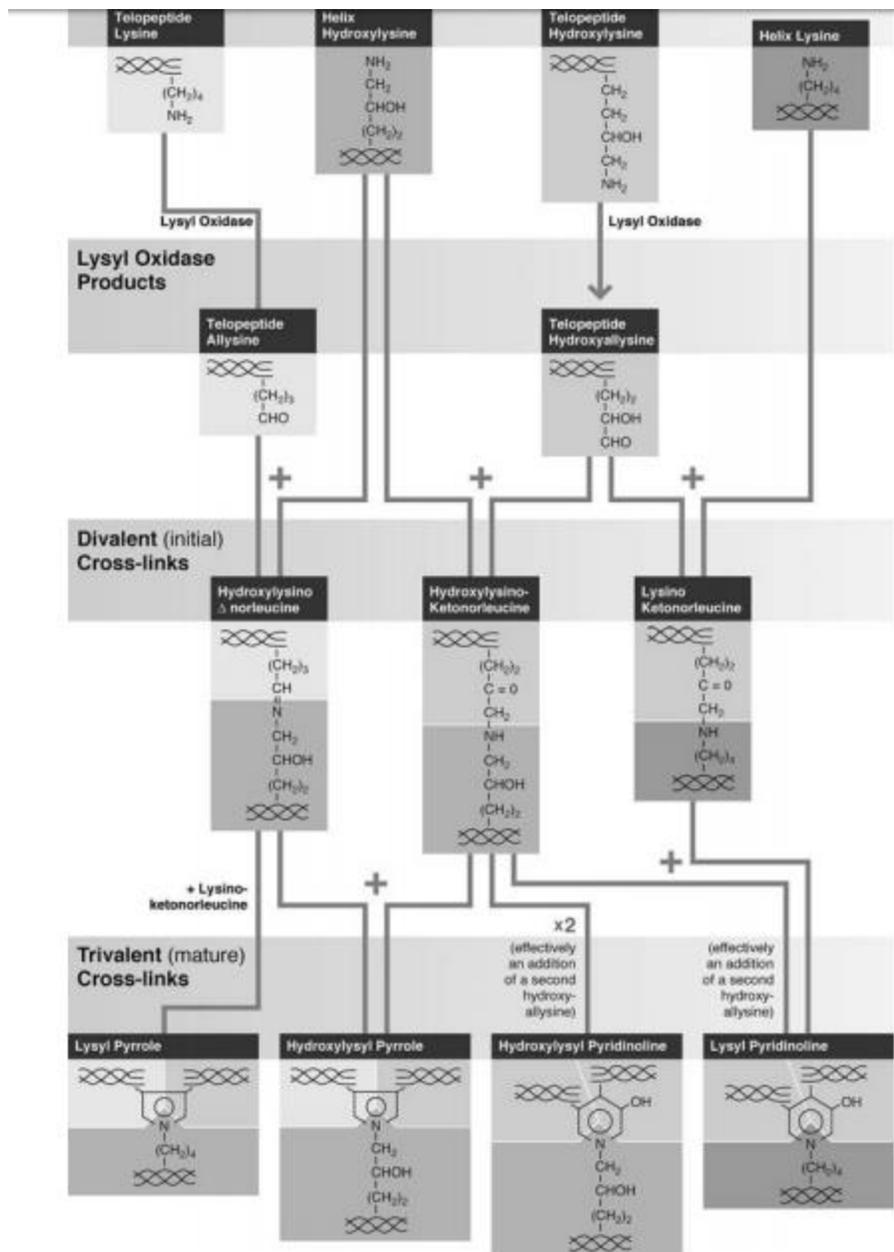
El grupo de moléculas denominadas comúnmente como piridinolinas son unas de las principales responsables de los entrecruzamientos de las fibras de colágeno maduro (Eyre y Wu, 2005). Estas han sido reportadas en el colágeno presente en hueso, ligamentos, tendones, cartílago articular (Fujimoto, 1977; Eyre, 1987) y más recientemente, en músculo de organismos marinos como salmón (*Salmo salar L.*), pargo rojo (*Pagrus major*), jurel (*Seriola quinqueradiata*), calamar gigante (*D. gigas*) y pulpo (*O. vulgaris*) (Ando y col., 2006; Li y col., 2005; Ramírez-Guerra y col., 2015a; Tapia-Vasquez y col., 2019). Dentro de este grupo de moléculas se conocen 4 tipos distintos, los cuales son, lisil piridinolina (L-Pyr), hidroxilisil piridinolina (HL-Pyr), lisil pirrol (L-Prr) y hidroxilisil pirrol (HL-Prr). Cada una de las moléculas presenta una estructura distinta, L-Pyr y HL-Pyr, presentan dentro de su estructura un anillo cíclico hexagonal, mientras que L-Prr y HL-Prr tienen un anillo aromático cíclico pentagonal. Por otro lado, L-Pyr y L-Prr carecen del grupo alcohol que presentan HL-Pyr y HL-Prr. La formación de cada una de estas moléculas se relaciona con el origen de los aminoácidos presentes en las fibras de colágeno y durante su madurez. En ciencia y tecnología de alimentos, la concentración de Pyr en el músculo podría llegar a ser utilizado como un indicador de la textura de alimentos de origen marino (Ramírez-Guerra y col., 2015a; Tapia-Vasquez y col., 2019). Sin embargo, en la actualidad se desconoce el tipo de Pyr que se encuentre presente en el músculo del pulpo.

### Síntesis de piridinolinas y pirroles

La síntesis de Pyr y pirroles (Prr) se inicia por la desaminación enzimática oxidativa de grupos aminos, específicamente de la Lys e Hyl por acción de la enzima LOX (Gallop y col., 1972). Los aldehídos que se producen luego se condensan espontáneamente con grupos amino sobre los residuos peptídicos específicos de Lys e Hyl para formar enlaces cruzados intermoleculares disfuncionales reducibles (Shapiro y col., 1979; Eyre, 1987), formando la estructura con el anillo cíclico característico que tiene la capacidad de entrecruzar hasta 3 moléculas de colágeno.

Se han reportado dos vías comunes para la formación de Pyr y Prr, lisina aldehído frente a hidroxilisina aldehído-iniciada, vías que aparecen generalmente en tejidos conectivos poco entrecruzados y mayor entrecruzados, respectivamente (Eyre y Wu, 2005). En detalle, las vías son más complejas, con elementos de ambas rutas y ambos precursores aldehídos combinados en algunos tejidos específicos (Hanson y Eyre, 1996).

Históricamente, las vías de formación de las Pyr (Figura 5), han sido estudiadas a través de la fluorescencia natural de los enlaces cruzados que permitió aislar péptidos y determinar sus sitios de origen moleculares (Eyre y col., 1987; Kuboki y col., 1993). Para determinar el origen de las vías es necesario poder obtener las fracciones de colágeno solubilizadas para poder determinar los residuos peptídicos (lisina y/o hidroxilisina) (Bornstein, 2004).



**Figura 5.** Resumen de las vías de síntesis de piridinolinas.

Fuente: Eyre y Wu, 2005. [Top Curr Chem (2005) 247: 209. Collagen cross-links].

## **HIPÓTESIS**

En el músculo de los brazos del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) se presenta un mecanismo de entrecruzamiento del colágeno distinto al del pulpo (*Octopus vulgaris*), a su vez, el tipo de piridinolina influye en las características mecánicas y reológicas de las fibras de colágeno.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Identificar y caracterizar los diferentes mecanismos de entrecruzamiento de colágeno presentes en el músculo de pulpo (*Octopus vulgaris*) y calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y relacionarlos con el comportamiento mecánico y reológico de las fibras de colágeno.

### **Objetivos Particulares**

1. Realizar la identificación proteómica del colágeno presente en el músculo de pulpo y calamar gigante.
2. Identificar y caracterizar los mecanismos de entrecruzamiento presentes en el músculo de las especies estudiadas para su comparación.
3. Establecer el efecto del tipo de piridinolina que entrecruza las fibras de colágeno sobre sus propiedades mecánicas y reológicas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de la Materia Prima**

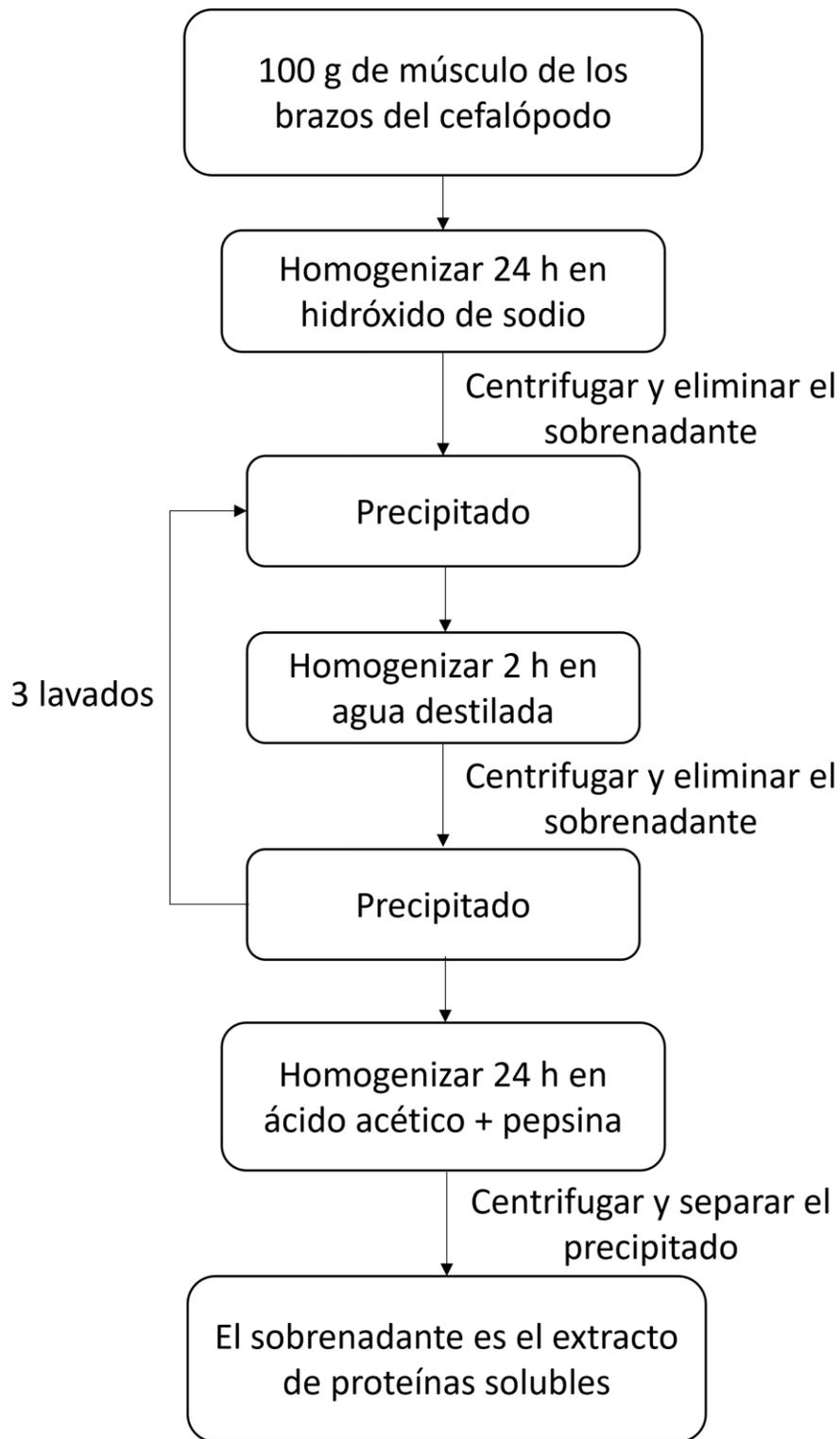
Se utilizaron especímenes de pulpo (*O. vulgaris*) (50 – 60 cm; 2.5 kg) y calamar gigante (*D. gigas*) (50 – 60 cm; 2.5 – 3 kg), los cuales fueron capturados en las costas de Bahía Kino, Sonora (28.48°N, 111.57°W) en los meses de noviembre de 2018 y marzo de 2020. Los organismos se transportaron en hielo al Laboratorio de Productos Marinos del Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos de la Universidad de Sonora en un lapso menor a 4 h. Los brazos de los cefalópodos fueron cortados y despojados de su piel; separados en tres grupos (n = 3) por especie. El análisis histológico se realizó de inmediato y el resto de muestra se guardó en bolsas de polietileno en congelación a – 20 °C.

### **Tinción Tricrómica de Masson**

La tinción tricrómica de Masson se realizó siguiendo la metodología descrita por Tapia-Vasquez y col., 2019. Se colocó músculo de pulpo y calamar gigante en una solución fijadora de Bouin. Se realizó un proceso de deshidratación utilizando concentraciones de alcohol del 70 % al 100 %, utilizando un procesador de tejidos. Los tejidos se fijaron en parafina. Utilizando un microtomo se obtuvieron cortes histológicos de 8.0 µm de espesor. Los tejidos se tiñeron utilizando la tinción tricrómica de Masson. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio (LEICA DM 1000 Moticam Pro 282a) con el objetivo 10X.

### **Extracción de Proteínas Solubles en Ácido Acético**

La Figura 6 muestra un diagrama general de la extracción. Todo el proceso de extracción se llevó a cabo a 4 °C siguiendo la metodología descrita por Torres-Arreola y col. (2008). El músculo proveniente de la región anatómica analizada (brazos) de pulpo y calamar gigante (100 g) se mezcló y homogenizó en una placa de agitación por 24 h con una solución de hidróxido de sodio 0.4 M, después se centrifugó a 8,500 rpm por 40 min. Se realizaron tres lavados mezclando y



**Figura 6.** Diagrama de flujo general para la obtención del extracto de proteínas solubles en ácido acético de pulpo (*O. vulgaris*) y calamar gigante (*D. gigas*).

homogenizando el precipitado con agua destilada y volviendo a centrifugar a 8,500 rpm por 20 min. Finalmente, el precipitado se mezcló y homogenizó por 24 h con pepsina en ácido acético (10 mg/g de tejido en ácido acético, CH<sub>3</sub>COOH 0.5 M), después se centrifugó a 8,500 rpm por 40 min y el sobrenadante fue liofilizado para los posteriores análisis.

### **Cromatografía de Exclusión Molecular (CEM)**

Se disolvieron 30 mg del extracto de proteína soluble liofilizado en 15 mL de ácido acético. Las proteínas de la muestra se prepararon para ser separadas en función de su tamaño por exclusión molecular utilizando una cromatografía de filtración en gel (CEM). Usando un Columna HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-200 HR, equilibrada con acetato de sodio 50 mM / urea 6 M (pH 4.8), se inyectaron 5 mL de muestra, y se pasaron con un caudal de 0.500 mL min<sup>-1</sup> a través de la columna. Las fracciones 10 – 12 se recolectaron y liofilizaron para posteriores análisis.

### **Cromatografía de Intercambio Iónico (CII)**

Utilizando la fracción obtenida por CEM se prosiguió a utilizar una cromatografía de intercambio catiónico con el método descrito por Sarabia-Sainz y col., 2018a. Las condiciones fueron las siguientes: una columna HiTrap™ CM FF se equilibró con acetato de sodio 50 mM/urea 6 M (pH 4.8). Se usó un gradiente lineal de NaCl 0 a 0.5 M a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La fracción obtenida al alcanzar el 66 % del gradiente con NaCl se recogió y se liofilizó para posteriores análisis.

### **Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida**

El análisis electroforético se realizó para la caracterización de las proteínas. Se empleó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) en condiciones desnaturalizantes, basándose en el método de Laemmli (1970). Las fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida al 8 %, inyectando alícuotas de 5 µg de proteína. Los geles se tiñeron con azul de

Coomasie R-250 y se destiñeron en una solución de metanol: agua: ácido acético (5:4:1, v/v/v).

### **Composición de Aminoácidos**

El contenido de aminoácidos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC por sus siglas en inglés) utilizando un sistema de HPLC serie 1200 de Hewlett-Packard (Waldbronn, Alemania) (Vázquez-Ortiz y col., 1997). Brevemente, las muestras se hidrolizaron usando HCl 6 M en un evaporador por 6 horas en tubos sellados a 150 °C. Los hidrolizados se diluyeron con un buffer de borato de sodio 0.4 M; para la determinación de aminoácidos primarios se derivatizaron con o-ftalaldehído (OPA) y para la determinación de aminoácidos secundarios la derivatización se llevó a cabo con 9-fluorenilmetil cloroformiato (Fmoc). Se registraron los cromatogramas y las integraciones se calcularon utilizando un software ChemStation (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.). La emisión de fluorescencia se controló continuamente a una onda de excitación 330 y de emisión de 418 nm.

### **Digestión en Gel y Análisis de Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS / MS)**

Las bandas de proteínas se escindieron de los geles, se redujeron con DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 25 mM, seguido de alquilación de proteínas con yodoacetamida 55 mM. La digestión de proteínas se llevó a cabo durante toda la noche a 37 ° C con tripsina de grado MS. La separación de péptidos se realizó por LC con un sistema UPAC nanoACQUITY (Waters, Milford, MA, EE. UU.). El análisis LC-MS/MS se realizó en un SYNAPT HDMS Q-TOF (Waters) (Huerta-Ocampo y col., 2014) con una breve modificación: se recopilaron datos masivos precisos en un modo de adquisición dependiente de datos (DDA) alternativo. En el modo de baja energía, los datos se recolectaron a una energía de colisión constante de 3 eV. En el modo de energía elevada, la energía de colisión aumentó de 15 a 45 eV durante 3 s de integración.

## Identificación Proteómica

Se realizaron búsquedas en las bases de datos de espectros MS/MS en una base de datos interna que contiene el subconjunto *Cephalopoda* de la base de datos de proteínas NCBI nr (103,215 secuencias, enero de 2020) utilizando el software PEAKS Studio v8.0 (Bioinformatics Solutions Inc. Ontario CAN). Se utilizó tripsina como la proteasa específica, y se permitió una escisión perdida. La carbamidometil cisteína se estableció como una modificación fija, mientras que la oxidación de metionina y la hidroxiprolina se especificaron como modificaciones variables. Las tolerancias de masa de iones precursores y fragmentos se fijaron en 20 ppm y 0.05 Da, respectivamente. Los puntajes de proteína significativos ( $> 32$ ) indicaron identificaciones exitosas a una tasa de descubrimiento falso  $< 0.01\%$ .

## Calorimetría Diferencial de Barrido

El comportamiento térmico de las proteínas extraídas del músculo de los brazos de pulpo y calamar gigante se analizó por medio de calorimetría de barrido diferencial de 10 a 150 °C a una velocidad de 10 °C por min. La temperatura de transición y entalpía fueron medidas usando un sistema de análisis térmico 1020 serie DSC7 (Perkin Elmer, Norwalk, CN). La evaluación de las señales se realizó con una computadora utilizando un equipo Perkin Elmer Nelson modelo 1022. Las muestras (20-30 mg) se colocaron en cápsulas herméticas CDB (Perkin Elmer no. 0319-0218) y la prueba se realizó con un flujo de calor de 10 °C/min. Una cápsula vacía se utilizó como referencia (Ramírez-Olivas y col., 2004).

## Propiedades Viscoelásticas

Se prepararon soluciones con el extracto de proteína soluble de los brazos de pulpo (*O. vulgaris*) y calamar gigante (*D. gigas*) disolviendo 18 mg de muestra en 18 mL de agua destilada. Se clasificó el fluido y su comportamiento reológico mediante un reómetro (Anton Paar, modelo MCR102, USA). Se utilizó una celda de cilindros concéntricos aplicando rangos de velocidad de corte de 100 hasta 400 s<sup>-1</sup>. Se obtuvieron 150 mediciones.

## **Espectrometría Fluorométrica**

Los datos de fluorescencia se recogieron de la solución de proteína del extracto inicial con ácido acético utilizando un fluorómetro Perkin Elmer LS50-B. La preparación de la muestra fue colocar 1 mg de colágeno en 5 mL de solución 1 M de ácido acético. Posteriormente se tomó una alícuota de 500  $\mu$ L y se aforó a 1 mL con una solución de ácido acético 1 M. La muestra se midió en un soporte de celda termocontrolado a 25 °C. Las longitudes de onda de excitación variaron de 200 a 380 nm, mientras que la emisión de fluorescencia se recogió desde 15 nm por encima de la longitud de onda de excitación hasta 700 nm.

## **Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Los espectros de RMN se obtuvieron usando un Espectrómetro Magnético Nuclear Bruker Avance 400 (Billerica, MA, EE.UU.) operado a 400 MHz. Para llevar a cabo las determinaciones se utilizó 1 mg de proteína liofilizada, se disolvió en 0.5 mL de hidróxido de potasio deuterado al 1% (v / v) (KOD) y ácido clorhídrico (HCl) 6 M. El ácido sulfónico dimetilsilapentano (DSS) se utilizó como referencia. La ventana espectral fue de 20 ppm y las lecturas de RMN se realizaron a  $24 \pm 1$  °C.

## **Análisis Estadístico**

El diseño estadístico del presente estudio fue planeado para reducir la variación entre réplicas. Los resultados del contenido de colágeno, perfil de aminoácidos, contenido de Pyr y perfil térmico fueron determinados del promedio de tres repeticiones. Los datos fueron evaluados usando un análisis de varianza (ANDEVA) con comparación de medias de Tukey donde las diferencias significativas fueron establecidas a  $p < 0.05$ . Finalmente, los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico JMP versión 5.0 (StatSoft, Tulsa, OK).

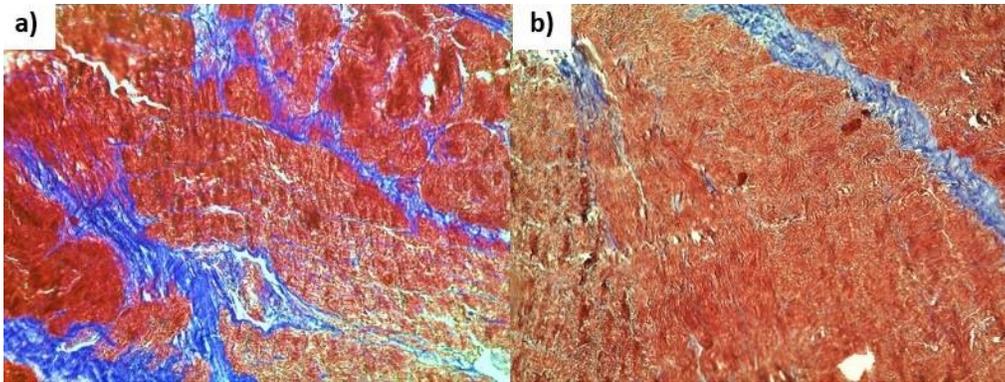
## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Análisis Histológico del Músculo

La visualización de la distribución de las fibras de colágeno en los cefalópodos evaluados se logró mediante la tinción tricrómica de Masson, que tiñe de rojo las proteínas miofibrilares y el tejido conectivo (principalmente colágeno) de azul (Prophet y col., 1992). El análisis histológico mostró un mayor contenido de colágeno en el músculo de los brazos de pulpo en comparación con el de calamar gigante (Figura 7).

Las fibras de colágeno en el músculo de los brazos de calamar gigante se han detectado en menor proporción en comparación con el pulpo, sin embargo, es más alto que en otros organismos marinos, como por ejemplo en elasmobranquios *Squatina guggenheim* y *S. occulta* (Schäfer y col., 2012). Por otro lado, es posible observar que las fibras en el músculo de los brazos de pulpo mostraron más contacto entre ellas, debido a un grado de colágeno más entrecruzado o la existencia de diferentes tipos de colágeno entre cada organismo. Mientras que las fibras teñidas del músculo de los brazos de calamar gigante siguen un arreglo mejor definido (las fibras corren paralelamente unas de otras a través de los campos de visión) (Tapia-Vasquez y col., 2019; Torres-Arreola y col., 2018).

Según los resultados obtenidos en esta investigación, en el músculo de los brazos de pulpo se encuentra mayoritariamente colágeno que no puede ser solubilizado con pepsina y ácido acético; esto probablemente debido a un alto grado de entrecruzamiento de colágeno. Por otro lado, las fibras de colágeno teñidas en el músculo de calamar gigante si pudieron solubilizarse en pepsina y ácido acético; y según la identificación proteómica dieron identidad a colágeno tipo II de *Sepia pharaonis*.



**Figura 7.** Análisis histológico. a) Imagen objetivo 10X del músculo pulpo (*O. vulgaris*). b) Imagen objetivo 10X del músculo calamar gigante (*D. gigas*).

## Rendimientos de Extracción

Los rendimientos de extracción de las fracciones de proteína soluble e insoluble del músculo de los brazos pulpo y calamar gigante se muestran en la Tabla 1. El colágeno de los cefalópodos es obtenido utilizando ácido acético con la adición de pepsina para incrementar la solubilidad del colágeno. Esta enzima incrementa la solubilidad del colágeno por encima del 50% (Nagai y col., 2002). El incremento de la solubilidad al adicionar pepsina puede observarse en los resultados reportados por los siguientes autores: Nagai y col. (2002) observaron un incremento del 62.9% en los rendimientos de extracción en los brazos de pulpo (*Callistoctopus arakawai*). Mientras que en *S. lycidas* y *O. vulgaris*, los rendimientos de extracción de colágeno soluble con pepsina fueron de un 50% y 80%, respectivamente (Mizuta y col., 2003; Nagai y col., 2001). Finalmente, en *D. gigas*, la solubilidad del colágeno también se vio incrementada al adicionar pepsina (Torres-Arreola y col., 2008). Sin embargo, aun utilizando una extracción con ácido acético y pepsina puede llegar a existir la prevalencia de otras proteínas, tal como la paramiosina de los cefalópodos. La paramiosina es una proteína fibrilar relacionada con el músculo de invertebrados, tiene la función de estabilizar la orientación de la cadena de la miosina. Otra característica de la paramiosina es que tiene la capacidad de unirse al colágeno, esta podría ser una razón por la cual se ha encontrado reportada en trabajos que usan esta misma metodología de extracción (Cortés-Ruiz y col., 2008, Vareltzis y Undeland, 2012 y Edwards y col., 1977).

Por otro lado, la fracción insoluble es el remanente final de las extracciones con ácido de las proteínas miofibrilares, sarcoplasmáticas y estromales. La fracción de proteínas insoluble está estrechamente relacionada con colágeno altamente entrecruzado (Osuna-Amarillas y col., 2017; Ramírez-Guerra y col., 2015b). La fracción insoluble en los cefalópodos varía dependiendo de la región anatómica evaluada; esto podría deberse a las distintas funciones biológicas que desempeñan cada región (Morales y col., 2000; Sarabia-Sainz y col., 2018a). Finalmente, los rendimientos de extracción de la fracción insoluble obtenidos del músculo de los brazos de pulpo y calamar gigante también se muestran en la Tabla 1, no se encontraron diferencias significativas entre cefalópodos ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 1.** Rendimientos de extracción de la proteína soluble en ácido acético con adición de pepsina (% p/p)<sup>1</sup>.

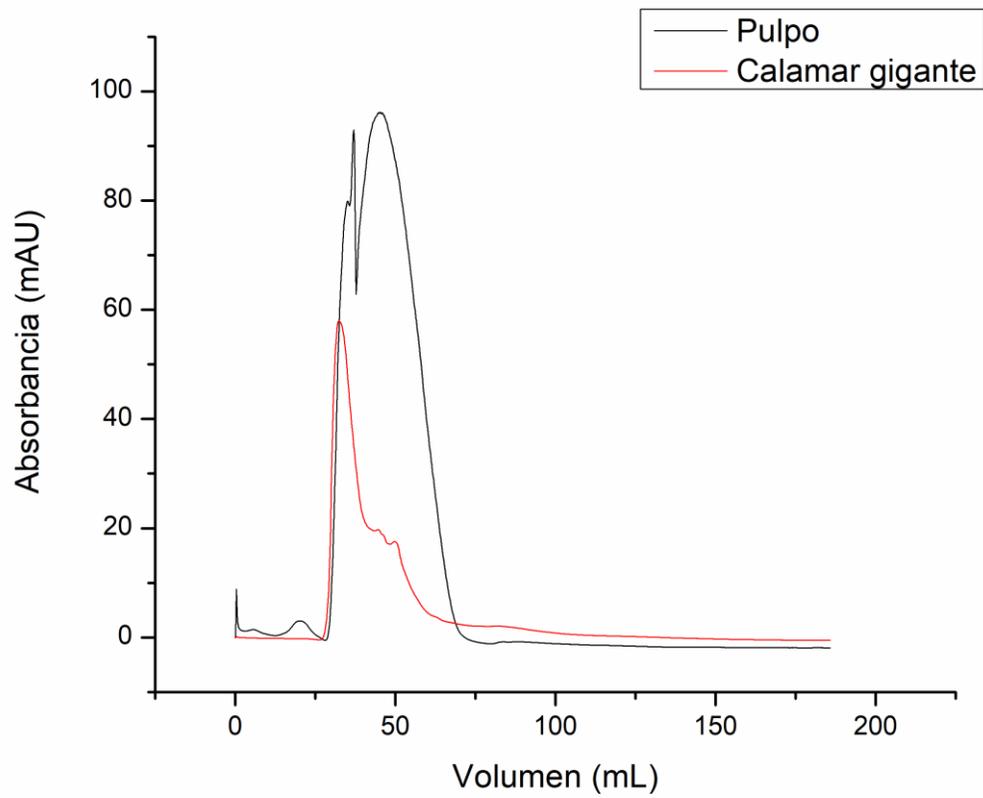
	Proteína soluble	Proteína insoluble
Pulpo ( <i>O. vulgaris</i> )	1.57 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.14 <sup>a</sup>
Calamar gigante ( <i>D. gigas</i> )	2.22 ± 0.34 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.25 <sup>a</sup>

Promedio ± S.D., (n = 3). <sup>1</sup>Porcentajes expresados en g de muestra seca por 100 g de músculo fresco

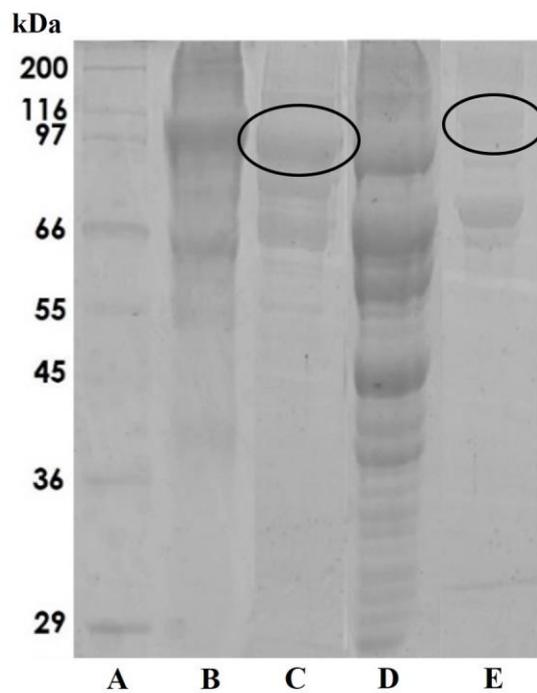
A partir del músculo de los brazos de pulpo (*O. vulgaris*) y calamar gigante (*D. gigas*) y utilizando la metodología descrita para la extracción de proteínas se obtuvieron por cada 100 g de músculo de los brazos: 1.57 g en pulpo y 2.22 g en calamar gigante de proteína soluble; y del remanente de proteína insoluble se encontraron 0.82 g en pulpo y 0.90 g en calamar gigante. Estos resultados son mayores a los reportados para otros organismos marinos como en el caso de del pez gato donde obtuvieron 0.24 g fracción insoluble (Kim y Park, 2004) o la sepia (*S. lycidas*) donde se reportaron 0.2 g de fracción insoluble (Nagai y col., 2001). Las variaciones en los rendimientos de extracción entre organismos marinos pueden atribuirse a modificaciones en la estructura del colágeno, como puede ser la variación en el entrecruzamiento de la estructura de la proteína. El cual se ha reportado un mayor grado de entrecruzamiento en pulpo y calamar gigante posiblemente debido a la fisiología del músculo de los brazos los cuales necesitan de mayor fuerza para atrapar a sus presas (Tapia-Vasquez y col., 2019). De cualquier forma, los rendimientos de extracción de colágeno a partir de cefalópodos siguen siendo mayores a los de otras especies marinas, como desechos de pescado (escamas, huesos, entre otros) (Nagai y col., 2002). Los rendimientos de extracción y las propiedades fisicoquímicas de estos organismos los mantiene como una alternativa para la obtención de colágeno a partir de fuentes de origen marino.

### **Análisis del Cromatograma CEM**

Se inició un proceso para la purificación del colágeno a partir del extracto crudo inicial del pulpo y el calamar gigante utilizando como primer paso una cromatografía de exclusión molecular. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 8. La eficiencia del proceso de purificación se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 9). Las moléculas de colágeno consisten en tres cadenas polipeptídicas de cadenas- $\alpha$ , aproximadamente de 100 kDa cada una (Badii y Howell, 2003). En cefalópodos como el pulpo y el calamar gigante, es común extraer cadenas - $\beta$  (dos cadenas- $\alpha$  unidas por enlaces covalentes) o cadenas- $\gamma$  (tres cadenas- $\alpha$  unidas a través de enlaces covalentes) debido a su alto grado de entrecruzamientos intramoleculares (Sarabia-Sainz y col., 2017); estos enlaces se pueden formar pre- o poscaptura (Osuna-Amarillas y col., 2017; Ramírez-Guerra y col., 2015b).



**Figura 8.** Cromatograma obtenido de la cromatografía de exclusión molecular (CEM) de las proteínas extraídas de pulpo (*O. vulgaris*) y calamar gigante (*D. gigas*).



**Figura 9.** SDS-PAGE de las proteínas extraídas de pulpo y calamar gigante. Donde: A = marcador de peso molecular, B = extracto crudo de proteínas de pulpo, C = colágeno de pulpo, D = extracto crudo de proteínas de calamar gigante y E = colágeno de calamar gigante.

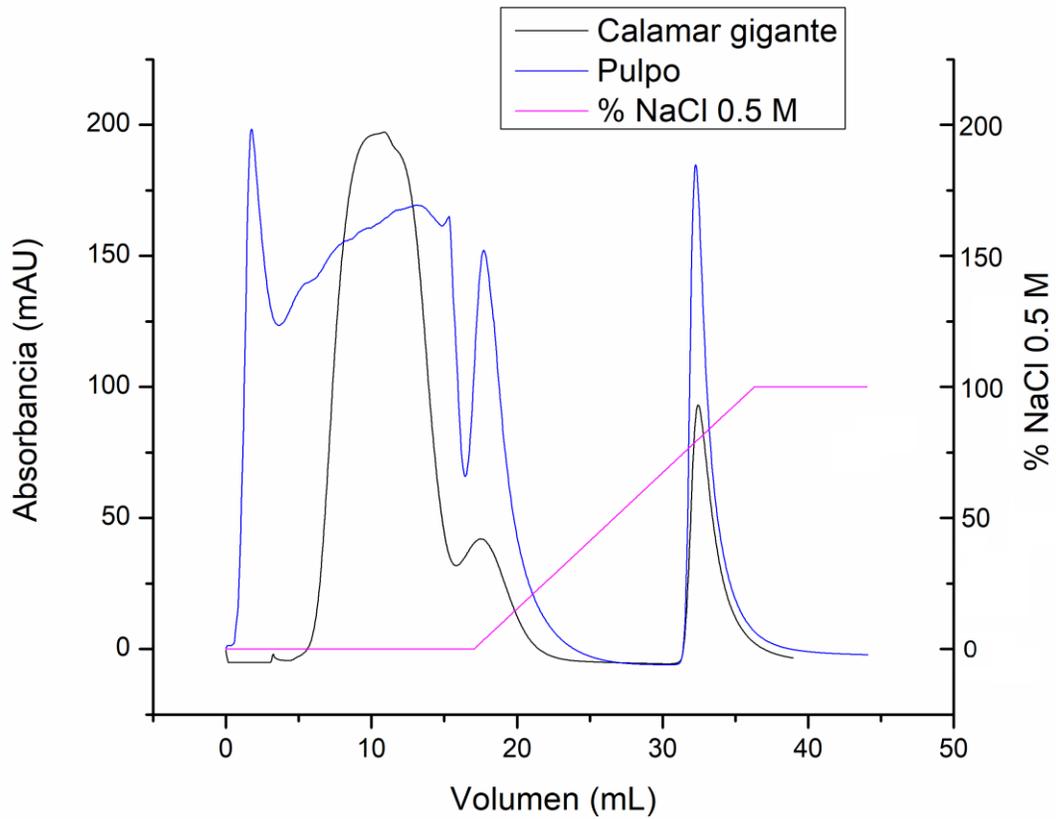
Después de la CEM, se encontró una disminución en las bandas del extracto crudo inicial. El perfil electroforético muestra bandas en la parte superior del gel, principalmente alrededor de 205 - 97 kDa tanto en pulpo como en calamar gigante. Se ha reportado la presencia de colágeno con bandas ligeramente por debajo de los 116 kDa en distintos cefalópodos (Ezquerro-Brauer y col., 2018; Tapia-Vasquez y col., 2019).

Por otro lado, la paramiosina está compuesta por dos subunidades de cadenas helicoidales que tienen un peso molecular de alrededor de 97 kDa (peso molecular parecido al del colágeno). Las bandas observadas en el extracto de pulpo en la Figura 8 a la altura de los 100 kDa pueden estar relacionadas con esta proteína miofibrilar de alto peso molecular, la cuál ha sido reportada por Cortés-Ruiz y col. (2008) en calamar gigante, los cuales también utilizaron una extracción ácida. Además, la paramiosina además de las funciones musculares tiene la capacidad de unirse al colágeno (Zhao y col., 2007; Ferrer y col., 2003; Ferreira y col., 2002). Este podría ser un motivo por el cual en este trabajo se identificó paramiosina en la identificación proteómica en el extracto de pulpo.

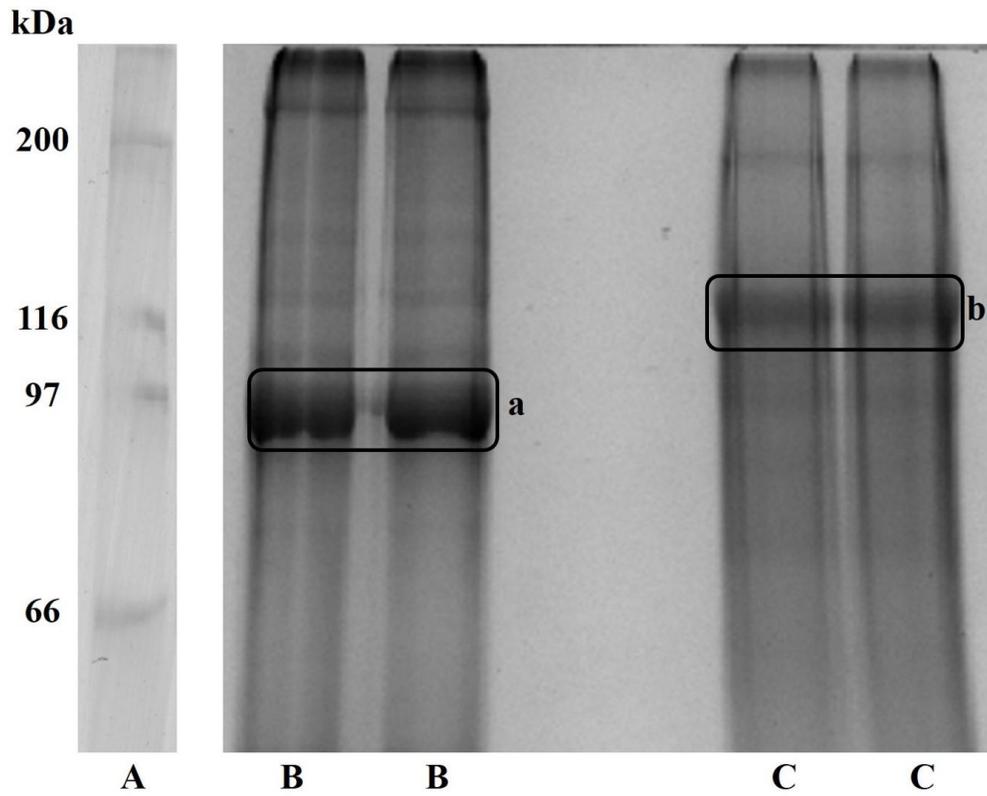
Finalmente, también se pueden encontrar bandas alrededor de los 66 kDa. Estas bandas pueden atribuirse a la elastina, que también es una proteína del tejido conectivo y puede encontrarse unida junto al colágeno (Badui, 2006). Esta proteína no se logró separar del colágeno utilizando la CEM.

## **Análisis del Cromatograma CII**

El proceso de purificación continuó con la aplicación de una cromatografía de intercambio catiónico a las fracciones 10 – 12 obtenidas de a partir de la CEM (Figura 10). El perfil electroforético mostró la eliminación de las bandas superiores a los 100 kDa que se atribuyeron a las cadenas  $\beta$  del colágeno (Figura 11). También se muestra la eliminación de las bandas cercanas a los 66 kDa atribuidas a la elastina. Por otro lado, se encontraron diferencias aparentes en el perfil de las bandas de obtenidas entre organismos. El pulpo mostró una única banda bien definida, mientras que el calamar gigante mostró dos bandas que pueden atribuirse a la cadena  $\alpha_1$  y cadena  $\alpha_2$ .



**Figura 10.** Cromatograma obtenido de la cromatografía de intercambio iónico (CII) de las proteínas extraídas de pulpo (*O. vulgaris*) y calamar gigante (*D. gigas*).



**Figura 11.** SDS-PAGE de las proteínas extraídas de pulpo y calamar gigante. Donde: A = marcador de peso molecular, B = paramiosina de pulpo, C = colágeno de calamar gigante, a = banda para identificación proteómica de pulpo y b = banda para identificación proteómica de calamar gigante.

Se ha informado que algunos colágenos como el tipo I presentan dos cadenas  $[\alpha_1 (I)]^2$  y  $\alpha_2 (I)$ , el tipo II  $[\alpha_1 (II)]^2$  y  $\alpha_2 (II)$  o tipo V  $[\alpha_1 (V)]^2$  y  $\alpha_2 (V)$ . Al realizarse la identificación proteica se encontró que la banda en gel de electroforesis de pulpo era paramiosina y la banda de calamar gigante dio como resultado colágeno tipo II cadena  $\alpha_2$ . Debido al alto grado de entrecruzamiento del colágeno de los brazos del pulpo fue más difícil la extracción de colágeno con la metodología utilizada (Torres-Arreola y col., 2008), este podría ser un motivo por el cual prevaleció la presencia de paramiosina.

### **Perfil de Aminoácidos**

El perfil de aminoácidos del extracto proteico extraído del pulpo y el calamar gigante se resume en la Tabla 2. El perfil aminoacídico del colágeno por lo general muestra altos contenidos de Gly, Pro e Hyp (Gómez-Guillén y col., 2011). La Hyp es el principal indicador de la presencia de colágeno en muestras de origen animal. Además, el contenido del aminoácido Hyp ayuda a diferenciar a los cefalópodos de otros organismos marinos. Una mayor cantidad de este aminoácido se ha reportado en cefalópodos (alrededor de un 8 %) en comparación con peces (alrededor de un 4 %) (Sikorski y Borderias, 1994). El contenido de los iminoácidos totales Pro + Hyp fue de 1.43 % en calamar gigante y 1.03 % en pulpo, las diferencias en los porcentajes sugieren que estos cefalópodos poseen distintos grados de entrecruzamiento de colágeno (Sarabia-Sainz y col., 2018a).

Gly (aminoácido promueve la estructura helicoidal de la triple hélice del colágeno) fue el aminoácido mayoritario en los extractos de este trabajo, alrededor del 20 a 40 % se encuentra en el pulpo y el calamar gigante, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportados anteriormente por otros autores que han trabajado con distintos cefalópodos (Morales y col., 2000; Coelho y col., 2017; Ezquerra-Brauer y col., 2018; Tapia-Vasquez y col., 2019). Por otro lado, Lys e Hyp son otros aminoácidos claves en los entrecruzamientos del colágeno, ya que están relacionados directamente con la formación de la Pyr. Estudios recientes han demostrado que la concentración de Pyr es inversamente proporcional al contenido de Lys (Ezquerra-Brauer y col., 2018; Tapia-Vasquez y col., 2019).

**Tabla 2.** Contenido de aminoácidos (por cada 1000 aminoácidos).

Aminoácido	Pulpo	Calamar gigante
Asp	83	80
Glu	140	86
Ala	87	107
Arg	90	50
Cys	n.d.	n.d.
Phe	23	4
Gly	202	458
His	20	8
Hyp	58	82
Ile	25	4
Leu	43	15
Lys	64	8
Met	1	2
Pro	45	61
Ser	43	28
Thr	22	1
Trp	n.d.	n.d.
Tyr	25	6
Val	30	1

Los valores son el promedio de dos repeticiones ( $n = 3$ ), con desviaciones estándar inferiores al 5%.

n.d.: no determinado.

## Identificación Proteómica

La identificación de proteínas de las bandas predominantes de pulpo y calamar gigante se presenta en la Tabla 3. La proteína aislada de pulpo se identificó con una homología para paramiosina de calamar gigante *D. gigas*. Se encontró en el extracto de los brazos de pulpo una alta concentración de ácido glutámico (14 %). Asimismo, se presentó una transición endotérmica a los 56 °C al momento de analizar los resultados de la calorimetría diferencial de barrido del extracto de los brazos de pulpo, lo cual podría confirmar la presencia y desnaturalización de la paramiosina (Tolano-Villaverde y col., 2018). La prevalencia de esta proteína en los brazos de *O. vulgaris* es interesante, ya que las condiciones de extracción (Torres-Arreola y col., 2008) se han realizado para la obtención de colágeno. Esto sugiere que el pulpo tiene una paramiosina altamente insoluble, que aún permanece en una extracción ácida. A diferencia de la paramiosina de otros moluscos como *D. gigas* o *Mytilus edulis* la cual se ha reportado soluble en condiciones ácidas (Cortés-Ruiz y col., 2008; Vareltzis y Undeland, 2012). Así como existe la posibilidad de que la paramiosina se encuentre unida al colágeno como se ha reportado anteriormente (Zhao y col., 2007; Ferrer y col., 2003; Ferreira y col., 2002). Sin embargo, existe poca información de la unión paramiosina-colágeno.

Por otro lado, la proteína aislada en el calamar gigante se identificó como la cadena  $\alpha_2$  de colágeno tipo II de *S. pharaonis* con coincidencia en tres péptidos. Esto corresponde con el alto contenido de Gly y Hyp en el calamar gigante en comparación con el pulpo en el perfil de aminoácidos (Ramírez-Guerra y col., 2015a; Sarabia-Sainz y col., 2018a). Asimismo, la presencia de la transición endotérmica por encima de los 100 °C indicaría la presencia de colágeno altamente entrecruzado (Ezquerro-Brauer y col., 2018; Torres-Arreola y col., 2008). El colágeno tipo II (como el que se identificó en calamar gigante) está generalmente relacionado con los tejidos del cartílago, estos resultados pueden sugerir que el calamar gigante presenta un colágeno distinto al que se reporta usualmente en otros organismos marinos (colágeno tipo V).

**Tabla 3.** Proteínas identificadas en pulpo y calamar gigante por LC-MS/MS y análisis informáticos.

<b>Organismo</b>	<b>Proteína obtenida</b>	<b>Número de acceso<sup>1</sup></b>	<b>Mr Experimental<sup>2</sup></b>	<b>Mr Teórica/PI<sup>3</sup></b>	<b>Cobertura<sup>4</sup> (%)</b>	<b>Score<sup>5</sup></b>	<b>Peptidos</b>
Pulpo	Paramyosin ( <i>Dosidicus gigas</i> )	BAX90013.1	97	102/5.52	31	418.94	20
Calamar	ColAb, collagen alpha 2 (II) ( <i>Sepia pharaonis</i> )	ALM01448.1	116	128/5.64	4	87.47	3

<sup>1</sup>Número de acceso de acuerdo con la base de datos NCBIInr. <sup>2</sup>Masa molecular experimental (kDa). <sup>3</sup>Masa teórica (kDa) y punto isoeléctrico (PI) de las proteínas identificadas de la base de datos NCBIInr. <sup>4</sup>Cobertura de la secuencia de la proteína. <sup>5</sup>Score reportado después de utilizar la base de datos, score >32 indica identidad o amplia homología con p<0.01.

## Resistencia Térmica

Se evaluó la resistencia térmica del extracto de proteínas soluble en ácido acético de los brazos de pulpo y calamar gigante. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el extracto soluble en ácido acético del pulpo y el calamar gigante presentan tres transiciones endotérmicas en el análisis de calorimetría diferencial de barrido (Tabla 4); con temperaturas máximas de  $58.2 \pm 1.5$ ,  $78.44 \pm 2.4$  y  $82.94 \pm 0.01$  °C. Todas las transiciones detectadas por el calorímetro tienen un  $\Delta H$  positivo, lo que significa la ruptura de los enlaces químicos traducidos a la desnaturalización de las proteínas.

El pico de 58 °C podría estar relacionado con cambios conformacionales en el colágeno inmaduro, el cual alcanza su temperatura de desnaturalización alrededor de 78 °C (Arias-Moscoso y col., 2011); a medida que el tejido madura, es posible encontrar fibras de colágeno inmaduras con enlaces cruzados divalentes, las cuales posteriormente se convierten en fibras de colágeno maduras con enlaces cruzados trivalentes por la acción enzimática de la LOX (Kerkhod y col., 2008). Sin embargo, también podría estar relacionado con la desnaturalización de la paramiosina como se informó anteriormente en *D. gigas* (Encinas-Arzate y col., 2014; Tolano-Villaverde y col., 2018). El pico endotérmico a los 80 °C podría estar relacionado con la desnaturalización del colágeno maduro, como se informa en brazos de calamar gigante (Ezquerro-Brauer y col., 2018). Por otro lado, el perfil térmico del calamar gigante muestra un pico endotérmico adicional a 117 °C que se puede atribuir a un colágeno más estable térmicamente, que podría estar relacionado con un mayor grado de entrecruzamiento (Ramírez-Guerra y col., 2015b; Tapia-Vásquez y col., 2019).

Como se puede observar en los resultados del perfil térmico de *D. gigas* la resistencia térmica del colágeno de los cefalópodos es más alta que la presentada por el colágeno de otros organismos marinos (Fu y col., 2008; Jridi y col., 2013; Nagai y col., 2002). Se ha reportado que el colágeno soluble en ácido de *D. gigas* tiene una resistencia térmica con un rango de los 45 – 55 °C (Osuna-Amarillas y

**Table 4.** Perfil térmico de los extractos de pulpo y calamar gigante.

	Pulpo		Calamar gigante	
	Tmax (°C)	$\Delta H$ (J/g)	Tmax (°C)	$\Delta H$ (J/g)
To (56 °C)	59.74 ± 1.50	0.14 ± 0.01	58.20 ± 0.01	0.21 ± 0.05
To (64 °C)	78.44 ± 2.40	0.15 ± 0.02	71.60 ± 0.14	1.25 ± 0.28
To (80 °C)	82.92 ± 0.01	0.16 ± 0.02	82.94 ± 0.01	0.20 ± 0.01
To (117 °C)	n.d.	n.d.	121.75 ± 0.34	0.05 ± 0.01

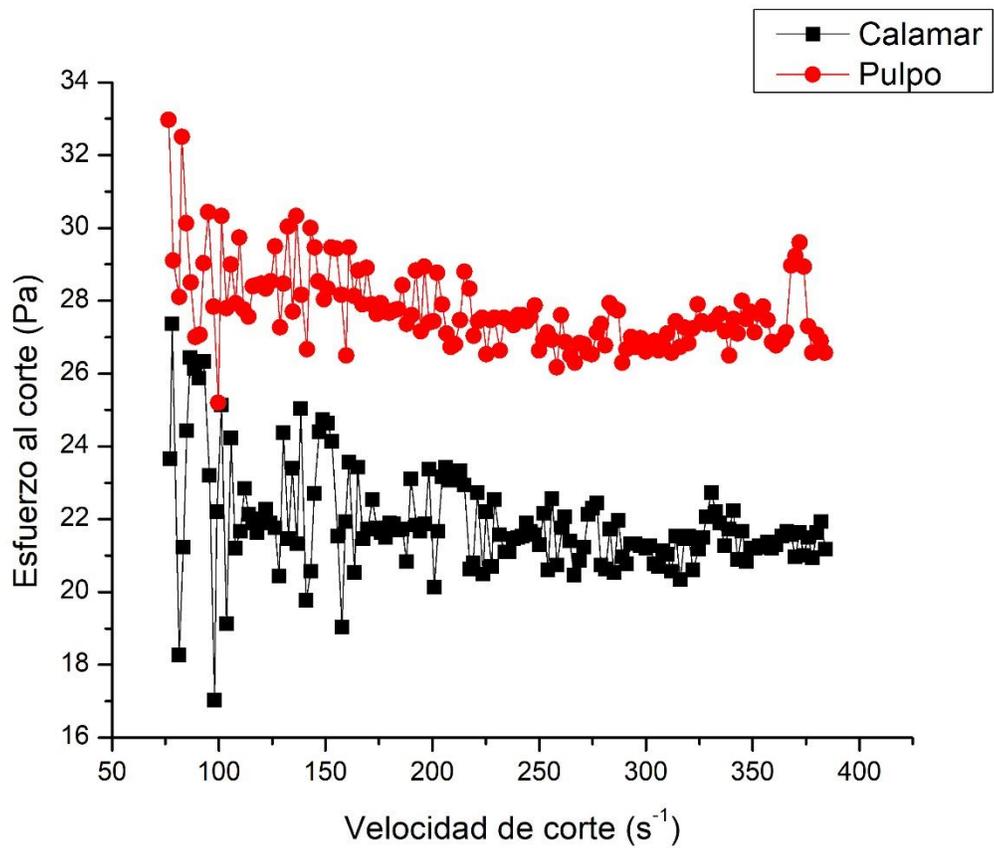
To = Temperatura de inicio; Tmax = Temperatura maxima;  $\Delta H$  = Cambio de entalpía total; n.d. = no detectado. Los valores fueron obtenidos por triplicado  $\pm$  desviación estándar (n = 3).

col., 2017), mientras que la resistencia térmica de la fracción de colágeno insoluble de los brazos puede alcanzar hasta los 120 °C (Ezquerro-Brauer y col., 2018). Estas diferencias pueden estar relacionadas con el grado de entrecruzamiento del colágeno que puede ocurrir después de la captura de los organismos. En otros cefalópodos como en *S. officinalis* y *S. pharaonis*, se han reportado temperaturas de desnaturalización de colágeno de 32 y 59 °C, respectivamente, (Jridi y col., 2013; Thanonkaew y col., 2006). Por otro lado, Coelho y col. (2017) reportaron temperaturas de desnaturalización de 31 °C para colágeno de *Illex argentinus*. Las distintas temperaturas máximas de desnaturalización ( $T_{max}$ , °C) obtenidas en la presente investigación comparadas con las discutidas en esta sección podrían atribuirse a distintos factores, como el reemplazo de proteínas durante el crecimiento de los cefalópodos, ya que la maduración del colágeno en el músculo depende de varios factores tales como la edad y el tamaño de los organismos (Sirkosky y Borderias, 1994).

### **Propiedades Viscoelásticas**

Se evaluaron las propiedades reológicas del extracto de proteína soluble de los brazos de pulpo y calamar gigante. Se analizaron las propiedades de viscosidad a través de gráficas de resistencia al corte (Pa) y viscosidad ( $mPa \cdot s$ ) contra velocidad de corte ( $s^{-1}$ ). Los extractos de proteína soluble de pulpo (*O. vulgaris*) y calamar gigante (*D. gigas*) presentaron el comportamiento de un fluido pseudoplástico. Este tipo de comportamiento reológico es el esperado para colágeno (Fung, 2013). La viscosidad de las soluciones de proteínas es una manifestación de interacciones complejas, que incluyen el tamaño, la forma y las interacciones con el solvente de la proteína, el volumen hidrodinámico y la flexibilidad molecular en el estado hidratado, que resulta mucho más voluminoso que cuando se trata de la proteína no hidratada (Zambrano-Herrera, 2020).

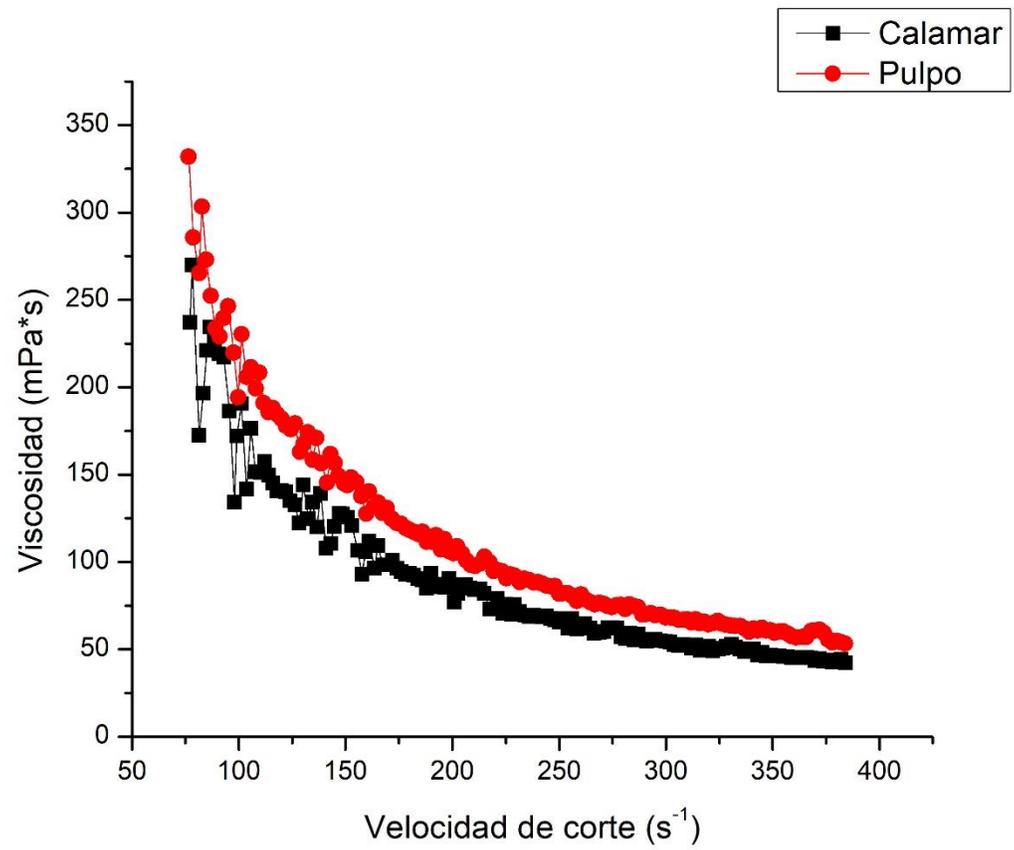
En Figura 12 podemos observar el comportamiento que presentan las proteínas del extracto soluble cuando son sometidas a una fuerza física externa (esfuerzo de corte) a medida que aumenta la velocidad de corte. Podemos observar en el análisis



**Figura 12.** Gráfica de velocidad de corte vs esfuerzo de corte del extracto de proteínas solubles de pulpo (*O. vulgaris*) y calamar gigante (*D. gigas*).

que el extracto de proteína de los brazos de pulpo necesita que se aplique una mayor fuerza física externa ( $33.2 \pm 0.3$  Pa en la primera medición y  $24.9 \pm 0.5$  en la medición 150) en comparación al calamar gigante ( $27.4 \pm 0.4$  Pa en la primera medición y  $21.2 \pm 0.5$  en la medición 150) para su deformación mientras se incrementa la velocidad de corte. Por otro lado, podemos observar como a menor velocidad de corte (alrededor de los  $75 - 225 \text{ s}^{-1}$ ) los valores de esfuerzo al corte tienden a presentar mayor diferencia entre cada medición y conforme la velocidad aumenta la diferencia entre las mediciones de esfuerzo disminuye. Este comportamiento puede ser atribuido a que las proteínas, al ser moléculas de gran tamaño, se irán orientando hacia la dirección del flujo de la solución. La desagregación y el desdoblamiento de la estructura nativa de la proteína, en este caso por el esfuerzo físico ejercido por el reómetro, contribuye a este comportamiento (Zambrano-Herrera, 2020).

La información de la Figura 13 complementa a la anterior, la cual compara velocidad de corte contra viscosidad aparente. Podemos observar el mismo comportamiento en los extractos de proteína soluble de los brazos de pulpo (*O. vulgaris*) y calamar gigante (*D. gigas*), la viscosidad aparente tiende a decrecer conforme aumenta la velocidad de corte. Este comportamiento es representativo de los fluidos pseudoplástico. Shen y col. (2011) reportaron este mismo comportamiento en fibras de colágeno de pepino de mar (*Cucumaria frondosa*). Huang y col., (2018) utilizaron gelatina obtenida a partir de colágeno de “carpa cabezona” (*Hypophthalmichthys nobilis*) y también obtuvieron un comportamiento pseudoplástico. Finalmente, este mismo comportamiento se encontró en el colágeno de piel de la carpa plateada (*H. molitrix*) (Sionkowska y col., 2020). Como se puede observar, es bien sabido que el colágeno presenta un comportamiento pseudoplástico. Sin embargo, los orígenes de esta viscoelasticidad y los mecanismos que llevan a esta proteína a presentar este comportamiento se conocen por completo (Shen y col., 2011).

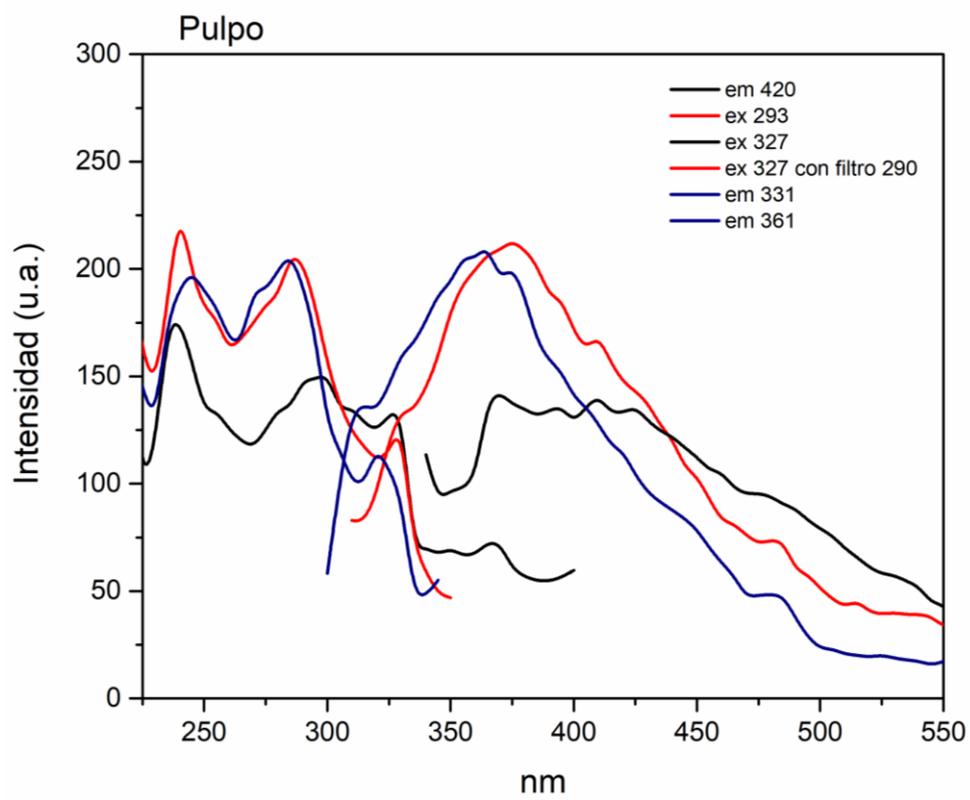


**Figura 13.** Gráfica de velocidad de corte vs viscosidad del extracto de proteínas solubles de pulpo (*O. vulgaris*) y calamar gigante (*D. gigas*).

## Fluorescencia

Se obtuvieron varios espectros para encontrar las diferentes bandas de emisión que pudieran relacionarse con la presencia de Pyr. El anillo aromático que presenta la Pyr en su estructura (piridina), se ha reportado se detecta por espectroscopia de fluorescencia cuando se excita alrededor de 295 nm y se obtiene una emisión alrededor de los 410 nm (Saito y col., 1997; Monticelli y col., 2011). Los espectros de fluorescencia del extracto de proteínas solubles de los brazos de pulpo (*O. vulgaris*) se muestran en la Figura 14. Cuando se excitó a 327 nm el máximo de emisión se observa a 420 nm, esta banda se relaciona con la Pyr. Este mismo comportamiento se reportó para una muestra de colágeno tipo I obtenido de tendones bovinos, mostrando un pico de emisión máximo a los 420 nm (Huang y col., 2019). Por otro lado, en la búsqueda del anillo de piridina en el extracto de proteína soluble de los brazos de pulpo se logró observar una banda de emisión 327 nm cuando se excitó a los 293 nm. Esta banda en el espectro de fluorescencia también fue reportada por Shen y col. (2018) en colágeno tipo I y está relacionada con el anillo aromático del aminoácido Tyr.

Al igual que en la muestra de pulpo, se hicieron mediciones excitando en longitudes de onda desde los 290 nm hasta los 325 nm. En el espectro de fluorescencia del extracto de proteínas solubles de los brazos de calamar gigante (*D. gigas*) (Figura 15) se encontró cuando se excitó a 325 nm la banda de emisión a los 420 nm relacionada con Pyr (Saito y col., 1997). La presencia de Pyr en colágeno de calamar gigante ya se había reportado anteriormente (Sarabia-Sainz y col., 2018b). Adicionalmente, se observaron las bandas relacionadas con los anillos aromáticos de los aminoácidos Tyr y Trp cuando se excitó a 290 y 300 nm y se obtuvo un espectro de emisión a los 383 y 410 nm, respectivamente. Finalmente, en el espectro del calamar gigante podemos observar una posible banda de emisión superior a los 500 nm que no se encuentra en pulpo, esta podría indicar la presencia de otro tipo de molécula entrecruzante de colágeno aun no reportada. La discusión de los resultados de fluorescencia se complementa con los resultados de  $^1\text{H-RMN}$ .



**Figura 14.** Espectros de fluorescencia de las proteínas extraídas de pulpo (*O. vulgaris*).

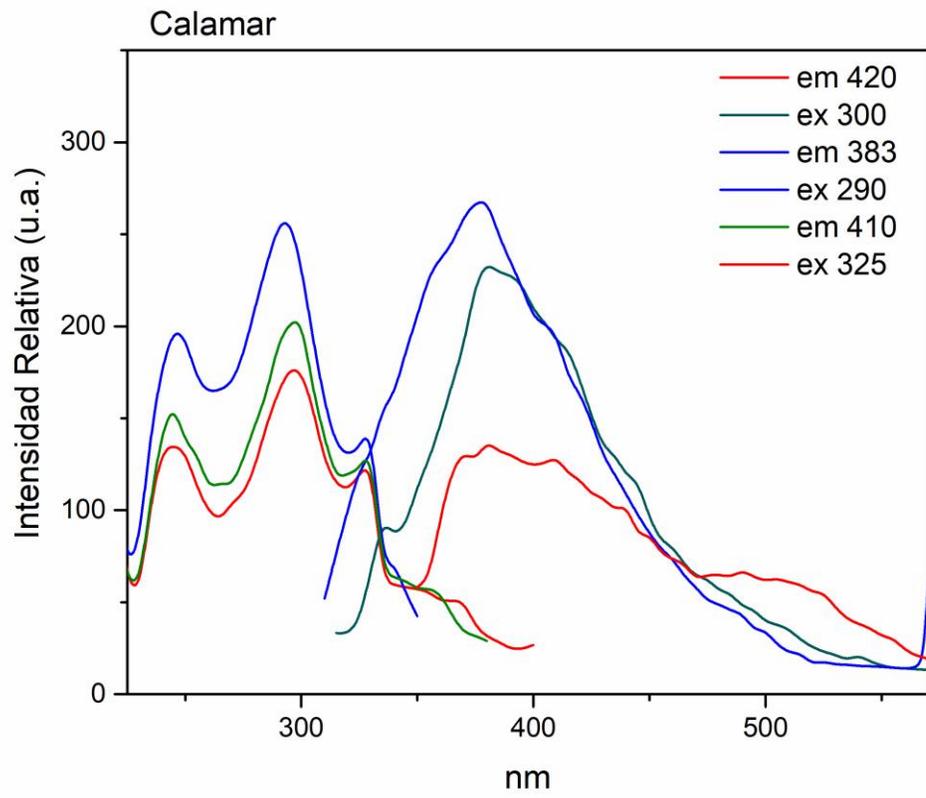
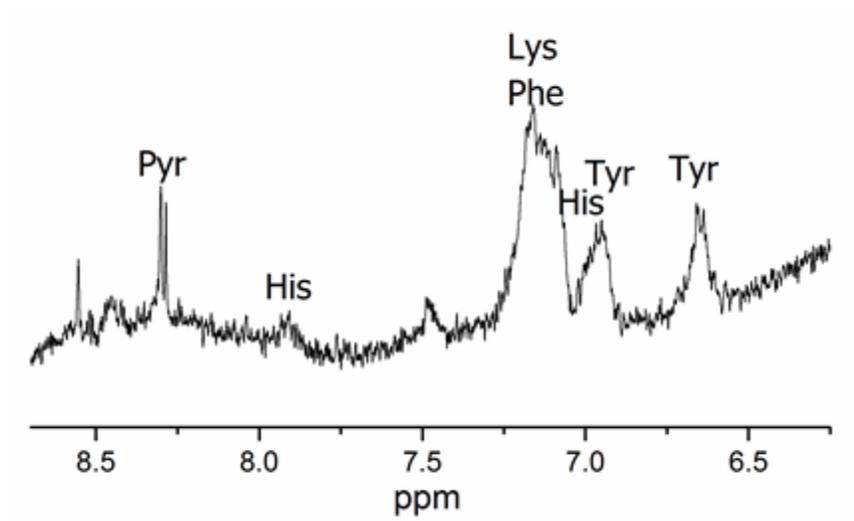


Figura 15. Espectros de fluorescencia de las proteínas extraídas de calamar gigante (*D. gigas*).

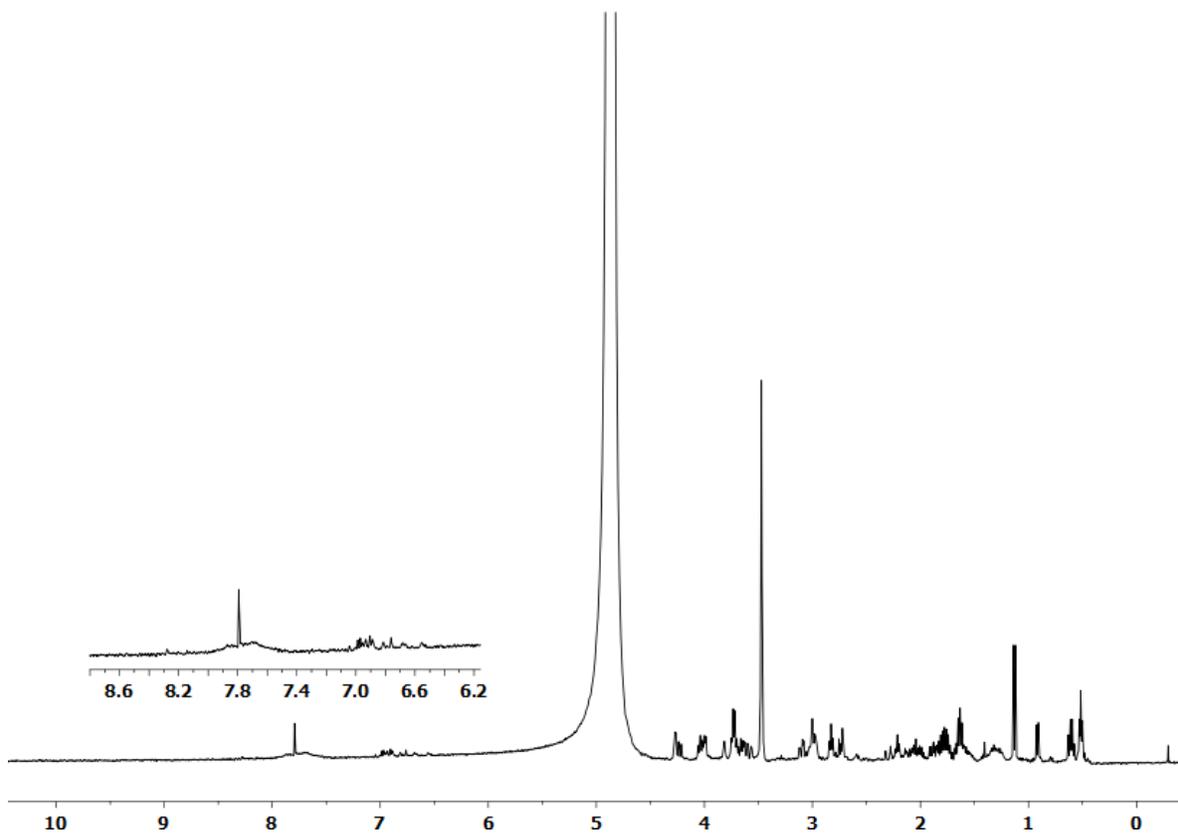
## Análisis de $^1\text{H}$ -RMN

La resonancia magnética nuclear es una técnica que nos permite determinar la posición y los entornos circundantes de los protones de hidrógeno a través de la medición de su frecuencia cuando se aplica la fuerza de un campo magnético. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de la muestra de proteína soluble de los brazos de pulpo (*O. vulgaris*) se muestran en la Figura 16, mientras que los de calamar gigante (*D. gigas*) se muestra en la Figura 17. Las señales asociadas a las moléculas entrecruzantes del colágeno, en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, se encuentran en la región de protones asociados a anillos aromáticos (8.5 a 6.5 ppm) (Sarabia-Sainz y col., 2018b). En los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los extractos de proteína soluble de pulpo y calamar gigante, se pueden observar en la región aromática las señales de tirosina (6.75, 6.85 ppm), histidina (6.90, 7.90 ppm) y phenilalanina (7-7.25 ppm), también se encontró lisina (7.25 ppm). Por otro lado, las señales relacionadas al anillo de la Pyr se encuentran en la región de 8.5 a 8.0 ppm (Robins y col., 1996; Molina-Diaz y col., 2002; Damonte y col., 2021). Esto concuerda con lo observado en el espectro de pulpo, en donde se encontró un singlete centrado a 8.29 ppm, mientras que el espectro de calamar gigante mostró un singlete alrededor de 8.25 ppm. La presencia de estos singletes en  $^1\text{H}$ -RMN y los espectros de fluorescencia, son un indicativo de que la Pyr es la molécula entrecruzante de colágeno en los brazos de pulpo (*O. vulgaris*) y calamar gigante (*D. gigas*).

Por otro lado, se obtuvieron los valores del área bajo la curva de los singletes de Pyr y de Tyr (aminoácido cuantificado en el perfil de aminoácidos), de esta forma conociendo los valores de Tyr en los extractos de proteína soluble se le asignó un valor proporcional a la Pyr. En la muestra de pulpo se encontró que por cada molécula de Pyr existen 2.5 más de Tyr, mientras que en calamar gigante se encontró una relación 1:1 (Pyr:Tyr). Esto sugiere que el extracto de calamar gigante tiene una mayor cantidad de Pyr en comparación con el pulpo, lo cual concuerda con los resultados obtenidos de la identificación proteómica en donde se determinó a la proteína evaluada con homología a colágeno.



**Figura 16.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de las proteínas extraídas de pulpo (*O. vulgaris*).



**Figura 17.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de las proteínas extraídas de pulpo (*O. vulgaris*).

## CONCLUSIONES

Bajo las condiciones planteadas en este estudio y a través de las técnicas espectrométricas de fluorescencia y  $^1\text{H}$ -RMN, se estableció que los brazos de pulpo (*O. vulgaris*) y de calamar gigante (*D. gigas*) presentan la misma molécula entrecruzante de colágeno (piridinolina). Aun cuando se identificó piridinolina en ambos cefalópodos estos presentan diferentes grados de entrecruzamiento del colágeno. Esto se pudo observar en el análisis histológico y en los resultados del perfil térmico, composición de aminoácidos y concentración de piridinolina (determinada a través de la  $^1\text{H}$ -RMN) de los extractos de proteína soluble. Este trabajo de tesis brinda un acercamiento a la naturaleza de los entrecruzamientos de colágeno del músculo de los brazos de *O. vulgaris* y *D. gigas*. Esta información será útil para futuros trabajos relacionados con el colágeno de pulpo y calamar gigante. Sin embargo, aún es necesario continuar con investigaciones que ayuden a mejorar el aprovechamiento de estos organismos, que en la actualidad son altamente considerados en la industria.

## **RECOMENDACIONES**

- Establecer las interacciones de la piridinolina a través de un análisis infrarrojo de un extracto de colágeno.
- Determinar la relación paramiosina-colágeno y optimizar un método de separación de estas proteínas.
- Identificar la existencia de otras posibles moléculas entrecruzantes en diferentes regiones anatómicas.

## REFERENCIAS

- Anderson, C., Bartlett, S. J., Gansner, J. M., Wilson, D., He, L., Gitlin, J. D. y Dowden, J. (2007). Chemical genetics suggests a critical role for lysyl oxidase in zebrafish notochord morphogenesis. *Molecular Biosystems*, 3(1), 51-59.
- Ando, M., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y. y Myoshi, M. 468 (1999). Muscle firmness and structure of raw and cooked arrow squid 469 mantle as affected by freshness. *Journal of Food Science*, 64(4), 470 659–662.
- Ando, M., Nakagishi, Y., Yoshida, K., Nakao, M., Nakagawa, T., Makinodan, Y. y Kawasaki, K. I. (2006). Pyridinoline concentrations in muscular and skin collagen of fish and relationship between collagen solubility and pyridinoline concentration in fish muscular collagen. *Fisheries Science*, 72(5), 1104-1108.
- Ames, J. M. (1990). Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 1, 150-154.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (1990). *Molecular biology of the Cell*. 2nd ed., Garland Pubs., New York, USA, 1219 pp.
- Arias-Moscoso, J. L., Soto-Valdez, H., Plascencia-Jatomea, M., Vidal-Quintanar, R. L., Rouzaud-Sández, O. y Ezquerro-Brauer, J. M. (2011). Composites of chitosan with acid-soluble collagen from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by-products. *Polymer International*, 60(6), 924-931.
- Arreguín-Sánchez, F., Seijo-Gutiérrez, J. C., Fuentes-Castellanos, D. y Solís-Ramírez, M. J. (1987). Estado del conocimiento de los recursos pesqueros de la plataforma continental de Yucatán y región adyacente. Inst. Nal. de la Pesca. *SEPESCA. CRJP. Yucalpetén Doc. Tec*, 4.
- Atsawasuwan, P., Mochida, Y., Katafuchi, M., Tokutomi, K., Mocanu, V., Parker, C. E. y Yamauchi, M. (2011). A novel proteolytic processing of prollysyl oxidase. *Connective tissue research*, 52(6), 479-486.
- Badii, F. y Howell, N. K. (2003). Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored cod collagen by FT-Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1440-1446.
- Badui, D. (2005). *Química de los Alimentos*. 4ta ed. Ed. Pearson Addison Weley. México, 154-163 pp.
- Bornstein, P., Agah, A. y Kyriakides, T. R. (2004). The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell–matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(6), 1115-1125.

- Boyle, P.R. (1983). Cephalopod Life Cycles. Comparative Reviews. Vol. II, Academic Press Inc., London. 441 pp.
- Bracho, G. E. y Haard, N. F. (1990). Determination of collagen crosslinks in rockfish skeletal muscle. *Journal of Food Biochemistry*, 14(6), 435-451.
- Brusca, R. C., Findley, L. T., Hastings, P. A., Hendrickx, M. E., Cosio, J. T. y Heiden, A. M. (2005). Macrofaunal diversity in the Gulf of California. *Biodiversity, ecosystems, and conservation in Northern Mexico*, 179 pp.
- Budelmann, B. U. (1994). Cephalopoda. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, Eighth Edition, 785-817.
- Cabello, A., Villarroel, R., Figuera, B., Ramos, M., Márquez, Y. y Vallenilla, O. (2004). Parámetros de frescura de moluscos. *Revista científica*, 14(5), 457-466.
- Coelho, R. C., Marques, A. L., Oliveira, S. M., Diogo, G. S., Pirraco, R. P., Moreira-Silva, J., Xavier, J. C., Reis, R. L., Silva, T. H. y Mano, J. F. (2017). Extraction and characterization of collagen from Antarctic and Sub-Antarctic squid and its potential application in hybrid scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 787-795.
- Consuegra, S. y Johnston, I. A. (2006). Polymorphism of the lysyl oxidase gene in relation to muscle collagen cross-link concentration in Atlantic salmon. *Aquaculture Research*, 37(16), 1699-1702.
- Cortés-Ruiz, J. A., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M. E., Carvallo-Ruiz, M. G. y García-Sánchez, G. (2008). Production and functional evaluation of a protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) by acid dissolution and isoelectric precipitation. *Food chemistry*, 110(2), 486-492.
- Cortés-Ruiz, J. A., Pacheco-Aguilar, R., Ramírez-Suárez, J. C., Lugo-Sánchez, M. E., García-Orozco, K. D., Sotelo-Mundo, R. R. y Peña-Ramos, A. (2016). Conformational changes in proteins recovered from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle through pH shift washing treatments. *Food Chemistry*, 196, 769-775.
- Damonte, G., Vallin, A., Fina, A. y Monticelli, O. (2021). On the Development of an Effective Method to Produce Conductive PCL Film. *Nanomaterials*, 11(6), 1385.
- Domínguez, P., Cortés, G. G., Vázquez, C. R. y Cruz-Suárez, L. E. (2004). Alimentación y nutrición de moluscos cefalópodos: avances recientes y perspectivas futuras. *Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Hermosillo, Sonora, 16-19.
- Dublán-García, O., Cruz-Camarillo, R., Guerrero-Legarreta, I. y Ponce-Alquicira, E. (2006). Effect of refrigerated storage on proteolytic activity and

- physicochemical and microstructural properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *Journal of Muscle Foods*, 17(3), 291-310.
- Dunajski, E. (1980). Texture of fish muscle. *Journal of Texture Studies*, 10(4), 301-318.
- Edwards, H. H., Johnson, W. H. y Merrick, J. P. (1977). Comparison of solubility properties of  $\alpha$ -paramyosin,  $\beta$ -paramyosin, and acid-extracted paramyosin. *Biochemistry*, 16(10), 2255-2260.
- Encinas-Arzate, J., Ezquerra-Brauer, J. M., Ocaño-Higuera, V. M., Ramirez-Wong, B., Armenta-Villegas, L., Torres-Arreaola, W. y Marquez-Rios, E. (2014). Effect of ionic strength on soluble protein removal from giant squid mantle (*Dosidicus gigas*) and functional evaluation of protein recovery. *Food Science and Biotechnology*, 23(2), 401-407.
- Exposito, J.Y., Cluzel, C., Garrone, R. y Lethias, C. (2002). Evolution of collagens. *Antatomical Record* 268(3), 302-316.
- Eyre, D. (1987). Collagen crosslinking amino acids. *Methods in Enzymology*, 115–139.
- Eyre, D. R. y Wu, J. J. (2005). Collagen cross-links. *Collagen*, 207-229.
- Ezquerra-Brauer, J. M., Márquez-Ríos, E., López-Corona, B. E., Ocaño-Higuera, V. M., Ramírez-Guerra, H. E., Cota-Arriola, O. y Torres-Arreaola, W. (2018). Physicochemical changes of pepsin-solubilized and insoluble collagen in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle after cooking process. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 821-834.
- Fennema, O. R. (2000). Química de los alimentos (No. 664.07 F335q). Zaragoza, ES: Acribia.
- Ferrer, E., Moyano, E., Benitez, L., Gonzalez, L. M., Bryce, D., Foster-Cuevas, M., Dávila, I., Córtez, M. M., Harrison, L. J. S., Parkhouse, R. M. E. y Garate, T. (2003). Cloning and characterization of *Taenia saginata* paramyosin cDNA. *Parasitology Research*, 91(1), 60-67.
- Ferreira, C. A. S., Barbosa, M. C., Silveira, T. C. L., Valenzuela, J. G., Vaz Jr, I. D. S. y Masuda, A. (2002). cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitology*, 125(3), 265-274.
- Foegeding, E. A., Lanier, T. C., & Hultin, H. O. (1996). Characteristics of edible muscle tissues. *Food Chemistry*, 3(15), 879-942.
- Fu, X., Xue, C., Jiang, L., Miao, B., Li, Z. y Xue, Y. (2008). Structural changes in squid (*Loligo japonica*) collagen after modification by formaldehyde. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(15), 2663-2668.

- Fujimoto, D., Akiba, K. y Nakamura, N. (1977). Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine achilles tendon collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 76(4), 1124-1129.
- Fung, Y. C. (2013). Biomechanics: mechanical properties of living tissues. Springer Science & Business Media.
- Gallop, P., Blumenfel, O. y Seifter, S. (1972). Structure and metabolism of connective tissue proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 41, 617- 672.
- Glaubrecht, M. y Salcedo-Vargas, M. A. (2004). The Humboldt squid *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835): History of the Berlin specimen, with a reappraisal of other (bathy-) pelagic “gigantic” cephalopods (Mollusca, Ommastrephidae, Architeuthidae). *Zoosystematics and Evolution*, 80(1), 53-69.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. A. y Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827.
- Guerra, A. y Nixon, M. (1987). Crab and mollusc shell drilling by *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) in the Ria de Vigo (north-west Spain). *Journal of Zoology*, 211(3), 515-523.
- Guerra, Á., Cortez, T. y Rocha, F. (1999). Redescrición del pulpo de los Changos, *Octopus mimus* Gould, 1852, del litoral chileno-peruano (Mollusca, Cephalopoda).
- Hanlon, R. T. y Messenger, J. B. (1998). Cephalopod behaviour. Cambridge University Press.
- Hanson, D. A. y Eyre, D. R. (1996). Molecular site specificity of pyridinoline and pyrrole cross-links in type I collagen of human bone. *Journal of Biological Chemistry*, 271(43), 26508-26516.
- Henle, T. (2005). Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino acids*, 29(4), 313-322.
- Hernández López J.L. (2000) Biología, ecología y pesca del pulpo común *Octopus vulgaris*, Cuvier 1797 en aguas de Gran Canaria. Tesis de Doctorado, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- Hickman C.P., Roberts L.S. y Hickman F.M. (1990) Zoología: principios integrales. Eds. McGraw Hill Interamericana de España, S.A. ISBN 0-8016-2450-9.
- Horgan, D., King, N., Kurth, L. y Kuypers, R. (1990). Collagen crosslinks and their relationship to the thermal properties of calf tendons. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 281, 21–26.

- Huang, T., Tu, Z. C., Shangguan, X., Wang, H., Sha, X. y Bansal, N. (2018). Rheological behavior, emulsifying properties and structural characterization of phosphorylated fish gelatin. *Food Chemistry*, 246, 428-436.
- Huang, J., Wu, R., Liu, D., Liao, B., Lei, M., Wang, M., Huan, R., Zhou, M., Ma, C. y He, H. (2019). Mechanistic insight into the binding and swelling functions of prepeptidase C-terminal (PPC) domains from various bacterial proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(14), e00611-19.
- Hudson, D. M., Archer, M., King, K. B. y Eyre, D. R. (2018). Glycation of type I collagen selectively targets the same helical domain lysine sites as lysyl oxidase-mediated cross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, 293(40), 15620-15627.
- Hudson, D. M., Weis, M. y Eyre, D. R. (2020). Collagen cross-linking and bone pathobiology. In *Principles of Bone Biology* (pp. 339-358). Academic Press.
- Huerta-Ocampo, J. A., Barrera-Pacheco, A., Mendoza-Hernández, C. S., Espitia-Rangel, E., Mock, H. P. y Barba de la Rosa, A. P. (2014). Salt stress-induced alterations in the root proteome of *Amaranthus cruentus* L. *Journal of Proteome Research*, 13(8), 3607-3627.
- Hultin, H. (1993). Características del tejido muscular. En: *Química de los alimentos*. Director Fennema, O.R. Zaragoza España. pp 815-888.
- Iglesias, J., Sánchez, J., Bersanob, J., Carrasco J., Dhont, J., Fuentes L., Linares, F., Muñoz, J., Okumura, S., Roo, J., van der Meeren, T., Vidal, E. y Villanueva, R. (2007). Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266, 1-15.
- Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M. y López-Fandiño, R. (2007). Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids*, 21(3), 433-443.
- Jridi, M., Souissi, N., Mbarek, A., Chadeyron, G., Kammoun, M. y Nasri, M. (2013). Comparative study of physico-mechanical and antioxidant properties of edible gelatin films from the skin of cuttlefish. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 17-25.
- Kagan, H. M. (1986). Characterization and regulation of lysyl oxidase. *Regulation of Matrix Accumulation*, 1, 321-398.
- Kagan, H. M. y Li, W. (2003). Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(4), 660-672.
- Kagawa, M., Matsumoto, M., Yoneda, C., Mitsuhashi, T. y Hatae, K. (2002). Changes in meat texture of three varieties of squid in the early stage of cold storage. *Fisheries Science*, 68(4), 783-792.

- Klett-Traulsen, A. (1996). Pesquería del calamar gigante *Dosidicus gigas*. *Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur*, 1, 127-149.
- Kołodziejaska, I., Sikorski, Z. E. y Niecikowska, C. (1999). Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skins. *Food Chemistry*, 66(2), 153-157.
- Kuboki, Y., Okuguchi, M., Takita, H., Kimura, M., Tsuzaki, M., Takakura, A., Tsunazawa, S., Sakiyama, F. y Hirano, H. (1993). Amino-terminal location of pyridinoline in dentin collagen. *Connective Tissue Research*, 29(2), 99-110.
- Kume, S., Kato, S., Yamagishi, S. I., Inagaki, Y., Ueda, S., Arima, N., Okawa, T., Kojiro, M. y Nagata, K. (2005). Advanced glycation end - products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(9), 1647-1658.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lluch, M., Pérez, M. y Hernando I. (2001). Proteins in Food Structures. En "Chemical and Functional Properties of Food Proteins". (Sikorski Z.E. Editor) Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster – Basel. USA. Pp. 13-33.
- Luna-Raya, M. C., Urciaga-García, J. I., Salinas-Zabala, C. A., Cisneros-Mata, M. A. y Beltrán-Morales, L. F. (2006). Diagnóstico del consumo del calamar gigante en México y en Sonora. *Economía, Sociedad y Territorio*, 6(22), 535-560.
- Maitena, U., Katayama, S., Sato, R. y Saeki, H. (2004). Improved solubility and stability of carp myosin by conjugation with alginate oligosaccharide. *Fisheries Science*, 70(5), 896-902.
- Mangold, K. y Von Boletzky, S. (1973). New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 19(1), 7-12.
- Mangold K.M. (1983) *Octopus vulgaris*. In: Cephalopod Life Cycles, Vol.1. Ed. Boyle, P.R. Academic Press, London, pp. 335-364.
- Markaida, U. y Sosa-Nishizaki, O. (2001). Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995–1997. *Fisheries Research*, 54(1), 63-82.
- Mather J.A. (1993) Octopuses as predators: implications for management. In: *Recent Advances in Fisheries Biology*. Eds. Okutani T., O'Dor R.K., Kubodera T. Tokai University Press, Tokyo, pp. 275- 282.
- Mizuta, S., Tanaka, T. y Yoshinaka, R. (2003). Comparison of collagen types of arm and mantle muscles of the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Food Chemistry*, 81(4), 527-532.

- Molina-Díaz, A., Ramos-Martos, N., Navalón, A. y Capitán-Vallvey, L. F. (2002). Simultaneous determination of codeine and pyridoxine in pharmaceutical preparations by first-derivative spectrofluorimetry. *Journal of AOAC International*, 85(4), 861-868.
- Monticelli, E., Aman, C. S., Costa, M. L., Rota, P., Bogdan, D., Allevi, P. y Cighetti, G. (2011). Simultaneous free and glycosylated pyridinium crosslink determination in urine: Validation of an HPLC-fluorescence method using a deoxypyridinoline homologue as internal standard. *Journal of Chromatography B*, 879(26), 2764-2771.
- Morales, J., Montero, P. y Moral, A. (2000). Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2142-2148.
- Moreno-Martínez, A., (2011). Calamar gigante (*Dosidicus gigas*): investigaciones, avances y aplicaciones del estudio de sus enzimas. Tesis de licenciatura. México, Universidad de Sonora.
- Nagai, T., Yamashita, E., Taniguchi, K., Kanamori, N. y Suzuki, N. (2001). Isolation and characterisation of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). *Food Chemistry*, 72(4), 425-429.
- Nagai, T., Nagamori, K., Yamashita, E. y Suzuki, N. (2002). Collagen of octopus *Callistoctopus arakawai* arm. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(3), 285-289.
- Nesis, K. N. (1987). Cephalopods of the world: squids, cuttlefishes, octopuses, and allies.
- Nigmatullin, C. M., Nesis, K. N. y Arkhipkin, A. I. (2001). A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research*, 54(1), 9-19.
- Norman, M. (2000) Cephalopods. A world Guide. Hackenheim, ConchBooks.
- Oliver, C. M., Melton, L. D. y Stanley, R. A. (2006). Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(4), 337-350.
- Osuna-Amarillas, P. S., Márquez-Ríos, E., Rouzaud-Sandez, O., Suarez-Jiménez, G. M., Cota-Arriola, O., Ocaño-Higuera, V. M., Arvizu-Flores, A. A. y Torres-Arreola, W. (2017). Physicochemical changes of connective tissue proteins in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle during ice storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e12794.
- Otwell, W. S. y Giddings, G. G. (1980). Scanning electron microscopy of squid, *Loligo pealei*: raw, cooked, and frozen mantle. *Marine Fisheries Review*, 42, 67-72.

- Panté, N. (1994). Paramyosin polarity in the thick filament of molluscan smooth muscles. *Journal of Structural Biology*, 113(2), 148-163.
- Paredi, M. E., Roldan, H. A. y Crupkin, M. (2006). Changes in myofibrillar proteins and lipids of squid (*Illex argentinus*) during frozen storage. *Journal of Food Biochemistry*, 30(5), 604-621.
- PRODUCE (2015). Anuario estadístico pesquero y acuícola. Recuperado de [www.produce.gob.pe/documentos/estadisticas/anuarios/anuario-estadistico-pesca-2015.pdf](http://www.produce.gob.pe/documentos/estadisticas/anuarios/anuario-estadistico-pesca-2015.pdf)
- Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J. B. y Sobin, L. H. (1992). Tissue processing: dehydration, clearing, and infiltration. Laboratory methods in histotechnology. American Registry of Pathology, Washington, DC, 29-32.
- Purslow, P. P. (2002). The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology*, 133(4), 947-966.
- Ramirez-Amaro, S. R., Cartamil, D., Galvan-Magaña, F., Gonzalez-Barba, G., Graham, J. B., Carrera-Fernandez, M. y Rochin-Alamillo, A. (2013). The artisanal elasmobranch fishery of the Pacific coast of Baja California Sur, Mexico, management implications. *Scientia Marina*, 77(3), 473-487.
- Ramírez, S. y Ramírez, M. J. M. J. S. (1998). Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solis (No. F/594.560972 S6).
- Ramírez-Guerra, H. E., Mazorra-Manzano, M. A., Ezquerra-Brauer, J. M., Carvajal-Millán, E., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M. E. y Ramírez-Suárez, J. C. (2015a). Hydroxylysyl-pyridinoline occurrence and chemical characteristics of collagen present in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) tissues. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 10-17.
- Ramírez-Guerra, H. E., Fimbres-Romero, M. D. J., Tapia-Vazquez, A. E., Ezquerra-Brauer, J. M., Márquez-Ríos, E., Suarez-Jimenez, G. M. y Torres-Arreola, W. (2015b). Relationship between lysyl oxidase activity, pyridinoline content and muscle texture during ice storage of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *International Journal of Food Science & Technology*, 50(12), 2700-2706.
- Ramirez-Olivaz, R., Rouzaud-Sandez, O., Haard, N., Pacheco-Aguilar, R. y Ezquerra-Brauer, J. (2004). Changes in firmness and thermal behavior of ice-stored muscle of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *European Food Research and Technology*.
- Risteli, J., Elomaa, I., Niemi, S., Novamo, A. y Risteli, L. (1993). Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation. *Clinical Chemistry*, 39(4), 635-640.

- Robins, S. P. y Bailey, A. J. (1972). Age-related changes in collagen: the identification of reducible lysine-carbohydrate condensation products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(1), 76-84.
- Robins, S. P., Duncan, A., Wilson, N. y Evans, B. J. (1996). Standardization of pyridinium crosslinks, pyridinoline and deoxypyridinoline, for use as biochemical markers of collagen degradation. *Clinical Chemistry*, 42(10), 1621-1626.
- SAGARPA, 2009. Programa Nacional de Investigación Científica y Tecnológica en Pesca y Acuicultura. Documento de Trabajo, Instituto Nacional de Pesca, México, D.F., 57 p.
- SAGARPA (2017). Sonora primer lugar en México en producción pesquera y acuícola. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/sonora/boletines/2017/marzo/Documents/2017B00027.pdf>.
- Salinas, Z., Sánchez, H. y Aragón, N. (2005). Programa maestro de la pesquería de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Programa Maestro de Comité Sistema Producto de la Pesquería de Calamar Gigante en el Estado de Sonora.
- Sanmartín, E., Arbolea, J. C., Villamiel, M. y Moreno, F. J. (2009). Recent advances in the recovery and improvement of functional proteins from fish processing by-products: use of protein Glycation as an alternative method. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(4), 332-344.
- Sarabia-Sainz, H. M., Torres-Arreola, W., Márquez-Ríos, E., Santacruz-Ortega, H. C., Rouzaud-Sández, O., Valenzuela-Soto, E. M., Burgara-Estrella A. J. y Ezquerra-Brauer, J. M. (2017). Interrelation of collagen chemical structure and nanostructure with firmness of three body regions of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *Food Biophysics*, 12(4), 491-499.
- Sarabia-Sainz, H. M., Ezquerra-Brauer, J. M., Santacruz-Ortega, H. C., Rouzaud-Sández, O., Valenzuela-Soto, E. M., Acosta-Elias, M. y Torres-Arreola, W. (2018a). Muscle lysyl oxidase activity and structural/thermal properties of highly cross-linked collagen in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle, fins and arms. *Food Science and Biotechnology*, 27(1), 57-64.
- Sarabia-Sainz, H. M., Torres-Arreola, W. y Ezquerra-Brauer, J. M. (2018b). Spectroscopic imaging: Nuclear magnetic resonance and Raman spectrometry for the detection of collagen cross-linking from giant squid mantle, fin, and tentacle tissues. *Instrumentation Science & Technology*, 46(5), 567-581.
- Saito, M., Marumo, K., Fujii, K. y Ishioka, N. (1997). Single-column high-performance liquid chromatographic-fluorescence detection of immature, mature, and senescent cross-links of collagen. *Analytical Biochemistry*, 253(1), 26-32.

- Sato, R., Sawabe, T. y Saeki, H. (2005). Characterization of fish myofibrillar protein by conjugation with alginate oligosaccharide prepared using genetic recombinant alginate lyase. *Journal of Food Science*, 70(1), C58-C62.
- Schäfer, B. T., Malavasi, C. E., Favaron, P. O., Ambrósio, C. E., Miglino, M. A., De Amorim, A. F. y Rici, R. E. G. (2012). Morphological observations of ampullae of lorenzini in *Squatina guggenheim* and *S. occulta* (chondrichthyes, elasmobranchii, squatinidae). *Microscopy Research and Technique*, 75(9), 1213-1217.
- Schmidt-Hebbel, H., Pennacchiotti, I., Masson, L. y M. A. Mella. (1990). Tabla de Composición química de alimentos chilenos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Santiago de Chile.
- Shahidi, F. (1994). Seafood proteins and preparation of protein concentrates. In *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality* (pp. 3-9). Springer US.
- Shapiro, F., Brickley-Parsons, D. y Glimcher, M. (1979). Biosynthesis of collagen crosslinks in rabbit articular cartilage in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 198, 205-211.
- Shen, Z. L., Kahn, H., Ballarini, R. y Eppell, S. J. (2011). Viscoelastic properties of isolated collagen fibrils. *Biophysical Journal*, 100(12), 3008-3015.
- Shen, Y., Zhu, D., Lu, W., Liu, B., Li, Y. y Cao, S. (2018). The characteristics of intrinsic fluorescence of type I collagen influenced by collagenase I. *Applied Sciences*, 8(10), 1947.
- Sikorski, Z. E. (1990). Tecnología de los productos del mar: Recursos, composición nutritiva y conservación.
- Sikorski, Z. E. y Borderias, J. A. (1994). Collagen in the muscles and skin of marine animals. In *Seafood Proteins*, 58-70.
- Sikorski, Z. E. y Kołakowska, A. (1994). Changes in proteins in frozen stored fish. In *Seafood Proteins*, 99-112.
- Sionkowska, A., Lewandowska, K. y Adamiak, K. (2020). The influence of UV light on rheological properties of collagen extracted from Silver Carp skin. *Materials*, 13(19), 4453.
- Sivakumar, P. y Chandrakasan, G. (1998). Occurrence of a novel collagen with three distinct chains in the cranial cartilage of the squid *Sepia officinalis*: comparison with shark cartilage collagen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1381(2), 161-169.
- Smale, M. J. y Buchan, P. R. (1981). Biology of *Octopus vulgaris* off the east coast of South Africa. *Marine Biology*, 65(1), 1-12.

- Smith, S. y Judge, M. (1991). Relationship between pyridinoline concentration and thermal stability of bovine intramuscular collagen. *Journal of Animal Science*, 69, 1989-1993.
- Smith, L. I. y Kagan, H. M. (1998). Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biology*, 16(7), 387-398.
- Sierra, A. G. (1992). Mollusca, cephalopoda (Vol. 1). Editorial CSIC-CSIC Press.
- Solís-Ramírez, M. J. (1962). Contribución al estudio del pulpo (*Octopus vulgaris*), Lamarck de la Sonda de Campeche. *Trab. Divulg*, 3(24), 1-36.
- Solís-Ramírez, M. J. (1994). La pesquería del pulpo del Golfo de México y Caribe Mexicano. Atlas Pesquero y Pesquerías Relevantes de México. CD Multimedia. Secretaría de Pesca, INP, CENEDIC, Univ. de Colima, México.
- Söller, R., Warnke, K., Saint-Paul, U. y Blohm, D. (2000). Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae). *Marine Biology*, 136(1), 29-35.
- Sotelo, C. G., Piñeiro, C., Pérez-Martín, R. I. y Gallardo, J. M. (2000). Analysis of fish and squid myofibrillar proteins by capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis: actin and myosin quantification. *European Food Research and Technology*, 211(6), 443-448.
- Takeda, H., Iida, T., Okada, A., Ootsuka, H., Ohshita, T., Masutani, E., Katayama, S. y Saeki, H. (2007). Feasibility study on water solubilization of spawned out salmon meat by conjugation with alginate oligosaccharide. *Fisheries Science*, 73(4), 924-930.
- Tanaka, J. (1958). On the stock of Octopus (*Octopus vulgaris*) Lamarck, on the East Coast of Boso Peninsula, Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 24(8), 601-607.
- Tapia - Vasquez, A. E., Ezquerra - Brauer, J. M., Martínez - Cruz, O., Márquez - Ríos, E., Ramírez - Guerra, H. E., Minjarez - Osorio, C. y Torres - Arreola, W. (2019). Relationship between muscle texture and the crosslinking degree of collagen fibers from octopus (*Octopus vulgaris*), guitarfish (*Rhinobatos productus*), and cazon (*Mustelus lunulatus*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(12), e14241.
- Thanonkaew, A., Benjakul, S. y Visessanguan, W. (2006). Chemical composition and thermal property of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2-3), 127-133.
- Tolano-Villaverde, I. J., Ocaño-Higuera, V., Ezquerra-Brauer, J., Santos-Sauceda, I., Santacruz-Ortega, H., Cárdenas-López, J. L., Rodríguez-Olibarria, G. y Márquez-Ríos, E. (2018). Physicochemical characterization of actomyosin-

- paramyosin from giant squid mantle (*Dosidicus gigas*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1787-1793.
- Torres-Arreola W., Pacheco-Aguilar R., Sotelo-Mundo R., Rouzaud-Sandez O. y Ezquerra-Brauer J. (2008). Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 6(2):101-108.
- Torres-Arreola, W., Ezquerra-Brauer, J. M., Pacheco-Aguilar, R., Valenzuela-Soto, E. M., Rouzaud-Sandez, O., Lugo-Sanchez, M. E. y Carvallo-Ruiz, G. (2012). Lysyl oxidase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle: purification and partial characterization. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(5), 947-953.
- Vareltzis, P. K. y Undeland, I. (2012). Protein isolation from blue mussels (*Mytilus edulis*) using an acid and alkaline solubilisation technique—process characteristics and functionality of the isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(15), 3055-3064.
- Vasan, S., Foiles, P. y Founds, H. (2003). Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product–protein crosslinks. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 419(1), 89-96.
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P. y Delmas, P. D. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*, 17(3), 319-336.
- Villamiel, M., Del Castillo, M. D. y Corzo, N. (2006). Browning reactions. *Food Biochemistry and Food Processing*, 71-100.
- Warnke, K., Söller, R., Blohm, D. y Saint-Paul, U. (2004). A new look at geographic and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (*Mollusca, Cephalopoda*): indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 42(4), 306-312.
- Wegener, H., Paulsen, H. y Seeger, K. (2014). The cysteine-rich region of type VII collagen is a cystine knot with a new topology. *Journal of Biological Chemistry*, 289(8), 4861-4869.
- Wells, M.J. (1978). *Octopus. Physiology and Behaviour of an Advanced Invertebrate*. Chapman and Hall, London. 417 pp.
- Xiong, Y. L. (1997). Structure-function relationships of muscle proteins. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker-*, 341-392.
- Young, A., Braggins, J. y Barker, J. (1994). Pyridinoline on ovine intramuscular collagen. *Meat Science*, 37, 297-303.
- Young, R. (2009). *Dosidicus Steenstrup 1857. Dosidicus Gigas* (Orbigny 1835). Jumbo squid. Version 29 December 2009 (under construction).

[http://tolweb.org/Dosidicus\\_gigas/19945/2009.12.29](http://tolweb.org/Dosidicus_gigas/19945/2009.12.29) in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org>

- Zambrano-Herrera, W. (2020). Reología de polímeros. *Revista de Ciencia y Tecnología Agrollanía*, 19, 47-53.
- Zhao, Q. P., Moon, S. U., Na, B. K., Kim, S. H., Cho, S. H., Lee, H. W., Kong, Y., Sohn, W. M., Jiang, M. S. y Kim, T. S. (2007). *Paragonimus westermani*: biochemical and immunological characterizations of paramyosin. *Experimental Parasitology*, 115(1), 9-18.