

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

**Actividad Antimutagénica y Actividad Anti-proliferativa *in vitro* en
Extractos de Piel de Pulpo (*Octopus vulgaris*)**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

Q.B.C. Adriana Isabel Cañez Zuñiga

Hermosillo, Sonora

Junio del 2022

APROBACIÓN

Actividad Antimutagénica y Actividad Anti-proliferativa *in vitro* en Extractos de Piel de Pulpo (*Octopus vulgaris*)



Adriana Isabel Cañez Zuñiga



Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer
Directora de Tesis



Dr. Wilfrido Torres Arreola
Miembro del Comité de Tesis



Dra. Carmen María López Saiz
Miembro del Comité de Tesis



Dra. Idalia Osuna Ruíz
Miembro del Comité de Tesis

Cesión de Derechos

Hermosillo, Sonora a 23 de Junio de 2022.

**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 Actividad Antimutagénica y Actividad Anti-proliferativa *in vitro* en Extractos de Piel de Pulpo (*Octopus Vulgaris*), en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de Maestro 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



Adriana Isabel Cañez Zuñiga

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento para:

- La Universidad de Sonora por ser parte integral en mi formación Profesional.
- Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) por darme la oportunidad de continuar con mis estudios.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de maestría y por el apoyo financiero a través del proyecto 2174.
- Mi directora de tesis Dra. Marina Ezquerro, por su orientación, paciencia, apoyo y comprensión.
- A los miembros de mi comité de tesis, quienes a pesar de la distancia siempre tuvieron la disponibilidad para orientarme: Dra. Carmen María López Saiz, Dra. Idalia Osuna Ruíz y Dr. Wilfrido Torres Arreola. Deseo hacer una mención especial a la Dra. Carmen María ya que sin su guía mucho del trabajo realizado no lo hubiera logrado hace sin su asesoría y apoyo en todo momento.
- Al Dr. Jesús E. Chan, por su disponibilidad, apoyo, guía y asesorías.
- A la Dra. Hisila Santacruz, por su ayuda en la caracterización estructural y su valiosa asesoría en la interpretación de los resultados.
- A Héctor Trujillo por ayudarme en los ensayos de actividad antimugénica que necesité repetir más de una vez.
- A Martín Hernández, Dania Leal y Carolina de la Ree por su apoyo, compañía y amistad durante la parte final de mi trabajo experimental.
- A Andrés Vidal sin su apoyo no hubiera empezado la maestría.
- A José Cañez, Ma. Isabel Zuñiga y Claudia Cañez por su apoyo, amor y guía.

DEDICATORIA

A mis padres sin ustedes nada esto seria posible

Adriana

RESUMEN

La alta incidencia de agentes mutágenos en los sistemas vivos ha propiciado que diversos sectores estén abocados a la identificación de compuestos quimioprotectores. Los mutágenos inducen una diversidad de enfermedades degenerativas, además de genotoxicidad y cáncer. El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Una alternativa para disminuir los efectos negativos de los mutágenos es el empleo de compuestos antimutágenos de origen natural, por lo que la búsqueda y obtención de este tipo de compuestos es una dinámica constante. En la naturaleza, los organismos marinos desarrollan una diversidad de colores que pueden ser producidos por compuestos químicos llamados pigmentos. Diferentes investigaciones han revelado que los pigmentos presentes en la piel de algunas especies de cefalópodos, principalmente del calamar, pueden actuar como agentes antioxidantes, así como poseer propiedades antimutagénicas, sin embargo, existen escasos estudios sobre los compuestos pigmentados presentes en la piel del pulpo común (*Octopus vulgaris*) y no hay reportes sobre las propiedades anti proliferativas de estos compuestos. Además de ello, el pulpo es un producto que posee alta demanda comercial, pero, en la mayoría de las sociedades la región anatómica que más se consume los tentáculos, y es común eliminar o no aprovechar completamente la cabeza, lo cual puede inducir problemas de contaminación. Por ello se considera importante buscar otras alternativas de aprovechamiento de esta región anatómica.

La idea central de este estudio estuvo encaminada a establecer el potencial papel que pudiesen tener los pigmentos extraídos de la piel del pulpo como agentes antiproliferativos. Por ello, el presente trabajo se dividió en tres etapas: 1) comparar la bioactividad antioxidante de los pigmentos obtenidos de piel de pulpo extraídos con dos disolventes, metanol acidificado e hidróxido de sodio, así como caracterizar éstos extractos estructuralmente por resonancia magnética nuclear de protón, 2) evaluar el potencial antimutagénico de los pigmentos obtenidos mediante el procedimiento de AMES y usando como agente mutágeno azida de sodio y, 3) comparar la capacidad de los extractos pigmentados obtenidos para prevenir la proliferación de líneas celulares cancerígenas (carcinoma de próstata (22Rv1)) y

(cáncer mama (MDA-MB)), usando como referencia células sanas del epitelio pigmentario de la retina humana (ARPE-19).

Los extractos pigmentados de la piel de *Octopus vulgaris* se extrajeron empleando dos disolventes (metanol-HCl e hidróxido de sodio 0.5 M). Bajo las condiciones de este estudio, los extractos pigmentados obtenidos con metanol presentaron un menor rendimiento y concentración de proteína, pero mayor actividad capacidad para prevenir la oxidación del hierro férrico y la hemólisis de eritrocitos. Ambos extractos presentaron una capacidad moderada (40-60%) para inhibir el efecto mutágeno inducido por el azida de sodio sobre la cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*.

Al evaluar la actividad antiproliferativa en las líneas celulares estudiadas, los resultados indicaron que los extractos pigmentados exhibieron bajo poder citoprotector, ya que aún a la concentración más alta evaluada (200 µg/mL) se detectaron más del 80% de células viables. Aún así, los resultados se consideran alentadores y sientan las bases para más estudios.

Los principales componentes identificados como pigmentos obtenidos con metanol se atribuyen al grupo de los omocromos, mientras lo obtenido con NaOH se consideran de origen proteico por lo que se puede suponer que se trata de proteínas asociadas a pigmentos. Las diferencias en las actividades biológicas se atribuyen a los diferentes tipos de compuestos obtenidos por los solventes empleados en la extracción.

LISTA DE TABLAS

	Página
APROBACION	Error! Bookmark not defined.
DERECHOS DE AUTOR.....	Error! Bookmark not defined.
DEDICATORIA.....	v
RESUMEN	vi
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE FIGURAS	Error! Bookmark not defined.
LISTA DE TABLAS.....	x
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIGRAFICA.....	4
Estrés Oxidativo	4
Relevancia de los Subproductos Pesqueros.....	6
Pigmentos	7
Pigmentos de Origen Marino	9
Tipos de Pigmentos de Origen Marino	10
Cefalópodos.....	10
La Tinta.....	12
Coloración Dinámica.....	14
Reactividad de los Omocromos	22
Bioactividad de los Omocromos	22
Pulpo.....	24
Anatomía del Pulpo	24
Pesquería del Pulpo Común.....	25
Pulpo como Producto de Consumo	25
Estudios Sobre el Efecto del Disolvente y la Actividad Biológica.....	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
Objetivo General	28
Objetivos Específicos.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Materia Prima.....	29
Extracción de Pigmentos de Piel de Pulpo	29

Proteínas Totales por el Método del Ácido Bicinconínico (BCA).....	29
Ensayos de Actividad Antioxidante <i>in vitro</i>	30
Ensayo DPPH•.....	31
Ensayo ABTS•+	32
Ensayo FRAP	32
Determinación de la Actividad Anti Hemolítica	32
Prueba de Antimutagenicidad	33
Ensayo Anti Proliferativo	34
Análisis Instrumental	35
Espectrometría de Infrarrojo Transformada de Fourier (FTIR)	35
Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ¹ H)	36
Análisis Estadístico	36
RESULTADOS	38
Rendimiento de Extracción	38
Capacidad Antioxidante	40
Capacidad Antimugénica	43
Capacidad Antiproliferativa	45
Análisis Químico Estructural	47
Espectrometría de FTIR.....	47
Espectrometría de NMR ¹ H	49
CONCLUSIONES.....	52
RECOMENCACIONES.....	53
REFERENCIAS.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Especies representativas de cefalópodos	11
2	Anatomía interna de un cefalópodo	13
3	Representación esquemática de los principales órganos pigmentarios presentes en la piel de un cefalópodo	15
4	Mecanismos de sincronización neurológicamente controlada de los iridoforos	17
5	Ejemplo de pigmentos omocromos derivados de xantomantina	21
6	Efecto de los extractos pigmentados extraídos con metanol acidificado (MeOH-HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) de la piel de pulpo en la mutagenicidad inducida por la azida de sodio (5 µg AzNa) en <i>Salmonella typhimurium</i> TA100.	44
7	Viabilidad de las líneas celulares cancerígenas al ser expuestas a los extractos pigmentados obtenidos de la piel de pulpo a) 22 Rv1 de cáncer de próstata b) MDA-MB de cáncer de mama	46
8	Espectro de FTIR de los extractos pigmentados obtenidos de la piel de pulpo extraídos con: (a) metanol acidificado; (b) hidróxido de sodio.	48
9	Espectro de NMR ¹ H de los extractos pigmentados obtenidos de la piel de pulpo extraídos con: (a) metanol acidificado; (b) hidróxido de sodio.	50

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Algunas especies reactivas del oxígeno producidas endógenamente	5
2	Actividades biológicas detectadas en diferentes subproductos de organismos marinos	8
3	Camino propuesto de la biosíntesis de xantomina en insectos	20
4	Actividades biológicas de extractos pigmentados obtenidos de la piel de cefalópodos	23
5	Rendimiento de extracción y concentración de proteína de pigmentos de piel de pulpo extraídos con los solventes metanol-HCl (MEOH-HCl) e Hidróxido de sodio (NaOH)	39
6	Actividad antioxidante de los extractos pigmentados obtenidos de la piel de pulpo empleando diferentes sistemas de extracción MEOH-HCl y NaO.	41

INTRODUCCIÓN

Los diferentes sistemas celulares son sumamente susceptibles a sufrir mutaciones derivado de la presencia de una amplia gama de compuestos que pueden actuar como agentes mutágenos, los cuáles pueden ser físicos, químicos y biológicos (Avello y Suwalsky, 2006). Los compuestos mutagénicos pueden iniciar y promover el desarrollo de varias enfermedades en el ser humano, entre las más comunes el cáncer, el cual es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, sin embargo, esta enfermedad se puede prevenir (PDQ, 2021). Por ello es que la búsqueda de compuestos naturales que poseen actividades biológicas y sobre todo que actúen contra la acción de agentes mutagénicos ha despertado gran interés en diferentes grupos de investigación (Venero Gutierrez, 2002). Los compuestos químicos que ayudan a reducir los efectos mutagénicos de agentes físicos o químicos se les conoce como antimutágenos (Möller, y col., 2008). Dentro de los compuestos naturales que han despertado gran interés como potenciales agentes antimutagénicos se encuentran aquellos provenientes [del ambiente marino](#) (Shahidi y col., 2019)

La razón por la cual en el lecho marino se han identificado una amplia gama de compuestos químicos con diferentes propiedades funcionales y biológicas se atribuye a que los organismos marinos al estar expuestos a una diversidad de cambios medio ambientales, han desarrollado diferentes mecanismos para adaptarse y defenderse de esas condiciones que pudiesen considerarse adversas, tales como la modificación de la temperatura, salinidad, oxígeno y la presencia de potenciales depredadores (Lauritano e Ianora, 2020). Los compuestos químicos que son generados como metabolitos secundarios después de estímulos externos específicos poseen diferentes actividades biológicas con gran potencial de aplicación en el sector industrial (Chakraborty y Joy, 2020), dentro de estos compuestos químicos se encuentran los pigmentos (Shahidi y col., 2019).

Los pigmentos de origen marino han despertado gran interés desde hace varias décadas, atribuido entre otras causas a la amplia gama de bioactividades detectadas, entre las que destacan las antioxidantes, antiproliferativas y antimutagénicas (Pangestuti y Kim, 2011). Estos pigmentos se han extraído de diferentes organismos,

entre los que destacan las algas, microorganismos, peces, crustáceos y moluscos (Manivasagana y col., 2018), en este último grupo se encuentran los cefalópodos.

Los cefalópodos son de los organismos marinos que más han llamado la atención desde tiempos inmemoriales por sus características biológicas (Derby, 2014), dentro de ellos se incluyen los calamares, sepias, pulpos y nautilus (Nair y col., 2011). Una característica que hace únicos a estos organismos es su capacidad para cambiar de color, lo cual se debe a la presencia de unas células llamadas omocromos (Deravi y col., 2014). Los omocromos se encuentran dentro de pequeños sacos elásticos debajo de la piel del animal, que se expanden y contraen para cubrir y cambiar el color de algunos cefalópodos marinos como la sepia, el calamar y el pulpo; son utilizados como mecanismo de defensa y adaptación a su medio ambiente (Deravi y col., 2014).

El precursor metabólico de los omocromos es el aminoácido triptófano, del cual se derivan compuestos químicos que confieren diferentes tonalidades, entre ellos la rodomatina y la xantomatina por mencionar algunos. Los omocromos se clasifican en dos grupos: las omatinas (bajo peso molecular, termolábiles y de color tenue) y las ominas (alto peso molecular, termoestables y que se relacionan a coloraciones intensas) (Shamim y col., 2014).

Por otro lado, en las últimas décadas se ha registrado un crecimiento exponencial en la producción pesquera global. Sin embargo, debido a que de manera tradicional solo se comercializan ciertas regiones anatómicas de los organismos marinos, esto ha propiciado un incremento en la generación de desechos pesqueros (FAO, 2020). De las principales regiones anatómicas eliminadas durante el manejo y procesamiento de los productos marinos se encuentran: vísceras, cabezas, huesos, aletas, piel, entre otras (Shahidi y col., 2019). Sin embargo, en estos desechos o subproductos pesqueros se han detectado actividades biológicas.

Dentro de los subproductos se encuentra la piel de cefalópodos como la del pulpo (*Octopus vulgaris*), el cual es una de las especies marinas económicamente importantes en varias partes del mundo (FAO, 2020), sin embargo, en forma tradicional la principal región consumida son sus tentáculos, eliminando la cabeza y las vísceras (SAGARPA, 2014). Esos desechos exhiben un alto contenido de pigmentos, diferentes estudios han reportado que estos pigmentos son una fuente de compuestos químicos

con actividades antioxidantes y antimutagénicas, capaces de prevenir la mutación de la aflatoxina B₁ (Esparza-Espinoza y col., 2022a,b) y también de actuar selectivamente contra la proliferación de células tumorales (Hernández-Zazueta y col., 2021b). No obstante, estos compuestos antiproliferativos fueron extraídos de la melanina del pulpo (Hernández-Zazueta y col., 2021a,b) y las propiedades antiproliferativas de los pigmentos de la piel del pulpo no han sido estudiados.

Se ha reportado que las actividades biológicas de los extractos obtenidos de la piel de *O. vulgaris* se ven afectadas por el tipo de disolvente empleado (Esparza-Espinoza y col. 2022 a,b). La mayor o menor bioactividad se atribuye a que los componentes bioquímicos presentes en los potenciales agentes bioactivos presentan diferentes afinidades hacia un determinado disolvente, debido a las características químicas del mismo (Ngo y col., 2017). Aunado a ello, se ha detectado que el hidróxido de sodio, disolvente empleado para remover proteínas es capaz también de remover pigmentos de la piel de calamar (Cuevas-Acuña y col., 2021). Sin embargo, en ese estudio los pigmentos presentes en los extractos obtenidos no fueron analizados.

Basado en lo anterior y ante la necesidad de encontrar nuevos productos bioactivos y desconocimiento de muchas de las propiedades de los pigmentos de la piel del pulpo común (*Octopus vulgaris*) resulta interesante indagar si estos pigmentos constituyen una fuente potencial para obtener compuestos químicos con actividades antiproliferativas, además de antioxidantes y antimutagénicas. Motivo por el cual en el presente estudio se propuso extraer los pigmentos presentes en la piel del pulpo empleando dos disolventes (metanol acidificado e hidroxido de sodio) y establecer el efecto de los mismos sobre las bioactividades presentes en los extractos pigmentados obtenido

REVISIÓN BIBLIGRAFICA

Estrés Oxidativo

En la actualidad, en muchos países del mundo se atraviesa por una transición epidemiológica donde se observa que prevalecen las enfermedades de tipo infecciosas y también se asocian a aquéllas relacionadas a países desarrollados, como lo son obesidad, aterosclerosis, hipertensión, cáncer, entre otros (OMS, 2021). Muchas de ésta enfermedades están relacionadas con el estrés oxidativo y se ha considerado como la mayor causa de decesos.

Las especies reactivas al oxígeno son productos secundarios de las reacciones de la fosforilación oxidativa, que se dan en la mitocondria para generar energía en forma de ATP. Los complejos enzimáticos que conforman la cadena respiratoria se encargan de estabilizar a muchas de esas especies reactivas, accionando sistemas como la manganeso superóxido dismutasa (que estabiliza el radical superóxido a peróxido de hidrógeno) y la citocromo C (Morales del Río y col., 2015). En forma natural en la célula se expresan compuestos de gran capacidad antioxidante, como son el glutatión y la tiorredoxina, por mencionar algunas, sin embargo, en muchas ocasiones las especies reactivas al oxígeno rebasan el nivel de protección natural que la célula posee, lo cual propicia una liberación de estos compuestos, que se conoce como estrés oxidativo (Morales del Río y col., 2015).

Existen varios tipos de radicales libres (**Tabla 1**), el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) es uno de los más reactivos de entre los radicales generados del oxígeno, (en comparación con otra especie como el radical superóxido $\text{O}_2\bullet^-$). Su producción se atribuye a varios factores como la radiación ionizante, la degradación de otros radicales como los peróxidos y una reacción que se conoce como Reacción de Fenton. La reacción de Fenton es la catálisis de la transición del peróxido de hidrógeno para formar al radical hidroxilo más el ion hidroxilo ($-\text{OH}$). Ya que la vida media del $\bullet\text{OH}$ es muy corta, ataca a otras moléculas, que son aquéllas cercanas a donde el radical fue formado, como el caso de la hidroxilación del ADN, propiciando el rompimiento de enlaces moleculares (Morales del Río y col., 2015).

Tabla 1. Algunas especies reactivas al oxígeno producidas endógenamente.

Radicales	No Radicales
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Hidroxilo (OH^{\bullet})	Peróxidos ($ROOH$)
Hidroperoxil (HO_2^{\bullet})	Ozono (O_3)
Peroxil (RO_2^{\bullet})	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
Alcoxil (RO^{\bullet})	Ácido hipobromoso ($HOBr$)
Óxido nítrico (NO^{\bullet})	Peroxinitrito ($ONOO^-$)

Fuente: Adaptada de Morales del Río y col., 2015.

Además, existen otro tipo de especies reactivas, entre ellas las reactivas de nitrógeno, como el óxido nítrico (NO•). El NO• es una molécula que, si bien cumple funciones normales en el organismo, como son la regulación de la presión sanguínea, ya que su vida media en medio acuoso es de segundos, aunado a su naturaleza anfipática y bajo peso molecular poseen una alta permeabilidad y fácilmente atraviesan las membranas y llegan a moléculas que pudieran no estar disponibles en el momento de su generación. Al reaccionar el óxido nítrico produce peroxinitritos (ONOO-), y estas moléculas son altamente reactivas y actuarán como prooxidante (Morales del Río y col., 2015).

Debido a que los radicales libres son altamente reactivos, éstos se han asociado con efectos negativos a nivel biológico, como: d

- Dañar al ADN e incrementar así la probabilidad de padecer tumores.
- Desnaturalizar las estructuras proteicas, induciendo que no operen correctamente.
- Dañar la célula, que es una vía abierta para el desarrollo de cáncer, entre otras enfermedades (PDQ, 2021).

Dentro de las opciones que hay para la prevención de los radicales libres, están los antioxidantes. Estos son moléculas que pueden interactuar o no con los radicales, o quelar metales para prevenir la reacción de Fenton, inhibir enzimas oxidantes o actuar como cofactores de enzimas endógenas de carácter antioxidante (Huang y col., 2005). A nivel experimental tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha establecido que la presencia de antioxidantes exógenos puede prevenir o detener el daño de radicales libres asociados con el desarrollo de cáncer. Por lo que la búsqueda de la complementación en la dieta con antioxidantes no sintéticos, que impacten positivamente en la salud no cesa, siendo así los compuestos obtenidos de los subproductos de la pesca una posible alternativa.

Relevancia de los Subproductos Pesqueros

Acorde con los reportes emitidos por la organización de las naciones unidas para la alimentación (FAO, 2020), se capturaron más de 90 millones de toneladas de productos pesqueros, los cuáles durante su manejo, preservación y mercado llegan a

generar más 54 millones de toneladas de desperdicios y por ende afectar de manera negativa al medio ambiente (Shahidi y col., 2019). Estos residuos pueden llevar distintos nombres como "subproductos", "coproductos", "desechos pesqueros", "masa visceral", "descarte pesquero" entre otros (Rustad y col., 2003). Los residuos son componentes que ya no pueden ser utilizados directamente, mientras los coproductos pueden ser reciclados o aprovechados después de un tratamiento (Shahidi y col., 2019).

El término subproducto se debe a que los residuos pueden ser una fuente de diferentes componentes con alto valor comercial, como son las proteínas, vitaminas, enzimas y pigmentos, y los compuestos químicos que pueden ser extraídos y comercializados de estos subproductos dan pauta a obtener los denominados coproductos (Shahidi y col., 2019).

Algunos de estos coproductos generados del manejo y procesamiento de los productos de la pesca exhiben actividad biológica, que se puede definir como la capacidad de afectar procesos biológicos, por lo tanto, tienen impacto en la salud humana, esta definición se enfoca a el potencial benéfico a la salud (Möller y col., 2008).

De las investigaciones realizadas se ha podido aislar y caracterizar diferentes tipos de compuestos (**Tabla 2**) entre los que se han detectado propiedades antioxidantes (Alemán y col., 2011), antimicrobianas (Chan-Higuera y col., 2019a), antimutagénicas, antiproliferativas y anticancerígenas (Cruz-Ramírez y col., 2015; López-Saiz y col., 2016; Suárez-Jiménez y col., 2019; Hernández-Zazueta y col., 2019). Dentro de los compuestos identificados con potencial actividad antioxidante y antimutagénicas se encuentran los pigmentos presentes en la piel de cefalópodos como es el caso del calamar (Esparza-Espinoza y col., 2022b; Chan-Higuera y col., 2019a).

Pigmentos

A nivel comercial los pigmentos son productos ampliamente utilizados en diferentes industrias, entre ellas la farmacéutica y la alimentaria, por lo que, derivado del continuo crecimiento del mercado de pigmentos para diversos fines, se ha hecho necesario

Tabla 2. Actividades biológicas detectadas en diferentes subproductos de organismos marinos.

Organismo	Compuesto Químico	Actividad	Referencia
Pulpo	Lípidos de tentáculo	Antimutagénica, anti proliferativa y antioxidante	Cruz Ramírez y col., 2015
Camarón	Lípidos de músculo	Antimutagénica	López-Saiz y col., 2016
Calamar	Proteínas de la piel	Antimutagénica, anti proliferativa y antioxidante	Suárez-Jimenez y col., 2019
Pulpo	Melanina de la tinta	Anticancerígenos	Hernandez-Zazueta y col., 2021
Calamar	Pigmentos de la piel	Antioxidante y antimicrobiana	Chan Higuera y col., 2019 ^a

desarrollar nuevas estrategias de producción de estos, entre ellas la constante búsqueda de pigmentos de origen natural.

Pigmentos de Origen Marino

En la naturaleza, la gran mayoría de animales poseen coloraciones intensas dadas por sustancias conocidas como pigmentos. Según la especie, los pigmentos localizados en la piel cumplen con diversas funciones: para alertar a posibles depredadores del riesgo de su consumo (aposematismo), para atraer a individuos del sexo opuesto para llevar a cabo la copulación y para confundirse con el medio circundante mediante una adaptación de la coloración (crispís) (Shahidi y col., 2019).

Los pigmentos además de dar color a los organismos que los expresan, exhiben propiedades biológicas y por ende, están relacionados con una reducción de enfermedades crónico-degenerativas. La astaxantina, por ejemplo, se ha reportado como un excelente agente antioxidante y anticancerígeno, demostrándose que es más eficaz que otros carotenoides en la mitigación del oxígeno singulete (Shahidi y col., 2019).

Las aplicaciones de los pigmentos marinos hasta la fecha reportadas son muy diversas, entre las que destacan su uso como suplemento dietario en el cultivo de peces, en la industria cosmética y farmacéutica. Como ejemplo se tiene el caso de la tinta de la pluma del pulpo, de la cual se obtiene la melanina y que actualmente se ha reportado que posee propiedades antimutagénicas y anti-proliferativas (Hernández Zazueta y col., 2019).

Sin embargo, hay que hacer énfasis que para poder obtener los pigmentos generados por los organismos marinos se ha requerido contar estudios detallados sobre la fisiología y bioquímica de estos animales. De los trabajos realizados se han establecido los componentes químicos que son capaces de desarrollar la diversidad de coloraciones que se pueden observar en el ambiente marino, así como el papel que éstos juegan dentro del organismo y como es que se expresan (Deravi y col., 2014).

Tipos de Pigmentos de Origen Marino

Los pigmentos de origen marino están emergiendo como una alternativa importante para la prevención de algunas enfermedades crónico-degenerativas. Recientemente, los pigmentos presentes en animales marinos invertebrados, como los cefalópodos, están llamando mucho la atención y se han podido identificar una amplia variedad de estos compuestos con potencial de aplicación en varios sectores industriales (Manivasagan y col., 2018). Acorde las investigaciones realizadas, los principales pigmentos identificados en los diversos organismos marinos son las ficobilinas, melaninas y carotenoides (Pangestuti y Kim, 2011; Vílchez y col., 2011) y en el caso particular de los cefalópodos se han detectado los denominados pigmentos nitrogenados como la melanina (Derby, 2014) y los omocromos (Messenger y col., 2001, Van den Branden y Declair, 1976, Froesch y col., 1979).

Cefalópodos

Los cefalópodos son una clase de invertebrado marinos que pertenecen al filo de los moluscos y aparecieron hace más de 500 millones de años y están ampliamente distribuidos en diferentes ambientes marinos. Las subclases representativas de los cefalópodos son la Nautiloidea y la Coleoidea. Dentro del grupo Coleoidea se encuentran dos subórdenes Octopodiformes, que incluye a los pulpos y la Decapodiformes, como los calamares y las sepias (**Figura 1**), siendo el pulpo (*Octopus vulgaris*) el cefalópodo de mayor interés comercial, tanto en México como a nivel mundial (FAO, 2020).

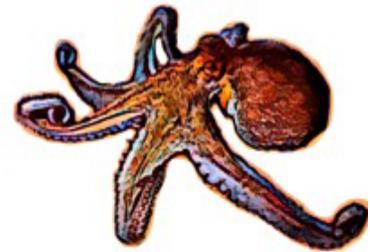
Los cefalópodos se caracterizan por poseer una extraordinaria capacidad de protegerse. La forma mediante la cual se defienden estos organismos es muy variada, depende de la especie y del hábitat, puede ser desde movimientos de propulsión a chorro con el fin de escapar, mediante cripsis para así pasar inadvertidos, o bien mediante la expulsión de sustancias venenosas o emisión de una tinta (Norman y col., 2001; Hanlon y Messenger, 1996).



Calamar gigante
(*Dosidicus gigas*)



Sepia
(*Sepia officinalis*)



Pulpo
(*Octopus vulgaris*)

Figura 1. Especies representativas de cefalópodos.
Elaboración: Josafat Marina Ezquerra Brauer

La Tinta

La emisión de la tinta es el mecanismo más reconocido como una respuesta adaptativa del grupo coleoidea de los cefalópodos (calamares, pulpos y sepias) a agentes extraños o depredadores. La tinta es una sustancia viscosa que no posee color, pero que contiene partículas de color oscuro de un pigmento llamado melanina, la cual está conjugada con proteínas (Derby, 2014) y que se produce mediante una serie de mecanismo químicos y sensoriales (Nair y col., 2011). Se ha reportado que el sistema de producción de la tinta en calamares y sepias está conformado por dos grandes regiones (**Figura 2**). La primera gran zona es la glándula de la tinta, en la cual se localiza el saco de la tinta, siendo esta región anatómica la que más se ha estudiado en los cefalópodos. En esta glándula se produce un líquido oscuro, que contiene melanina y otros componentes químicos. La segunda parte del sistema es un órgano conductor en forma de embudo, que contribuye en la secreción de la tinta, identificada como una glándula mucosa u órgano embudo (Ali y col., 2017).

La melanina se ha descrito como un amplio grupo de sustancias pigmentadas oscuros, negros o marrones. Estas moléculas se caracterizan por poseer una masa molecular elevada, altamente estables, amorfas y con cargas negativas (Cao y col., 2021).

Cuando los organismos se sienten en peligro la glándula de la tinta secreta un moco con el fin de lubricar la melanina y facilitar la secreción del líquido (Derby, 2014). 2003). El proceso de expulsión del líquido hacía el exterior es a través de un sifón mediante una serie de contracciones musculares (Derby, 2014). El mecanismo de eyección del óxido nítrico se da por un proceso de contracción de los esfínteres del saco de la tinta y de las paredes musculares, regulado por complejos enzimáticos (Palumbo, 2000).

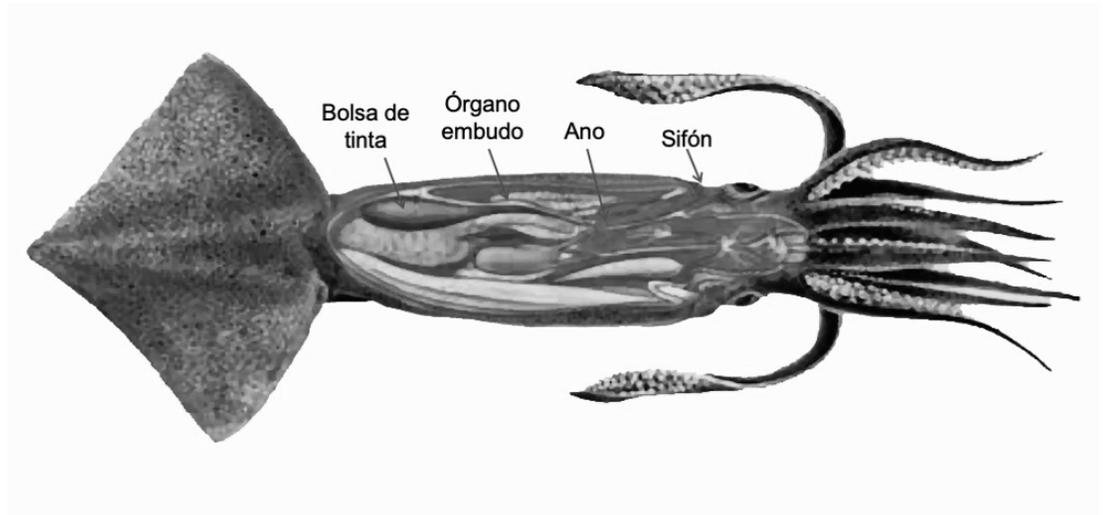


Figura 2. Anatomía interna de un cefalópodo
Elaboración: Josafat Marina Ezquerra Brauer

Coloración Dinámica

Los cefalópodos poseen la capacidad de expresar cierto grado de coloración dinámica (Messenger y col., 2001, Mäthger y col., 2009). El mecanismo que estos organismos utilizan para expresar esa coloración dinámica para el camuflaje o la comunicación depende de la profundidad del agua en donde habitan. Aquellos que viven en aguas poco profundas cambian sus patrones de coloración a través de unas células conteniendo pigmentos, conocidas como cromatóforos, mientras que aquellos que se localizan en aguas más profundas lo hacen mediante unos órganos que emiten luz llamados fotóforos.

La amplia gama de coloraciones expresada por los cefalópodos se produce mediante la inervación de sus músculos (Messenger y col., 2001, Cloney y col., 1983) y se deriva de células y órganos pigmentarios especializados llamados cromatóforos, iridóforos y los leucóforos (**Figura 3**), que pueden disponerse agrupados o dispuestos en capas superpuestas (Deravi y col., 2014).

Los cromatóforos son un filtro de color que se expande, mientras que los iridóforos son reflectores y los leucóforos reflejan una luz blanca (Cloney y col., 1983). Se ha establecido que los iridóforos y leucóforos producen color mediante coloración estructural y los cromatóforos son órganos pigmentarios (Mäthger y col., 2009, Messenger y col., 2001).

Los cromatóforos se observan como pequeños parches o puntos debajo de la piel y contienen en su interior pigmentos rojos (eritróforos), amarillos (xantóforos) y marrón-negros (melanóforos) (Deravi y col., 2014).

Iridóforos. Se llaman así por el efecto óptico que producen iridiscencia, que es un reflejo de la luz dependiendo del ángulo (Land y col., 1972). Se ha propuesto que debido a que la iridiscencia produce luz polarizada, podría ser una forma de comunicación en especies capaces de percibir diferencias en polarización (Mäthger y col., 2009). Estos contribuyen a la coloración dinámica para el camuflaje al interactuar con los cromatóforos para producir una variedad de colores (Mäthger y col., 2007).

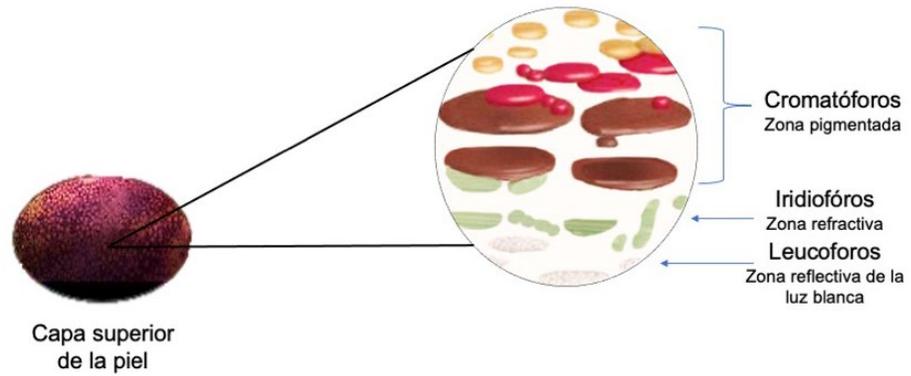


Figura 3. Representación esquemática de los principales órganos pigmentarios presentes en la piel de un cefalópodo.
Elaboración: Josafat Marina Ezquerria Brauer

En el caso de los cefalópodos, este efecto en combinación con la reflectina, una proteína estructural y de alto índice de refracción (DeMartini y col., 2013), es exclusiva de los cefalópodos como una proteína que puede funcionar como una multicapa reconfigurable (Izumi y col., 2010).

Algunos pulpos y sepias, los iridóforos parecen ser estructuras estáticas (Roger y col., 2018). Se ha visto que estos usan cromatóforos como moduladores del reflejo de los iridóforos para su utilización en la comunicación y camuflaje (Messenger y col., 2001). Recientemente se muestran un mecanismo, mostrando que mediante la acetilcolina comienza una serie de señalizaciones que lleva a la fosforilación de la reflectina (Norman y col., 2001), propiciando la condensación de la reflectina y la eliminación de agua de la célula (**Figura 4**) (Izumi y col., 2010).

La iridiscencia se debe al cambio en el índice de refracción de la reflectina es un cambio “lento” de minutos, en comparación a la utilización de cromatóforos que se da en cuestión de segundos.

Leucóforos. Estos no contribuyen a la coloración dinámica, pero proporcionan un fondo de luz blanca independiente del ángulo de visión (Mäthger y col., 2009, Cloney y col., 1983, Mäthger y col., 2013, DeMartini y col., 2013), se consideraba que los leucóforos se encontraban en una célula especializada en la que hay una concentración de partículas esféricas llamadas leucosomas, más recientemente se demostró la presencia de iridocitos dentro de estos puede contribuir a la reflectancia (Cloney y col., 1983, Roger y col., 2018).

Los leucosomas tienen un índice de refracción de 1.51 (Mäthger y col., 2013, DeMartini y col., 2013), su diferencia con el índice de refracción del citoplasma da una dispersión de banda ancha confirmada por el modelo de Mie (Mäthger y col., 2013). Esto se puede observar en la *S. officinalis* donde las bandas claras y oscuras se dan por dilatación o contracción de cromatóforos, los leucóforos, las líneas blancas no son controlados, el grado de expansión del cromatóforo puede ser controlado para aumentar o debilitar el contraste logrando la comunicación y el camuflaje (Mäthger y col., 2009, Adamo y col., 1996).

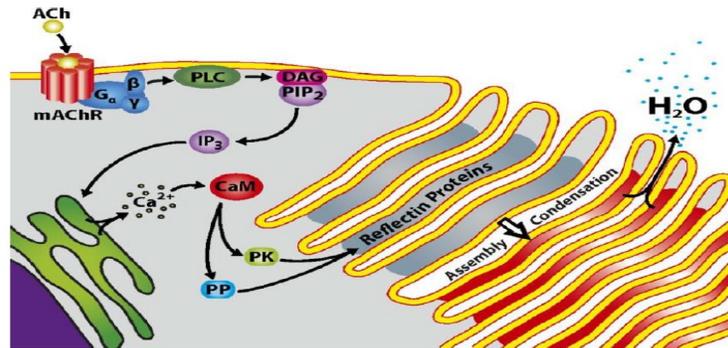


Figura 4. Mecanismo de sintonización neurológicamente controlada de los iridóforos. La acetilcolina (ACh) interactúa con un receptor acoplado a proteínas de tipo G (mAChR), que inicia una cascada de señalización. Esto provoca la liberación de calcio (Ca^{2+}) desde el retículo endoplásmico, que actúa como un mensajero secundario que se une a calmodulina (CaM), activando las proteínas quininas (PK) y fosfatasas (PP). Esto da como resultado la fosforilación y desfosforilación de reflectinas específicas seguidas de la expulsión de agua, causando un cambio en el grosor y el índice de refracción de las plaquetas de reflectina y alterando las propiedades reflectantes del reflector de pila de Bragg.

Fuente: DeMartini y col., 2013.

Los leucóforos en general no se encuentran en los calamares, pero si se encuentran en sepias y pulpo (DeMartini y col., 2013). Una excepción es *D. opalescens* la hembra de esta especie presenta leucóforos intercambiables que reflejan la luz blanca (DeMartini y col., 2013). También se descubrió que los leucóforos estáticos contienen reflectina (Mäthger y col., 2013), se sugiere que esta es la base para la coloración estructural, no solo en iridóforos, pero también en leucóforos (Izumi y col., 2010, DeMartini y col., 2013).

Las investigaciones en torno a la reflectina identificadas en cefalópodos indica que no están compuestas por purinas, como en la mayoría de los animales, sino por un grupo de proteínas que son codificadas por al menos seis genes, cuya secuencia de aminoácidos no ha sido reportada en otros organismos, ya que poseen una composición de aminoácidos inusual, con la presencia de 4 residuos poco comunes, la tirosina, metionina, arginina y triptofano, de dominios repetidos y disposición muy localizada. Lo cual indica que los cefalópodos poseen un sistema de coloración estructural único (Crookes-Goodson y col., 2004).

Cromatóforos. Los fenómenos de coloración dinámica, camuflaje y la alteración de la apariencia de manera rápida observados en los cefalópodos se debe a los cromatóforos. Los movimientos constantes de contracción y relajación muscular ayudan a controlar la expansión de los sáculos del cromatóforo, influyendo así en el tamaño del área que se expone. Este fenómeno de relajación y contracción muscular induce la concentración o dispersión de los pigmentos, propiciando con esto que se expresen una compleja combinación de colores, lo cual les permite a los organismos cambiar su color o patrón corporal en tiempos muy cortos (Loi y col., 1996). Estos cambios de coloración en los cefalópodos están bajo control directo neuromuscular, ya que cada cromatóforo está unido a una terminación nerviosa (Deravi y col., 2014).

Los gránulos pigmentados los cromatóforos expresan una amplia variedad de colores (**Figura 3**), los cuáles varían dependiendo de la especie, así se tiene que el calamar flecha (*Doryteuthis pealeii*) y la sepia común muestran tonos rojos, amarillos y marrones, mientras que el pulpo (*Ocotpus vulgaris*) tonos naranjas y negros y las variedades rojas, amarillas y marrones (Messenger y col., 2001, Van den Branden y Declair, 1976, Froesch y col., 1979). Los análisis realizados en torno a los cromatóforos

presentes en la piel de los cefalópodos indican que éstos pertenecen al grupo de los omocromos (Williams y col., 2016).

Los omocromos son un grupo de compuesto químicos derivados del triptófano, cuya estructura química está constituida por un grupo tricíclico de compuestos solubles en ácidos y álcalis, dentro de los cuales están presentes las aminas (Van den Branden y Decler, 1976). Éstos compuestos químicos son sintetizados como gránulos y están unidos a proteínas y a iones de calcio. La biosíntesis de los omocromos inicia con la transformación del triptófano hacia quinunerina, mediante reacciones de oxidación (Williams y col., 2019). Los omocromos son producidos en organelos intracelulares muy especializados, llamados omocromasomas (Figon y col., 2020). Recientemente se propusieron las etapas de la biosíntesis (**Tabla 3**) de uno de los omocromos identificados en cefalópodos, la xantomatina (Figon y col., 2020). La xantomatina es una molécula conformada por un sistema anillado de fenoxazona: pirido[3,2-a]fenoxazona con sustituciones de hidroxilo (OH), carboxi, oxo y 3-amino-3-carboxipropanoil en las posiciones 1, 3, 5 y 11, respectivamente (Figon y col., 2020).

La xantomatina fue la primera omatina sintetizada (Linzen y col., 1974). Partiendo de esto se han descubierto gran cantidad de omatinas que son resultado de modificaciones de la xantomatina (**Figura 5**) mediante una glucosilación se forma rodomatina y sulfatación se forma omatina-D.

La Xantomatina se ha identificado en un gran número de insectos, arañas y cefalópodos (Van den Branden y Decler, 1976, Linzen y col., 1974, Insausti y col 2008, Williams y col., 2016), su estructura principal es piridino-fenoxazina (Bolognese y col., 1988). Esta estructura es la que da la capacidad para absorber la luz, así como su solubilidad (Linzen y col., 1974), el cambio de color se puede apreciar después de una reacción de oxidación o reducción que recibe el nombre de electromimismo (Futahashi y col., 2012). Estas cualidades sumando su índice de refracción (Dinneen y col., 2017) crean un pigmento eficaz y un compuesto con funcionalidad química.

Tabla 3. Camino propuesto de la biosíntesis de Xantomatina en insectos¹

Paso	Reacción
I	Triptófano → 3-hidroxiquinurenina
II	La 3-hidroxiquinurenina es transportada a los omocromosomas
III	3-hidroxiquinurenina → xantomatina no ciclada
IV	xantomatina no ciclada se puede transformar en varios compuestos: → xantomatina ciclada → xantomatina decarboxilada → omia A: omocromo que puede generarse por la oxidación de aminoácidos azufrados o de la 3-hidroxiquinurenina.

Enzimas involucradas: triptófano 2,3-dioxigenasa, quinurenina 3-monooxigenasa, fenoxazona sintasa y se propone una tautomerasa durante la ciclación de la xantomantina.

¹Camino propuesto por Figon y col., 2020.

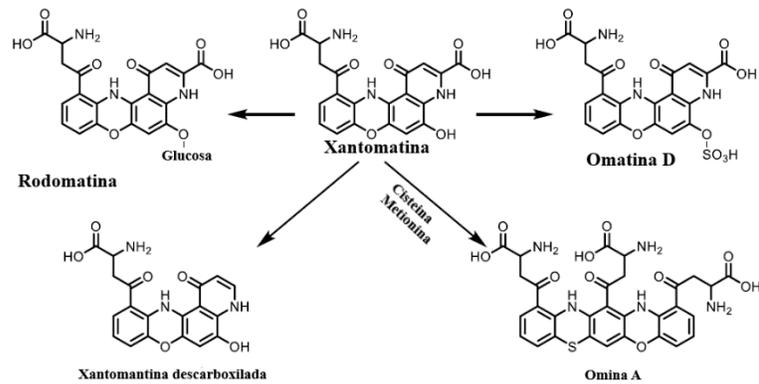


Figura 5. Ejemplos de pigmentos Omocromo derivados de xantomatina. Las omatinas se muestran en forma reducida.
Fuente: Riou y col., 2010.

La función que cumple la xantomatina en los organismos es diversa para la comunicación o como camuflaje, un ejemplo son las libélulas macho que cambian su coloración de amarillo a rojo en época de apareamiento (Futahashi y col., 2012). La araña cangrejo usa este pigmento para el camuflaje virando su color de blanco a amarillo buscando alimento en la vegetación que se posa (Insausti y col., 2008).

Reactividad de los Omocromos

En la naturaleza se ha señalado que los omocromos pueden actuar como aceptores o donadores de electrones, previniendo la peroxidación en los liposomas celulares ocasionada por las radiaciones UV (Dontsov y col., 1999). En cuanto al potencial mecanismo de acción y reactividad de estas moléculas, se ha establecido través de estudios teóricos, se reportó que dependiendo de la estructura química del omocromo este podría presentar el mecanismo de transferir electrones o átomos de hidrógeno o ambos (Romero y Martínez, 2015). En los cefalópodos el principal omocromo identificado es la xantomantina, detectándose que exhibía la capacidad de actuar como un agente antioxidante a través de dos de los mecanismos antioxidantes definidos, SET (transferencia de electrones) y HAT (transferencia del ion hidrógeno) (Chan-Higuera y col. 2019b).

Bioactividad de los Omocromos

En cuanto al potencial papel protector de los omocromos en sistemas biológicos existen escasos estudios y la gran mayoría se han centrado en la piel de calamar gigante (**Tabla 4**). De esos estudios se estableció que los cromatóforos presentes en la piel del calamar poseían la capacidad de retardar la oxidación de un aceite de pescado (Aubourg y col., 2016) y prolongar la vida de anaquel de dos especies de pescados almacenados en hielo (Ezquerro y col., 2016, 2017). Así mismo, se estableció a través de estudios espectrofotométricos que los extractos pigmentados aislados de la piel de calamar, que poseían actividad antioxidante y antimutagénica presentaban características estructurales similares a los omocromos (Chan-Higuera y col., 2019b). Esta información da indicios de que estos compuestos pudieran tener aplicación en diversas industrias como la alimentaria.

Tabla 4. Actividades biológicas de extractos pigmentados obtenidos de la piel de cefalópodos.

Organismo	Compuesto	Actividad	Referencia
Calamar	Extracto pigmentado de la piel de calamar	Actividad antioxidante Pico de xantomantina	Aubourg y col., 2016
Calamar	Extracto pigmentado de la piel de calamar	Actividad antimicrobiana prolongo la vida de anaquel	Ezquerria Brauer y col., 2016, 2017
Calamar	Extracto pigmentado de la piel de calamar	Actividad antimutagenica y antimicrobiana	Chan Higuera y col., 2019a
Calamar	Extracto pigmentado de la piel de calamar	Actividad antioxidante y caracterización de xantomantina	Chan Higuera y col., 2019b
Pulpo y Calamar	Extracto pigmentado de la piel de calamar y Pulpo	Actividad antioxidante, antimutagénica y antimicrobiana	Esparza-Espinoza y col., 2022a,b

Por otro lado, se ha detectado que los extractos pigmentados de la piel de pulpo presentan mayor actividad antioxidante que aquellos obtenidos de la piel de calamar (Esparza-Espinoza y col., 2022a,b).

Pulpo

Anatomía del Pulpo

Los pulpos son organismos que se caracterizan por poseer ocho brazos, de ahí su nombre (Bergbauer y col., 2001), siendo la especie *Octopus vulgaris* (pulpo común) la de mayor demanda y tamaño en México, la cual puede alcanzar los tres metros de largo y pesar hasta doce kilogramos.

La piel de los pulpos posee una coloración cobriza, la cual puede cambiar dependiendo de factores, como la temperatura, salinidad, e influir de esta manera en la textura de esta. Esta variación es más evidente cuando está en presencia de depredadores. (Bergbauer y col., 2001).

Otra característica de estos organismos es que poseen tres corazones, un cerebro muy desarrollado. Los estudios realizados tendientes a establecer la función de los corazones han indicado que dos de ellos bombean la sangre hacia las branquias y el tercero la dirige hacia las demás partes del cuerpo. Así mismo, se ha indicado que el movimiento de sus tentáculos es controlado por un cerebro pequeño, al cual se encuentran conectados (Bergbauer y col., 2001).

Los pulpos, como se mencionó previamente, emplean como mecanismo de defensa la expulsión de una tinta, la cual está localizada dentro de una glándula llamada saco de tinta. Esta se encuentra conectada a un sifón, que le permite expulsar una gran cantidad de agua en conjunto con la tinta, y de esta manera el pulpo puede escapar moviéndose a gran velocidad e incluso cambiando la dirección rápidamente (Otero y col., 2008).

En cuanto a la profundidad que normalmente se localizan los pulpos y sus hábitos de alimentación, se ha reportado que se pueden ubicar entre los 0 a 100 m de profundidad, y que es muy raro encontrarlo a mayores profundidades (Katsanekavis y Verriopoulus, 2004). A la hora de alimentarse tiende a cazar organismos de tallas pequeñas, tiene preferencia por algunos peces, crustáceos y bivalvos. Además, como

un sistema de protección tiende a ocultarse en cavernas o grietas (Bergbauer y col., 2001).

Los machos presentan variaciones en su fisionomía sexual (diformismo), ya que poseen un tercer brazo que va modificando (hectolizado) para poder llevar a cabo la inseminación de las hembras. Las puestas suceden durante todo el año, pero con picos estacionales en primavera y otoño. La hembra deposita en lugar alejados de depredadores, entre diez mil a cincuenta mil huevecillos. La incubación varía entre uno a cuatro meses, dependiendo de la temperatura (Otero y col., 2008).

Pesquería del Pulpo Común

La pesquería del pulpo en México inició en 1949 (Solís-Ramírez, 1967; 1975; 1988). La pesca de pulpo se realiza exclusivamente durante el día, permitiendo que la embarcación se mantenga con un movimiento lento, arrastrando así los aperos que utilizan para pescar, los cuáles contendrán principalmente jaibas y cangrejos, cómo carnadas. Para llevar un mejor control de la pesca, los pescadores atan las carnadas a un extremo la caña, y fijan la misma a un costado de su barca (Instituto Nacional de Pesca, 2019).

México ocupa el tercer productor de pulpo a nivel mundial, siendo una de las pesquerías de gran valor comercial para los productores mexicanos. La captura de este organismo representa una actividad de gran importancia social, representando una importante fuente de ingresos, sobre todo en las entidades como Yucatán y Campeche (Instituto Nacional de Pesca, 2017).

Pulpo como Producto de Consumo

El pulpo es un producto aceptado en la gastronomía de muchas culturas. Es un producto con valor nutritivo alto, bajo en calorías, alto contenido en proteínas y con vitaminas necesarias por el organismo. En forma tradicional se adquiere el pulpo sin la bolsa de tinta y el estómago, y algunas personas asumen que solo se pueden comer los brazos (SAGARPA, 2014). No obstante, la cabeza que podría considerarse como una región que no se aprovecha adecuadamente, al utilizarse como ingrediente para obtener diferentes productos que pudiesen ser más atractivos comercialmente le daría un mayor valor. Dentro de los compuestos considerados atractivos están los pigmentos.

Estudios Sobre el Efecto del Disolvente y la Actividad Biológica

Se ha reportado que la actividad biológica de los diferentes compuestos químicos que forman parte de los organismos marinos puede verse afectada por el tipo de disolvente que se emplee (Esparza-Espinoza y col., 2022a). En estudios realizados en cefalópodos, se han podido extraer compuestos bioactivos usando solventes como la acetona, el etanol, el hexano y el metanol (Cruz-Ramírez y col., 2015; Chan-Higuera y col., 2019a; Esparza-Espinoza y col. 2022a; Hernandez-Zazueta y col., 2021).

En el caso particular de los pigmentos presentes en la piel de los cefalópodos, estos se han podido extraer usando como disolvente metanol y etanol acidificados, los extractos obtenidos empleando metanol acidificado poseían mejor capacidad antioxidante (Esparza-Espinoza y col., 2022a).

Por otro lado, Cuevas-Acuña y col. (2021) detectaron que, al extraer proteínas de la piel del calamar, se obtenía un extracto proteico al que no se le pudo remover el color, y que al mezclarlo con quitosano se producía una biopelícula que mostró tonalidades rojizas. Estos autores sugirieron que el hidróxido de sodio a molaridades bajas era capaz además extraer pigmentos asociados a proteínas.

HIPÓTESIS

En esta tesis se presentan tres grandes preguntas:

¿Los pigmentos presentes en la piel de pulpo poseerán actividad antiproliferativa?

¿Habrá diferencias en las actividades biológicas de extractos pigmentados de la piel de cefalópodos, empleando metanol acidificado, comparado contra hidróxido de sodio?

¿Los extractos pigmentados extraídos con hidróxido de sodio presentarán por resonancia magnética nuclear señales asociadas a compuestos omocrómicos?

Derivado de esas preguntas se plantea la hipótesis del trabajo:

Los extractos pigmentados de la piel del pulpo (*Octopus vulgaris*) obtenidos con metanol acidificado e hidróxido de sodio poseen actividades antioxidantes, antimutagénicas y antiproliferativas similares.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la actividad antioxidante, antimutagénica y antiproliferativa de los pigmentos de la piel de pulpo (*Octopus vulgaris*), extraídos con metanol acidificado e hidróxido de sodio.

Objetivos Específicos

1. Comparar la actividad antioxidante de extractos pigmentados obtenidos de la piel de *Octopus vulgaris* extraídos con metanol acidificado contra aquellos extraídos con hidróxido de sodio.
2. Comparar la naturaleza química de los extractos obtenidos con metanol acidificado contra aquellos extraídos con hidróxido de sodio de la piel de pulpo.
3. Evaluar y comparar la actividad antimutagénica de los extractos pigmentados de la piel de pulpo obtenidos empleando como disolvente el metanol acidificado contra el obtenido con hidróxido de sodio.
4. Determinar y comparar la potencial actividad antiproliferativa de los extractos pigmentados de la piel de pulpo obtenidos empleando como disolvente el metanol acidificado contra el obtenido con hidróxido de sodio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

El pulpo (*Octopus Vulgaris*) fue el sujeto de estudio de este trabajo, el cual fue capturado en Bahía de Kino, Sonora en diciembre de 2019. El pulpo después de la captura se transportó en hielo al laboratorio de Marinos, donde primeramente se removió la piel, posteriormente se liofilizó (LABONCO, Kansas City, MO, EE. UU.), finalmente se almacenó a -25 °C hasta su uso.

Extracción de Pigmentos de Piel de Pulpo

Los pigmentos fueron obtenidos siguiendo lo descrito por Chan-Higuera y col. (2019a) y Esparza-Espinoza y col. (2022a). Se mezcló 1 g de piel liofilizada de la cabeza del pulpo en dos tratamientos diferentes (T): 10 ml de MeOH-HCl al 1% (T1) y 10 ml de NaOH 0.5 M (T2). La mezcla se homogeneizó 5 min en vortex, después se sónicó 5 min a temperatura ambiente. La solución se centrifugó (Modelo Biofuge Stratos, Thermo Scientific, Alemania) a $10\ 000 \times g$ por 30 min y se recogió el sobrenadante pigmentado. El disolvente fue eliminado utilizando un rotavapor (R-100, Büchi, Suiza), los extractos se concentraron aún más por evaporación en una campana de flujo laminar durante 24 h. Los extractos pigmentados concentrados se liofilizaron (LABONCO, Kansas City, MO, EE. UU.). El rendimiento de los extractos pigmentados se calculó utilizando la Ecuación (1)

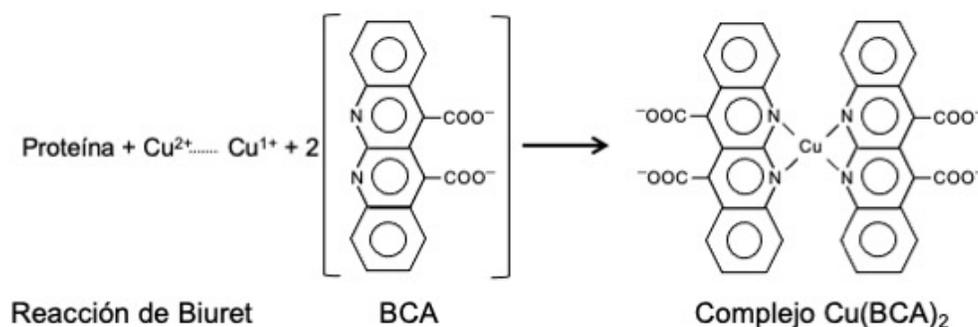
$$\text{Rendimientos (\%)} = [(peso\ del\ extracto)/(peso\ de\ la\ piel)] \times 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

Proteínas Totales por el Método del Ácido Bicinonínico (BCA)

Es un método basado en el BCA se basa en la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} en un medio alcalino a lo que se le llama reacción de Biuret (**Reacción 1**). Los responsables de iniciar la reacción son el número de los enlaces peptídicos y la presencia de ciertos aminoácidos (cisteína, triptófano y tirosina).

Para llevar a cabo la determinación de proteínas de los extractos obtenidos, las muestras liofilizadas fueron solubilizadas en un buffer de fosfatos 100 mM, conteniendo EDTA 1 mM y Tritón X-100 (detergente aniónico), a un pH de 7.6. Posteriormente se procedió a concentrar las muestras usando unos filtros con corte de

3 kDa (Amicon®). Una vez concentradas las muestras, estas (100 µl) fueron mezcladas con el reactivo de BCA (1000 µl). Esta mezcla se incubó por 10 min a 60°C y se leyó la absorbancia a 562 nm frente a un blanco. Se utilizó la albúmina de suero bovino (1 mg/mL) como proteína patrón.



Reacción 1

Ensayos de Actividad Antioxidante *in vitro*

Los ensayos de actividad antioxidante empleados en este trabajo se fundamentan en el empleo de distintos radicales sintéticos que evalúan diferentes mecanismos de antioxidación, tales como transferencia de átomo de hidrogeno (HAT, por sus siglas en inglés), transferencia de un electrón (SET, por sus siglas en inglés) y mecanismos mixtos (HAT/SET) (Zulueta y Esteve 2009). Los extractos pigmentados, fueron sometidos a su evaluación antioxidante por diferentes técnicas que emplean algunos de los mecanismos mencionados, lo que permite una mejor caracterización de la bioactividad: (1) Inhibición del radical catiónico 2,2-Difenil-1-Picrilhidracilo (DPPH•; HAT/SET); (2) Inhibición del radical catiónico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinal 6-sulfonato) (ABTS•+; HAT/SET); (3) Reducción Férrica o de Poder Antioxidante (FRAP; SET). También se empleó un medio biológico, basado en la protección sobre heritrocitos humanos que las sustancias activas poseen sobre la hemólisis provocada por el diclorohidrato de 2,2-azobis(2-meilpropinamidina) (AAPH) (Luy y col., 2010).

Todos los ensayos se realizaron empleando distintas dosis de los extractos pigmentados (5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.325 mg/mL).

Para los análisis de ABTS y DPPH se midió el porcentaje de inhibición expresado en μM de equivalentes trolox ($\mu\text{mol ET/g}$ muestra). Para ello se corrió una curva estándar del análogo de vitamina E (Trolox).

Trolox es un antioxidante estándar sintético que se emplea comúnmente en aplicaciones bioquímicas con el objetivo de que el estrés inducido por procesos de oxidación disminuya. Los ET ayudan a comprender la capacidad antioxidante de una muestra desconocida y representan el promedio de esta capacidad y se basa en unidades de equivalentes Trolox.

Además, en los análisis de DPPH y ABTS se estableció el IC_{50} de los extractos. El valor de IC_{50} se determinó utilizando una curva elaborada con los valores del % de inhibición contra las diferentes concentraciones empleadas de los pigmentos.

Para los ensayos de FRAP los resultados fueron expresados como μmol de equivalentes trolox (ET), mientras que los valores de la capacidad de los pigmentos para inhibir la hemólisis inducidas por el AAPH fue expresada en porcentaje de inhibición.

Ensayo DPPH•

El ensayo DPPH• se realizó mediante el método de Brand-Williams y col. (1995) el cual cuantifica la reducción del radical DPPH por la presencia de grupo hidroxilo presentes en el compuesto antioxidante. Al llevarse a cabo esta reacción induce una decoloración del reactivo. El mecanismo que evalúa el ensayo de DPPH es mixto (HAT/SET). Para este ensayo se utilizaron diferentes diluciones (5 mg/mL 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL y 0.3125 mg/mL) de los que se tomaron 100 μL y se agregaron 900 μL de DPPH, se usó como control negativo 100 μL de etanol y 900 μL de DPPH, como control positivo se tomaron 900 μL de etanol con 100 μL del extracto. Se determinó la absorbancia (515 nm) después de 30 min de incubación utilizando un espectrofotómetro UV (Thermo Scientific, Multiskan GO). La inhibición del radical DPPH se expresó se calculó utilizando la **Ecuación 2**.

$$\text{Inhibición radical DPPH \%} = [(A_1 - A_2)/(A_1)] \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde: A1 es la absorbancia del control y A2 es la absorbancia de la muestra

Ensayo ABTS•+

El ensayo ABTS•+ se realizó mediante el método de Re y col. (1999) el cual mide la interacción del radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinal 6-sulfonato) con especies que pueden donar ya sea hidrógeno o electrones, induciendo esto una decoloración del reactivo. El ensayo ABTS evalúa dos mecanismos HAT y SET. Para este ensayo se preparó una solución del radical ABTS con 19.3 mg de ABTS disuelto agua (5 mL). La mezcla se mantuvo a 25 °C en la oscuridad durante 16 h antes de su uso. Se tomó un mL de solución del radical ABTS y se mezclaron con metanol (50 mL). Posteriormente se realizaron diluciones a partir de diferentes concentraciones (5 mg/mL 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL y 0.3125 mg/mL) de las que se tomaron 100 µL y se agregaron 900 µL de ABTS, se usó como control negativo 100 µL de metanol y 900 µL de ABTS, como control positivo se tomó 900 µL de metanol con 100 µL del extracto. La absorbancia (734 nm) se determinó después de 30 min de incubación utilizando un espectrofotómetro UV (Thermo Scientific, Multiskan GO). La inhibición del radical ABTS se calculó utilizando la **Ecuación 3**.

$$\text{Inhibición radical ABTS \%} = [(A_1 - A_2)/(A_1)] \times 100 \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde: A1 es la absorbancia del control; A2 es la absorbancia de la muestra

Ensayo FRAP

El ensayo FRAP se llevó a cabo siguiendo lo descrito por Benzie y Strain (1996), con algunas modificaciones. El mecanismo que evalúa el ensayo FRAP es SET. Para este análisis se obtuvo una disolución a base de un buffer de acetato de sodio (pH 3.6, 300 mM), FeCl₃ (20 mM) y TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) solución (10 mM) y HCl (40 mM). La solución de trabajo FRAP se preparó en una relación 10: 1: 1 (buffer: FeCl 3: TPTZ). Se llevó a cabo mediante diluciones de diferentes concentraciones (5 mg/mL 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL y 0.3125 mg/mL), de la cuáles 100 µL fueron mezcladas con 900 µL de FRAP. La absorbancia (638 nm) fue medida después de un periodo de incubación de 30 min.

Determinación de la Actividad Anti Hemolítica

El ensayo de actividad anti hemolítica se basó en lo descrito por Luy y col. (2010), el cual se basa en medir la capacidad que posee un compuesto activo en inhibir la

hemólisis inducida por el radical AAPH. Para ello se extrajeron 5 mL de sangre humana de voluntarios sanos, mediante punción venosa. La suspensión de eritrocitos se preparó al 10%, se centrifugó a 2000 x g durante 10 min. Posteriormente se realizaron tres lavados con solución isotónica.

Para determinar la actividad anti hemolítica de los extractos, se tomaron 100 µL de la solución de glóbulos rojos a los cuáles se adicionaron 100 µL de radical AAPH (2,2'-azobis- [2-metilpropionamidina]) y 100 µL de los extractos. Las muestras se dejaron reposar por 3 horas a 37°C y en agitación continua. Posteriormente se les adicionó PBS (1 mL) y centrifugó (2000 x g, 10 min, 4°C). La absorbancia fue leída a 540 nm, usando como controles una suspensión de eritrocitos y el radical AAPH con eritrocitos. La actividad antihemolítica se caculó utilizando la **Ecuación 4**.

$$\text{Inhibición Hemolítica \%} = [(AAPH - HS)/(AAPH)] \times 100 \quad \text{(Ecuación 4)}$$

donde: AAPH es la absorbancia de la hemólisis inducida por el radical; HS es la absorbancia de la inhibición de la hemólisis de los tratamientos.

Prueba de Antimutagenicidad

El ensayo de Ames evalúa la capacidad que poseen ciertos compuestos químicos de actuar como mutágenos. La prueba utiliza cepas de *Salmonella typhimurium* alteradas genéticamente, las cuales presentan mutaciones en genes involucrados en el proceso producción de histidina. Por lo que las bacterias requieren histidina para su crecimiento. En esta prueba examina la potencialidad de un compuesto para inducir la reversión de las mutaciones en *S. typhimurium* para que sea capaz de crecer sin la fuente externa de histidina (Levy y col., 2019).

La prueba de antimugenicidad se realizó de acuerdo con el ensayo descrito por Maron y Ames, (1983). El ensayo se realizó usando 100 µL de cepas de *Salmonella typhimurium* TA100 cultivadas durante 12 h (1×10^9 células / mL), 100 µL de los extractos pigmentados (0.005, 0.05, 0.5 y 5.0 mg / mL) y el agente mutagénico Azida de Sodio (5 µg por placa) en placas de agar mínimamente glucosado por triplicado. Se usó el extracto (100 µl) sin mutágeno como control negativo. Las colonias revertantes fueron contabilizadas después de una incubación por 48 h a 37 °C. El porcentaje de inhibición de la actividad mutagénica fue calculado utilizando la **Ecuación 5**.

$$\text{Inhibición (\%)} = 1 - \left(\frac{A-C}{B-C} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde: A = número de revertantes por placa en presencia del mutágeno y de las muestras; B = número de revertantes por placa en el control positivo (mutágeno solo); C = número de revertantes espontáneas.

Ensayo AntiProliferativo

El principio de este ensayo se basa en la reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) que es inducida por la generación de las coenzimas NADH y NADPH. Estas coenzimas son producidas durante el proceso metabólico de las células por acción de enzimas deshidrogenasas y reductasas como la succinato-deshidrogenasa y reductasas citosólicas. El MTT en estado oxidado es de color amarillo y soluble, al reducirse se transforma en formazán, que es insoluble en agua y presenta un coloración azul-violeta. La cantidad formazán generada esta directamente relacionada con la viabilidad celular después del tratamiento, que indica la capacidad de un compuesto para impedir la reproducción celular (agente anti proliferativo). Este análisis es ampliamente empleado para evaluar la capacidad de un potencial agente antiproliferativo.

La potencial actividad antiproliferativa de los pigmentos obtenidos fue evaluada *in vitro* en las líneas celulares MDA-MB-231 (cáncer de mama) (ATCC® HTB-26™) y 22Rv1 (cáncer de próstata) (ATCC® CRL-2505™) usando el ensayo de MTT (Mosmann , 1983; Denizot y Lang, 1986). Las células se cultivaron en el medio DMEM (Dubelco's modified Eagle Medium Applichem) el cual contenía D-glucosa, L-glutamina y piruvato sódico. Las células se sembraron en una placa de 96 pozos a una densidad de 10 000 células por pozo. Se incubaron por 12 h a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%, para permitir su adherencia. Después de la incubación, las células se trataron con 100 µL de los extractos pigmentados a diferentes concentraciones de (25, 50, 100 y 200 µg/mL), disueltos en DMSO (Dimetil Sulfóxido) al 0.2 %, y se incubaron por 48 h. Se tuvo como control al DMSO al 0.2 % y las células epiteliales de los pigmentos de retina (ARPE-19, ATCC® CRL-2302™). Después de 48 h de tratamiento, se agregaron 10 µL de la solución MTT (5 mg/mL) y se incubaron por 4 h a 37°C para permitir la

formación de cristales de formazán. Los cristales formados se disolvieron con 100 µl de dodecilsulfato de sodio y se mantuvieron por 12 h a temperatura ambiente hasta la disolución de los cristales. La cantidad de formazán producido, relacionado células viables, se midió empleando un lector de placas de ELISA ((Benchmark Microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a una longitud de onda de 630 nm. La viabilidad celular fue calculada aplicando la **Ecuación 6**.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \left(\frac{(A-C)}{(B-C)} \right) \times 100 \quad \text{(Ecuación 6)}$$

donde: A es la absorbancia de las muestras con las células; B es la absorbancia de las muestras sin células; C es la absorbancia del control con las células; D es la absorbancia del control sin las células..

Análisis Instrumental

Espectrometría de Infrarrojo Transformada de Fourier (FTIR)

La espectrofotometría FTIR es una técnica de análisis espectroscópica ampliamente utilizada, que permite analizar compuestos químicos estudiando la vibración de sus enlaces. La absorción en el infrarrojo (IR) de un determinado enlace molecular presente en una muestra, se produce cuando un fotón IR con una determinada frecuencia de vibración interactúa con el mismo produciendo así un intercambio de energía y generando una señal. La señal resultante genera un espectro que representa la “huella” molecular de la muestra analizada. El FTIR permite identificar los enlaces en la denominada región “Medio” del IR, que es una zona de mayor riqueza de información, muy deseable para el análisis e identificación de compuestos.

Los espectros de FTIR de los pigmentos se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin Elmer Spectrum GX (Waltham, MA, USA). Las pastillas obtenidas de los extractos liofilizados (1 mg) mezcladas con bromuro de potasio (100 mg) se obtuvieron empleando una prensa hidráulica. Los espectros de FT-IR (16 exploraciones) se analizaron en el modo de transmitancia (400 -4000 cm⁻¹) a 4 cm⁻¹ de resolución. El espectro se analizó un con el software v.10 Spectrum. El sistema se purgó con nitrógeno durante la adquisición de los espectros y las lecturas se hicieron a 24±1 °C.

Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN¹H)

El análisis RMN mide la capacidad de las sustancias de emitir una radiación electromagnética, permitiendo dilucidar posibles estructuras y se fundamenta en el comportamiento de núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones al exponerse a un campo magnético (Millán, 2016). El campo magnético produce un desdoblamiento del spin nuclear, induciendo transiciones entre los protones o neutrones debido a la radiación electromagnética. La absorción de energía de los núcleos atómicos genera una transición, que es detectada, amplificada y registrada, que es lo que se denomina señales. En el método de RMN de protón (¹H) el área de una señal de resonancia se relaciona con el número de núcleos que genera esa señal, que al integrarse permite identificar al núcleo. El acoplamiento entre espines nucleares de núcleos vecinos genera desdoblamientos de señales. Las señales son separadas por una frecuencia característica por lo que no todas las líneas espectrales son simples (Sanders y Hunter, 1988).

Para llevar a cabo este análisis se procedió de acuerdo con la metodología descrita por Esparza-Espinoza (2022a). El espectro de RMN¹H de los extractos pigmentados liofilizados se obtuvo en un espectrófotometro de resonancia magnética nuclear Bruker Avance 400. Las muestras (1 mg) se disolvieron en una mezcla de cloruro de deuterio (DCl) y óxido de deuterio (D₂O). Los parámetros establecidos para la obtención del espectro fueron: 2s (demora), 4.56 s (tiempo de obtención), 5 ls (pulso), 30 (ángulo), 64 (el número de escaneos) y 3.35 kHz (para la obtención del espectro).

Análisis Estadístico

El presente trabajo se basó en un diseño completamente al azar y empleando un análisis de varianza de una sola vía para establecer si había diferencias entre los dos procesos de extracción empleados para la obtención de los extractos pigmentados, metanol acidificado e hidróxido de sodio. Las variables respuesta fueron rendimiento, concentración de proteína, actividad antioxidante, actividad antimutagénica y actividad antiproliferativa. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se reportan como el promedio \pm la desviación estándar. La comparación de medias se realizó aplicando la

prueba t de Student. Para los análisis de FTIR y RMN¹H se aplicó una estadística descriptiva. El paquete estadístico que se empleó fue el JMP (SAS, Cary, NC, USA). Las diferencias entre ambos tratamientos se consideraron significativas empleado un nivel de significancia menor o igual al 95% ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Rendimiento de Extracción

Los extractos obtenidos fueron analizados primeramente por sus características físicas y su solubilidad en diferentes disolventes. Los dos extractos pigmentados obtenidos presentaron coloraciones asociadas a compuestos omocrómicos (Van den Branden y Declair, 1976), cuando se empleó al MeOH-HCl como disolvente se apreció un color rojizo, mientras que los extractos obtenidos con NaOH 0.5 M era de color naranja. Como complemento de esta evaluación física, la prueba de solubilidad utilizando diferentes solventes es un parámetro indicador de la naturaleza de extractos pigmentados (Kiyomoto y col., 1969). Ambos extractos presentaban solubilidad en H₂SO₄ y MeOH-HCl descartando la presencia de pigmentos como los carotenoides, además los extractos con NaOH fueron insolubles en DMSO, indicando la presencia de una mayor concentración de otros compuestos como las proteínas. La alta solubilidad en MeOH-HCl al 2% hace suponer que los principales compuestos en los pigmentados obtenidos pueden pertenecer al grupo omocromos (Van den Branden y Declair, 1976).

Los resultados que se muestran en la **Tabla 5** indican que se logró un alto rendimiento de recuperación cuando se usó NaOH como sistema de extracción ($p \leq 0.05$). Los mayores rendimientos detectados empleando NaOH se atribuyen a que este disolvente es empleado para la solubilización y remoción de proteínas (Fennema, 1996). Esto se pudo confirmar al establecer la concentración de proteína en ambos extractos, ya que en en los extractos obtenidos con MeOH-HCl se detectaron valores más bajos de este compuesto que en aquellos donde se empleó NaOH. Los rendimientos presentados en los extractos MeOH-HCl son similares a los reportados por Esparza-Espinoza (2022a) al trabajar con la misma especie, sin embargo, menores a los detectados por Chan-Higuera y col. (2019a) que trabajó con calamar. Las diferencias entre especies se atribuyen a los diferentes comportamientos biológicos de cada una, el calamar tiende a ser más activo que el pulpo, lo cual puede impactar la composición química de sus tejidos (Morales y col., 2000).

Tabla 5. Rendimiento de extracción y concentración de proteína de pigmentos de piel de pulpo extraídos con dos solventes: metanol-HCl (MeOH-HCL) e hidróxido de sodio (NaOH)¹

Determinación	MeOH-HCl	NaOH
Rendimiento (g/100g)	196±36 ^b	258±12 ^a
Proteína (mg/mL)	28.8±0.6 ^b	34.3±1.3 ^a

¹Los valores representan la media ± desviación estándar de cuatro réplicas. La diferencia entre los tratamientos están señalados con diferentes letra (a,b) ($p \leq 0.05$)

Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante de diferentes compuestos extraídos de alimentos o sistemas biológicos puede ser evaluada por varios métodos, de los más empleados se encuentran los ensayos basados en la reducción de los radicales DPPH y ABTS, así como el poder reductor (FRAP) y la inducción de hemólisis por el radical AAPH. Por lo que estos métodos fueron seleccionados para establecer el potencial poder antioxidante de los pigmentos obtenidos (**Tabla 6**).

La actividad DPPH de los extractos dependió de la concentración empleada. La **tabla 6** indica que los extractos obtenidos con MeOH-HCl tuvieron mayor capacidad para transferir átomos de hidrógeno ($p < 0.05$). Estas diferencias indican que el DPPH posee mayor afinidad por los compuestos extraídos con MeOH-HCl, como pudiesen ser los grupos amino presentes en éstos extractos (Sharma y Bhat, 2009) mientras que al evaluar la actividad por el ensayo de ABTS, los extractos obtenidos empleando NaOH mostraron mayor capacidad para reducir el radical $ABTS^{\bullet+}$ ($p \leq 0.05$) probablemente debido a la presencia de aminoácidos con carga presentes en éstos extractos (Suárez-Jimenez y col., 2019).

La capacidad para inhibir el radical DPPH de ambos extractos obtenidos se consideró poco efectiva ya que valores de IC_{50} son mayores a los reportados extractos pigmentados de la cabeza de diferentes especies de camarón (1.43–2.98 mg/mL) (Kim y col., 2014) y piel de calamar (6.49 mg/mL) (Chan-Higuera y col., 2019b). Sin embargo, se podría considerar que los extractos obtenidos con NaOH poseen mayor habilidad de inhibir el radical $ABTS^{\bullet++}$, ya que los valores son similares o incluso menores para carotenoides extraídos de *Penaeus borealis*, *P. hypsinotus* y *P. japonicus* (3.34-7.94 mg/mL) (Kim y col., 2014) y de omocromos de *D. gigas* (6.54 mg/mL) (Chan-Higuera y col., 2019b).

El efecto del disolvente utilizado en el método de extracción se apreció al evaluar la actividad antioxidante por el método de FRAP y de la inhibición de la hemólisis (**Tabla 6**). La mayor capacidad para reducir el Fe^{+3} (ion férrico) a Fe^{+2} (ion ferroso) se detectó en los extractos pigmentados obtenidos con MeOH-HCl. Sin embargo, los valores obtenidos son menores a los reportados para extractos

Tabla 6. Actividad antioxidante de los pigmentos obtenidos de la piel de pulpo empleando dos diferentes sistemas de extracción metanol acidificado (MeOH-HCl) e hidróxido de sodio 0.1 N (NaOH)

Método	MeOH-HCl	NaOH
DPPH (ET $\mu\text{mol/g}$)	107.5 \pm 1.4 ^a	24.7 \pm 1.9 ^b
IC ₅₀ DPPH (mg/mL)	9.1 \pm 0.5 ^b	39.5 \pm 6.5 ^a
ABTS (ET $\mu\text{mol/g}$)	366.9 \pm 2.9 ^b	2177.6 \pm 5.1 ^a
IC ₅₀ ABTS (mg/mL)	16.5 \pm 3.4 ^a	2.8 \pm 0.2 ^b
FRAP (ET $\mu\text{mol/g}$)	100.1 \pm 0.06 ^a	32.8 \pm 0.04 ^b
Inhibición de hemólisis (%) ²	100 ^a	64 ^b

¹Los valores representan la media \pm desviación estándar de cuatro réplicas. Las letras (a,b) indican diferencias debido al efecto del tratamiento ($p \leq 0.05$).

pigmentados de la piel de pulpo (304 $\mu\text{mol ET/g}$) y calamar (185 $\mu\text{mol ET/g}$) (Esparza-Espinoza y col., 2022a) y de la melanina del *Loligo formosona* (171 $\mu\text{mol ET/g}$) (Vate y Benjankul, 2006), pero mayores a los carotenoides obtenidos del exoesqueleto del camarón *Litopenaeus schimitti* (46.27 $\mu\text{mol ET/g}$) (Macena Lira y col., 2017).

La actividad anti hemolítica al usar al eritrocito como modelo vivo, en el cual se detecta como el radical AAPH afecta a los eritrocitos, ya que este radical tiene la capacidad de destruir la membrana lipídica, proteínas e inducir así la hemólisis (González y col., 2021). La **tabla 6** muestra la capacidad inhibir la hemólisis inducida por el radical AAPH de los extractos pigmentados obtenidos con MeOH-HCl y NaOH. La tabla indica que los extractos obtenidos con MeOH-HCl fueron más efectivos para prevenir la hemólisis. Lo que hace suponer que los extractos MeOH-HCl poseen una mayor potencial de evitar el daño celular causado por el radical, y de esa manera podrían presentar mayor potencial para disminuir la viabilidad de células cancerosas.

A la fecha no hay estudios donde hayan estudiado la capacidad antihemolítica de extractos pigmentados de la piel de pulpo, por lo que los resultados fueron comparados con investigaciones donde se trabajó con pigmentos. González-Vega y col. (2021), analizaron el porcentaje de inhibición de hemólisis de extractos pigmentados de la microalga *Navicula incerta* y reportaron valores de 96.7% de inhibición, así mismo, se ha reportado que pigmentos, como las flavinas, son capaces de inhibir la oxidación y la formación de radicales libres que inducen alteraciones en el ADN (Liu y Huang, 2015).

Aunque se requieren más estudios, la alta capacidad detectada en los extractos pigmentados obtenidos con MeOH para inhibir los radicales libres producidos por el AAPH y la de atrapar los radicales ABTS de los extractos MeOH, extractos se puede atribuir a la presencia de protones aromáticos y grupos amino (Esparza-Espinoza y col., 2022a), ya que se ha reportado que la presencia de aminas primarias y secundarias asociadas a anillos aromáticos (Shamim y col., 2014) tienen la capacidad de donar o aceptar electrones (Romero y Martínez y col., 2015).

Capacidad Antimugénica

El ensayo de Ames permite determinar las alteraciones que se pueden inducir en la *Salmonella typhimurium* por diferentes agentes físicos y químicos (Maron y Ames, 1983). Para este ensayo se emplean cepas de *S. typhimurium* con diferentes mutaciones en los genes que codifican para producción de enzimas relacionados con la síntesis de histidina. Las mutaciones son el blanco para que diferentes mutágenos actúen sobre el ADN. Estas bacterias solo crecen en presencia de histidina, por lo que el número de colonias revertantes es constante para cada cepa (revertantes espontáneas) y cuando son expuestas a un compuesto mutágeno, el número de colonias revertantes aumenta conforme aumenta la concentración de dicho mutágeno. Matsumura y col. (1995) indicó que al evaluar la mutagenicidad inducida por azidas alcalinas, este compuesto generaba una potente actividad solamente contra *S. typhimurium* TA100, por ello en este estudio se trabajó usando esa cepa.

Antes de establecer la acción antimutágena de los extractos, se evaluó el efecto de las muestras en el crecimiento bacteriano, se expuso la cepa *S. typhimurium* TA 100, en una placa de agar nutritivo a tres concentraciones 50 mg/mL, 5 mg/mL y 0.5 mg/mL de cada extracto. Esta determinación permitió establecer que al emplear la concentración más alta (50 mg) los extractos pigmentados pueden llegar a presentar un efecto tóxico sobre la bacteria, inhibiendo su crecimiento. Así mismo, se observó que el disolvente empleado para la extracción de los pigmentos no presentaba un efecto tóxico sobre la cepa usada en el ensayo de Ames.

El mutágeno evaluado en este trabajo fue la azida de sodio, ya que se considera un compuesto altamente mutagénico. La azida de sodio es un agente químico ampliamente utilizado en la agricultura para eliminar parásitos del suelo (Talavera y col., 2019). La capacidad de mutación de la azida de sodio se verificó al detectar que el número de revertantes por placa de las cepas testigos aumentó más del doble en presencia del mutágeno (**Figura 6**).

Al comparar el porcentaje de inhibición entre ambos extractos no se detectaron diferencias entre ellos en ninguna de las concentraciones evaluadas ($p > 0.05$) (Figura 6).

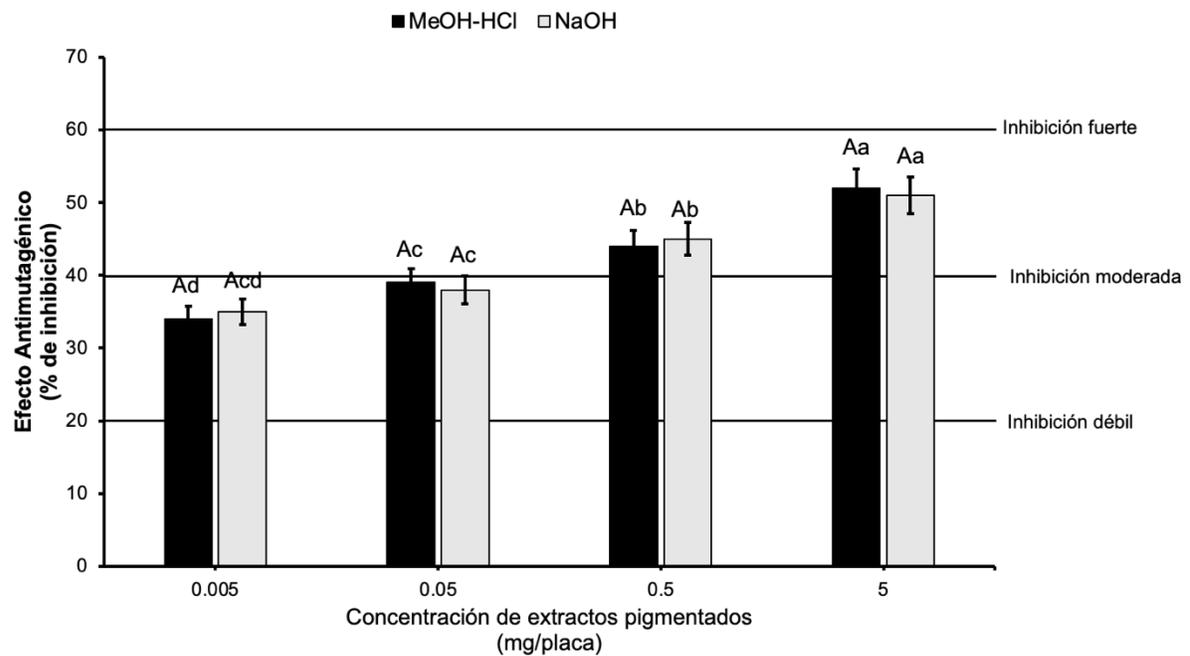


Figura 6. Efecto de los extractos pigmentados extraídos con metanol acidificado (MeOH-HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) de la piel de pulpo en la mutagenicidad inducida por la azida de sodio (5 μ g AzNa) en *Salmonella typhimurium* TA100. El número de revertantes en el control negativo fue de 195 ± 13 y en presencia del mutágeno 3009 ± 154 . Las columnas representan la media \pm error estándar de tres réplicas. Las letras (a,b,c,d) indican diferencias debido a la concentración ($p \leq 0.05$) y la letra (A) indica que no hay diferencias entre los tratamientos ($p > 0.05$).

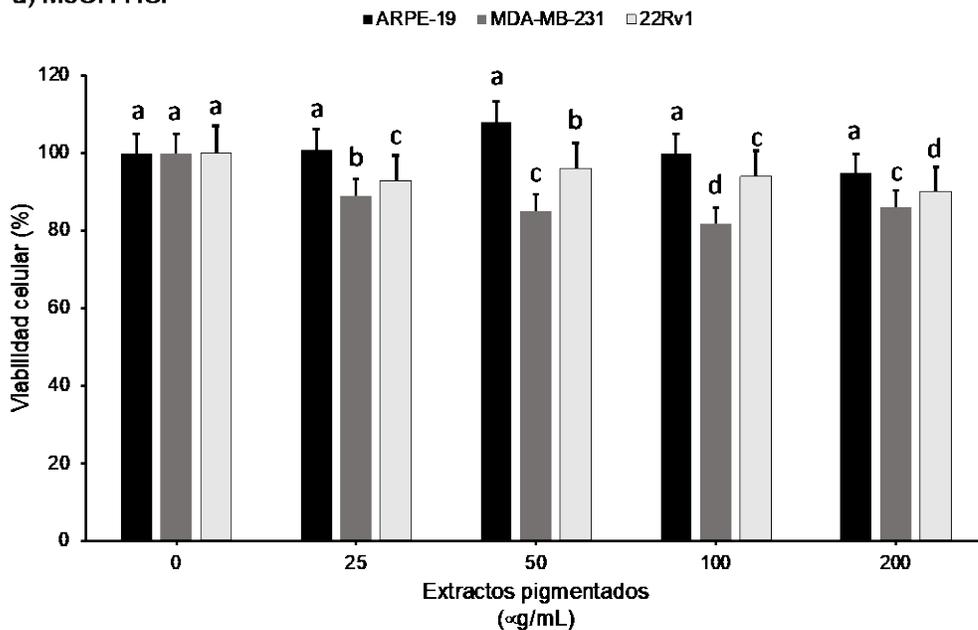
En cuanto al potencial antimutagénico este se consideró débil (20%–40%) para la concentración más baja (0.005 mg/placa) y moderada (40–60%) al trabajar con 0.05 mg/placa (Ikken, 1999). Este resultado sugiere que los compuestos químicos presentes en la piel de pulpo podrían ejercer un efecto antimutagénico de débil a moderado sobre la acción de la AzNa. Alpsy y col. (2009) indicaron que el mecanismo de los mutágenos está mediado por la producción de radicales libres, mientras que Chan y col. (2019b) indicaron que moléculas contenidas protones aromáticos y grupos amino podrían funcionar como agentes antimutagénicos previniendo así la formación de radicales. Lo cual hace suponer que en ambos extractos se encuentran presentes este tipo de moléculas, tal como se observó en los estudios de FTIR y RMN, que más adelante se discuten.

Capacidad Antiproliferativa

El ensayo antiproliferativo se realizó en tres líneas celulares la 22rv1 que corresponde a carcinoma de próstata y la MDA-MB correspondiente a células de cáncer de mama, ARPE-19 correspondiente a células de retina se hicieron triplicados del ensayo de MTT para cada línea celular, los resultados se expresaron como el porcentaje de células viables.

Para determinar el porcentaje de células protegidas por los extractos pigmentados sobre las líneas celulares estudiadas, se realizaron los ensayos de viabilidad celular. Como se muestra en la **Figura 7**, estos resultados fueron graficados como el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la concentración de extracto pigmentado añadida a los cultivos celulares. Los dos extractos pigmentados mostraron baja actividad antiproliferativa en el rango de concentración aplicada (25–200 $\mu\text{g/mL}$). Al comparar ambos extractos se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los mismos a las diferentes concentraciones estudiadas. Siendo los extractos obtenidos con NaOH los que mostraron la mayor inhibición en la proliferación de las células cancerígenas estudiadas. Los extractos obtenidos con NaOH a la concentración más alta lograron inhibir un 27% la proliferación de las células cancerígenas de mama y un 21% las de próstata, mientras que los de MeOH-HCl a esa misma concentración la inhibición fue del 14% para mama y de un 10% para próstata.

a) MeOH-HCl



b) NaOH

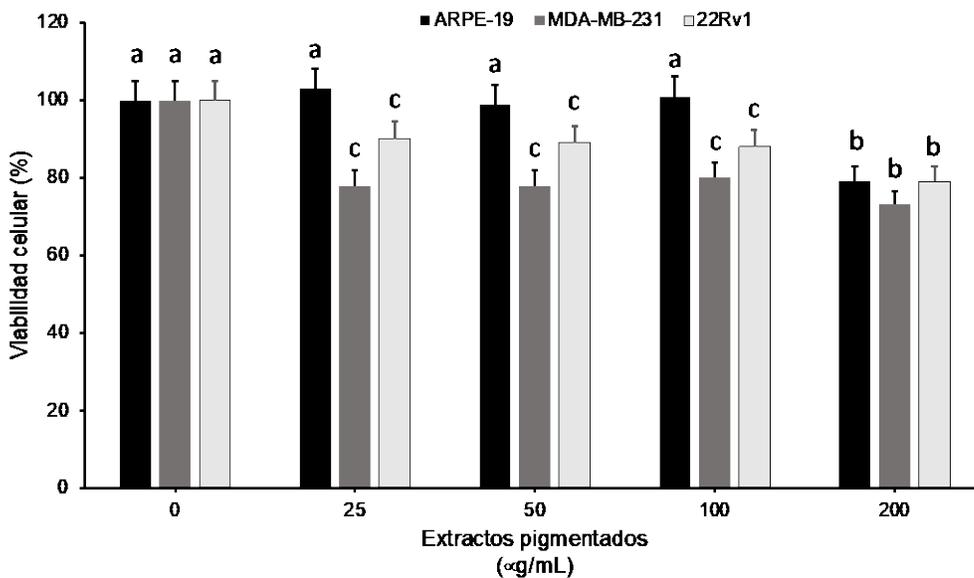


Figura 7. Viabilidad de tres líneas celulares al ser expuestas a los extractos pigmentados de la piel de pulpo extraídos con: a) metanol acidificado); b) hidróxido de sodio. ARPE-19: células epiteliales de los pigmentos de retina; MDA-MB-231: células de cáncer de mama; 22rv1: células de cáncer de próstata. Las columnas representan la media \pm error estándar de tres réplicas. Las letras (a,b,c) indican diferencias debido a la concentración ($p \leq 0.05$).

Loubn y col. (2021) al evaluar extractos metanólicos obtenidos de la bacteria *Borrelia hispánica* reportaron un inhibición entre un 10 y 20% en el carcinoma de próstata y un 10% en cáncer de mama. Cruz-Ramírez y col. (2015) reportaron que reportaron que las fracciones metanólicas obtenidas de tentáculos de pulpo no logaron inhibir la proliferación del linfoma B (M12.C3.F6). Más aún, ambos extractos no afectaron a las células epiteliales de los pigmentos de la retina (ARPE-19) (Figura 7). Por lo que éstos resultados se consideran alentadores ya que se trabajó con extractos obtenidos directamente de la piel del pulpo.

Análisis Instrumental

Espectrometría de FTIR

Las frecuencias a las cuales se observaron los principales picos o señales en el espectro de FTIR de los pigmentos de la piel de pulpo liofilizada provenientes del MeOH-HCl se muestran en la **Figura 8a**. En el espectro obtenido de dichas muestras se identificaron bandas de vibración asociadas a compuestos omocromicos: (i) una banda alrededor de los 3450 cm^{-1} , que indica la presencia de grupos carboxílicos y enlaces N–H y C–H; (ii) una banda a los $1500\text{--}1425\text{ cm}^{-1}$, la cual es característica de los ácidos carboxílicos y de los enlaces N–H y C–H; (iii) una banda a los $1240\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$, que indica las vibraciones asociadas C–O y C–N. Más aún, se detectaron bandas a los 1740 cm^{-1} (enlace carboximetoxi C–O), a los 1670 cm^{-1} (enlaces quinónicos C–O) y un comportamiento muy similar en la zona de las huellas digitales ($750\text{--}525\text{ cm}^{-1}$) característico de los omocromos de tipo omatina, tal como la xantomatina de acuerdo a los reportados para extractos pigmentados de la piel de calamar (Aubourg y col., 2016; Chan-Higuera y col., 2019 a,b).

En el espectro de FTIR de los pigmentos extraídos con NaOH se aprecian bandas similares al de los extractos obtenidos con MeOH-HCl, pero con intensidades diferentes en los picos (**Figura 8b**). Las señales detectadas en este espectro pueden ser asociadas a compuestos omocromicos: 3430 cm^{-1} , 1740 cm^{-1} y $1240\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$.

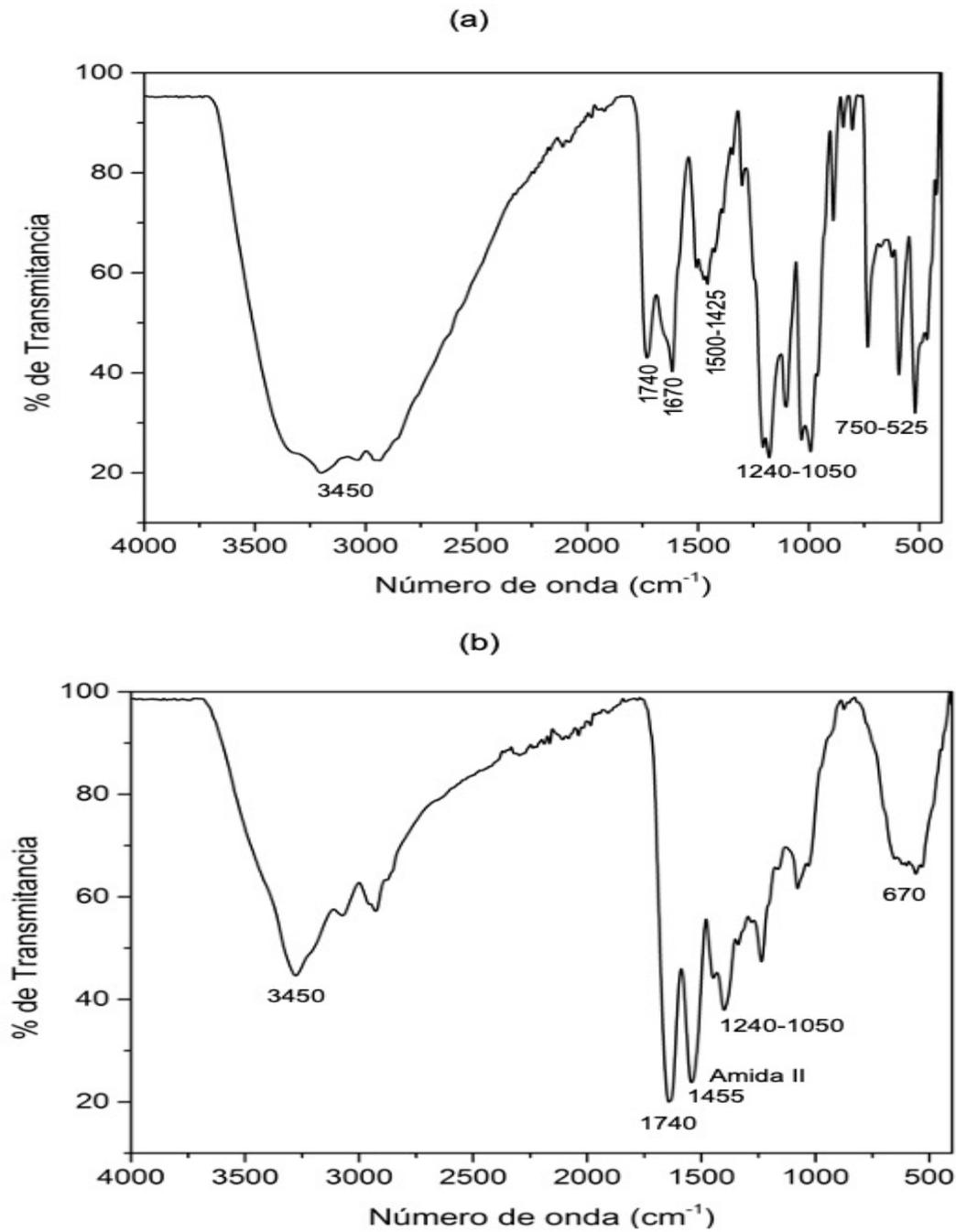


Figura 8. Espectro de FTIR de los extractos pigmentados obtenidos de la piel de pulpo extraídos con: (a) metanol acidificado; (b) hidróxido de sodio.

Sin embargo, también se identificaron regiones vinculadas a proteínas: 1455 cm^{-1} (amida II) y una huella digital (670 cm^{-1}) característica de los grupos CH_2 de la cadena lateral de aminoácidos como la glicina y prolina (Roberts y Jardetzky, 1970), lo que sugiere un mayor número de grupos proteicos en esta muestra.

Espectrometría de NMR¹H

Para poder analizar los espectros de NMR¹H de los extractos pigmentados (**Figura 8**) se realizarán comparaciones con con estudios similares.

Las señales detectadas para cada pigmento obtenido fueron diferentes. Los pigmentos obtenidos con MeOH-HCl (**Figura 9a**) muestran señales entre δ 9.0 y 6.5 ppm las cuáles están asociada con protones aromáticos y protones del grupo amino. Así mismo se aprecian cambios químicos de δ 4.5 a 3.0 ppm asociados a aminas vinculadas a un hidrocarburo aromático. Mientras que las señales observadas en δ 3.0 a 2.0 ppm indican protones unidos a compuestos de carbonilo y nitrógeno. La última sección (δ 2.0–0.5 ppm) se vincula a compuestos alifáticos. Al comparar la porción de espectro de 9.0–6.5 ppm con espectros obtenidos de omocromos provenientes de la piel de pulpo y calamar (Esparza-Espinoza y col., 20221; Chan-Higuera y col., 2021a,b), sugieren que en éstos extractos se encuentran compuestos como quinurenina, dihidroxantomatina y xantomomatina.

En el espectro de los extractos obtenidos con NaOH (**Figura 9b**) se detecta una señal entre δ 7.0 y 6.5 ppm asociada con protones aromáticos. Los cambios químicos de δ 4.0 a 3.0 ppm indican aminas sustituidas por radicales OH. Las señales detectadas en δ 2.5 a 1.0 ppm estan vinculadas a protones unidos a compuestos de carbonilo y nitrógeno. La sección final (δ 1.0 - 0.5 ppm) está asociada a grupos alifáticos. Al comparar la porción de espectro de 7.0–6.5 ppm y δ 4.0 a 3.0 ppm con espectros obtenidos de hidrolizados provenientes de la piel calamar (Cuevas-Acuñas y col., 2021) presupone que en éstos extractos, sí bien pudiesen estar presente pigmentos, también se detectan señales que pudiesen indicar la presencia de aminoácidos como la fenilalanina (δ 7.0–6.5) y la glicina (δ 4.0–3.0). Sin embargo, con la finalidad de confirmar el tipo de componentes químicos presentes en ambos extractos se requieren realizar más estudios tendientes a procesos de purificación.

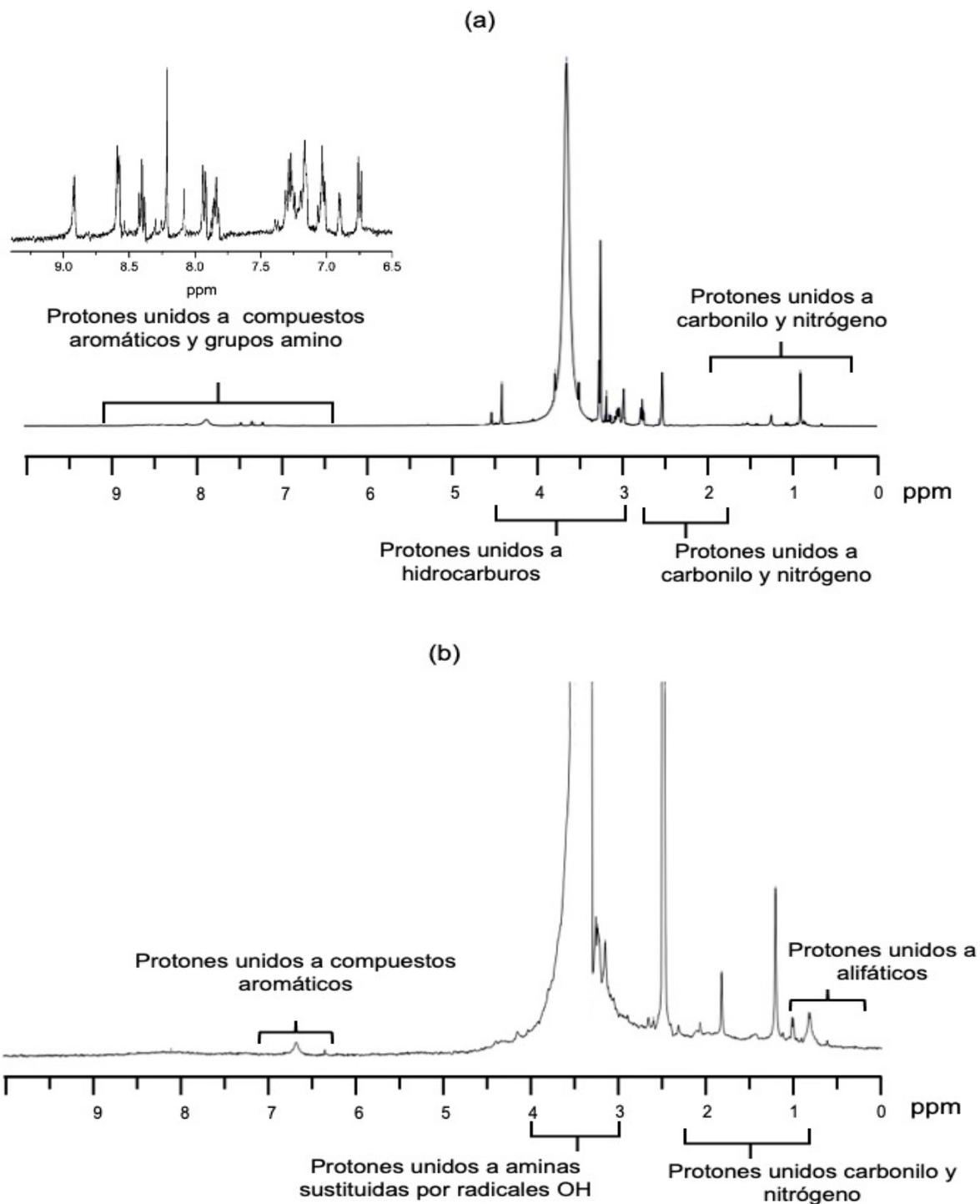


Figura 9. Espectro de NMR¹H de los extractos pigmentados obtenidos de la piel de pulpo extraídos con: (a) metanol acidificado; (b) hidróxido de sodio.

Aunque los espectros de FTIR y RMN obrtenidos no pueden ser utilizados como indicadores absolutos de los componentes químicos presentes en los extractos pigmentados, pueden generar un estimación relativa de la composición química de los mismos. La mayor actividad antioxidante que mostrarón los extractos MeOH-HCl en los ensayos DPPH, FRAP y hemólisis quizá se deban a la presencia de protones aromáticos vinculados a grupo amino (Chan-Higuera y col., 2019b; Esparza-Espinoza y col., 2022a) y la detección de aminas sustituidas por grupos OH podrían probablemente favorecer el mayor potencial antiproliferativo mostrada por los extractos obtenidos con NaOH (Suárez-Jimenez y col., 2019).

Los mecanismos antioxidantes, antimutagénicos y antiproliferativos de los pigmentos presentes en la piel del pulpo aún no han sido aún elucidados. Sin embargo, por la detección de señales asociadas a omocromos, los cuáles están conformados por anillos de fenoxazona, se podría inferir que por la presencia de dichos compuestos en los pigmentos obtenidos con MeOH-HCl, estos poseen la capacidad de actuar como sistemas aceptores y donadores de electrones (Romero y Martínez, 2015). Así mismo, la unidad iminoquinona presenten en dichos anillos pudiese estar participando en la disminución de las mutaciones inducidas por mutágenos (Bennett y col, 2012). Mientras que la presencia de ciertos aminoácidos, como la glicina y la fenilalanina detectados en los extractos NaOH quizá sean algunas de las moléculas responsables de bloquear la acción de especies reactivas al oxígeno y prevenir de esta manera el daño al ADN y su mutación (Tian y col., 2013).

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio, se lograron extraer pigmentos de la piel de pulpo que presentaron además de actividad antioxidante, propiedades antimutagénicas y antiproliferativas.

Los extractos obtenidos empleando como disolvente hidróxido de sodio presentó mayor potencial de actuar como agentes antiproliferativos y a los pigmentos extraídos con metanol acidificado inhibir la formación de radicales libres.

Los pigmento obtenidos con metanol acidificado pertenecen principalmente al grupo de los omocromos, mientras que en los obtenidos con NaOH están presentes moléculas asociadas a aminoácidos.

RECOMENDACIONES

Para esclarecer los componentes presentes en los extractos pigmentados obtenidos, se recomienda en futuro trabajos fraccionar los mismos.

Con el fin de determinar la presencia de proteínas asociadas a pigmentos, realizar estudios tendientes a la recuperación de este tipo de compuestos, así como efectuar análisis que permitan corroborar el tipo de proteína presente.

Afin de asegurar la inocuidad de los de los extractos pigmentados obtenidos, es recomendable que se lleven a cabo estudios donde se evalúe la toxicidad de los mismos.

Es necesario realizar estudios tendientes a establecer la estabilidad y el comportamiento químicos de los extractos pigmentados bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

REFERENCIAS

- Adamo, S., Hanlon, A. y Do, R. T. (1996). Cuttlefish (Cephalopoda) signal their intentions to conspecifics during agonistic encounters. *Animal Behaviour*, 52 (1), 73–81. <https://doi.org/10.1006/anbe.1996.0153>
- Alemán, A., Perez-Santin, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gomez-Guillen, M.C. y Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anti-cancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(4): 1044–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.010>
- Ali S.M., Mohammed T.A., Mandour A.M. y Abd El-Malek A.R. (2017). Structure of the ink apparatus and the funnel organ of the squid “*Sepioteuthis sepioidea*” (Cephalopoda: Loliginidae). *Egyptian Journal of Zoology*, 65, 35–50. <https://doi.org/10.12816/0037793>
- Aubourg, S. P., Torres-Arreola, W., Trigo, M., y Ezquerra-Brauer, J. M. (2016). Partial characterisation of jumbo squid skin pigment extract and its antioxidant potential in a marine oil system. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(9), 1293–1304. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500356>
- Avello M. y Suwaslky M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea 494, II Semana*, 161–172.
- Bennett, L. L., Rojas, S. y Seefeldt, T. Luna(2012). Role of antioxidants in the prevention of cancer. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, 4(4), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.jecm.2012.06.001>
- Bolognese, A., Liberatore, R., Riente, G. y Scherillo, G. (1988). Oxidation of 3-hydroxykynurenine. A reexamination. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 25 (4), 1247–1250. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570250439>
- Cao, W, Zhou, X., McCallum, N. C., Hu Z., Ni, Q. Z., Kapoor, U., Heil, Ch.M., Cay, K. S., Zand, T., Mantanona, A. J. y Jayaraman, A. (2021). Unraveling the structure and function of melanin through synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 143 (7), 2622–2637. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c12322>
- Chan-Higuera, J.E., Carbonell-Barrachina, A.A., Cárdenas-López, J.L., Kačániová, M., Burgos-Hernández, A. y Ezquerra-Brauer, J.M. (2019a). Jumbo squid

- (*Dosidicus gigas*) skin pigments: Chemical analysis and evaluation of antimicrobial and antimutagenic potential. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(2), 349–353. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.2.349-353>
- Chan-Higuera, J.E., Santacruz-Ortega, H.C., Carbonell-Barrachina, A.A., Burgos-Hernández, A., Robles-Sánchez, R.M., Cruz-Ramírez, S.G. y Ezquerra-Brauer, J.M. (2019b). Xanthommatin is behind the antioxidant activity of the skin of *Dosidicus gigas*. *Molecules*, 24, 3420. <https://doi.org/10.3390/molecules24193420>.
- Chakraborty, K. y Joy, M. (2020). High-value compounds from the molluscs of marine and estuarine ecosystem as prospective functional food ingredients: An overview. *Food Research International*, 137, 109637. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109637>
- Cloney, R. A. y Brocco, S. L. (1983). Chromatophore Organs, Reflector Cells, Iridocytes and Leucophores in Cephalopods. *American Zoologist*, 23, 581–592. <https://doi.org/10.1093/icb/23.3.581>
- Crookes, W. J., Ding, L. L., Huang, Q. L., Kimbell, J. R., Horwitz, J. y McFall-Ngai, M. J. (2004). Reflectins: The unusual proteins of squid reflective tissues. *Science*, 303 (5655), 235–238. <https://www.jstor.org/stable/3835944>
- Cruz-Ramírez, S.G., López-Sainz, C.M., Rosas-Burgos, E.C., Cinco-Moroyoqui, F.J., Velázquez, C., Hernández, J. y Burgos-Hernández, A. (2015). Antimutagenic, antiproliferative, and antioxidant effects obtained from octopus (*Paraoctopus limaculatus*). *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(4), 722–728. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0001>
- Cuevas-Acuña, D.A., Plascencia-Jatomea, M., Santacruz-Ortega, H.C., Torres-Arreola, W. y Ezquerra-Brauer, J.M. (2021). Development of chitosan/squid skin gelatin hydrolysate films: Structural, physical, antioxidant, and antifungal properties. *Coatings*, 11(9), 1088. <https://doi.org/10.3390/coatings11091088>
- DeMartini, D.G., Krogstad, D.V. y Morse, D.E. (2013). Membrane invagination facilitate reversible water flux driving tunable iridescence in a dynamic biophotonic

- system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (7), 2552–2556. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217260110>
- Derby, Ch. D. (2014). Cephalopod Ink: Production, chemistry, functions and applications. *Marine Drugs*, 12(5), 2700–2730. <https://doi.org/10.3390/md12052700>
- Deravi, L. F., Magyar, A. P., Sheehy, S. P., Bell, G. R. R., Mähger, L. M, Senft, S. L., Wardill, T. J., Lane, W. S., Kuzirian, A. M., Hanlon, R. T., Hu, E. L. y Parker, K. K. (2014). The structure-function relationships of a natural nanoscale photonic device in cuttlefish chromatophores. *Journal of the Royal Society Interface*, 11, 20130942. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0942>
- Dinneen, S. R., Osgood, R. M., Greenslade, M. E. y Deravi, L. F. (2017). Color Richness in Cephalopod Chromatophores Originating from High Refractive Index Biomolecules. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 8 (1), 313–317. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.6b02398>
- Esparza-Espinoza, D.M., Santacruz-Ortega, H.C., Chan-Higuera, J.E., Cárdenas-López, J.L., Burgos-Hernández, A., Carbonell-Barrachina, A.A. y Ezquerra-Brauer, J.M. (2022a). Chemical structure and antioxidant activity of cephalopod skin ommochrome pigment extracts. *Food Science Technology (Campinas)*, 42, e56520. <https://doi.org/10.1590/fst.56520>.
- Esparza-Espinoza, D.M., Plascencia-Jatomea, M. , López-Saiz, C.M., Parra-Vergara, N.V., Carbonell-Barrachina, A.A., Cárdenas-López, J.L. y Ezquerra-Brauer, J.M. (2022b). Improving the shelf life of chicken burgers using *Octopus vulgaris* and *Dosidicus gigas* skin pigment extracts. *Food Science Technology (Campinas)*, 42, e18221. <https://doi.org/10.1590/fst.18221>.
- Ezquerra-Brauer, J. M, Miranda, J., Cepeda, A., Barros-Velázquez, J. y Aubourg, S. (2016). Effect of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin extract on the microbial activity in chilled mackerel (*Scomber scombrus*). *LWT-Food Science and Technology*, 72, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.024>
- Ezquerra-Brauer, J. M., Miranda, J., Chan-Higuera, J., Barros-Velázquez, J. y Aubourg, S. (2017). New icing media for quality enhancement of chilled hake (*Merluccius merluccius*) using a jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin extract. *Journal of the*

- Science of Food and Agriculture*, 97(10), 3412–3419. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8192>.
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- Figon F., Musch T., Croix C., Viaud-Massuard M.C., Lanoue A. y Casas J. (2020). Uncyclized xanthommatin is a key ommochrome intermediate in invertebrate coloration. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 124, 103403. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103403>.
- Froesch, D. y Packard, A. (1979). Octopus chromatophores accumulate nickel. *Experientia*, 35 (6), 828–830.
- Futahashi, R., Kurita, R., Mano, H. y Fukatsu, T. (2012) Redox alters yellow dragonflies into red. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (31): 12626–12631. 10.1073/pnas.1207114109
- Hanlon R.T. y Messenger J.B. (1996). Cephalopod behaviour. *Cambridge University Press*, Cambridge, 232 pp.
- Hernandez-Zazueta, M.S., Luzardo-Ocampo, I., García-Romo, J.S., Noguera-Artiaga, L., Carbonell-Barrachina, A.A., Taboada-Antelo, P., Campos-Vega, R., Rosas-Burgos, E.C., Burboa-Zazueta, M.G., Ezquerro-Brauer, J.M., Burgos-Hernández, A. (2021). Bioactive compounds from *Octopus vulgaris* ink extracts exerted anti-proliferative and anti-inflammatory effects *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 151, 112119. <https://doi-org/10.1016/j.fct.2021.112119>
- Huang, D., Ou, B. y Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Insausti, T. C. y Casas, J. (2009). Turnover of pigment granules: Cyclic catabolism and anabolism of ommochromes within epidermal cells. *Tissue Cell*, 41 (6), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2009.05.002>
- Izumi, M., Sweeney, A. M., DeMartini, D., Weaver, J. C., Powers, M. L., Tao, A., Silvas, T. V., Kramer, R. M., Crookes-Goodson, W. J., Mäthger, L. M., Naik, R. R., Hanlon, R. T. y Morse, D. E. (2010). Changes in reflectin protein phosphorylation

- are associated with dynamic iridescence in squid. *Journal of the Royal Society Interface* , 7(44), 549–560. [https://doi.org/ 10.1098/rsif.2009.0299](https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0299)
- Lauritano, Ch. e Ianora, A. (2020). Chemical defense in marine organism. *Marine Drugs*. 18 (10), 518.[https://doi.org/ 10.1007/b95453](https://doi.org/10.1007/b95453)
- Land, M. F. (1972). The physics and biology of animal reflectors. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 24, 75–106. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(72\)90004-1](https://doi.org/10.1016/0079-6107(72)90004-1)
- Linzen, B. (1974). The Tryptophan→Ommochrome pathway in insects. In *Advances in Insect Physiology*, J.E. Treherne, Berridge, M.J. y Wigglesworth, V.B. (Eds). Academic Press. Vol. 10, pp 117–246. ISSN: 0065-2806
- Loi, P.K., Saunders, R.G., Young, D.C. y Tublitz, N.J. (1996). Peptidergic regulation of chromatophore function in the European cuttlefish, *Sepia officinalis*. *The Journal of Experimental Biology*, 119, 1117–1187. [https://doi.org/ 10.1242/jeb.199.5.1177](https://doi.org/10.1242/jeb.199.5.1177).
- López-Saiz, C.M., Torres-Moreno, H., Velazquez, C., Plascencia-Jatomea, M., Robles-Sánchez, M., Machi-Lara, L., Robles-Zepeda, R., Martínez-Higuera, A. y Burgos-Hernández, A. (2016). Bioactive triglycerides isolated from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) induce apoptosis in murine lymphoma cells. *Toxicology Letters*, 259, S103. [https://doi.org/ 10.1016/j.toxlet.2016.07.258](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.258)
- Manivasagana, P., S Bharathirajaa, S., Moorthya, M.S., Mondala, S., Seob, H., Leec, K.D. y Oh, J. (2018). Marine natural pigments as potential sources for therapeutic applications. *Critical Review in Biotechnology*, 38(5), 745–761. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1398713>
- Maron, D.M. y Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 54, 63–62. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- Mäthger, L. M. y Hanlon, R. T.(2007). Malleable skin coloration in cephalopods: selective reflectance, transmission and absorbance of light by chromatophores and iridophores. *Cell and Tissue Research*, 329, 179–186. [https://doi.org/ 10.1007/s00441-007-0384-8](https://doi.org/10.1007/s00441-007-0384-8)

- Mäthger, L. M., Denton, E. J., Marshall, N. J. y Hanlon, R. T. (2009). Mechanisms and behavioural functions of structural coloration in cephalopods. *J Journal of the Royal Society Interface*, 6, S149-S163. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0366.focus>
- Mäthger, L.M., Senft, S.L., Gao, M., Karaveli, S., Bell, G.R.R., Zia, R., Kuziran, A.M., Dennis, P.B., Cookes-Goodson, W.J., Naik, R.R., Kattawar, G.W. y Hanlon, R.T. (2013). Bright white scattering from protein spheres in color changing, flexible cuttlefish skin. *Advanced Functional Materials*, 23(32), 3980–3989. <https://doi.org/10.1002/adfm.201203705>
- Messenger, J. B. (2001). Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biological Reviews*, 76, 473–528. <https://doi.org/10.1017/S1464793101005772>
- Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N. y Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2>
- 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, 2142–2148. <https://doi.org/10.1021/jf990711k>
- Morales del Río, J.A., Gutiérrez-Lomeli, M., Guerrero Medina, P., Del Toro Sánchez, C.L. (2015). Antioxidantes en alimntnos. En *Alimentos funcionales y compuestos bioactivos*. Plaza y Valdez, S.A. de C.V. 215–240.
- Mosman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survial: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nair, R.J., Pillai, D., Joseph, S.M., Gomathi, P., Senan, P.V. y Sherief, P.M. (2011). Cephalopod research and bioactive substances. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 40(1), 13–27.
- Norman, M. D., Finn, J. y Tregenza, T. (2001). Dynamic mimicry in an Indo-Malayan octopus. *Proceedings of the Royal Society B*, 268 (1478), 1755–1758. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1708>

- OMS. (2021). Cáncer. *Organización Mundial de la Salud*. www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer.
- Palumbo A, Poli A, Di Cosmo A y D'Ischia M. (2000). N-Methyl-d-aspartate receptor stimulation activates tyrosinase and promotes melanin synthesis in the ink gland of the cuttlefish *Sepia officinalis* through the nitric oxide/cGMP signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 275,16885–16890. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909509199>
- Pangestuti, R. y Kim, S.K. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods*, 3, 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001>
- PDQ (2021). Cancer Prevention Overview (PDQ®). *Health Professional Version*. *National Cancer Institute*, US. Published online: October 15, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66016/>.
- Riou, M. y Christidès, J.-P.(2010). Cryptic Color Change in a Crab Spider (*Misumena vatia*): Identification and quantification of precursors and ommochrome pigments by HPLC. *Journal of Chemical Ecology*, 36 (4), 412–423. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9765-7>
- Roberts, G.C.K. y Jardetzky, O. (1970). Nuclear magnetic resonance spectroscopy of amino acids, peptides, and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 24, 447–545. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60246-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60246-6)
- Romero, Y. y Martínez, A. (2015). Antiradical capacity of ommochromes. *Journal of Molecular Modeling*, 21 (8), 220.<https://doi.org/10.1007/s00894-015-2773-3>
- Rustad, T., Storrø, I. y Slizyte, R. (2011). Possibilities for the utilisation of marine by-products. *International Journal of Food Science +Technology*, 46, 2001–2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02736.x>
- SAGARPA. (2014). Plan de manejo pesquero de pulpo (*O. maya* y *O. vulgaris*) del Golfo de México y Mar de Caribe. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*. *Estados Unidos Mexicanos*.
- Shahidi, F., Varatharajan, V., Peng, H. y Senadheera, R. (2019). Utilization of marine by-products for the recovery of value-added products. *Journal of Food Bioactives*, 6, 10-61. <https://doi.org/10.31665/JFB.2019.6184>

- Shamim, G., Ranjan, S. K., Pande, D.M. y Raman, R.J. (2014). Biochemistry and biosynthesis of insect pigments. *European Journal of Entomology*, 111: 149–164. <https://doi.org/10.14411/eje.2014.021>
- Suárez-Jiménez, G.M., Burgos-Hernández, A., Torres-Arreola, W., López-Saiz, C.M., Velázquez-Contreras, C.A. y Ezquerra-Brauer, J.M. (2019). Bioactive peptides from collagen hydrolysates from squid (*Dosidicus gigas*) by-products fractionated by ultrafiltration. *International Journal of Food Science + Technology* 54, 4, 1054–1061. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13984>
- Tian, X., Azpurua, J., Hine, Ch., Vaidya, A., Myakishev-Rempel, M., Ablava, J., Mao, Z., Nevo, E., Gorbunova, V. y Seluanov, A. (2013). High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature*, 499, 346–349. <https://doi.org/10.1038/nature12234>
- Van den Branden, C. y Declair, W. (1976). A study of the chromatophore pigments in the skin of the cephalopod *Sepia officinalis*. *Biologische Jaarb*, 44, 345–352.
- Venero Gutiérrez, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Instituto Superior de Medicina Militar “Dr. Luis Díaz Soto”. *Revista Cubana de Medicina Natural*, 31(2), 2019–236.
- Williams, T. L., DiBona, C. W., Dinneen, S. R., Jones Labadie, S. F., Chu, F. y Deravi, L. F. (2016). Contributions of phenoxazone-based pigments to the structure and function of nanostructured granules in squid chromatophores. *Langmuir*, 32, 3754–3759. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00243>
- Williams, T.L., Senft, S.L., Yeo, J. Martín-Martínez, F.J., Kuzirian, A.M., Martin, C.A., DiBona, C.W., Chen, C.T., Dinneen, S.R., Nguyen, H.T., Gomes, C.M., Rosenthal, J.J.C., MacManes, M.D., Chu, F. Buehler, M.J., Hanlon, R.T. y Deravi, L.F. (2019). Dynamic pigmentary and structural coloration within cephalopod chromatophore organs. *Nature Communications*, 10, 1004. | <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08891-x>