

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Extracción y caracterización preliminar de pigmentos y colágeno a partir de medusas *Stomolophus meleagris*, *Aurelia aurita*, *Rhizostoma pulmo* y *Rophilema esculentum*

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctora en Biotecnología

PRESENTA

M. en B. Olivia Lugo Magaña

Directora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Asesoras:

Dra. Xochitl Guzmán García

Dra. Raquel García Barrientos

El programa de Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con el apoyo del mismo Consejo.

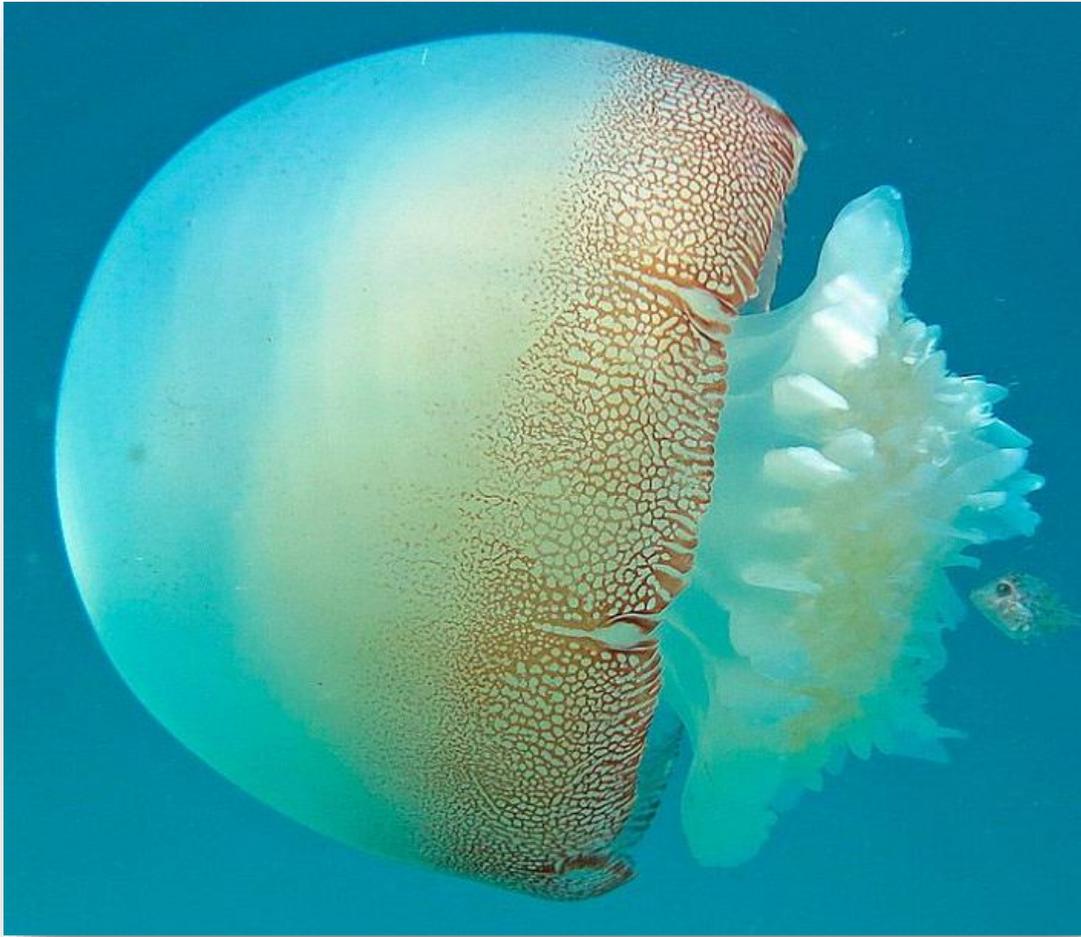
La experimentación para la obtención de resultados de esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas, Departamento de Biotecnología y en el Laboratorio de Histopatología, Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Asimismo, los estudios sobre colágeno se llevaron a cabo en el Instituto de Investigaciones Marinas, Departamento de Bioquímica de los Alimentos, Vigo, España.

Se contó con el apoyo del programa de becas de posgrado de CONACyT y de la Universidad Autónoma Metropolitana para la participación en Eventos de Difusión y de Investigación en Ciencia y Tecnología.

ÍNDICE

Resumen	6
Summary	9
1. Antecedentes	12
1.1. Las medusas	12
1.1.3. Algunas medusas de importancia industrial	18
1.1.3.1. <i>Stomolophus meleagris</i>	18
1.1.3.2. <i>Rhizostoma pulmo</i>	20
1.1.3.3. <i>Rhopilema esculentum</i>	21
1.1.3.4. <i>Aurelia aurita</i>	22
1.1.4. Legislación en México para protección de la medusa	24
1.1.5. Las medusas en la industria alimentaria	24
1.1.6. Usos biotecnológicos de las medusas	25
1.2. Las medusas como fuentes de pigmentos	26
1.2.1. <i>El color en los alimentos</i>	26
1.2.2. La medición del color	29
1.2.3. Colorantes azules en la industria	31
1.2.4. Algunos pigmentos abundantes en el ambiente marino	32
1.2.4.1. Carotenoides	35
1.2.4.2. Pigmentos fenólicos	39
1.2.4.3. Azulenos	41
1.2.5. Pigmentos en medusas	42
1.3. Las medusas como fuente de colágeno	43
1.3.1. El colágeno	43
2. Justificación	47
3. Hipótesis	48
4. Objetivos	48
5. Materiales y Métodos	49
5.1. Estudios histológicos de <i>Stomolophus meleagris</i>	49
5.2.1. Obtención de los especímenes y preparación de las muestras	53
5.2.2. Análisis de humedad y cenizas en muestras de medusa	53
5.2.3. Análisis de metales pesados en muestras de medusa, campana y brazos orales	54
5.2.7. Determinación de solubilidad del extracto pigmentado por polaridad y gradiente osmótico	56
5.2.8. Purificación parcial del extracto pigmentado por ultrafiltración	56
5.2.9. Purificación del extracto pigmentado por cromatografía en capa fina	57
5.2.10. Purificación del extracto pigmentado por cromatografía de filtración	57
5.2.11. Colorimetría de reflectancia (coordenadas L*a*b*)	58
5.2.12. Estabilidad de los extractos purificado y crudo con respecto al tiempo	58
5.2.13. Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad del extracto pigmentado	58
5.2.14. Análisis de carbohidratos totales	59
5.2.15. Análisis de la proteína asociada al pigmento	59
5.2.15.2. Determinación de pesos moleculares y presencia de glucoproteínas	60
5.2.15.3. Determinación de la concentración de hidroxiprolina en el extracto semipurificado	61
5.2.16. Determinación de péptidos por MALDI-TOF	61
5.3. Extracción y caracterización de colágeno de <i>Rhopilema esculentum</i> y <i>Aurelia aurita</i>	68
5.3.1. Obtención de los especímenes y preparación de la muestra	68
5.3.2. Análisis morfológico	70
5.3.3. Análisis proximal	71

5.3.4. Determinación del contenido de hidroxiprolina.....	72
5.3.5. Extracción de colágeno de las medusas	72
5.3.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	73
5.3.7. Determinación de la temperatura de desnaturalización de colágeno PSC de R. esculentum.....	73
5.3.8. Determinación del mapa peptídico mediante hidrólisis enzimática.....	73
5.3.9. Estrategia experimental	74
5.3.10. Diseño experimental y análisis estadístico	74
6. Resultados y discusión	76
6.2.1. Obtención de las muestras	79
6.3.1. Extracción del pigmento	84
6.3.4.1. Polaridad.....	88
6.3.4.2. Gradiente osmótico.....	89
6.3.9. Efecto del pH y temperatura sobre la estabilidad del extracto pigmentado	95
6.3.10. Rendimiento del pigmento.....	97
6.4.1. Análisis morfológicos	104
6.4.2 Análisis proximal y contenido de colágeno.	106
6.4.4. Determinación de la temperatura de desnaturalización de colágeno PSC de R. esculentum.	110
6.4.5 Determinación del mapa peptídico mediante hidrólisis enzimática.....	111
7. Conclusiones	113
8. Bibliografía.....	114
Anexos.....	124
Artículo científico.....	129
Productividad	140



Physalia physalis meleagris
Medusa bola de cañón

RESUMEN

Recientemente se ha comenzado a utilizar a las medusas como un recurso pesquero importante, tanto en Asia como en América. Sin embargo, sólo algunas clases de medusas son comestibles.

Hasta hace poco tiempo la industria mexicana comenzó a mostrar interés por la captura de *Stomolophus meleagris*, conocida como medusa bola de cañón. En este continente se practica la pesca de esta medusa a lo largo de la costa atlántica del sur de los Estados Unidos y en el Golfo de México, en general para exportación a Asia, donde se preparan para el consumo humano.

La cría de medusas para este fin se desarrolla mayormente en el sudeste asiático y China, donde se prefiere la producción de *Rhopilema esculentum*. Se ha visto favorecida la crianza de medusa bola de cañón debido a que su cuerpo es más grande y rígido, y sobre todo por no ser tóxica para el consumo humano.

Asimismo, y debido a los problemas que causa la sobrepoblación de medusas, se han propuesto alternativas para su aprovechamiento para fines alternativos al consumo humano. Una de estas aplicaciones es la extracción del colágeno, el cual puede ser utilizado para una variedad de fines como la fabricación de cosméticos y fármacos que se emplean en el tratamiento de enfermedades, como la artritis reumatoide.

El objetivo de este trabajo fue extraer, purificar y caracterizar dos recursos biotecnológicos importantes presentes en la medusa *Stomolophus meleagris* como el pigmento azul. Asimismo, se llevaron a cabo estudios preliminares del colágeno en *Rhizostoma pulmo*, *Aurelia aurita* y *Rhopilema esculentum*.

En la primera parte de este trabajo consistió en la identificación histológica de las secciones oral, subumbrelar, y campana de *Stomolophus meleagris*, en donde se reconocieron varios organelos. Estos organismos presentaban la típica simetría radial. Se identificaron cavidades

gastrovasculares, y células epiteliales y glandulares en el ectodermo. Estos resultados fueron una guía para la extracción de los compuestos bioactivos, ya que se caracterizaron las zonas para la extracción (campana y tentáculos).

Para la extracción y caracterización del pigmento se utilizaron organismos con un color azul intenso identificados morfológicamente como *Stomolophus meleagris*. Se llevó a cabo la siguiente estrategia experimental: en una primera fase se estudió morfológica e histológicamente al organismo, y se llevó a cabo una extracción parcial del pigmento. Una vez definida la naturaleza de éste, se caracterizó por métodos fisicoquímicos, y finalmente se llevó a cabo el estudio de la proteína ligada al pigmento.

Se concluyó que el pigmento es de naturaleza polar, no pertenece a la familia de los carotenoides y está asociado a una fracción proteica, presuntamente una glucoproteína.

Aplicando un diseño central rotatorio se determinó que el pigmento es estable en condiciones de pH tanto ácidas como básicas (3-9); sin embargo, es lábil a altas temperaturas. El pigmento mantiene su color a temperatura de congelación y refrigeración por un periodo de hasta 35 días. Su uso en alimentos se recomendaría en productos acidificados, como yogurt o helados, pero no en para los que se someten a tratamiento térmico elevado, cuando ocurriría una degradación considerable del color.

La identificación de la huella peptídica se llevó a cabo utilizando la técnica MALDITOF, en el cual las proteínas a identificar son hidrolizadas a péptidos pequeñas de los que se obtiene el correspondiente espectro. Se encontró una similitud de aminoácidos que corresponden a la siguiente huella peptídica:

R.NSPGLLVSPGGMNKNMQTK.S + 4 Desaminación (NQ); Oxidación (M)

Para encontrar una fracción más precisa se realizó una fragmentación del espectro con mayores áreas, aunque no se encontró homología. Se concluyó que no existe hasta el

momento información con la cual comparar nuestros resultados. Es necesario realizar una secuenciación completa para obtener mayor información al respecto.

La extracción y caracterización de colágeno se llevó a cabo por los procesos ASC (*acid soluble collagen*, por sus siglas en inglés) y PSC (*pepsin soluble collagen*, por sus siglas en inglés) en muestras de medusas *Rophilema escueletum* para consumo al público, y muestras congeladas de las especies *Rhizostoma pulmo* y *Aurelia aurita*. Se realizaron análisis proximales obteniéndose las siguientes concentraciones: 92-98% de humedad; 0.3-2% de proteína; 0.2-0.9% de ceniza. Los rendimientos de colágeno fueron 0.52 y 28% por ASC y PSC, respectivamente. SDS-PAGE mostró bandas de 215 y 125 kDa en la fracción ASC y 42 y 41 kDa en la fracción PSC. Finalmente, se llevó a cabo el análisis y perfil de aminoácidos en muestras sujetas a digestión enzimática. Este colágeno es termolábil, con una temperatura de desnaturalización (Td) de 24°C.

SUMMARY

Jellyfish has been recently recognized as an important fishing resource in Asia as well as in America. However, only few classes are edible.

Until recently, the Mexican industry began to show interest in fishing for *Stomolophus meleagris*, known as “cannonball jellyfish”. In this continent, cannonball jellyfish catching is practiced along the Atlantic coast of the United States and in the Gulf of Mexico, and then exported to Asia where it is prepared for human consumption.

Jellyfish production for this purpose is mainly developed in Southeast Asia and China, where *Rhopilema esculentum* is preferred. Cannonball jellyfish is favored due to its large body and hard texture, but mainly because it is not toxic for consumption.

In the same way, and due to the problems caused by the overpopulation of this species, alternatives to human consumption have been proposed for its use.

Jellyfish are also used for the extraction of collagen, which can be used for a variety of applications, such as cosmetic and drug manufacture, and is used in the treatment of diseases such as rheumatoid arthritis.

The objective of this work was to obtain, purify and characterize two important biotechnological resources present in *Stomolophus meleagris* such as the blue pigment and collagen. Likewise, preliminary studies on collagen in *Rhizostoma pulmo*, *Aurelia aurita* and *Rhopilema esculentum* were carried out.

The first part of the work was the histological characterization of tissues from oral, subumbelar and campana regions of *Stomolophus meleagris*. Here, several organelles were identified, mainly composed of water. Gastrovascular cavities, and glandular and epithelium cells in the ectoderm were also identified. These results allowed the location of possible bioactive compounds for further extraction (campana and tentacles).

For the extraction and characterization of the pigment, organisms with intense blue color were used, morphologically identified as *Stomolophus meleagris*. The experimental strategy was as follows: in a first phase the organism was morphologically and histologically studied and a partial extraction of the pigment was carried out. Once the nature of the pigment was defined, it was characterized by physicochemical methods, and finally the protein associated to the pigment was studied.

It was concluded that the pigment is of polar nature, does not belong to the carotenoid family and is associated to a protein moiety, presumably a glycoprotein.

Applying a central rotary design, it was concluded that the pigment is stable at both acidic and basic pH conditions (3-9) but is labile at high temperatures. The pigment maintains its color at freezing and cooling temperature for a period of up to 35 days. This pigment, intended for the food industry, is not recommended for those products with high heat treatment, but can be used in acidified products such as yogurt and ice cream.

The peptide trace was identified by MALDITOF technique. In this method the proteins to be identified are hydrolyzed in small peptides and the corresponding hydrolyzed mass spectrum is obtained. A similarity of amino acids corresponding to the following peptide trace was found:

R.NSPGLLVSPGGMNKNMQTK.S + 4 Deamination (NQ); Oxidation (M)

To find a more accurate fraction a fragmentation of the spectrum was performed with larger areas, although no homology was found. It was concluded that, at present, there is no information for comparing our results. It is necessary to perform a complete sequencing to obtain further results.

Collagen extraction and characterization was carried out using the ASC (acid soluble collagen) and PSC (pepsin soluble collagen) processes. The raw material was edible samples of *Rophilema escueletum* ready for human consumption, and frozen samples of species

Rhizostoma pulmo and *Aurelia aurita*. Proximal analyzes were carried out, samples consisted of 92-98% moisture, 0.3-2% protein and 0.2-0.9% ash. A yield of ASC and PSC collagen were 0.52% and 28%, respectively. SDS-PAGE showed bands at 215 and 125 kDa in the ASC fraction and 42 and 41 kDa in the PSC fraction. Amino acid analysis and amino acid profile were performed by enzymatic digestion. This collagen is thermolabile with denaturation temperature (Td) at 24 ° C.

1. ANTECEDENTES

1.1. LAS MEDUSAS

Las medusas son un grupo de invertebrados marinos. Su composición interna es principalmente agua (cerca del 95% de su peso corporal). Son cazadores de peces y otros animales marinos que atrapan con sus tentáculos urticantes libres a merced de las corrientes marinas.

Estos animales se encuentran en todos los océanos, desde la superficie hasta las profundidades del mar; son comunes en zonas costeras de todo el mundo. Incluso, algunas medusas habitan en agua dulce. Las medusas han vagado por los mares durante, al menos, 500 millones de años por lo que es el animal multiorgánico más antiguo (Griffin y Scdnr, 1983).

Las medusas pertenecen al Phylum Cnidaria, el cual se divide en cinco clases: *Staurozoa* (estauromedusas); *Scyphozoa* (medusas verdaderas); *Hydrozoa* (corales de fuego e hidras); *Cubozoa* (medusas) y *Anthozoa* (anémonas y corales) e incluyen cerca de 10,000 especies, 100 de estas son peligrosos para los seres humanos.

El estudio de las medusas ha despertado un gran interés por parte de la comunidad científica debido al excesivo y constante crecimiento de sus poblaciones. Pueden llegar a ser consideradas una verdadera plaga, ya que forman grandes acumulaciones súbitas o afloramientos de gran impacto ambiental y económico, debido a sus altas tasas de depredación de zooplancton, la competencia por el alimento con especies de peces planctívoros y la reducción en las capturas de peces de importancia comercial por la depredación de huevos y estadios juveniles (Burgess y Thompson, 2002; Morton, 2015).

La distribución geográfica de las medusas parece estar atravesando un impacto por el calentamiento global. Se ha estimado que hay 150 millones de picaduras de medusas al año, en algunas áreas del Pacífico se reportan hasta 800 eventos diarios en una sola playa. Por lo

tanto, más allá de ser un problema de salud pública, las medusas también constituyen una amenaza para el turismo (Gershwin y col., 2013).

1.1.1. ESTRUCTURA DE LA MEDUSA

Los cnidarios son radialmente o biradialmente simétricos, un tipo general de simetría que se cree primitivo para los eumetazoos, con un nivel de organización de tejido en el que algunas células similares se asocian en grupos o agregaciones, pero no se producen órganos verdaderos. Los cuerpos de los cnidarios tienen dos o tres capas (exumbrela, campana y subumbrela), una cavidad gastrovascular (celenteron) con una sola abertura exterior que sirve como boca y ano, a menudo los tentáculos rodean esta abertura. Algunas células están organizadas en dos redes nerviosas simples, una epidérmica y otra gastrodérmica, que ayudan a coordinar las funciones musculares y sensoriales (Brusca y Brusca, 2003; Hickman y col., 2003).

Los cnidarios presentan un cuerpo de una de dos formas básicas; el de las medusas, con simetría tetramérica tiene forma de paraguas gelatinosa que puede pulsar como medio de locomoción, y tentáculos en la parte posterior. La boca está generalmente en el lado cóncavo, y los tentáculos se originan en el borde de la campana. Otros cnidarios, como los pólipos comúnmente son sésiles; tienen cuerpos tubulares, con un extremo unido al sustrato y una boca, generalmente rodeada por tentáculos, en el otro extremo. En este último caso, los individuos diferentes se especializan a veces para las diversas funciones, tales como reproducción, alimentación o defensa.

Reproductivamente, los cnidarios pueden ser monoicos o dioicos (Pauly y col., 2009). El resultado de la reproducción sexual es una larva plánula ciliada y con natación libre. La reproducción en los pólipos se realiza por brotación asexual (pólipo) o formación sexual de gametos.

Los nematocistos definen a los cnidarios, estos diminutos organelos, son dispositivos altamente eficientes para capturar presas y disuasivos extremadamente eficaces a los

depredadores. Cada uno contiene un hilo en espiral, tubular, que puede llevar barbas y que es a menudo venenoso. Un nematocisto se descarga cuando una especie de presa o depredador entra en contacto con ella, conduciendo sus hilos con púa y veneno en la carne de la víctima por medio de un rápido aumento de la presión hidrostática. Cientos o miles de nematocistos pueden alinear los tentáculos o la superficie del cnidario. Son capaces incluso de penetrar la piel humana, produciendo a veces una herida dolorosa o en casos extremos, la muerte (Lucas y col., 2012).

Las medusas tienen tamaños variados, carecen de cabeza y esqueleto, y no poseen ningún órgano especializado en la reproducción y excreción, ya que realizan esta última por difusión a través de cualquier zona de su superficie corporal. Su color va desde transparente al blanquecino, amarillento, azulado o púrpura (Omori y Nakano, 2001).

El cuerpo de la medusa consiste en una umbrela hemisférica transparente; la boca se encuentra en la parte baja de la campana protegida por brazos orales llamados tentáculos, los cuales miden desde unos pocos milímetros hasta 40 cm, dependiendo de la especie (Figura 1) (Omori y Nakano, 2001).

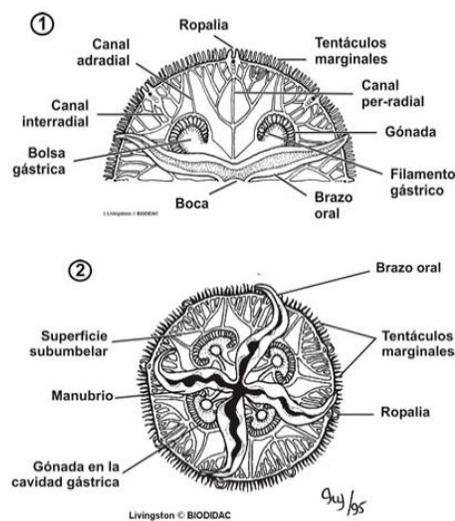


Figura 1. Anatomía de la medusa
(<http://www.asturnatura.com/articulos/cnidarios/medusas.php>)

Los tentáculos presentan células epidérmicas especializadas, llamadas cnidocitos, que contienen tres tipos de organelos, llamados nematocistos. Los nematocistos, una de las tres categorías de cnidocitos, son cápsulas huecas que contienen un túbulo enrollado inmerso en una sustancia tóxica, de manera que esta se inyecta al exterior por medio del túbulo, algunos de los cuales son ahuecados y pueden descargar el veneno hasta el final. Los tentáculos contienen desde unos pocos miles a varios millones de nematocistos (Cegolon y col., 2013).

La umbrela tiene típicamente la forma de una campana en las medusas pequeñas; al incrementarse el tamaño la campana va adoptando progresivamente una forma más aplanada hasta alcanzar la forma de platillo (Moran y col., 2013), aunque hay una variación considerable de formas. Así, se presenta una forma esférica en *Bougainvillia ramosa*, abovedadas en *Aglantha*, aplanadas en *Phialella*, con forma de platillo en *Aequorea*, o de disco en *Obelia*. La campana varía también en el grado de rigidez dependiendo del tamaño de la campana, capa gelatinosa no celular entre el ectodermo y el mesodermo, el grosor de la cual varía en las diferentes regiones de la campana. En algunas especies, la campana es muy gruesa en el ápice de la campana dando origen a un cono puntiagudo o redondeado, de tamaño variable que se denomina proyección o proceso apical.

En el margen de la campana se localizan los tentáculos marginales, cuya función principal es la captura de alimentos. Estos presentan una gran variedad de formas, sin embargo, en algunas especies, pueden estar ausentes o reducidos. Generalmente hay cuatro tentáculos marginales, sin embargo, esta cantidad varía con las especies, o aún en la misma especie durante las diferentes fases del desarrollo. Los tentáculos en la mayoría de las especies son sencillos, aunque en algunos casos se bifurcan y algunas de sus ramas pueden terminar en órganos adhesivos, como en *Cladonema*.

De igual forma, en el margen de la campana se localizan también los órganos sensoriales. En las hidromedusas los principales órganos sensoriales son los ocelos y los estatocistos, los cuales presentan diferentes grados de organización (Nawroth y col., 2012). Los ocelos son órganos especializados para la percepción luminosa, comunes en las antomedusas (clase Hydrozoa subclase Hydroides), se presentan como manchas de color café, negras o rojizas.

Los estatocistos, por su parte, son órganos del equilibrio y gravedad, en forma de saco con un epitelio de células ciliadas y líquido en su interior (Cegolon y col., 2013).

1.1.2. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

La palabra histología significa “el estudio del tejido” y se refiere al análisis de la composición microscópica y la respectiva función del material biológico. Las primeras investigaciones histológicas fueron posibles a partir del año 1600, cuando se incorporó el recién inventado microscopio a los estudios de anatomía (Young y col., 2013). La histología explica las interrelaciones entre las células, los tejidos, la estructura y la composición molecular de los órganos. Existen 4 tipos de tejidos fundamentales: epitelial, conjuntivo, muscular y nervioso (Hernández, 2010).

En general los métodos histológicos se clasifican en dos grupos: los que se basan en observación directa de las células y los tejidos vivos; y los que estudian material muerto (Redi, 2010). En el estudio de la célula y tejidos se utiliza con mayor frecuencia el tejido muerto, que se mantiene mediante procesos químicos aplicados inmediatamente después de la separación del tejido del espécimen a estudiar, cortado en secciones muy delgadas o cortes histológicos. Después de la tinción con distintos colorantes se observan los cortes bajo el microscopio óptico, el mayor contraste entre los componentes tisulares permite su diferenciación (Geneser, 2003). La fijación tiene la finalidad de evitar que se deforme y degeneren la estructura de las células y tejidos, y se endurezcan los tejidos blandos. Esto se atribuye al hecho de que se coagulan proteínas, componente mayoritario de las células, en las cuales se detienen los procesos celulares dinámicos con la mayor rapidez posible, manteniendo la estructura con las mínimas modificaciones posibles. Esto se logra con la insolubilización de los componentes estructurales de la célula y la formación de enlaces cruzados por la acción de distintos agentes químicos, los fijadores. De esta manera se mantienen todas las estructuras que ya existían en la célula viva. Asimismo, las proteínas solubles se unen a las estructurales, insolubilizándose (Redi, 2010). La fijación también produce la inactivación de las enzimas celulares, las cuales de otro modo iniciarían la

autodigestión o autólisis y conducen a la degeneración *post mortem*. Además, se eliminan algunas bacterias y otros microorganismos que podrían destruir el tejido.

El tejido fijado se corta en secciones delgadas, que permiten el paso de la luz. La mayoría de los preparados para microscopía óptica tienen un espesor de alrededor de 5-10 μm , para lo que se requiere un micrótomo. Para obtener la consistencia necesaria para poder cortar secciones tan delgadas es necesario incluir antes el tejido en un material que le confiera suficiente dureza. Las sustancias adecuadas para este fin, los medios de inclusión, son tipos de cera insolubles en agua, por lo general se utiliza parafina. La inclusión es la operación mediante la cual se hace penetrar en el tejido deshidratado un material que solidifica con una consistencia similar a la del tejido, facilitando la ejecución de cortes finos ya que se conserva la posición original de cada uno de los elementos que integran los tejidos. Este procedimiento implica la deshidratación, aclaración, infiltración y colado de bloques (Redi, 2010).

La deshidratación se hace de forma gradual, se pasa el tejido fijado por una serie de soluciones acuosas de etanol en concentraciones crecientes, hasta llegar a alcohol absoluto. El tejido se sumerge entonces en un líquido miscible en etanol y parafina, generalmente xileno. Esta etapa (aclaramiento) se lleva a cabo por cambios sucesivos de xilol, hasta substituir el alcohol por xilol. Se continúa con la infiltración donde se coloca el tejido en parafina líquida para que penetre en éste, disolviendo el xileno. Por último, está el colado de bloques, donde al enfriar la parafina esta se solidifica y forma, junto con el tejido incluido, un bloque sólido del que se obtendrán los cortes histológicos. La mayoría de los colorantes histológicos se utilizan en solución acuosa, por lo que los cortes incluidos en parafina deben ser desparafinados, mediante un tratamiento con xileno, y posteriormente rehidratados, para lo cual tratan con concentraciones descendentes de alcohol hasta agua (Redi, 2010).

La mayor parte de los métodos de tinción histológicos se desarrollaron en función de su capacidad para teñir selectivamente los distintos componentes tisulares. La tinción tiene como objetivo que las estructuras celulares y tisulares queden contrastadas y de esta forma se facilite la identificación. El método de tinción más utilizado es la combinación de hematoxilina y eosina (H-E), que tiñe los componentes nucleares de azul violáceo, mientras

que casi todas las estructuras citoplasmáticas adquieren una tonalidad rosada. Con la técnica de Hematoxilina-Eosina se pueden observar las diversas estructuras: núcleo, citoplasma, forma y extensión de las células, límites celulares, sustancias producidas por las células y los límites que tienen los tejidos. Después de la tinción, la muestra se deshidrata y se aclara nuevamente, finalmente se cubre con una gota de medio de montaje transparente y se coloca un cubre objeto para proteger el preparado (Ross y Pawlina, 2011).

1.1.3. ALGUNAS MEDUSAS DE IMPORTANCIA INDUSTRIAL

1.1.3.1. *Stomolophus meleagris*

Las poblaciones de medusa comestible “bola de cañón” (*Stomolophus meleagris*) se ha registrado desde el Sur de California, Estados Unidos, hasta Ecuador (Javier y col., 2013). Son de tamaño pequeño, aproximadamente 127 mm de alto y 180 mm de ancho, de forma hemisférico, gruesas, duras y de color lechoso o amarillento, con o sin una banda marrón pálida alrededor del margen.

El primer país que utilizó a este organismo para consumo humano fue China, extendiéndose el hábito alimentario por toda Asia, siendo Japón el mayor consumidor. Los asiáticos reconocen el valor medicinal de las medusas; se cree en su poder como tranquilizante y se sabe que tiene actividad farmacológica, por lo que ha sido usada en China como tratamientos en la bronquitis, hipertensión, asma y úlceras gástricas (García-Barrientos y col., 2001).

La medusa bola de cañón no tiene tentáculos. En lugar, tienen 16 brazos orales cortos y bifurcados fusionados. La medusa de esta especie no es un peligro público de importancia debido a que la toxina de sus células urticantes (nematocistos) es relativamente inocua para los humanos (Toom y Chan, 1972).

La clasificación taxonómica de la medusa bola de cañón es la siguiente:

Reino: Animalia
Fílum: Cnidaria
Clase: Scyphozoa

Orden: Rhizostomae
Familia: Stomolophidae
Género: Stomolophus
Especie: *S. meleagris*

En México, hasta hace poco tiempo, se comenzó a mostrar interés por la pesca de *Stomolophus meleagris* (Figura 2) ya que es una especie comestible de gran aceptación en el mercado asiático (Carvalho-Saucedo y col., 2011).



Figura 2. Medusa Bola de Cañón *Stomolophus meleagris*
(Alastair, 2014. Fotografía por Steven Giese)

Su éxito se basa en parte en su capacidad para crecer rápidamente. Como otras medusas comestibles, la bola de cañón se encuentra en aguas estuarinas y salinas con temperaturas promedio de 23.1°C y salinidades de 17.1 a 36.5 partes por millón (ppm) con un promedio de 33.8 ppm. Las medusas bola de cañón se alimentan de zooplancton, principalmente bivalvos y moluscos en fase larvaria (Griffin y Scdnr, 1983).

El ciclo de vida de *Stomolophus meleagris* es similar al de vida de muchos escifozoos. Comenzando como larva plánula alargada y cilíndrica sin boca, esta especie tiene una masa endodérmica rodeada por un ectodermo ciliado. La plánula nada durante unos días, luego se adhiere a un sustrato donde se puede metamorfosear en un escifozoo (el pólipó sésil) (Afford y Patel, 2013). Cuando el escifozoo se desarrolla, el disco oral forma la probóscide, surgiendo ocho tentáculos contráctiles. En esta etapa ya es capaz de comer y crecer a un tamaño máximo

de unos pocos milímetros. Finalmente se presenta la segmentación y desarrollo de los tentáculos (Calder, 1982).

Estas medusas son una de las principales fuentes de alimentos para la tortuga laúd *Dermochelys coriacea*. Otras especies de peces y crustáceos que tienen a las medusas de bola de cañón como fuente de alimento son el cangrejo de piedra *Menippe mercenaria*, cangrejos azules, *Callinectes*, y el pez espada Atlántico *Chaetodipterus faber*. Las medusas de bola de cañón también forman relaciones simbióticas con otras especies marinas, incluyendo diez especies de peces y el cangrejo juvenil de nariz larga *Libinia dubia*. Los simbioses usan las medusas para protegerse y alimentarse del zooplancton que toman las medusas, así como el zooplancton que se encuentra en la propia medusa. La mayoría de las relaciones simbióticas de *S. meleagris* son comensalistas, pero algunos simbioses pueden ser parásitos, alimentándose de la propia medusa. Sin embargo, la medusa se puede regenerar rápidamente así que la medusa no es muy dañada (Griffin y Scdnr, 1983).

1.1.3.2. *Rhizostoma pulmo*

Rhizostoma pulmo es la escifomedusa de mayor abundancia y tamaño del Mediterráneo. Alcanza unos 90 cm de diámetro, siendo el máximo registrado de 100 cm (Figura 3). La umbrela, la parte más amplia de su cuerpo, es de color entre blanquecino y amarillo o rosa, con el borde azul. No posee tentáculos, sino ocho fuertes brazos que se unen en la zona superior y que forman una estructura en su parte media en forma de coliflor (Hargitt, 1904). Bajo la campana tiene ocho tentáculos orales fusionados y gruesos que presentan una serie de ramificaciones formando una especie de esponja, de la cual le viene el nombre científico, por su aspecto de pulmón (Fuentes y col., 2011). Carece de abertura bucal, estando sustituida por varios orificios de tamaño pequeño. La campana está compuesta de una campana bastante sólida, contiene pocas células y fibras de colágeno. En la parte central es gruesa y se vuelve más delgado cerca del borde de la campana, cuya superficie está cubierta con nematocistos pequeños y firmemente comprimidos. El borde de la campana está dividido en una serie de lapiceros semicirculares, con una intensa pigmentación de color púrpura-azul oscuro. Alrededor del borde del paraguas hay ocho pares de pequeños lóbulos puntiagudos y entre

ellos se encuentra el órgano sensorial. En el centro de la campana hay una cavidad gastrovascular que se une al exterior por una red de canales interconectados (Ramšak y col., 2012). Esta especie se encuentra distribuida principalmente en el Mar Mediterráneo, en el Atlántico Este y el Mar Negro. Se considera una de las especies más caras en el mercado, distribuyéndose principalmente en Japón (Omori y Nakano, 2001).



Figura 3. Medusa *Rhizostoma pulmo*
(<http://fantasymagic-fairy.blogspot.mx/2010/11/rhizostoma-pulmo.html>)

La clasificación taxonómica de esta medusa es la siguiente:

Reino: Animalia
Fílum: Cnidaria
Clase: Scyphozoa
Orden: Rhizostomae
Familia: Rhizostomatidae
Género: *Rhizostoma*
Especie: *Rhizostoma pulmo*

1.1.3.3. *Rhopilema esculentum*

Se conoce también como medusa llama (Figura 4), es una especie nativa de las aguas templadas del Océano Pacífico, popular en el sudeste de Asia. En la década de 1980 se comenzó a investigar en China, donde actualmente se cultiva para su consumo (Hsieh y col.,

2001). Al ser destinada para el consumo humano se cultiva de forma artificial. Una vez que alcanzan un diámetro de campana de alrededor de 12.5 milímetros se llevan a lugares específicos de cultivo como la bahía de Liaodong, China, entre mayo y junio de cada año. La tasa de recuperación de medusas criadas puede llegar a 3.2%, con un total de 12,500 TM. El peso promedio de esta medusa cuando se cosecha es de 2.5 kg y el diámetro máximo de la campana es de alrededor de 70 centímetros (Marques y col., 2016).

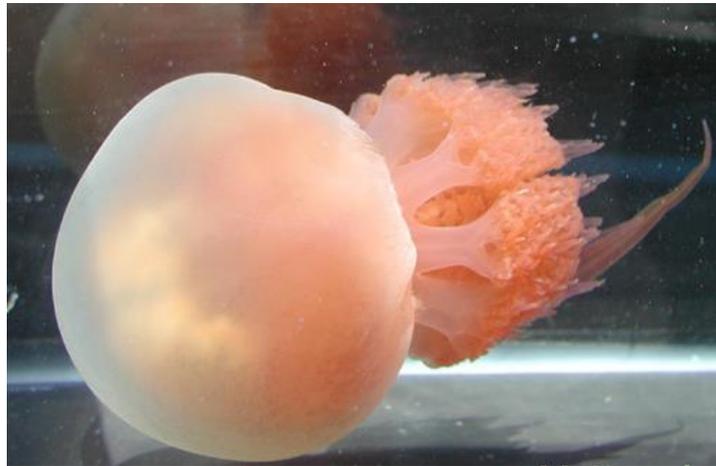


Figura 4. Medusa *Rhophilema esculentum*
(http://thescyphozoa.ucmerced.edu/tSimage/Rhophilema_esculentum_15cm.jpg)

La clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Animalia
Fílum: Cnidaria
Clase: Scyphozoa
Orden: Rhizostomae
Familia: Rhizstomatidae
Género: Rhophilema
Especie: *R. esculentum*

1.1.3.4. *Aurelia aurita*

La medusa común *Aurelia aurita* también es conocida como medusa sombrilla, medusa luna o medusa platillo (Figura 5). Es es una escifomedusa con una amplia distribución geográfica, variando la potencia de sus toxinas en las diferentes localidades. Es considerada como una especie inocua y casi inofensiva para el ser humano sin embargo puede causar lesiones. Es

el escifozoo más común en las aguas costeras de todo el mundo, habiéndose reportado la abundancia esta especie desde varias regiones. En las últimas décadas, las afloramiento de *A. aurita* se han sido cada vez más prominentes en los mares de Asia Oriental, causando serios problemas a las pesquerías (Ponce y col., 2013).

Morfológicamente son de color blanco y transparente en el endodermo. El ectodermo es a menudo azulado o rosado, la campana está rodeada por cientos de tentáculos largos y delgados, filamentosos y urticantes que capturan y paralizan el zooplancton del que se alimenta. También puede atraparlos sobre la campana, gracias a una mucosidad pegajosa que llega hasta la boca. Sus numerosas terminaciones nerviosas, blancas, son visibles en su endodermo, desde el centro hasta el borde de la umbrela. Posee cuatro gónadas de herradura dispuestas simétricamente alrededor del centro del endodermo (Miyake y col., 1997). En los machos las gónadas son blancas o amarillas, y en las hembras rosas o moradas. Posee también cuatro tentáculos bucales translúcidos que rodean su manubrio (apéndice bucal) (Shaposhnikova y col., 2005). Es carnívora y se alimenta de plancton; sus alimentos principales incluyen pequeños organismos de plancton como moluscos, crustáceos, larvas tunicadas, copépodos, rotíferos, nematodos, poliquetos jóvenes, protozoarios, diatomeas y huevos. *A. aurita* nada por pulsaciones en la parte superior de la campana. Nadan horizontalmente, manteniendo la campana cerca de la superficie en todo momento. Esto permite que los tentáculos se distribuyan en el área más grande posible, con el fin de capturar mejor los alimentos. El músculo coronal permite al animal pulsar para moverse (Chapman, 1999)



Figura 5. Medusa *Aurelia aurita*.

(<http://d2on3k3hzjn2sy.cloudfront.net/wp-content/uploads/2013/11/medusa-comun2.jpg>)

La clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Animalia
Filum: Cnidaria
Clase: Scyphozoa
Orden: Semaestomeae
Familia: Ulmaridae
Género: Aurelia
Especie: *A. aurita*

1.1.4. LEGISLACIÓN EN MÉXICO PARA PROTECCIÓN DE LA MEDUSA

En México las medidas de protección para las especies nativas están publicadas en el Diario Oficial de la Federación, en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, “Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo”. En la norma NOM-059-SEMARNAT-2010 están catalogadas siete especies del Phylum Cnidaria, todas ellas diferentes tipos de corales, pero no se encuentra ninguna especie de medusa.

1.1.5. LAS MEDUSAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Las medusas comestibles son, en su gran mayoría, de tipo estuarinas encontrándose principalmente en las desembocaduras de los ríos. Son principalmente capturadas por los países del noroeste del Pacífico y de la región central occidental; Filipinas y China. Entre las especies comestibles *Rhopilema esculentum* es la más abundante e importante en la pesca asiática, siendo China el país que procesa más medusas para consumo humano. Aunque los chinos han consumido medusas durante más de mil años, la pesca se ha convertido recientemente en una industria comercial (Hsieh y col., 2001).

En el procesamiento de la medusa, la campana y los tentáculos orales se separan inmediatamente después de la captura; el resto se limpia con agua de mar, se raspan para eliminar las membranas mucosas y el material gonadal. Tanto la campana como los tentáculos orales se utilizan en el procesamiento (Hsieh y col., 2001). Los métodos tradicionales implican una reducción escalonada del contenido de agua usando sal y alumbre (1 kg de mezcla de sal y alumbre para 8-10 kg de producto). Luego se dejan en esta salmuera durante 3-4 días, seguido de varias transferencias a otro recipiente salado con una mezcla fresca que contiene una cantidad más pequeña de alumbre. El producto salado puede acumularse y dejarse secar en una rejilla a temperatura ambiente durante 2 días, para que el exceso de agua se drene. El proceso de 20 a 40 días, llegando a un producto final 60-70% de humedad y 16-25% de sal. La medusa procesada tiene un rendimiento de aproximadamente 7-10% del peso bruto, según la especie y la fórmula de procesamiento (Omori y Nakano, 2001).

1.1.6. USOS BIOTECNOLÓGICOS DE LAS MEDUSAS

Muchas investigaciones en animales marinos se enfocan en el estudio de compuestos bioactivos para diversos propósitos, incluyendo nuevos medicamentos, suplementos nutricionales y aplicaciones para la biotecnología industrial. Estas investigaciones pueden llevarse a cabo *in vivo* e *in vitro* (Johansen y col., 2010). Las primeras investigaciones biotecnológicas se llevaron a cabo sobre los cnidocistos conocidos por sus efectos tóxicos. Sin embargo, la toxicidad no está exclusivamente asociada a este tipo de células, de hecho, las neurotoxinas también están asociadas con células de la glándula ectodérmica. Por lo tanto, estos estudios a menudo consideran no solo el veneno del nematocisto, sino también la toxicidad de otras partes del cuerpo del animal (Frazão y Antunes, 2016).

Por otro lado, las propiedades bioquímicas y antioxidantes de las medusas, en términos de valores nutricionales y nutraceuticos, todavía están en gran medida inexploradas. La abundancia de colágeno, péptidos y otras moléculas bioactivas hacen que este organismo resulte de interés para fines nutraceuticos, cosméticos y farmacológicos (Leone y col., 2015).

Los componentes bioactivos de las medusas se caracterizan por diversas técnicas. El enfoque tradicional utiliza el extracto de procedimientos de purificación hasta obtener los compuestos puros. Ejemplos de tales ensayos incluyen SDS-PAGE, 2DE, filtración en gel, LC-MS, RP-HPLC, cromatografía de intercambio aniónico, DEAE-Sepharose Fast Flow, MALDI-TOF MS, etcétera. Todos los procedimientos deben realizarse en hielo y las muestras deben almacenarse preferentemente a -80°C , ya que los compuestos son sensibles al calor. La cuantificación de proteínas se puede hacer por varios métodos, pero el método de Bradford o el método de Lowry es el más utilizado (Frazão y Antunes, 2016)

1.2. LAS MEDUSAS COMO FUENTES DE PIGMENTOS

1.2.1. El color en los alimentos

El color es una característica importante de los alimentos. Juega un papel fundamental en la aceptación de los productos, ya que, basándose en éste, se lleva a cabo la primera impresión de aceptación o rechazo, si es seguro para consumir y si se puede esperar un sabor y textura determinados. Dado que el color está estrechamente asociado con las expectativas, la adición de color a los alimentos es una manera de satisfacer éstas. El color se añade a los alimentos por: reemplazar el color perdido durante el procesamiento, mejorar el color natural, las variaciones entre lotes y proporcionar color a productos que carecen de éste.

Los colores de los alimentos se deben a muy diferentes compuestos, principalmente orgánicos, algunos de los cuales se producen durante su manejo y procesamiento, como es el caso del color que se desarrolla en las reacciones de Maillard, a la caramelización o a los pigmentos sintetizados o modificados por un proceso de fermentación. Sin embargo, la mayoría de los alimentos deben su color a las sustancias pigmentadas que contienen o que se añaden. En la mayoría de los casos, estos pigmentos también tienen una función biológica; en el caso de la clorofila es la fotosíntesis y de la mioglobina el del almacenamiento del oxígeno en músculo. Muchos pigmentos se extraen de su fuente natural y se emplean como colorantes en la elaboración de un gran número de alimentos (Guerrero Legarreta y col., 2006).

Los términos "pigmento" y "tinte" se usan indistintamente. Estrictamente hablando, un pigmento es insoluble en el medio dado, mientras que un tinte es soluble (Mortensen, 2006), aunque Zollinger (1991) define a los pigmentos como un tipo de colorantes, separándolos de los tintes. Los pigmentos se caracterizan por ser prácticamente insolubles en el objeto al que se le aplica y por unirse al substrato por compuestos de adición (polímeros en pinturas, plástico o alimentos), mientras que los tintes son aplicados a varios substratos (materiales textiles, piel, papel, cabello, etc.) a partir de un líquido en el cual son solubles.

Existe una distinción entre colorantes y pigmentos; un colorante es cualquier sustancia química natural o sintética que confiera color. Los pigmentos, en cambio, son sustancias naturales de las células, ya sea animales o vegetales, que confieren color. Puede ser definido como aquellos compuestos que absorben en la región UV-A o UV-B. En la industria alimentaria se entiende por colorante aquél que posee una pureza de grado alimentario, es soluble en agua y está certificado por la *Food and Drug Administration* (FDA). Éstos se conocen como colorantes certificados asignándoles a cada uno la categoría FD&C. En la Tabla 1 se muestra una clasificación de los colorantes y un ejemplo de éstos.

Tabla 1. Clasificación de colorantes (Fennema, 2000; Bandaranayake, 2006)

Colorante	Ejemplo
Certificado	
1) Colorante	FD & C Rojo No 40
2) Laca	Laca de FD &C Rojo No 40
Exento de certificación	
1) Pigmentos naturales	Antocianinas, jugo concentrado
2) Sintéticos (idénticos a los naturales)	β -caroteno

Los pigmentos sintéticos son colorantes que no se generan por la naturaleza y son producidos por síntesis química. Los más conocidos comercialmente son cristalinos y contienen una alta pureza, son comercializados como suspensiones micronizadas de aceite y como formulaciones dispersables en agua (Bechtold y Mussak, 2009). Entre los colorantes sintéticos destacan los compuestos azo y las antraquinonas como los de mayor venta. Los pigmentos azo son la clase química más grande e importante de los compuestos coloridos sintéticos, su versatilidad es tal que están disponibles en casi todos los colores, se caracterizan por poseer un grupo cromóforo $-N=N-$. Entre los colores más importantes están los amarillos 5 y 6, los rojos 2, 4 y 40, y el naranja B (Francis, 1997). La segunda clase más importante de compuestos sintéticos son las antraquinonas. Su característica principal es la de poseer uno o más grupos carboxilo en un sistema de anillos conjugados, al menos con tres anillos condensados. Las antraquinonas se dividen en tres grupos:

1. Ácidos sulfonados solubles en agua como el verde 5.
2. Colorantes no sulfonados solubles en aceite que pueden ser convertidos al tipo ácido por sulfonación, como el verde 6.
3. Hidroxiantraquinonas con dos miembros en la lista certificada: violeta 2 y violeta 20, de aplicación externa.

Aunque estos tipos de pigmentos son más firmes en color, contienen mayor intervalo de tinte, menor costo, ausencia de aroma o sabor y una alta efectividad, muchos están relacionados con daños menores a la salud, como alergias, asma, rinitis e hiperactividad en niños.

Los pigmentos naturales son generalmente productos de vías biosintéticas en los que intervienen numerosas enzimas. Los pigmentos resultantes de los procesos metabólicos se pueden clasificar en dos clases: los directamente responsables de los colores de plantas y animales, y los metabolitos secundarios, que pueden o no estar involucrados directamente con los colores visibles de los organismos (Cai y col., 2011). Estos pigmentos son sustancias colorantes o extractos naturales que proporcionan un color menos intenso que sus equivalentes sintéticos y son inestables cuando se exponen a la luz o al calor. Ante la presencia de oxígeno, los pigmentos son susceptibles a oxidarse debido a que contienen

estructuralmente dobles enlaces conjugados (Mortensen, 2006). El pH alcalino produce isomerización trans-cis, así como también solventes como diclorometano, cloroformo, acetona, metanol y acetonitrilo. Los diversos pigmentos encontrados en la naturaleza difieren en su estructura química y en su origen; los más ampliamente distribuidos en los alimentos pueden agruparse en las siguientes categorías (Guerrero Legarreta y col., 2006):

1. Carotenoides
2. Clorofilas.
3. Pigmentos fenólicos: flavonoides, antocianinas y taninos.
4. Betalaínas.
5. Hemopigmentos

Existe un interés creciente en el desarrollo de colorantes de origen natural como aditivos para su uso en la industria alimentaria, alentado por una fuerte demanda de los consumidores por los productos naturales. Se reporta que la producción de pigmentos naturales aumenta a un ritmo de 10% cada año en el mercado internacional (Mortensen, 2006; Cai y col., 2011).

1.2.2. La medición del color

El color se refiere a la percepción humana de los materiales que poseen algún tipo de pigmentación. Es una propiedad directamente relacionada con el espectro de la luz, por lo tanto puede medirse físicamente en términos de energía radiante o intensidad (Guerrero Legarreta y col., 2006). El fenómeno de color es el resultado de cómo un individuo percibe diferentes longitudes de onda de la luz y no es una propiedad inherente del objeto. Según el comité de colorimetría de la Sociedad Óptica de los Estados Unidos (*Optical Society of America*) la definición de color adoptada internacionalmente es: “El color consiste en las características de la luz distinta de su homogeneidad espacial y temporal”, siendo la luz “el espectro de energía radiante que el observador humano es capaz de percibir por la estimulación que produce en sus retina” (Alejandre, 1999).

Los colores visibles abarcan longitudes de onda entre 300 y 700 nm (ultravioleta a rojo). En sistemas animales, los colores como el rojo, el naranja y el amarillo se deben en su mayoría a pigmentos carotenoides; sin embargo, los pigmentos azules como tales son muy raros (Bulina y col., 2004). En general, se acepta que el color azul se debe a la percepción de la reflectancia selectiva de la luz entre las longitudes de onda de 450 y 490 nm (Figura 6). Ya que los colores son un fenómeno de percepción, las características y condiciones de cada espectador dicta en última instancia cómo se perciben las longitudes de onda.



Figura 6. Espectro visible

Los atributos de la percepción de color incluyen: claridad, tono, saturación, forma, localización, textura, pulimiento, transparencia, entre otros. Excepto los tres primeros, todos los demás se refieren a aspectos espaciales y temporales de la percepción. El tono es el atributo se refiere a un color determinado: rojo, verde, azul, etcétera; se relaciona con una longitud de onda determinada del espectro continuo (longitud de onda dominante). La saturación indica la relación entre el blanco y el color espectral puro; es la inversa a la proporción del blanco. La claridad se refiere a la cantidad de luz; en el aspecto físico este atributo del color se asocia con la emisión de la fuente de luz o con la iluminación del objeto que se trate (Alejandre, 1999).

Sin embargo, es necesario estandarizar un color determinado para poder clasificarlo y reproducirlo. El procedimiento utilizado en la medición del color consiste en sumar la respuesta de estímulos de colores y su normalización a la curva espectral de respuesta del fotorreceptor sensible al color. Como referencia, se utiliza la curva espectral codificada de la Comisión Internacional de Iluminación, (CIE por sus siglas en francés, *Commission*

International de L'Éclairage) llamada función colorimétrica. Debe notarse que el color es una característica subjetiva, pues solo existe en el ojo y en el cerebro del observador humano, no siendo una característica propia de un objeto. Los fotorreceptores del ojo humano son los conos de la retina, de los que existen diferentes tipos, con sensibilidades diferentes a las distintas partes del espectro luminoso (Alejandre, 1999).

La apreciación del color involucra un efecto del cerebro humano a través de una señal captada con los ojos, estos son órgano muy sensible que, en el ser humano, pueden detectar más de 10,000,000 colores diferentes. Es posible estimar rigurosamente el estímulo recibido por el ojo humano, el cual eventualmente es interpretado como un color, por lo que los instrumentos colorimétricos están diseñados para proporcionar automáticamente valores estandarizados (como valores triestímulo y coordenadas de color de un estímulo dado), sin usar el ojo humano. Este es el caso de instrumentos tipo Hunter Lab o Minolta (Ansorena y col., 1997). La medición de color por espectrofotometría evalúa la luz transmitida o reflejada por un objeto, comparando la radiación a la salida del objeto con la incidente, para cada longitud de onda (Selvameenal y col., 2009). La espectrofotometría como técnica de estudio de color, permite la obtención de curvas espectrales. El color de un material determinado es el combinación de la absorción (o reflexión) de la radiación en cada una de las bandas de color de espectro visible. Así, todos los materiales tienen un espectro característico que indica la radiación que absorbe o refleja con respecto a la radiación incidente, una determinada longitud de onda. Cada curva espectral representa un color; por lo tanto, aunque puede haber colores con varias curvas con distinta composición espectral, estos colores aparecen iguales al ojo humano (Alejandre, 1999).

1.2.3. Colorantes azules en la industria

El color azul es muy escaso en las plantas y animales. Cuando se produce en la naturaleza, es el efecto de la difracción o dispersión de la luz, y aún en esos casos las tonalidades azules son poco comunes probablemente debido a que son el resultado de absorción de luz a una longitud de onda alta (>600 nm) (Bulina y col., 2004). En oposición a los colores amarillo y rojo, la producción de color azul necesita de una cantidad considerable de energía absorbida,

lo que necesita un sistema polar electrónico conjugado (Gastineau y col., 2014). Los colorantes azules usados en la industria son mayormente de origen sintético.

La familia de pigmentos sintéticos azules tiene varios miembros y amplios usos en ciencias de la salud y asuntos industriales. El colorante sintético *Brilliant Blue G*, también conocido como *Coomassie Brilliant Blue* se sintetizó primero a partir del colorante de alquitrán de hulla. Es estable cuando se expone a la luz, al calor y a condiciones ácidas, mientras que tiene baja estabilidad oxidativa.

El azul brillante europeo FCF o E133 (o *FD&C Blue N°1* en Estados Unidos), es uno de los tintes más comunes utilizados en alimentos y preparaciones cosméticas y medicamentos. Es aprobado en varios países para ser utilizado como aditivo alimentario en productos lácteos, dulces, cereales, queso, coberturas, jaleas, licores y refrescos (Klimová y col., 2013). Este colorante se utiliza también en cosméticos como champús, esmaltes de uñas, lápices labiales y en el sector textil. Los usos de este colorante se justifican debido a su alto costo-beneficios. *FD&C Blue N° 1* también se encuentra en alimentos y bebidas verdes en combinación con una mezcla con colorantes amarillos. Tiene una baja absorción gastrointestinal, y la cantidad absorbida es altamente excretada por vesículas biliares y vías urinarias; tiene además propiedades genotóxicas debido a la intercalación de bases de ADN (Klimová y col., 2013), por lo que en Canadá el uso está limitado a 100 ppm y en la Unión Europea se restringe a algunos alimentos.

1.2.4. Algunos pigmentos abundantes en el ambiente marino

Las características de color de los organismos son el resultado visual de tres procesos diferentes:

- 1) La formación metabólica de pigmentos naturales o el almacenamiento de pigmentos ingeridos, tanto de moléculas con colores o pigmentos químicos que reflejan y transmiten partes de la luz visible.

- 2) La formación de los colores estructurales (estructuras no pigmentadas), que incluyen laminados, estrías, burbujas de aire, cristales, partículas, etcétera que dividen la luz en sus colores constituyentes por la reflexión, la dispersión y la interferencia.
- 3) Una combinación de ambos.

La distribución y la función de los pigmentos varían entre grupos de invertebrados. Además de jugar un papel importante en cómo los organismos marinos interactúan, los pigmentos pueden estar implicados en procesos fisiológicos. Aunque los pigmentos nitrogenados predominan, los organismos marinos contienen pigmentos pertenecientes a todas las clases principales así como algunos que son únicos para el medio marino (Bandaranayake, 2006). Los animales marinos, especialmente los de aguas tropicales, son brillantemente coloreados. A medida que aumenta la profundidad, los colores varían, comenzando por la escala de rojos y violetas (Ramirez y col., 2013). Los animales marinos que viven a profundidades superiores a 500 m, se encuentran profundamente coloreados (generalmente rojo, café, negro o morado) a pesar de las condiciones de escasa o nula luz por debajo de estas regiones. Sin embargo, hay poca información sobre la naturaleza y la función de muchos de estos pigmentos, en parte debido a la dificultad de muestreo. Por lo que han habido muy pocas investigaciones químicas y bioquímicas en estos pigmentos (Bonnett, 1979).

El Phylum Coelenterata, que incluye a anémonas, medusas, corales duros y blandos, hidrozoos, esponjas (*Demospongiae*), seguidos de los moluscos (*Mollusca*) y equinodermos (*Echinodermata*) tiene algunas de las coloraciones más espectaculares, así como los patrones de color más inusuales en el ambiente marino. La mayoría de estos organismos marinos de colores son sésiles. A pesar de sus brillantes colores, se sabe muy poco acerca de la química de los pigmentos de esponjas, anemonas corales, medusas y ascidias. Los pigmentos de cnidarios y ascidias se pueden difundir a través de la pared del cuerpo o localizarse en espículas o materiales esqueléticos. La relación espacial de los pigmentos de partes duras, zonas transparentes o entre sí puede dar lugar a la iluminación o la intensificación de los colores (Bandaranayake, 2006).

En el caso de las bacterias marinas, y a pesar de la dificultad de aislar y cultivarlas, los metabolitos microbianos son cada vez más atractivos para la investigación e industria debido a su actividad farmacológica de amplio alcance, especialmente aquellos que producen pigmentos (Soliev y col., 2011). La Tabla 2 enlista algunos de los pigmentos de bacterias marinas con actividad biológica. Los pigmentos presentes en el ambiente marino pertenecen a varias familias químicas. A continuación, se describen los principales pigmentos marinos, aislados de bacterias y su actividad biológica.

Tabla 2. Algunos pigmentos bioactivos, aislados de bacterias marinas (Soliev y col., 2011)

Pigmento	Actividad	Bacteria productora
Undecilprodigiosina	Anticáncer	<i>Streptomyces rubber</i>
Cicloprodigiosina	Inmunosupresor; Anti-cáncer; Antimalaria	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>
Hetpilprodigiosina	Antiplasmódica	<i>α-Proteobacteria</i>
Prodigiosina	Antibacterial; Anticáncer; Algicida	<i>Pseudoalteromonas rubra Hahella chejuensis</i>
Astaxantina (caroteno)	Antioxidante	<i>Agrobacterium aurantiacum Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>
Violaceina	Antibiótico; Antiprotozoarios; Anticáncer	<i>Pseudoalteromonas tunicata Pseudoalteromonas sp. 520P1 Collimonas CT</i>
Metil safenato	Antibiótico	<i>Pseudonocardia sp. B6273</i>
Derivados de fenazina	Citotóxico	<i>Bacillus sp.</i>
Fenazina ácida	Antibiótico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Metilester de 5,10-dihidrofencomicina	Antibiótico	<i>Streptomycete sp.</i>
Fridamicina D, Himalomicina A, Himalomicina B	Antibacterial	<i>Streptomycete sp. B6921</i>
Piocianina y piorubrina	Antibacterial	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Cinicomicina A y Cinicomicina B, Manumicina A	Anticáncer	<i>Streptomycete sp. M045</i>
Tambjamins (pirroles y sus análogos sintéticos)	Antibiótico, Anticáncer	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i>
Scitonemina	Protección de radiación UV; Antiinflamatorio	Cyanobacteria
Triptantrina	Antibiótico	<i>Cytophaga/Flexibacteria</i>

1.2.4.1. Carotenoides

Los pigmentos carotenoides constituyen un grupo de compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son considerados indispensables para la vida, fundamentalmente debido a las diferentes funciones que llevan a cabo en relación con la fotosíntesis (Meléndez-Martínez y col., 2007); son responsables de colores de un gran número de frutas, vegetales, partes de plantas y, al ser ingeridos, de partes de algunos animales (Onodera y col., 2014).

Los carotenoides pertenecen a la clase de los polienos, cadenas largas con dobles ligaduras conjugadas cuya presencia explica el color intenso, ya que los sistemas conjugados presentan resonancia posicional, lo que produce una deslocalización electrónica y, por lo tanto, absorben energía que se traduce en emisiones energéticas de determinadas longitudes de onda lo que da como resultado el color. El espectro de absorción tiene máximos cuyas longitudes de onda dependen del número de dobles enlaces conjugados (Fennema, 2000).

A los carotenoides se les han atribuido varias funciones en la planta. Por ejemplo, por estar presente en los órganos reproductivos hace postular que cumplen funciones de preservación de la especie; también cumplen funciones antioxidantes y de material de reserva. El carotenoide más conocido es el β -caroteno o provitamina A (Figura 7).

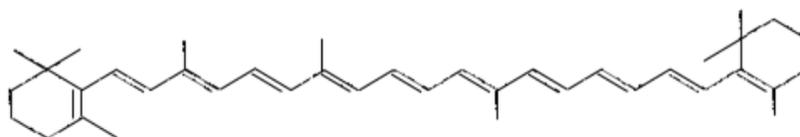


Figura 7. Estructura del β -caroteno

Entre sus actividades más importantes está la relacionada con la visión, una propiedad que, además del β -caroteno, poseen alrededor del 10% de los carotenoides identificados en la naturaleza (Vílchez y col., 2011). Por una reacción de oxidación se transforma en retinal, el cual se conjuga con la proteína opsina por la terminal lisina para formar la rodopsina, pigmento fotosensible principal de la retina, como se muestra en la Figura 8.

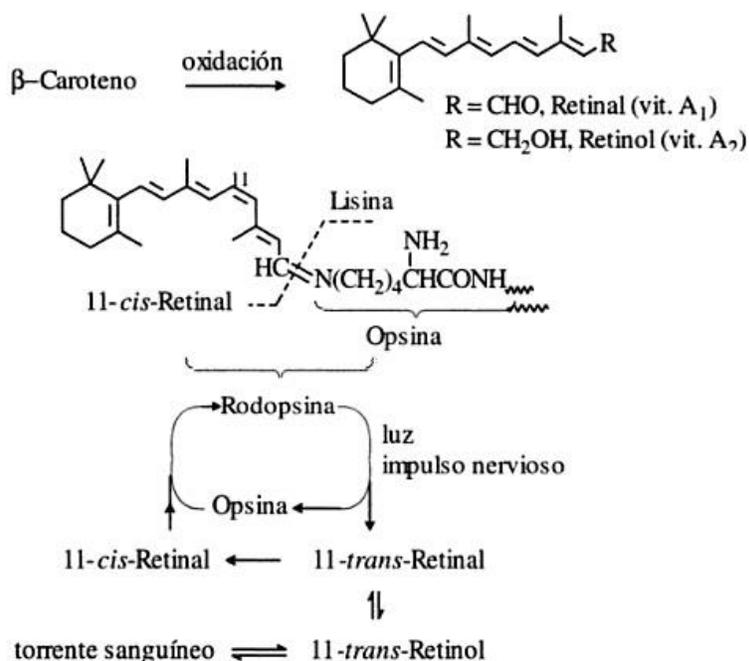


Figura 8. Conjugación de β -caroteno y opsina en el proceso de visión

La deficiencia de β -caroteno provoca alteraciones en la visión, diversas enfermedades pulmonares y patologías de la cavidad oral. Los animales y los seres humanos no pueden sintetizar carotenoides *de novo*, aunque son capaces de convertirla en vitamina A. La dieta es la única fuente de estos precursores para la síntesis de retinol proviniendo de frutas, verduras y microalgas, siendo los carotenoides los principales proveedores de provitamina A activa. Se ha propuesto una ingesta diaria recomendada de 6 mg. Este valor se basa en la contribución de compuestos con actividad de provitamina A, especialmente β -caroteno, al que se ha asignado una actividad de provitamina A de 100% (Vílchez y col., 2011).

Los carotenoides se han utilizado tradicionalmente en los alimentos para humanos y animales debido a sus propiedades de color. Los carotenoides naturales se utilizan para reforzar el color de peces, lo que aumenta la percepción de calidad de los consumidores. Un ejemplo es la adición de carotenoides a las dietas de trucha y salmón de piscifactorías en donde, además de materias pigmentantes de la carne, actúan como factores de crecimiento. La funcionalidad biológica de los carotenoides también es factor de su asociación con proteínas, a través de la cual se favorece su estabilidad *in vivo* (Britton y col., 2008). Los animales marinos contienen

varios carotenoides con amplia diversidad estructural. Entre los 750 carotenoides reportados en la naturaleza, más de 250 son de origen marino. En particular los carotenoides alénicos, a excepción de neoxantina y sus derivados. Como los animales no sintetizan a los carotenoides, los que se encuentran en estos provienen de sus fuentes alimenticias, o son parcialmente modificados a través reacciones metabólicas, como se muestra en la Figura 9. Las principales conversiones metabólicas de los carotenoides ocurridas en los animales son la oxidación, la reducción, la traducción de dobles enlaces, la escisión oxidativa de enlaces dobles, y escisión de los enlaces (Maoka y col., 2014).

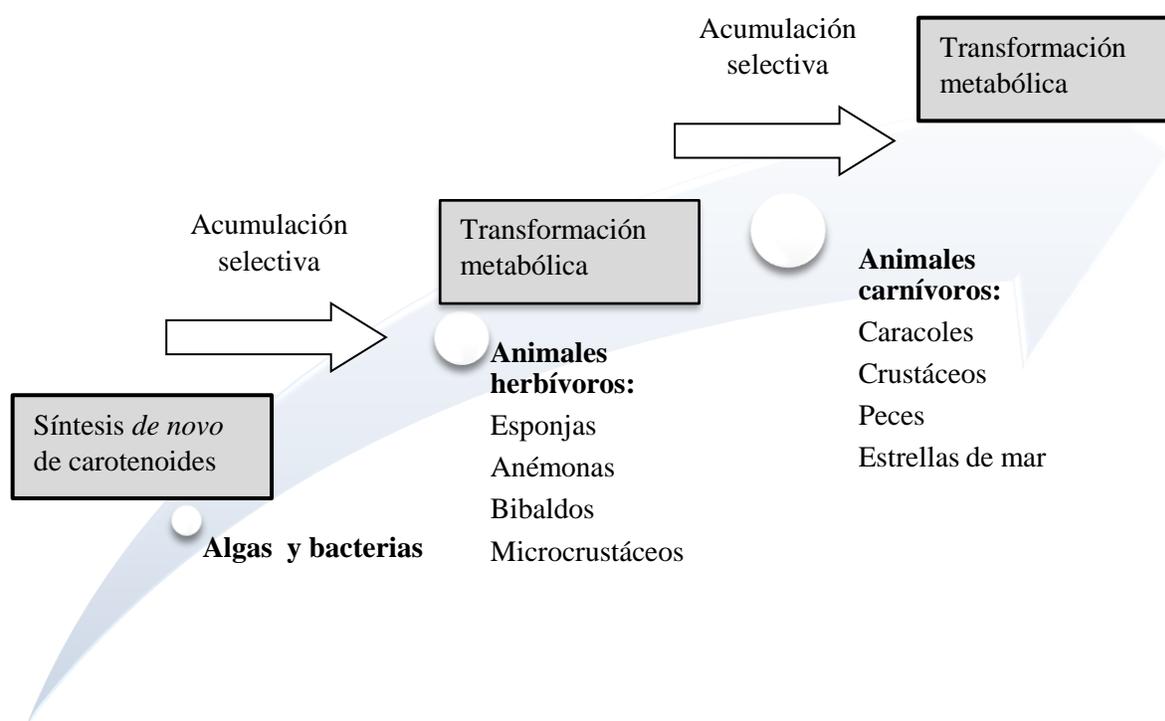


Figura 9. Acumulación y el metabolismo de los carotenoides en los animales marinos a través de la cadena alimentaria

Los carotenoides marinos también son los responsables del color de un gran número de peces y moluscos. Sin embargo, hay poca información sobre el impacto de estos pigmentos en la salud humana, mientras que existen numerosas revisiones en el tema acerca de los carotenoides de origen terrestre. Los efectos benéficos potenciales de los carotenoides marinos se han centrado en la astaxantina y la fucoxantina, los más abundante. Ambos

carotenoides presentan una alta actividad antioxidante que se atribuye al bloqueo del oxígeno singulete y de los radicales libres. Este papel en la dieta es sugerido como uno de los principales mecanismos de sus efectos preventivos contra el cáncer y la inflamación (Onodera y col., 2014).

Por ejemplo, el origen de la astaxantina presente en especies como *Coelenterata* es el zooplancton de la dieta. Se han encontrado peridinina, piroxantina y diadinoxantina en algunos corales, originados en dinoflagelados simbióticos. Por otro lado 2-nor-astaxantina y actinioeritrina se han reportado en las anémonas de mar (Figura 10) (Bandaranayake, 2006).

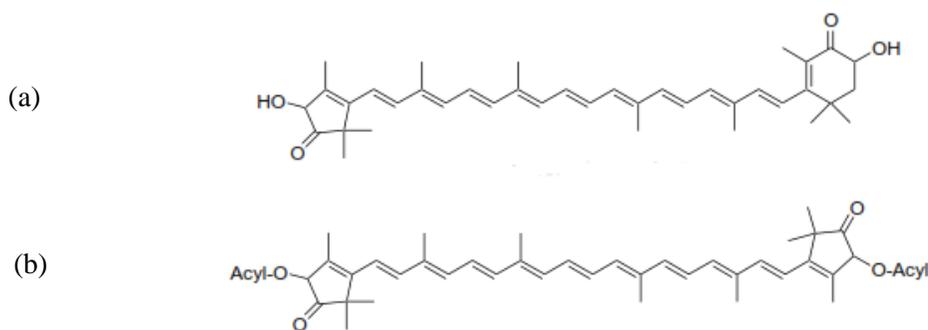


Figura 10. Carotenoides típicos en anémonas: (a) 2-nor-astaxantina; (b) actinioeritrina

1.2.4.2. Pigmentos fenólicos

Estas son sustancias con uno o más anillos aromáticos y, al menos, un sustituyente hidroxilo. Se distinguen dos grandes grupos, los ácidos fenólicos (benzoico y cinámicos) y los flavonoides (flavonoides, antocianinas y taninos). Los ácidos fenólicos tienen un solo anillo mientras que los flavonoides tienen dos anillos fenólicos unidos por un anillo heterocíclico. Los pigmentos fenólicos reaccionan fácilmente con un ácido orgánico o un azúcar, como los flavonoides y las antocianina, o entre sí para formar polímeros como los taninos (Fennema, 2000).

También perteneciendo a la familia de pigmentos fenólicos se encuentran los pigmentos policétidos, de tres tipos sustituidos de diferente forma: las naftoquinonas y las antraquinonas

(Figura 11) y los naftopiranos (Figura 12) que se han aislado de varios organismos marinos. La *Crinoidea* (estrella de pluma) contiene sulfatos fenólicos derivados de naftopironas. La ubiquinona (coenzima Q10, CoQ10) y el ubiquinol, pertenecientes a esa familia química, no son pigmentos visibles sino enzimas respiratorias (Figura 13), por ejemplo, la hidroxihidroquinona, fácilmente oxidable, se produce en la esponja *Axinella polypoides*. Aunque las naftoquinonas se han encontrado en varias clases del Phylum Echinodermata marina, hasta hace poco las antraquinonas y naftopironas se limitaban a una sola clase, los *Crinoideos* (lirios de mar), y *Crinemodin*; parece ser que estos son uno de los pigmentos más comunes crinoideos. El color amarillo sulfuroso de la esponja del Mar Rojo *Verongia (Aplysina) aerophoba* es debido a la uranidina, hidroquinona quinolina responsable del rápido ennegrecimiento observado cuando la esponja se expone al aire. Este cambio de color es debido al aumento de pH en las células dañadas y consecuente oxidación aérea. Una de las quinonas más inusuales, la halenaquinona, proviene de la esponja tropical *Xestospongia exigua* que es, al menos en parte, responsable de su color amarillo oscuro (Bandaranayake, 2006).

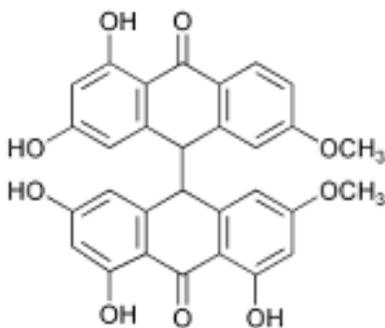


Figura 11. Estructura de antraquinonas

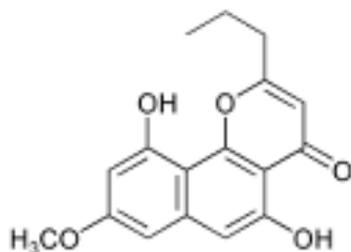


Figura 12. Estructura de naftopiranos

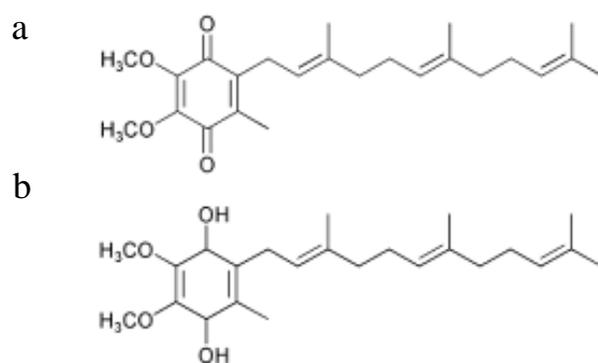


Figura 13. Estructura de ubiquinona (a) y ubiquinol (b)

1.2.4.3. Azulenos

Los azulenos son hidrocarburos no alternados, consisten en un anillo de siete miembros, insaturado, fusionado con un anillo de cinco miembros insaturados (Figura 14). En contraste con la estructura de isómeros estructurales no polares, como el naftaleno, los azulenos tiene una estructura asimétrica altamente polar, con un momento dipolar permanente. Como tal, los azulenos absorben la luz roja en la región visible (600 nm) de la primera transición del estado excitado y a la luz UVA (330 nm) de la segunda transición del estado excitado, para iniciar posibles reacciones fotoquímicas en estado excitado. Debido a su absorción de la luz, las soluciones acuosas de azuleno producen un color azul. Este es drásticamente diferente de naftaleno que absorbe la luz sólo en la región UVB (Wang, y col., 2013).



Figura 14. Estructuras de azulenos

Los colores brillantes de la fauna marina tropical incluyen una gran variedad de tonos de azul y púrpura. La estructura molecular de los pigmentos azules marinos se desconocía hasta el aislamiento de guaiazuleno de la gorgonia octocoral *Euplexaura erecta*. Posteriormente, varios tonos de azul y del verde se han atribuido a otro guaiazuleno y derivados sesquiterpenoides relacionados. Sin embargo, los colores azules también pueden deberse a otros pigmentos, como tetrapirroles y carotenoproteínas (Bandaranayake, 2006). Además, en el ambiente marino, los pigmentos fotosintéticos del zooplacton o de las cianobacterias que colonizan las células animales pueden producir colores azules.

1.2.5. Pigmentos en medusas

Entre los pigmentos producidos por las medusas, se han identificado dos compuestos azules con componentes proteicos. *R. pulmo* (Scyphozoa), presente en las costas rusas del Mar Negro, contiene el pigmento rpulFKz1 que imparte una intensa coloración azul en los márgenes de la campana. Bulina y col. (2004) lo caracterizaron por primera vez en un extracto crudo, obtenido con agua de mar a 4°C. Se extrajo una fracción del pigmento, intensamente coloreada. Esta fracción se trató con fenol, observando una pérdida completa de la coloración con lo que se concluyó que el pigmento tenía una naturaleza proteica. Asimismo, las pruebas rápidas de identificación de carotenoides mostraron que el compuesto no pertenecía a esta familia. SDS-PAGE de la proteína azul, aislada por precipitación con sulfato de amonio, tuvo un peso molecular promedio de 30 kDa. El pigmento Cassio azul (*Cassio blue*), aislado de la medusa *Cassiopea xamachan* y también de naturaleza proteica, fue extraído con agua de mar presentando de igual forma un peso molecular aproximado de 30 kDa (Phelan y col., 2005). Teniendo en cuenta la similitud de las propiedades espectrales

y bioquímicas es posible concluir que rpulFKz1 y Cassio azul pertenecen a la misma clase de pigmentos. En el caso de Cassio azul, Phelan y col. (2005) infieren que el pigmento se es una cys-glucoproteína multimérica que consta de monómeros de 30 kDa, los cuales contienen un cromóforo unido covalentemente. Además, se observó que tanto rpulFKz1 como Cassio azul solo se presenta en la campana y no dentro de las células, por lo que no es claro si las células de medusas son la fuente del pigmento (Bulina y col., 2004; Phelan y col., 2005).

1.3. Las medusas como fuente de colágeno

1.3.1. El colágeno

Las proteínas más abundantes en la matriz extracelular de la medusa pertenecen a la familia del colágeno. Esta es la proteína más abundante de origen animal, constituye 25 a 30% del total de las proteínas de los organismos animales. Se encuentra en el tejido intersticial de prácticamente todos los órganos, donde contribuye a la estabilidad de los tejidos y órganos, y mantiene su estructura e integridad (Gelse y col., 2003). En el músculo estriado, forma una cobertura de las fibras musculares y alrededor del músculo (Figura 15). El colágeno tiene una estructura de triple hélice, lo que le confiere su alta resistencia y propiedades de retención de humedad.

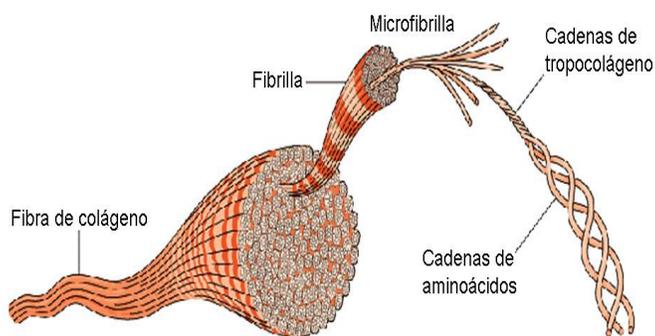


Figura 15. Localización del colágeno en la estructura del músculo estriado

La pérdida de la cantidad y estructura espacial de esta proteína disminuye la elasticidad de los tejidos y aumenta su fragilidad. El colágeno es de gran importancia como material biomédicos, así como en la industria farmacéutica y cosmética (Lu y col., 2004).

1.3.2. ESTRUCTURA DEL COLÁGENO

La triple hélice de colágeno está formada por unidades de tropocolágeno, cada una de ellas con aproximadamente 1000 residuos (Figura 16). Las cadenas individuales son hélices orientadas a la izquierda, con aproximadamente 3.3 residuos/vuelta, con enlaces de hidrógeno entre ellas (Gomez-Lizarraga y col., 2011). Cada tercer residuo es glicina, el cual se encuentra cerca del centro de la hélice. La formación de las hélices individuales se favorece por la presencia de prolina o hidroxiprolina, repitiéndose la secuencia Gly-X-Y, donde X suele ser prolina e Y prolina o hidroxiprolina.

La resistencia mecánica del colágeno se debe en gran parte al entrecruzamiento de las moléculas de tropocolágeno por las cadenas laterales de la lisina, algunas de estas se oxidan para dar lugar a derivados aldehídos, que pueden reaccionar con un residuo de lisina o bien unos con otros mediante una condensación aldólica y deshidratación para dar lugar a más entrecruzamientos. Este proceso continúa con el tiempo, aumentando el número de entrecruzamientos, que hacen que el colágeno sea cada vez menos elástico y más quebradizo.

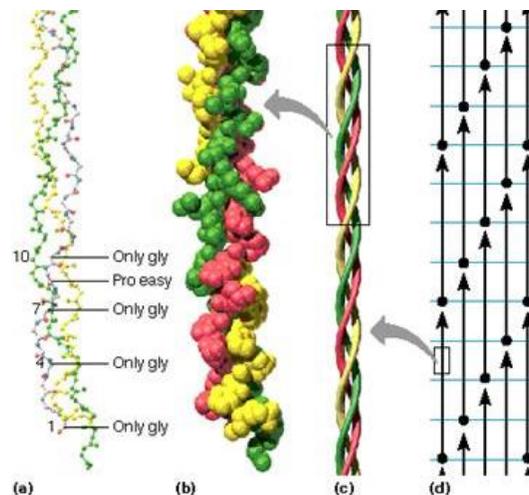


Figura 16. Estructura del colágeno

1.3.3. TIPOS DE COLÁGENO

El colágeno tiene variantes genéticas que se agrupan en 26 tipos designados como I a XXVI. Estos se caracterizan por diferencias en las propiedades físicas debidas a la secuencia de aminoácidos. La característica estructural común de los colágenos, la triple hélice, puede variar desde 96% en el colágeno I, hasta menos del 10% en el colágeno tipo XII. La diversidad estructural se incrementa por la existencia de cadenas α , varias isoformas moleculares y estructuras supramoleculares, así como empalme (*splicing*) alternativo, que produce alrededor de 28 tipos de colágeno (Ricard-Blum, 2011). Los telopéptidos son los responsables de la posible respuesta inmunogénica que puede presentar un biomaterial a base de colágeno. Para eliminar este problema, los telopéptidos se remueven mediante el empleo de enzimas proteolíticas como la pepsina.

1.3.4. EXTRACCIÓN DE COLÁGENO

Industrialmente, el colágeno se obtiene principalmente de piel y huesos de porcinos y bovinos. Sin embargo, debido a la posibilidad de transmisión de enfermedades tales como encefalopatía espongiiforme bovina o prácticas religiosas y culturales, la obtención de colágeno a partir de organismos acuáticos se ha incrementado considerablemente. La medusa es una fuente promisoriosa, la cual se ha investigado en años recientes. El uso del colágeno en las industrias de alimentos, cuero, cosméticos y productos biomédicos tales como membranas biológicas, se ha potenciado en los últimos años. Debido a su estructura entrecruzada, aún después de solubilizarlo, el colágeno conserva algunos de estos entrecruzamientos, por lo que generalmente las soluciones obtenidas contienen una mezcla de oligómeros. La extracción del colágeno a partir de tejidos animales debe ser cuidadosamente controlado, ya que cualquier cambio en las condiciones de proceso produce variaciones en la concentración de colágeno y, por tanto, en el rendimiento del producto final y en las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del biomaterial (Gomez-Lizarraga y col.,2011). Para la extracción de colágeno se lleva a cabo una solubilización inicial en el tejido mediante ácido acético (fracción ácido soluble). Posteriormente, se extrae enzimáticamente con pepsina en 5% de ácido acético (fracción pepsina soluble). La extracción de cada fracción se realiza en

agitación en frío (4°C) de 24 a 48 h. El extracto de colágeno se somete a centrifugación a 20000 g por 1 h, mientras que el sobrenadante se dializa con Na₂HPO₄ por 72 h. El precipitado es separado por centrifugación y resuspendido en ácido acético (Nagai y col., 1999).

2. JUSTIFICACIÓN

Existen pocas especies de medusas que han sido estudiadas con fines biotecnológicos, entre éstas, se encuentra la medusa comestible *R. esculentum*, abundante en los litorales de China. Otras especies florecen abundantemente, causando un impacto negativo a diversas actividades humanas, como es el caso de *A. aurita* y *S. meleagris*. De estudios recientes se ha concluido que las fluctuaciones en la biomasa de medusas son cíclicas y su abundancia va en aumento.

Estas especies marinas representan un reservorio de productos naturales en gran parte inexplorados, una fuente potencial de alimentos diversos, de nuevos fármacos y de compuestos bioactivos. Por esta razón, las moléculas bioactivas de organismos marinos, como las medusas son el foco de investigaciones recientes.

La pesca responsable y sustentable en México de *S. meleagris* puede generar beneficios, tanto con fines de consumo humano, como en el uso de compuestos bioactivos. Una de estas alternativas es la extracción de pigmentos de origen natural para uso industrial.

El uso de algunas especies, como es el caso de *R. pulmo* y *A. aurita* puede orientarse a la extracción de colágeno. En general, las medusas son una materia prima de alto valor potencial debido a su composición mayoritaria de agua y proteínas, la más abundante de estas últimas es el colágeno.

Por lo anterior, la presente tesis consistió en las siguientes etapas:

- Estudios histológicos de *Stomolophus meleagris*
- Extracción y caracterización preliminar del complejo formado por el pigmento azul y la proteína asociada de *Stomolophus meleagris*
- Extracción y caracterización preliminar de colágeno de *Rhopilema esculentum*, *Aurelia aurita* y *Rhizostoma pulmo*.

3. HIPÓTESIS

Las medusas, en particular *Stomolophus meleagris*, *Rophilema esculentum*, *Aurelia aurita*, y *Rhizostoma pulmo* son fuente de moléculas de alto valor potencial, como el pigmento azul y el colágeno. La posibilidad de obtener estos compuestos en forma parcialmente purificada representa una base para el uso racional de este recurso, abundante en los mares mexicanos.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener y caracterizar parcialmente biomoléculas de posible importancia en la industria alimentaria a partir de cuatro tipos de medusas. Dichas biomoléculas son: complejo pigmento azul-proteína a partir de *Stomolophus meleagris*, y colágeno a partir de *Rophilema esculentum*, *Aurelia aurita* y *Rhizostoma pulmo*.

Objetivos Particulares

- Caracterizar algunos tejidos de *Stomolophus meleagris*, capturada en mares mexicanos, así como *Rhizostoma pulmo* y *Aurelia aurita* capturadas en costas españolas del Mar Mediterráneo.
- Establecer las condiciones óptimas de extracción y purificación parcial del complejo pigmento azul-proteína a partir de *Stomolophus meleagris*.
- Establecer las características fisicoquímicas del extracto pigmentado.
- Conocer las características moleculares de la proteína asociada (peso molecular, presencia de azúcares, perfil de aminoácidos).
- Conocer la estabilidad del extracto pigmentado por efecto del pH y temperatura.
- Establecer las condiciones óptimas para la extracción de colágeno a partir de *Rophilema esculentum*, *Rhizostoma pulmo* y *Aurelia aurita*.
- Caracterizar al colágeno extraído a partir de *Rophilema esculentum*, *Rhizostoma pulmo* y *Aurelia aurita*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Estudios histológicos de *Stomolophus meleagris*

5.1.1. Obtención de los especímenes

Para poner a punto las técnicas histológicas, se utilizaron especímenes de *Crisaura*, ya existentes en el laboratorio de Ecotoxicología, del Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Posteriormente, se procedió a estudiar especímenes de *S. meleagris* que se colectaron en Laguna de Tecolutla, Veracruz (Latitud 20.474; Longitud -97.014), Laguna de Mandiga Grande, Veracruz (Latitud: 18.991; Longitud: -96.075) y La Roqueta, Acapulco, Guerrero (Latitud: 16.829; Longitud: -99.912).

5.1.2. Preparación de las muestras

5.1.2.1. Fijación

Se colocaron las muestras de los tejidos en recipientes de vidrio con solución fijadora de formol al 4% durante 72 h. Las muestras fijadas se dividieron en tres tipos de corte: corte transversal desde la zona exumbrelar hasta la zona subumbrelar; corte medio de campana a campana; y corte a los tentáculos. Estas muestras se colocaron en casetes para histología (Histosette, Leica Biosystems, Nussloch, Alemania) previamente etiquetados. Los casetes, se sumergieron para su conservación en una solución de alcohol al 70% (Fan y col., 2013), y se colocaron en un procesador automático de tejidos Leica, modelo TP 1020 (Leica Biosystem), en el cual se llevó a cabo la fijación, deshidratación, aclaración e infiltración con parafina líquida. La secuencia para la inclusión y los tiempos de la misma se muestran en la Figura 17.

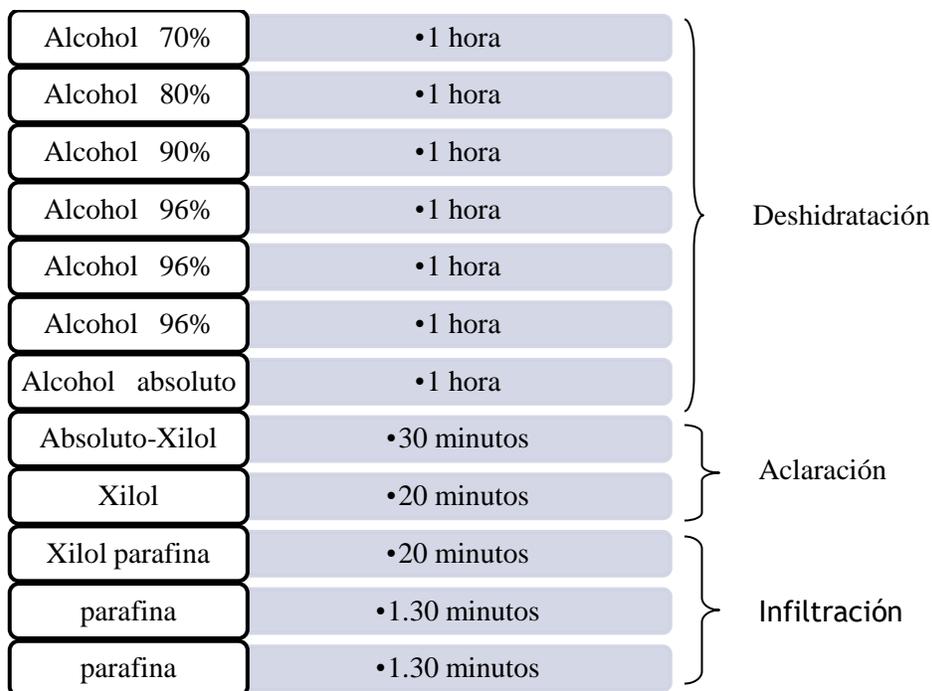


Figura 17. Preparación de muestras en el procesador automático de tejidos Leica^{MR}.
Volumen mínimo y máximo: 1.2-1.5 L

5.1.2.2. Inclusión en parafina

Concluida la inclusión en parafina se continuó con el colado de bloques en un incluidor Leica modelo EG1140C. Cada tejido incluido se colocó en un molde con ayuda de pinzas de punta plana, de modo de que el tejido quedara en dirección del corte requerido, ya sea de forma longitudinal o transversal. El molde se llenó de parafina líquida previamente calentada a 60 a 70°C, encima del cassette Histosette. Finalmente; se enfrió a 4°C en un solidificador Leica modelo EG1140H. Cuando se endureció la parafina, se desprendió del molde y se conservó en un lugar fresco hasta ser cortado con un micrótopo.

5.1.2.3. Corte

Se utilizó un micrótopo rotario Microm modelo HM315 (Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Alemania), con la finalidad de obtener cortes lo suficientemente delgados para ser

iluminados a través y ser observados y analizados en un microscopio óptico, una vez teñidos. Se realizaron cortes de 5 μm de espesor, colocándolos en un portaobjetos (Figura 18).

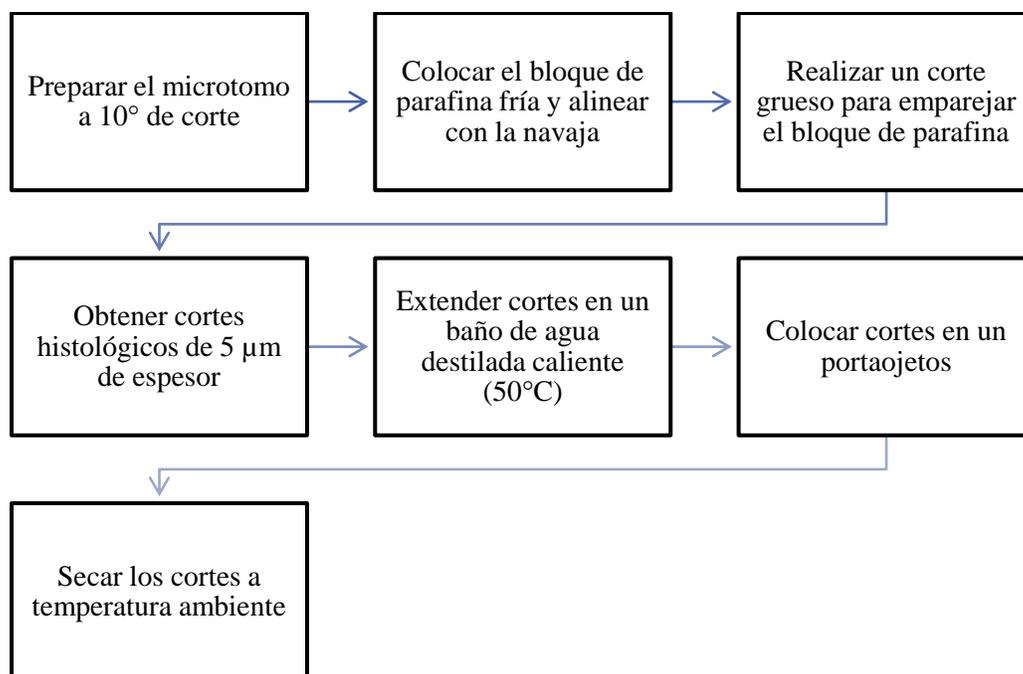


Figura 18. Secuencia de inclusión en parafina y corte

5.1.2.4. Tinción

Los cortes se secaron en 58°C durante 1 h para adherir el tejido al porta objetos y eliminar el exceso de parafina. Los portaobjetos se sumergieron en los reactivos mencionados en la tabla 3 para la tinción diferencial de los componentes celulares. Los tiempos fueron adaptados para ser los óptimos a muestras de medusas.

5.1.2.5. Montaje y observación

Una vez teñidos los cortes, se montaron en resina sintética disuelta en xileno. Se cubrieron con cubreobjetos cuidando de que no quedaran burbujas sobre el corte histológico y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 h. Finalmente, los cortes histológicos teñidos

se observaron en un microscopio óptico (Leica DM300, Microsystem, Alemania) con cámara digital acoplada, utilizando los objetivos 4X, 10X y 40X.

Tabla 3. Secuencia y tiempos de eliminación de parafina y tinción con Hematoxilina –Eosina (HE)

Reactivo	Tiempo
Xileno I	2.5 min
Xileno II	2.5 min
Alcohol Absoluto I	2.5 min
Alcohol Absoluto II	2.5 min
Alcohol 96% I	2.5 min
Alcohol 96% II	2.5 min
Alcohol 70%	2.5 min
Agua destilada	5 min
Hematoxilina	10 min
Alcohol ácido (1%)	Instantáneo
Agua corriente	Lavado
Agua amoniacal	2-3 s
Agua destilada	5 min
Alcohol 80%	2 min
Eosina	5 min
Alcohol 96%	2.5 min
Alcohol 96% II	2.5 min
Alcohol Absoluto I	2.5 min
Alcohol Absoluto II	2.5 min
Alcohol Xileno	2.5 min
Xileno I	2.5 min
Xileno II	2.5 min

5.2 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DEL COMPLEJO PIGMENTO-PROTEÍNA DE *Stomolophus meleagris*

5.2.1. Obtención de los especímenes y preparación de las muestras

Los especímenes de *S. meleagris* utilizados en la extracción de pigmentos se capturaron en Bahía de Lobos, Sonora, Mexico (Longitud: 27.352; Latitud: -110.453) y en la Laguna Mandinga Grande, Veracruz, a finales de Julio de 2015. Las muestras recolectadas en las costas de Sonora fueron congeladas posteriormente a su captura y transportadas a la Ciudad de México. Una vez en el laboratorio (Bioquímica de Macromoléculas, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa), las muestras se descongelaron a temperatura ambiente (aproximadamente 18°C). Las muestras obtenidas en Mandinga Grande fueron transportadas vivas en agua de mar sintética (Anexo 1) y 50% de agua de la laguna en depósitos de 35 x 40 x 30 cm; estas muestras fueron destinadas para el análisis proximal. Se registró el peso y tamaño. En ambos lotes de muestras se separaron los tentáculos de la campana y se fraccionaron en secciones de tamaño homogéneo. Las muestras de medusa provenientes de las costas de Sonora fueron liofilizadas después de su descongelamiento. Diez gramos de las muestras se conservaron sin liofilizar para la extracción del pigmento de material fresco. Para la extracción del pigmento, las muestras obtenidas en la laguna Mandinga Veracruz se transportaron a 10°C para bajar el metabolismo y preservar sus características de la mejor manera posible. El objetivo de transportar a las muestras vivas es para registrar la humedad de las muestras y evitar la pérdida de agua después de su muerte. Al ser un organismo vivo y estar constituido en su mayor parte por agua, una vez que sale de su medio comienza a descomponerse y la primera pérdida es agua del tejido y la lisis celular (Abe y Okuma, 1991).

5.2.2. Análisis de humedad y cenizas en muestras de medusa

Se empleó el método basado en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa de la muestra desecada o calcinada hasta obtener un peso constante. Para la determinación de humedad se pesaron 5 g de muestra fresca (4 h después de la captura) por triplicado. Se

homogenizaron y colocaron en una cápsula de porcelana previamente estandarizada. Se registró la pérdida de agua hasta peso contante de la muestra. La determinación de humedad se calculó de acuerdo con el método reportado por AOAC (Cunniff, 1998). Para la determinación de cenizas se utilizó el residual de la muestra de humedad, calcinándose por 3 h a 500 a 550 °C, hasta peso constante (AOAC, 2000).

5.2.3. Análisis de metales pesados en muestras de medusa, campana y brazos orales

Se llevó a cabo de acuerdo con la técnica reportada por Duysak y col. (2013), analizando Ag, Al, Ca, Cd, Cr, Fe, Mn, Pb, Sñ y Zn. Muestras de 5 g de la medusa homogenizada, 1g de brazos orales liofilizados y 1 g de campana liofilizada, se digirieron con 10 mL del ácido nítrico concentrado durante 15 días a temperatura ambiente. Una vez que se completó la digestión de la muestra, las muestras se filtraron a través de fibra de vidrio, la solución resultante se aforó a 50 mL con agua desionizada. Se analizaron en un Espectrómetro de Emisión Atómica acoplado a plasma (Variant Serie II, Palo Alto, California), previamente calibrado con estándares de cada elemento analizado. Las condiciones de análisis se muestran en el Anexo 2. La concentración de metales fue calculada en mg/mL.

5.2.4. Análisis de aminoácidos en muestras de medusas

Para realizar el análisis del perfil de aminoácidos en muestras homogenizada de medusa (5 g de medusa en 15 mL de agua de mar sintética) se utilizó un equipo analizador de aminoácidos Sykan (Módulo de reacción modelo S4300, módulo de solventes S2100, auto muestreador modelo S5200 y organizador de reactivos modelo S7130) con una columna de separación KO6/Na marca Sykan (Sykan, Gilching, Alemania). La fase móvil estuvo formada por dos búferes de citrato de litio. (A-1 0.12N, pH 2.95 y B-1 0.3N pH 4.20) marca Sykan. Las condiciones de operación fueron: temperatura del reactor 130°C, temperatura de la columna 57 °C, flujo 25 mL/min, presión 10 bares.

5.2.5. EXTRACCIÓN DEL COMPLEJO PIGMENTO-PROTEÍNA

Se extrajo de las secciones coloridas de la campana. Se tomaron cuatro secciones, de las cuales se pesaron 10 g; se homogenizaron en 100 mL en agua de mar sintética con una batidora mecánica. El agua de mar se preparó de acuerdo con la metodología propuesta por la Norma Oficial Mexicana (www.conagua.gob.mx) (Anexo 1). El homogenizado se filtró por una malla de algodón para eliminar el tejido, el remanente coloreado se filtró a través de papel Whatman 4 con ayuda de una bomba de vacío (Tseng y col., 2000). El filtrado que contenía el pigmento fue lavado dos veces con cloroformo, recuperándose la fracción acuosa (Bulina y col., 2004), ésta se centrifugó 8000 rpm a 4°C en una centrifuga (Beckman modelo J2-MI, Fullerton, California). La muestra pigmentada fue filtrada en papel filtro para eliminar impurezas de menor tamaño, se liofilizó hasta un 10% de su volumen y se almacenó a 4°C hasta su estudio (extracto crudo). Las muestras se reconstituyeron con agua de mar sintética hasta 50% de su volumen inicial. A estas muestras se analizó el contenido proteico por el método de Lowry (Waterborg y col., 1984), y peso molecular por SDS-PAGE, como se indica en la sección 5.2.14.2. El tejido remanente se sonicó a 37 kHz por 30 min a temperatura ambiente (aproximadamente 18°C) con el fin de promover la ruptura celular, y se extrajo con agua de mar sintética por 2, 4 y 6 h a 4°C. Se estudió el efecto de los tres tiempos de extracción y de la extracción inmediatamente después de mezclar la muestra con agua de mar sintética (0 h). Después de la extracción se filtró al vacío con filtros Whatman 4 para eliminar el tejido, y se lavó con cloroformo para recuperar la fracción acuosa. La concentración de pigmento se evaluó por absorbancia a 360 nm

5.2.6. DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL EXTRACTO PIGMENTADO

Se llevó a cabo un barrido espectral de 200 a 840 nm, obteniéndose una curva de absorción en un espectrofotómetro Numak modelo 756 (Buenos Aires, Argentina).

5.2.7. Determinación de solubilidad del extracto pigmentado por polaridad y gradiente osmótico

Se dializaron 10 mL del extracto parcialmente purificado a través de tubos de diálisis de alta retención de celulosa (Sigma Aldrich) de 15 mm durante 24 h contra agua desionizada. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 25 min a temperatura ambiente (aproximadamente 18°C) en una centrífuga Beckman J2-MI, recuperando la fracción acuosa coloreada en la que se determinó la absorbancia a 360 nm.

La polaridad del pigmento se estimó llevando a cabo una extracción de éste con etanol a partir del tejido homogenizado (0.02 g de muestra se mezclaron con 10, 20, 40, 60, 80 y 100% de etanol). El rendimiento de la extracción se calculó a partir de la absorbancia del extracto, medida a 360 nm en un espectrofotómetro Numak modelo 756).

Para determinar el gradiente osmótico se pesaron 0.02 g de las muestras liofilizadas y 1 mL de solución salina (NaCl a 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 M). Se registró la absorbancia de la muestra a 360 nm en un espectrofotómetro Numak modelo 756.

5.2.8. Purificación parcial del extracto pigmentado por ultrafiltración

Los procesos de separación y purificación por membrana son aplicaciones muy comunes en el campo de la biotecnología. El uso de las membranas en ultrafiltración para la concentración y la osmosis inversa son los más usados (Hinková y col., 2005). En el caso de las proteínas, la separación por diferentes membranas de tamaño de corte permite separar selectivamente éstas de acuerdo al límite de peso molecular nominal (NMWL), o diámetro de corte (cutoff-diameter) dejando en la parte del retenido la fracción mayor al corte y en el permeado las moléculas de menor tamaño.

Diez mililitros del extracto pigmentado homogenizado se ultrafiltró en membranas Amicon de 30 y 50 kDa (Amicon Ultra-4, PLQK Ultracel-PL, Darmstadt, Alemania), centrifugando a 13,000 rpm a 4°C en una centrífuga Beckman J2-MI. El extracto colorido se dializó a través

de membranas de 200 μm contra agua destilada. El retenido contenía el extracto parcialmente purificado. La absorbancia de este se midió de 200 a 840 nm, analizándose la concentración de proteína (Laemmli, 1979; Waterborg y Matthews, 1984). Las muestras se liofilizaron y almacenaron a 4°C hasta su estudio. Asimismo, se tomaron 10 mL del extracto pigmentado y se realizó una ultrafiltración en un equipo Millipore Amicon Stirred Cell Modelo 8050 (Millipore/Merck, Darmstadt, Alemania) con una membrana de corte de 100 kDa, empleando nitrógeno para generar presión (extracto parcialmente purificado).

5.2.9. Purificación del extracto pigmentado por cromatografía en capa fina

Se aplicó el extracto pigmentado en una placa de vidrio TLC con celulosa F marca Millipore-Merck (Darmstadt, Alemania) de 10 x 20 cm x 80 μm realizando la inyección a 2 cm del extremo de la placa. La cámara se estabilizó por 2 h con búfer de fosfatos a pH de 6.5. Se aplicaron 40 μL del extracto en dos dosis de 20 μL , esperando a que la primera inyección seicara completamente. Se eluyó el pigmento hasta lograr una separación visual. Se identificó la migración de la muestra aplicando una solución de ninhidrina al 0.3 % (p/v) en alcohol n-butílico con ácido acético al 3 % (v/v) por aspersion sobre la placa.

5.2.10. Purificación del extracto pigmentado por cromatografía de filtración

La cromatografía por filtración en gel permite la separación con altos rendimientos de las proteínas y otras moléculas biológicas (O'Fágáin y col., 2011). La capacidad separadora reside fundamentalmente en el gel cuya matriz consta de un gran número de esferas porosas microscópicas. Cada gel se caracteriza por un rango de fraccionamiento que depende del tamaño de sus poros. Se utilizó una columna de 3000 mm de Sephadex S-100 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania), la cual se hidrató con búfer de fosfatos pH 6.5. Se equilibró por 16 h con un flujo continuo de 0.2 mL/min del búfer de fosfatos. Se determinó el volumen de la columna y el tiempo de retención con un estándar externo de albúmina. Se recolectaron fracciones cada 2 min, que se leyeron en un espectrofotómetro a 240 nm y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

5.2.11. Colorimetría de reflectancia (coordenadas L*a*b*)

Se tomaron tres secciones de la campana (superior, media y extremo) por triplicado, a las cuales se midió el color por reflectancia empleando un colorímetro Hunter Lab (MiniScan EZ 4500L, Reston, Virginia), adaptado a un software Easy Match QC software (Hunter Lab, Reston). Se obtuvieron los valores L*a*b*, obteniéndose un sólido de color.

5.2.12. Estabilidad de los extractos purificado y crudo con respecto al tiempo

Al extracto parcialmente purificado y al extracto crudo se les determinó la estabilidad en almacenamiento a 4°C (refrigeración) y -20°C (congelación). Se determinó la absorbancia a 360 nm por un total de 30 días.

5.2.13. Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad del extracto pigmentado

Se tomaron alícuotas de 5 mL del pigmento parcialmente purificado y se ajustaron a valores de pH con NaOH 0.2 M y HCl 0.2 M; se incubaron 15 min a las temperaturas que se indican en la Tabla 4, según el modelo propuesto (Sección 5.2.12.). Después de la incubación se determinó la absorbancia a 360 nm en un espectrofotómetro marca Numak como variable de respuesta Y.

Tabla 4. Niveles de pH y temperatura para determinar el efecto en la estabilidad del extracto pigmentado

Punto	pH	Temperatura (°C)
1	9	70
2	6.5	48
3	4	70
4	6.5	48
5	9	26
6	4	16
7	2.99	48
8	10	48
9	6.5	70
10	6.5	79
11	6.5	48
12	6.5	48

5.2.14. Análisis de carbohidratos totales

Se llevó a cabo de acuerdo a la técnica descrita por Albalasmeh y col. (2013). Se colocaron en tubos de ensayo 2 mL soluciones de glucosa de 10-100 mg/L, utilizando agua como blanco. Se mezclaron 2 mL de muestra con 2 mL de fenol al 5% y se colocaron en una gradilla sumergida en un baño de agua fría. A los tubos se les añadieron 5 mL de H₂SO₄, se dejaron reposar por 15 min. Finalmente, se leyó la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro marca Numak. La concentración de carbohidratos totales se obtuvo por interpolación en una curva estándar de glucosa.

5.2.15. Análisis de la proteína asociada al pigmento

5.2.15.1. Hidrólisis enzimática del complejo pigmento-proteína

Éste se hidrolizó por acción de dos proteasas comerciales: 5 U/mg de proteasa de páncreas bovino P4630 (Sigma, Steinheim, Alemania) y 30 U/mg de Proteinasa K (Promega, Fitchburg, Wisconsin). Se mezclaron 5 mL del extracto parcialmente purificado con 1

mg/mL de cada enzima, por separado. Las muestras se incubaron por 30 min al pH óptimo para cada enzima, previamente determinado (pH 7.5 para P4630 y pH 8.0 para Proteinasa K). La reacción se detuvo por calentamiento a 70°C por 10 min. Se leyó la absorbancia de las muestras a 360 nm.

5.2.15.2. Determinación de pesos moleculares y presencia de glucoproteínas

El peso de la proteína unida al pigmento se analizó por SDS-PAGE (Laemmli, 1970), usando β -mercaptoetanol como medio desnaturizante, un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad, Richmond, California), con geles de separación de poliacrilamina al 10% (0.375 M Tris, pH 8.8) y geles de concentración de 5% (0.15 M Tris, pH 6.8). Los marcadores de peso molecular fueron: miosina 200 kDa, β -galactosidasa 116.25 kDa, fosforilasa b 97.4 kDa, seroalbúmina 66.2 kDa, ovoalbúmina 45kDa, anhidrasa carbónica 31kDa, inhibidor de tripsina 21.5 kDa, lisozima 14.4 kDa y aprotinina 6.5 kDa). Los geles se tiñeron con reactivo de Coomassie R-250 al 0.1%+metanol al 40% +ácido acético al 10%, por 30 min, y se destiñeron con metanol al 40%+ácido acético al 10%.

La presencia de glucoproteínas se analizó por SDS-PAGE usando tinción PAS (ácido periódico al 3%-reactivo de Schiff), específico para proteínas unidas a carbohidratos ya que los glicanos unidos a la estructura de la glucoproteína reaccionan con ácido periódico al 1% en ácido acético al 3% (Doerner y col., 1990). El exceso de los iones periodato e iodato se eliminan con 6 lavados con agua por 10 min cada uno. El desarrollo del color se produce por inmersión del gel en el reactivo Schiff durante 1 h en oscuridad. El gel se decolora con solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 0.5% y agua desionizada por 24 h.

Asimismo, se llevó a cabo tinción de plata. Se utilizó una solución de fijación con 12% de ácido acético, 50% de etanol y 0.5% de formaldehído, una solución de lavado con etanol al 50%. Para el desarrollo se utilizó una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 2% y AgNO_3 2% en formaldehído al 37%. Para el revelado se utiliza una solución de Na_2CO_3 al 3% y formaldehído al 37%. El gel se mantuvo en la solución de fijación durante 1 h en agitación, se lavó 3 veces en la solución de lavado y se enjuagó en solución de tiosulfato y

posteriormente con agua 3 veces. Se incubó durante 20 min en solución de nitrato de plata y se enjuagó 3 veces más. Se realizó el revelado hasta visualizar las bandas. Se lavó el gel finalmente para su visualización.

Las electroforesis se llevaron a cabo a 100 mV, voltaje constante por 2 h a 4°C. Todos los geles se fijaron con ácido tricloroacético al 12% por 30 min; el exceso de ácido se lavó con agua desionizada. Finalmente, los geles se leyeron en un equipo Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, México) acoplado a un software Quantity One versión 4 (Bio-Rad, México) para obtener la densitometría de las bandas.

5.2.15.3. Determinación de la concentración de hidroxiprolina en el extracto semi-purificado

Se llevó a cabo de acuerdo con la técnica reportada por Reddy y Enwemeka (1996). A 0.5 mL del extracto parcialmente purificado se añadió 1 mL de agua. Las muestras se desnaturalizaron en autoclave por 15 min a 121°C. Se prepararon soluciones stock con alícuotas de hidroxiprolina (2 a 20 µg) y las muestras desnaturalizadas, se mezclaron con una solución de NaOH (2 N) hasta llegar a un volumen de 50 µL. Se añadieron 450 µL de cloramina T, las muestras se incubaron a 25°C por 25 min. Se añadieron 500 µL del reactivo de Ehrlich (15 g de p-dimetil amino benzaldehído en 100 mL de n-propanol/ácido preclórico 2:1 v/v) y se incubaron a 65°C por 20 min. Finalmente, las muestras se leyeron a 550 nm en un espectrofotómetro. La concentración de hidroxiprolina se obtuvo de la interpolación en una curva estándar.

5.2.16. Determinación de péptidos por MALDI-TOF

Para la identificación de proteínas mediante MS se han desarrollado dos estrategias: Identificación mediante huella peptídica PMF (*Peptide Mass Fingerprinting* o mapeo peptídico) utilizando un espectrómetro tipo MALDI-TOF y la identificación mediante fragmentación de péptidos obteniendo la secuencia total o parcial de aminoácidos (secuencia

peptídica o etiqueta de secuencia): utilizando un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS).

El sistema MALDI-TOF (*Matrix-Assisted laser Desorption/Ionization. Time of Flight*) es una herramienta basada en la espectrometría de masas (Conway y col., 2001). Los espectrómetros de masas están formados por tres elementos básicos: la fuente de iones, donde a partir de la muestra se forma un haz de iones en estado gaseoso; el analizador de masas, tiempo de vuelo, que separa los iones formados en función de su relación masa/carga (m/z); y, el detector de los iones previamente separados (Croxatto y col., 2012). Para realizar el análisis mediante MALDI-TOF es necesario que las proteínas se ionicen; las proteínas purificadas se depositan sobre la placa o porta muestras y, a continuación, sobre esta muestra se deposita una disolución matriz que contiene moléculas con anillos aromáticos en su estructura. Se deja evaporar el disolvente a temperatura ambiente, produciéndose la cocrystalización de la muestra y de la matriz y así, las moléculas analizadas quedan incorporadas dentro de la estructura de los cristales de la matriz. A continuación, la placa es introducida en la cámara de alto vacío donde la superficie cristalina de la muestra está expuesta a disparos de un láser de longitud de onda en la zona ultravioleta del espectro, con lo que las moléculas orgánicas aromáticas de la matriz absorben una gran cantidad de energía por excitación de los electrones π (electrones de dobles y triples enlace) produciéndose la sublimación del analito y de la matriz previamente depositados sobre la placa. Ya en fase gaseosa, la estabilización de estas moléculas aromáticas tiene lugar mediante la liberación de protones que son captados por las proteínas (Conway y col., 2001). Mediante un electrodo situado a pocos milímetros frente a la placa, se genera un campo eléctrico que acelera los iones formados desde las proximidades de la muestra hacia el analizador de masas. De esta forma los iones siguen una trayectoria lineal. Así, el tiempo que tardan los iones en recorrer el tubo es proporcional a la relación masa/carga (m/z) de los mismos (Fenselau y col., 2001; Seng y col., 2010). El sistema realiza la identificación rápida mediante la “huella peptídica”, las proteínas son hidrolizadas en pequeños péptidos, obteniéndose el correspondiente espectro de masas hidrolizado, el cual se compara con una base de datos que identifica a la proteína (Vargha y col., 2006).

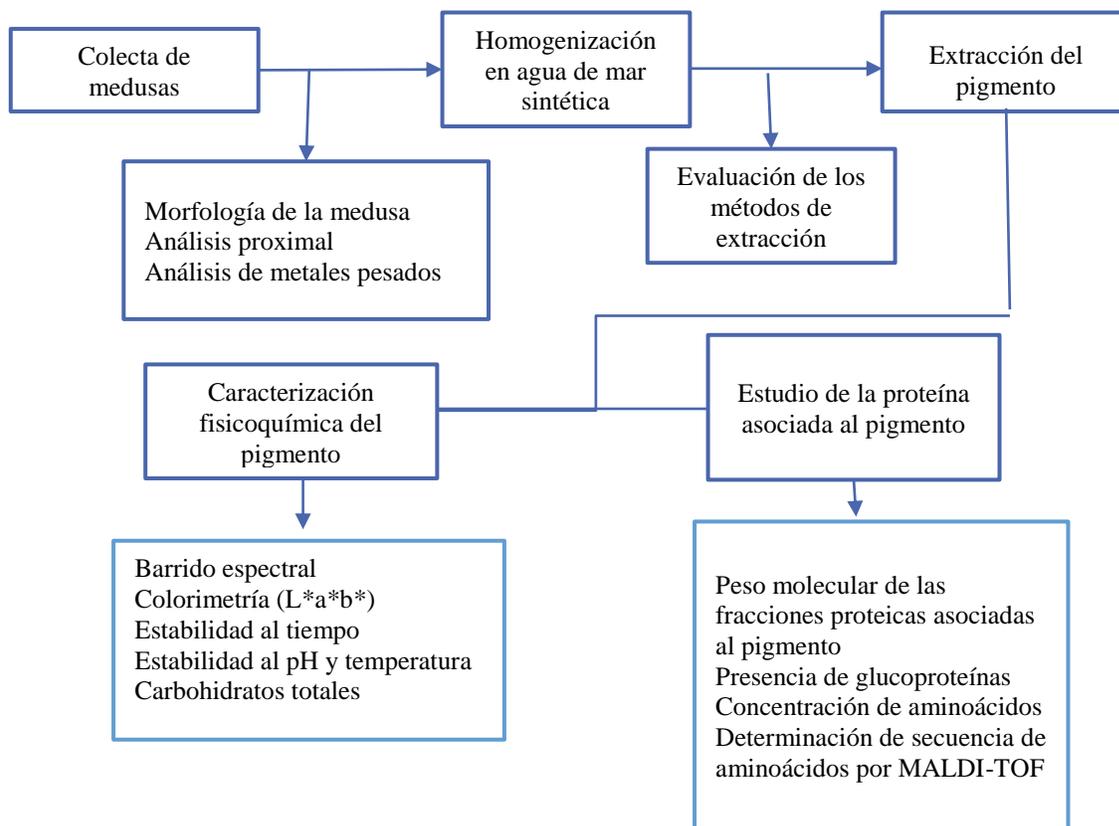
Se siguió el método reportado por Schägger (1994). Se llevaron a cabo electroforesis SDS PAGE identificando las bandas que podrían estar asociadas al pigmento; estas se cortaron y destiñieron en un vial Eppendorf de 1.5 mL con una solución de bicarbonato de amonio 50 mM. Se adicionaron 500 μ L de solución 250 mM de bicarbonato de amonio, 50% acetonitrilo y se colocaron en agitación hasta que la solución se tornara del mismo tono que la banda (en este punto, se encontraba equilibrada). Para llevar a cabo la reducción y alquilación de puentes disulfuro (S-S) y grupos SH libres, se cortaron las bandas en cubos de 1 mm, se lavaron con solución de bicarbonato de amonio 50 mM para evitar la contaminación con queratina. Se añadió el suficiente volumen de 10 mM de ditioneol en NH_4HCO_3 50 mM para cubrir los cubos de acrilamida. Se incubó por una hora a 60°C y se descartó la solución. Se añadió el mismo volumen de 50 mM de iodoacetamida en NH_4HCO_3 50 mM y se incubó por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se añadieron 300 μ L de NH_4HCO_3 50 mM y se dejó en agitación durante 10 min. Finalmente se añadieron 300 μ L de CH_3CN para deshidratar, se descartaron y se secó en al vacío hasta eliminar el disolvente. Para llevar a cabo la digestión de los péptidos, se rehidrataron los fragmentos con un volumen mínimo de tripsina (12.5 ng/ μ L) disuelta en una solución de NH_4HCO_3 50mM. Se incubó a 37°C por 16 h. La extracción de los péptidos se llevó a cabo agregando 30 μ L de agua milliQ y se agitó a temperatura ambiente durante 45 min. Se centrifugó y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se agregaron 30 μ L de agua miliQ acidificada con ácido trifluoroacético (0.1%) y se agitaron por 45 minutos. Se centrifugó y se unió con el recuperado anterior (Suckau et al., 2003). La muestra se analizó por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF.

Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI-TOF Autoflex speed, Bruker, mediante la colocación de la muestra en una matriz de solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en CH_3CN 35% y TFA 0.01%, se mezclaron 1:1 en la placa 4 μ l y fueron colocados en dos pozos. Las huellas peptídicas fueron adquiridas en un rango de detección de 500 a 3500 Da, con una resolución de 5 GS/s, la adquisición fue de tipo reflector, con un voltaje de polaridad positiva, la calibración se realizó mediante un estuche (SIGMA, *ProteomeMass Peptide* and Protein MALDI-MS Calibration 1001663545) con un voltaje de 19.13 kV y del reflector de 21.17 kV, con una supresión de la matriz de tipo deflexión y una detección base de 2500 V y una reflexión base de 1700 V. De cada una de las huellas

peptídicas se obtienen espectros de fragmentación de 5-10 masas, dependiendo de la muestra, con un rango de detección de 40 al ion precursor, con una resolución de 2.50 GS/s, el voltaje de ion fue de 6.05 kV y del reflector de 24.48 kV.

En este estudio se utilizaron como referencia proteínas que han sido identificadas positivamente por una puntuación MASTOC (*Matriz Science*) significativa. El puntaje es una referencia estadística que coincide con la base de datos previamente obtenida. Esta puntuación integra a los péptidos individuales, la masa de los estos y la masa de los iones de fragmentos de péptidos. Para realizar la búsqueda en bases de datos, se tomaron en cuenta oxidaciones y deaminizaciones que pudieron ocurrir durante la purificación del péptido. Las modificaciones indicadas en el manual MASCOT (2007-2009) se refieren principalmente a la oxidación durante la preparación de la muestra. Los valores de masa se calculan a partir de fórmulas químicas empíricas, eliminando la fuente de error más común. Las especificidades también se definen en la búsqueda en las bases de datos, existe además la opción de ingresar datos específicos de especificación masiva. Para que haya coincidencia entre la proteína encontrada por métodos experimentales y la encontrada en una base de datos determinada, puntaje debe estar por encima del 95%. El puntaje se encuentra en escala logarítmica (<http://www.matrixscience.com>)

5.2.17. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



5.2.18. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Extracción del pigmento con agua de mar sintética

Se evaluaron tres tiempos de extracción (2, 4 y 6 h) empleado agua de mar sintética, así como el efecto de tres tratamientos de reposo contra la extracción sin reposo sobre la extracción del pigmento azul. La variable de respuesta fue la concentración del pigmento extraído medida como absorbancia de la solución a 360 nm). Se llevó a cabo una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($\alpha=0.05$).

Análisis elemental de metales pesados

Los resultados de los análisis se analizaron por Análisis de Varianza y prueba múltiple de Tukey ($\alpha=0.05$) (Steel y Torrie, 1988).

Color instrumental medido en el sistema CIE-Lab

Las coordenadas de color L*a*b*, leídas en las regiones superior, centro y orilla de la campana, al igual que la absorbancia de los extractos durante el almacenamiento refrigerado y congelado se analizaron a través de análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey ($\alpha= 0.05$) (Steel y Torrie, 1988).

Efecto de pH y temperatura por metodología de superficie de respuesta

Para determinar el efecto del pH y la temperatura sobre el color, determinado por la absorbancia a 360 nm se usó de un Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) de dos variables y cinco niveles (pH 4 a 9, 26 a 70°C, obteniéndose 12 experimentos factoriales, cuatro puntos axiales y puntos centrales cuadruplicados) (Cuadras, 2014). La ecuación de regresión aplicada fue:

$$xi = \frac{Xi - Xo}{\partial Xi} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde:

xi valor adimensional codificado de la variable independiente a la i-ésima variable independiente

Xi valor natural de la variable i-ésima independiente

Xo es el valor natural i-ésimo independiente en el punto central

∂Xi es el valor del cambio escalonado.

Los resultados experimentales se ajustaron a una función polinómica de segundo orden:

$$Y=b_0+b_1x_1-b_2x_2+b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2+b_{12}x_1x_2 \quad \text{Ecuación 2}$$

donde:

Y variable respuesta

bo intersección;

b1, b2 coeficientes lineales

b11, b22 coeficientes cuadráticos

b12 interacción de los coeficientes

Todos los análisis se llevaron a cabo en triplicado. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando un programa *Statgraphics Centurion* (Scientec, Ciudad de México), instalado en una computadora personal.

5.3. Extracción y caracterización de colágeno de *Rophilema escueletum*, *Aurelia aurita* y *Rhizostoma pulmo*

Los estudios de extracción y caracterización preliminar de colágeno se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de los Alimentos, Departamento Tecnología de los Alimentos en el Instituto de Investigaciones Marinas, Vigo, España.

5.3.1. Obtención de los especímenes y preparación de la muestra

Las muestras de medusa comestible (*Rophilema esculentum*) se obtuvieron de una fuente comercial en tienda de productos asiáticos. Estas se encontraban en salmuera en charolas de 25g (figura 19). Estas muestras son procesadas por métodos tradicionales que incluyen salado y secado al sol. Una vez en el laboratorio, se lavaron inicialmente con agua corriente y después con recambios de agua destilada por 6 días para eliminar el exceso de sal.



Figura 19. Medusa comestible de venta en tiendas de productos asiáticos, utilizada en el estudio.

Las muestras frescas se obtuvieron en una colecta realizada por el Instituto Español de Oceanografía (IEO) Centro Oceanográfico de Murcia. Estas muestras fueron identificadas mediante una guía para la identificación morfológica.

(http://jellyrisk.eu/media/cms_page_media/115/Spain_GuiaMedusas_2013_espanol.pdf) y reportadas como *Rhizostoma pulmo* (1 espécimen) y *Aurelia aurita* (20 especímenes). Dicha colecta se llevó a cabo en el mes de Julio de 2017 en el Canal del Estacio (*R. pulmo*) y entre El Carmolí y Los Urrutias (*A. aurita*) Cartagena, España (37°41'33"N 0°50'30"O). La captura se llevó a cabo a nivel superficial (Figura 20).



Figura 20. Zona de captura de medusas *R. pulmo* y *A. aurita*

Todos los organismos se congelaron, colocaron en contenedores de 1 m² aproximado (30x30x30 cm). Los contenedores funcionaron como aislante térmico con bolsas de hidrogel dentro para conservar las muestras congeladas. El transporte duró aproximadamente 24 h desde su captura hasta su procesamiento. Al llegar al laboratorio, los organismos se lavaron con agua destilada, se descartó la cavidad gastrovascular y se almacenaron a -20°C hasta su estudio.

5.3.2. Análisis morfológico

Después de una identificación preliminar inmediatamente después de la captura, *Aurelia aurita* y *Rhizostoma pulmo*, ya en el laboratorio se descongelaron 4°C y se procedió a los estudios morfológicos. En *A. aurita* se midió el radio y contaron los tentáculos marginales por octante; se determinó el peso y se identificaron mediante morfología simétrica radial, la forma de campana y las 4 gónadas con forma de herradura invertida, siguiendo la referencia que se muestra en la Figura 21. La muestra de *R. pulmo* consistía en único organismo capturado, y se identificó de forma similar, como se indica en la Figura 22.

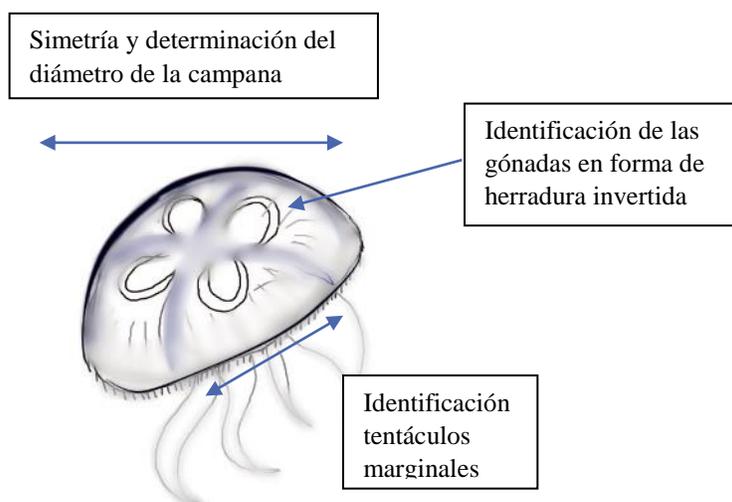


Figura 21. Características consideradas para la identificación morfológica de *Aurelia aurita*

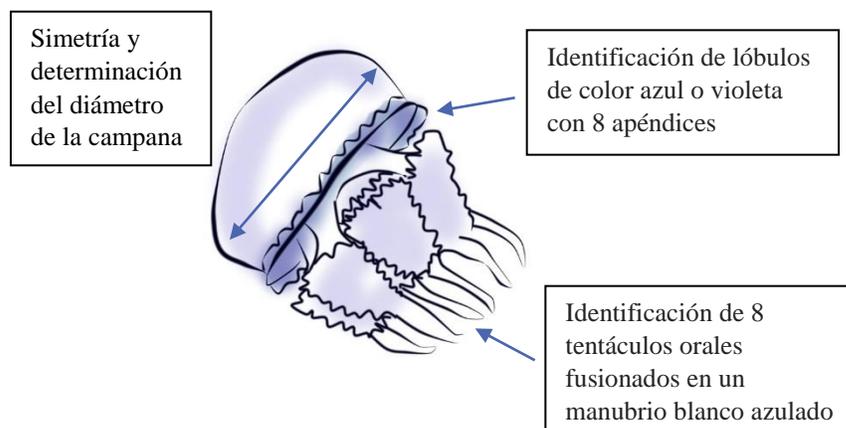


Figura 22. Características consideradas para la identificación morfológica de *Rhizostoma pulmo*

5.3.3. Análisis proximal

El análisis de humedad se llevó a cabo por el método reportado por AOAC (2000) con algunas modificaciones. Se tomaron aleatoriamente y pesaron en cajas Petri (previamente secadas a 100°C por 1 h) alrededor de 5 g de la muestra lavada de medusa comercial *R. escueletum*, 10 g de *A. aurita*, 10 g de la campana de *R. pulmo* y 10 g de tentáculos de *R. pulmo*. Se secaron a 110°C por 24 h y se registró el peso seco. El % de humedad fue la diferencia de pesos.

Las cenizas se determinaron utilizando el residual de la muestra de humedad, llevándose a cabo por calcinación por 24 horas a 500-550 °C, incrementando la temperatura gradualmente. Una vez calcinados las muestras se enfriaron para registrar su peso (Cunniff, 1998; AOAC, 2000).

El contenido proteico se determinó por el método Kjeldahl en un equipo automático Tecator (Buchi K-350, Alemania). Se pesaron 0.15 g de muestras de medusas previamente secas y molidas. Una vez en el digestor del equipo (Digi Pret HT, SCP Science, Bucarest, Rumanía), se añadieron 6 mL de H₂SO₄, 1 mL de H₂O₂ y catalizador (3.5g CuSO₄+0.4g de K₂SO₄). La temperatura de las mezclas de reacción se elevó en forma gradual de 100 a 400°C, en esa

temperatura se digirieron 60 min. Posteriormente, se destilaron las muestras (Digi PREP 500, Fully Automatic Steam Valorador, Tritoline easy, Schott Instruments, Alemania) recogiendo el destilado en ácido bórico (a que concentración) y se tituló con HCl 0.01M. para el cálculo de proteína se realizó la conversión de nitrógeno total (%) con un factor de conversión de 6.25.

5.3.4. Determinación del contenido de hidroxiprolina

Se pesaron 80 mg de las muestras secas de las 3 especies de medusa; se homogenizaron y se hidrolizaron con HCl 6M en horno de microondas (MWS 2 Microwave System, Berghof, Alemania) por 45 minutos. Una vez digeridas las muestras, se llevaron a un volumen total de 10 mL. De esta solución, se tomaron 400 μ L; se dejó secar en estufa a 95°C por 72 h en presencia de NaOH. Las muestras secas se resuspendieron en búfer de hidroxiprolina (ácido acético al 1%, propanol al 26%, NaOH 0.18 M, NaC₂H₃O₂ 0.32 M y ácido cítrico 0.05 M).

De esta solución se tomaron 3 mL y se añadió 1.5 mL de cloramina T 0.05 M. Se mantuvo en reposo por 25 min, se añadió el reactivo cromógeno (dimetilamino benzaldehído al 15%, p/v + n-propanol al 60%, v/v + ácido perclórico al 26%, v/v). Se incubó a 60°C por 15 min, se enfrió y leyó la absorbancia a 550 nm en un espectrómetro (modelo DV-800, Beckman Coulter, California). La concentración de hidroxiprolina se calculó interpolando a una curva estándar de trans-4-hidroxi-L- prolina, de 0.5 a 10 μ g/mL.

5.3.5. Extracción de colágeno de las medusas

Se tomaron 120 g de medusa *R. escueletum* y se cortaron en cubos de 1 cm por lado. Se descongelaron 10 organismos de *A. aurita*, se cortaron en 4 secciones de 112 g cada una, además, se separaron los tentáculos y la campana de un organismo de *R. pulmo* tomándose 300 g de cada fracción. Todas las muestras se sometieron a un tratamiento con NaOH 0.1 M con agitación por 24 h.

Posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada. Las muestras fueron resuspendidas en ácido acético 0.5 M de las que se extrajeron las proteínas ácido solubles a 72 h a 4°C por agitación constante (fracción ASC). El material insoluble remanente fue lavado y resuspendido en ácido acético al 0.5 M con pepsina al 5% (Sigma) en agitación constante por 24 h a 4°C. El extracto de colágeno soluble en pepsina (fracción PSC) se centrifugó a 10,000 g por 1 h; el sobrenadante se dializó contra Na₂HPO₄ 0.02M por 72 h.

El precipitado resultante, fue separado por centrifugación a 10,000 g por 1 h y se disolvió en ácido acético 0.5 M. Finalmente se dializó contra ácido acético 0.1 M y contra agua destilada, y se liofilizó (Nagai y col., 1999).

5.3.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE (Cannon-Carlson y Tang, 1997) utilizando las muestras de colágeno PSC y ASC de cada organismo para identificar el peso y tipo de colágeno, de forma similar a la descrita en la sección 5.2.14.3 (Cannon-Carlson y Tang, 1997)

5.3.7. Determinación de la temperatura de desnaturalización de colágeno PSC de *R. esculentum*

El cálculo de la curva de desnaturalización se realizó a través de mediciones de absorbancia del residuo de la precipitación de muestras sometidas al calentamiento. Se elaboró una solución madre con 1.5 mg/mL de colágeno PSC en ácido acético 0.5 M, de la cual se tomaron 1.5 mL de colágeno que se incubaron a la temperatura correspondiente a cada punto por 25 min. Las muestras se centrifugaron por 10 min para separar el precipitado desnaturalizado; la absorbancia del sobrenadante se leyó a 240 nm.

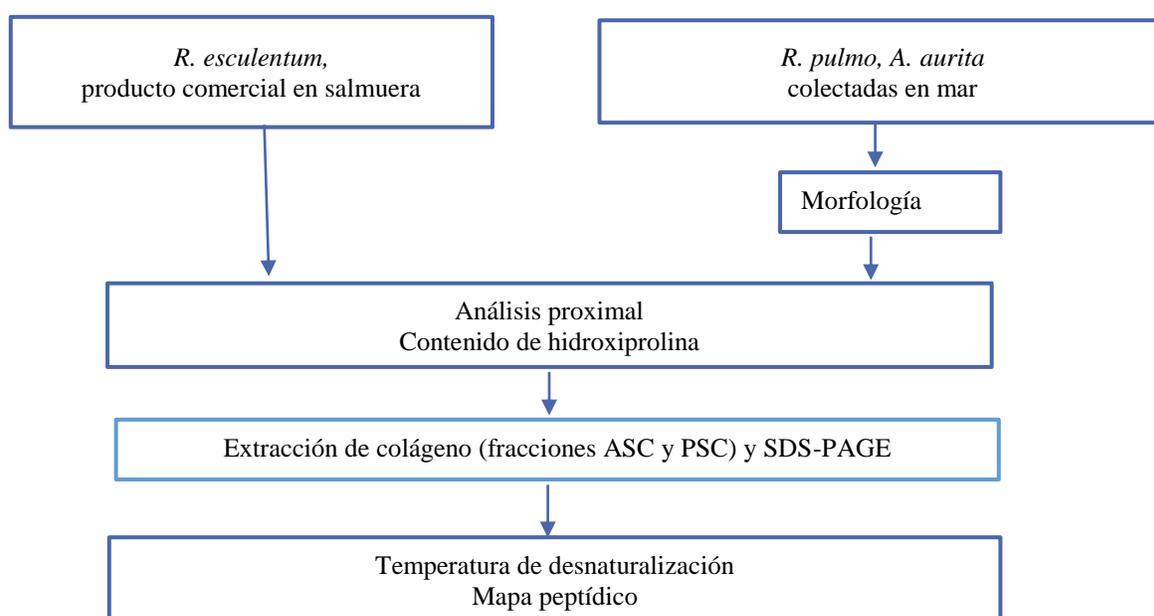
5.3.8. Determinación del mapa peptídico mediante hidrólisis enzimática

El mapa de péptidos se analizó según la metodología descrita por Nagai y col. (1999), con algunas modificaciones. El colágeno PSC se solubilizó en 0.5 M de ácido acético 0.5 M (10mg/mL) + Tris 1 M, pH 8, en SDS 0.5% p/v. Las muestras se calentaron por 5 min a 100

°C, posteriormente se dejó enfriar. Se incubaron con dos enzimas: 500 µg de tripsina (Sigma) y 75 µg de endoproteasa Glu-C de *Staphylococcus aureus* V8 (Sigma).

Cada digestión se llevó a 37°C, 6 h para la tripsina y 3 h para la endoproteasa. (Nagai col., 1999). Después de cada digestión, 200 µL de las muestras de colágeno se inyectaron en un gel SDS-PAGE al 10% y se tiñó mediante tinción de plata. La electroforesis y la tinción se llevó a cabo de la forma descrita en la sección 5.2.14.3.

5.3.9. Estrategia experimental



5.3.10. Diseño experimental y análisis estadístico

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la desnaturalización del colágeno se usó un diseño experimental de 28 niveles para evaluar el efecto de la temperatura de 4 a 80°C (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación de la temperatura de desnaturalización de colágeno soluble en pepsina (PSC)

Nivel	Temperatura (°C)	Nivel	Temperatura (°C)	Nivel	Temperatura (°C)
1	61	11	4	21	23
2	23	12	23	22	61
3	80	13	4	23	4
4	4	14	42	24	61
5	4	15	42	25	42
6	4	16	42	26	23
7	4	17	4	27	80
8	80	18	80	28	80
9	80	19	80		
10	80	20	61		

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando un programa Statgraphics Centurion (Scientec, Ciudad de México), instalado en una computadora personal.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estudios histológicos de *Stomolophus meleagris*

El análisis histológico de las muestras de medusa permitió estudiar y caracterizar la campana con un corte sagital oral-aoral, un corte transverso a nivel medio (campana) y un corte transverso en la parte apical aoral (Figura 23). Los organismos de este fílum son eumetazoos de organización sencilla, cuyos cuerpos muestran una simetría radial limitada y están contruidos según un tipo de organización en un saco ciego. El filum está constituido por un epitelio externo o epidermis que lo recubre y uno interno o endodermis que primariamente posee una función nutritiva y, además, constituye una gastrodermis que tapiza la única cavidad interna. Existe una boca que se define como un polo oral a través del cual pasa el alimento hacia la cavidad gástrica, y que por consiguiente delimita la presencia de otro aboral. Esta boca es el único orificio del cuerpo, a través del cual entran y salen sustancias de la cavidad gástrica, que esencialmente es un saco ciego. El cuerpo de los cnidarios tiene por lo general la forma de un pólipo cilíndrico o de una medusa discoidal de forma aplanada o cónica. En ambas formas los ejes de simetría a lo largo oral-aboral están limitados por el número y ciertas posiciones de estructuras y órganos (Gardiner, 1977).

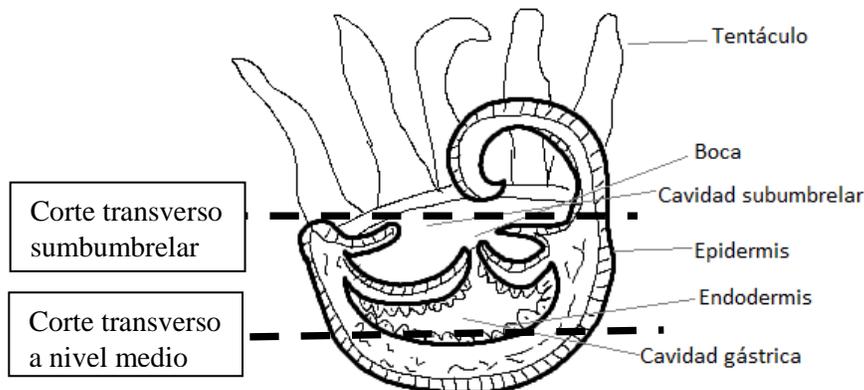


Figura 23. Organización anatómica de una medusa.
Se representa un corte sagital oral-aboral

La campana de la medusa mostró capas de la epidermis endodermis y la cavidad gástrica además de campana. En este caso se observan mayoritariamente: tejidos conjuntivos posibles células basófilas, células con actividad enzimática así como bordes granulares y vesículas internas (Figura 24).

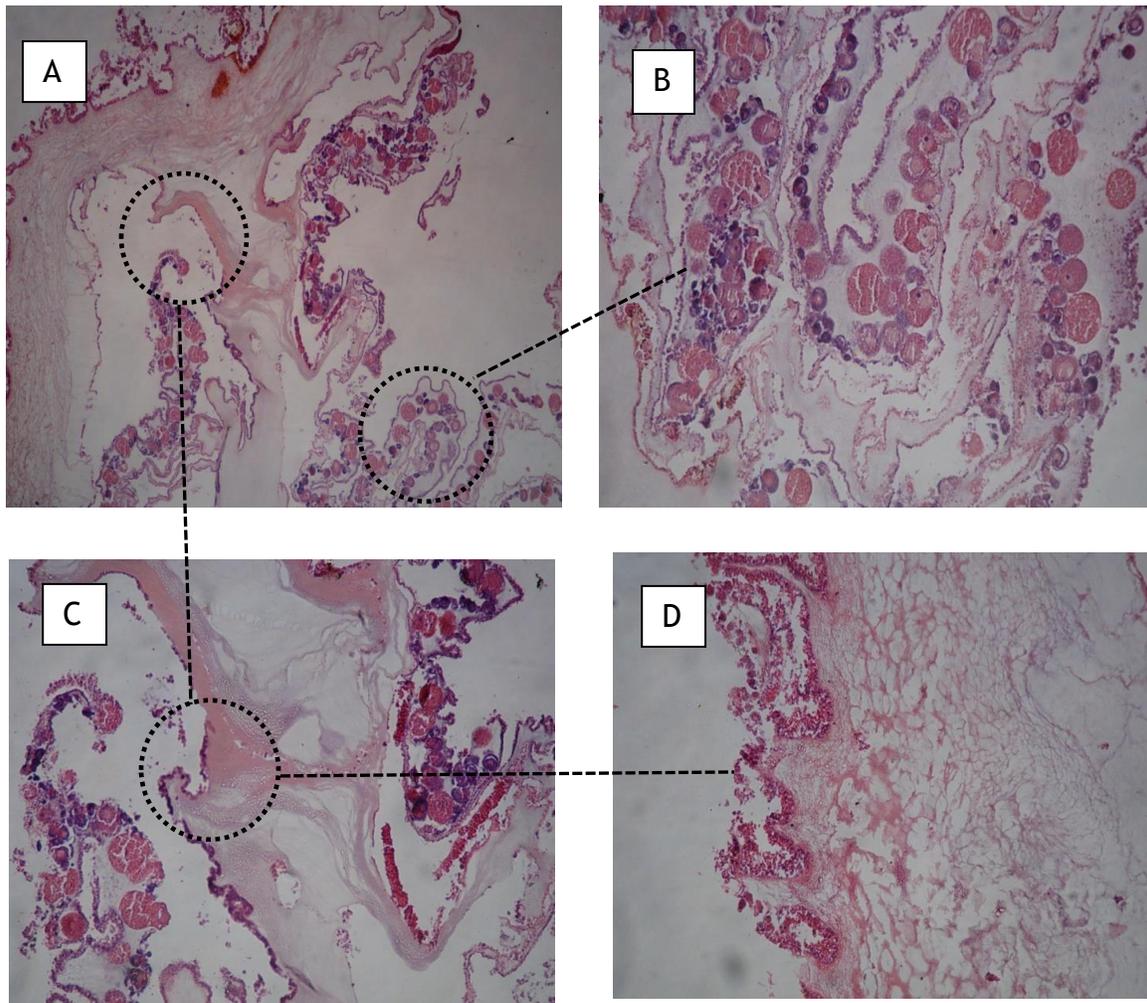


Figura 24. Secciones histológicas de un corte sagital oral-aboral a nivel medio de medusa entera. A) Campana y célula basófilas y acidófilas, bordes epiteliales y tejido conjuntivo, 10X; B, C, D) Acercamientos a los diferentes tejidos, 40X

Se ha descrito que la campana en medusas es una sustancia gelatinosa, transparente y principalmente de naturaleza proteica entre la zona epitelial y gástrica, como se muestra en la Figura 24A. La campana es similar a la matriz extracelular en vertebrados. En los invertebrados tiene múltiples funciones, principalmente hace el papel de soporte y estructura del cuerpo, además de tener un papel importante como almacén y transporte de nutrientes.

Las células adyacentes a la musola y la matriz celular (Figura 24D) además de estar involucrada en la funciones de flotabilidad, conduce el esfuerzo de propulsión para el movimiento, generado por la contracción del sistema muscular en la campana (Shaposhnikova y col., 2005). Las figuras 24B y 24C muestran células epiteliales, células excretoras y parte de la gastrodermis. Esta zona se caracteriza por poseer células con actividad enzimática y vacuolas alimenticias. El tejido epitelial de la campana de la medusa está compuesto por endodermis y epidermis. La Figura 25 muestra las secciones histológicas del tejido epitelial subumbrelar, que es una bicapa celular con formas redondeadas.

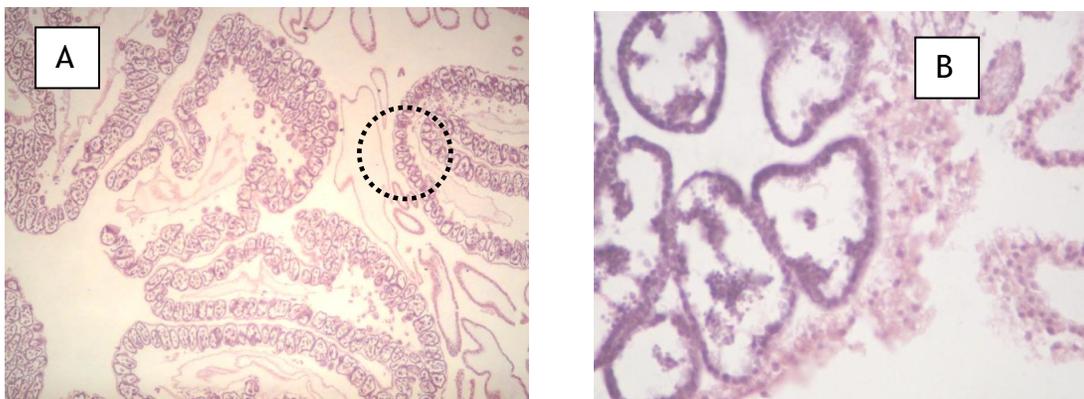


Figura 25. Secciones histológicas de un corte transverso en la zona media en de la medusa.

A) Tejido epitelial subumbrelar, celular cúbicas con núcleo definido, 10X;

B) Aumento 40X a las células

Se ha descrito al epitelio celular de las medusas contiendo células superficiales ordinarias, algunas células mucosas y presumiblemente células digestivas (Chapman, 1999). La Figura 25 muestra un corte histológico transverso a la altura media de la medusa. En este se observa tanto a la campana como al tejido epitelial exumbrelar conteniendo matrices con excreciones así como zonas acidófilas, las cuales pueden pertenecer a un tipo de tejido conjuntivo especializado.

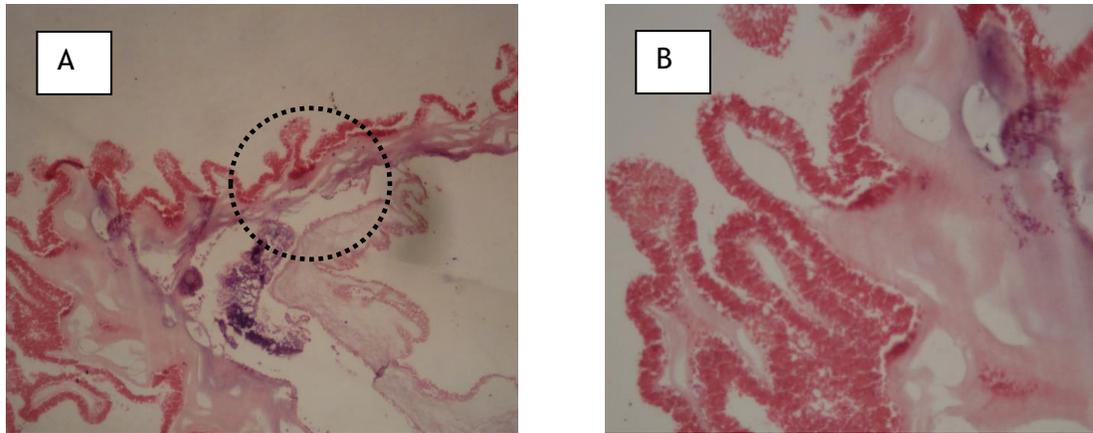


Figura 26. Secciones histológicas de un transversal a la altura media de la medusa.
 A) Células basófilas con tejido granular y secreciones, 10X.
 B) Acercamiento a la zona epitelial exumbrelar, 40X

Los músculos de los cnidarios tienen dos propósitos: (1) funciones contráctiles para ayudar con la locomoción, y (2) digestión intracelular de alimentos. Están dispuestos en estructuras longitudinales y circulares, lo que permite una variedad de tipos de movimiento. El movimiento locomotor más común de las medusas es la propulsión a chorro, y eso se logra al contraer y liberar el cuerpo contra la campana, que actúa como un resorte (Zachariah y Mitchel, 2009). Estos músculos están compuestos por células epitelio-musculares. La gastrodermis interna recubre la cavidad gastrovascular y participa en la digestión y la absorción. Esta capa es similar a la epidermis externa en que están presentes células epitelio-musculares, glandulares, sensoriales y nerviosas; sin embargo, se caracteriza por células de la glándula gástrica que ayudan en la digestión y absorción de nutrientes (Folino-Rorem, 2015).

6.2. *Stomolophus meleagris* COMO FUENTE DE PIGMENTO

6.2.1. Obtención de las muestras

Se emplearon 5 muestras representativas de los especímenes congelados y una muestra de 5 g de tejido liofilizado con el característico color azul. Todas las muestras se homogenizaron

y se destinaron para la purificación del pigmento. La Figura 27 muestra un espécimen, así como las medidas tomadas y los sitios donde se tomaron las muestras.

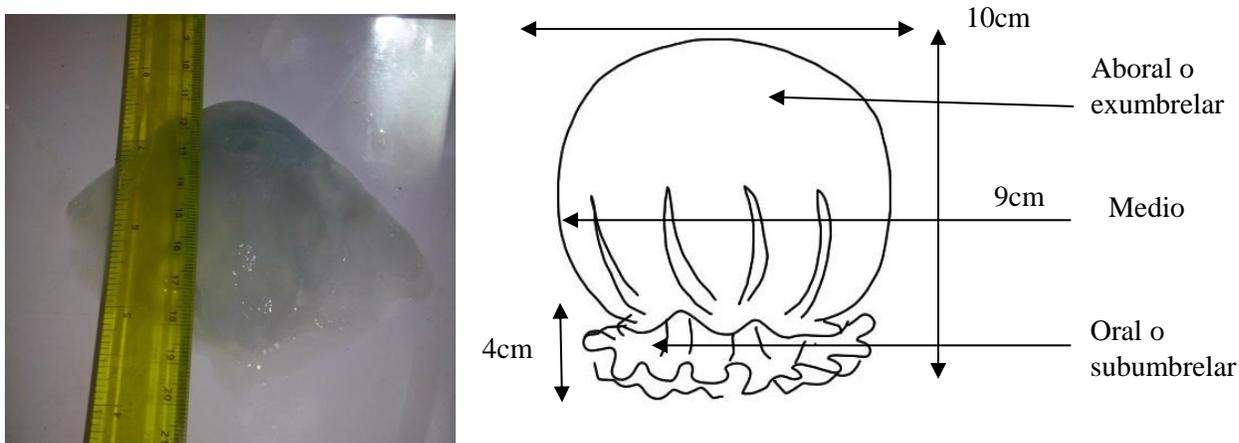


Figura 27. Imagen de la medusa descongelada y tamaño promedio de las medusas utilizadas

Las medusas utilizadas en la presente tesis registraron las siguientes medidas promedio: 10 cm de la zona exumbrelar a la zona subumbrelar; 9 cm entre extremos de la campana; 4 cm longitud de tentáculos. El peso promedio de las muestras fue 80.2 g. Se ha reportado que el peso promedio de esta especie, dependiendo de la zona de captura oscila entre 20 y 140 g (Nopatitla, 2012). Las muestras presentaban una pobre pigmentación azul, por lo que fueron destinadas para la determinación de humedad y cenizas.

6.2.2. ANÁLISIS PROXIMAL

La Tabla 6 reporta la composición promedio encontrada en las muestras, así como los parámetros de color $L^*a^*b^*$. Otros estudios en esta misma especie han reportado resultado de humedad de 82 y 96% (Nopatitla 2012). La composición y valores $L^*a^*b^*$ de color de un extracto homogenizado de medusa *S. meleagris* son los indicados en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición y valores Lab del extracto homogenizado de medusa *S. meleagris*

	Extracto homogenizado
Humedad	96.23±0.3 %
Proteínas	2.644±0.07 %
Cenizas	1.96±0.2 %
Carbohidratos	0.553±0.05 %
Color	L 51.03±8.19
	a -13.16±2.54
	b -13.58±15.52

Las diferencias entre los valores reportados por otros autores y los obtenidos en este trabajo se pueden deber al tratamiento de la muestra después de la captura. Otras especies de medusas como *Lychnorhiza Lucerna* reportan un porcentaje de humedad similar (97%), además de observarse una diferencia de humedad entre la campana y las gónadas de la medusa (Schiariti y col., 2011). Para prevenir las pérdidas de agua en estudios de extracción de pigmentos de medusa azul *Cassiopea xamachana*, Blanquet y Phelan (1987) mantuvieron vivo al organismos en sistemas artificiales hasta el inicio de la extracción, pero no reportan haber llevado a cabo análisis proximales.

El contenido de cenizas en las muestras estudiadas fue 1.96±0.2%. Otros autores encontraron valores similares para la misma especie (1.9%) (Nopatitla, 2012). En el caso de otras especies como *Lychnorhiza lucerna*, se reportan valores de 2 y 3% en la campana y las gónadas, respectivamente (Schiariti y col., 2011).

Se determinó el peso de las muestras congeladas después del descongelamiento, encontrando una pérdida del 40% en peso con respecto al que habían registrado en la captura. El contenido de agua en alimentos varía entre un 60 y 95% en tejidos vivos vegetales y animales. Existen dos formas de humedad: agua libre y agua ligada. El agua libre es la forma predominante y

se libera con facilidad con presión simple. En la medusa, un organismo acuático, se pierde agua con facilidad, por lo que después de un tratamiento como la congelación no es posible determinar la humedad con precisión (Nopatitla, 2012). La descongelación es normalmente un proceso más lento que la congelación, puesto que la conductividad térmica de los tejidos congelados es mucho menor que la de los no congelados (Abe y Okuma, 1991). Además, la formación de una capa acuosa líquida en la superficie del producto que se está descongelando forma una barrera que mantiene el producto un período a 0°C, causando con esto fenómenos como aumento de la concentración de solutos y recristalización. El agua en el tejido muscular comienza a congelarse a -1°C aproximadamente; a -5°C alrededor del 80% del agua está congelada y a -30°C esta cifra aumenta hasta un 90%. Aparentemente, el agua extracelular formada al derretirse los grandes cristales de hielo del espacio extracelular formados durante la congelación lenta no es bien reabsorbida por las células musculares, como lo sería el agua formada por la fusión de los cristales intracelulares procedentes de una congelación rápida (Onega Pagador, 2003).

6.2.3. ANÁLISIS DE METALES PESADOS EN MUESTRAS DE MEDUSA

El conocimiento de la concentración de metales presentes en aguas marinas es un factor importante para monitorear la salud de un ecosistema, Asimismo, el uso de organismos como biomonitores es una herramienta para entender los cambios en la calidad del agua, al igual de cómo pueden afectar los metales a la diversidad, abundancia y la biota local. En este contexto, las medusas, tienen la capacidad de acumular metales desde su medio ambiente (Templeman y Kingsford, 2012). La Figura 28 muestra la concentración elemental de metales pesados en muestras homogenizadas de medusa, muestras de campana y de brazos orales.

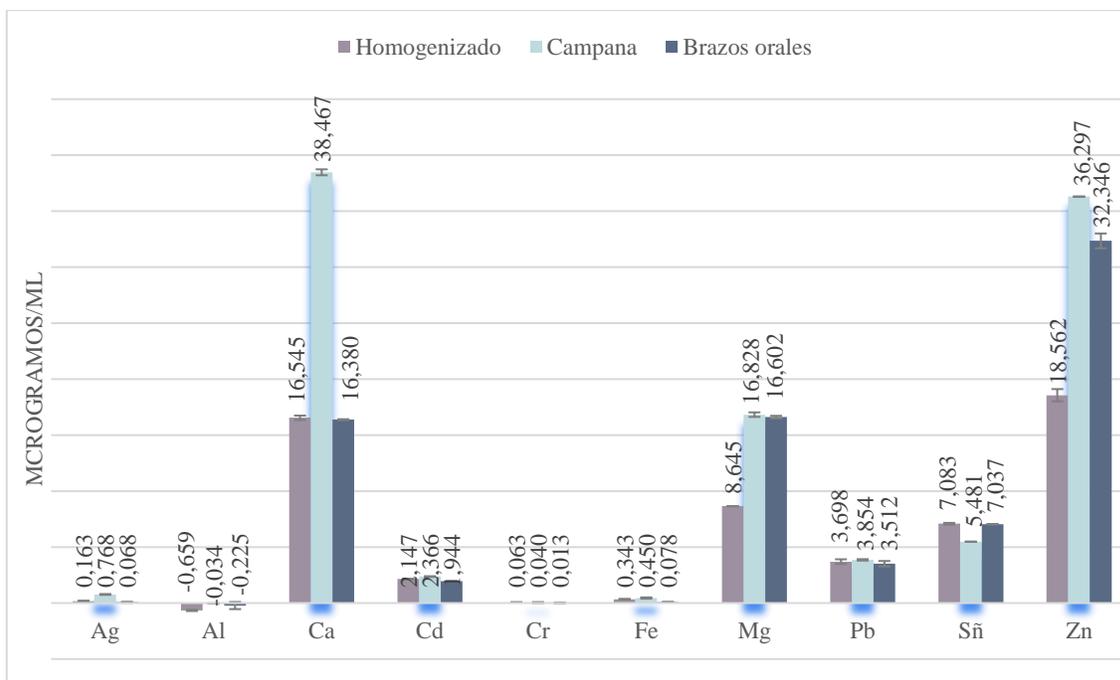


Figura 28. Concentración de metales en extracto homogenizado, campana, y brazos orales

Ca y Zn presentaron las mayores concentraciones, particularmente en la campana) donde se encontraron 38.467 y 16.380 $\mu\text{g Ca/mL}$ en campana y brazos orales, respectivamente, y 36.297 y 32.346 $\mu\text{g Zn/mL}$ en campana y brazos orales, respectivamente. Mg se detectó en menor concentración; mientras que Cd, Pb y Sn estuvieron en cuarto lugar. En estudios previos se ha reportado que la acumulación de algunos elementos depende de cada especie y del tejido, existiendo afinidad entre los tejidos y el tipo de metal (Templeman y Kingsford, 2012). El Zn es un metal que ha sido detectado en varias especies de medusas (*Cassiopea* sp. y *Mastigias* sp.) sin embargo, no se ha identificado algún papel específico, como en el caso de Cu o Ca. Algunos metales tienen un papel importante en el cuerpo de las medusas, relacionado con el equilibrio en la salud del organismo. Por ejemplo, el cobre en concentraciones trazas es indispensable como una defensa contra radicales libres de oxígeno, actuando con una actividad de superóxido dismutasa (Templeman y Kingsford, 2012).

La contaminación por metales pesados no parece ser un problema en las medusas bola de cañón capturadas en esta zona en particular. Finalmente, Ag, Al, Cr y Fe estuvieron en

concentraciones muy bajas. Se ha reportado que la mayor influencia en la presencia de metales en medusas es su existencia en el mismo ambiente marino Lin y col (2016). A diferencia de lo reportado por Hsieh y col., (1996) reportaron concentraciones de 0.29 y 1.6 $\mu\text{g/mL}$ para la campana y para los brazos orales respectivamente de esta misma especie (*S. meleagris*). En nuestro estudio, no se encontró aluminio. No hubo diferencias significativas ($P>0.01$) en la concentración de metales en brazos orales y campana, a excepción de Ca y Zn. El Ca se acumula principalmente en la campana mientras que Zn se encuentra predominantemente en los brazos orales.

6.3. Extracción y caracterización preliminar del complejo pigmento-proteína de *Stomolophus meleagris*

6.3.1. Extracción del pigmento

La extracción del pigmento dependió del tiempo de reposo en agua de mar sintética, produciendo una mayor longitud de onda. Las absorbancias de los extractos, después de los tratamientos, se muestran en la Figura 29. En el extracto sin tratamiento se obtuvieron valores significativamente menores ($P<0.001$). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos de 2, 4 y 6 h de reposo ($P>0.01$). Por lo tanto, en los siguientes experimentos se aplicó un tiempo de reposo de 2 h.

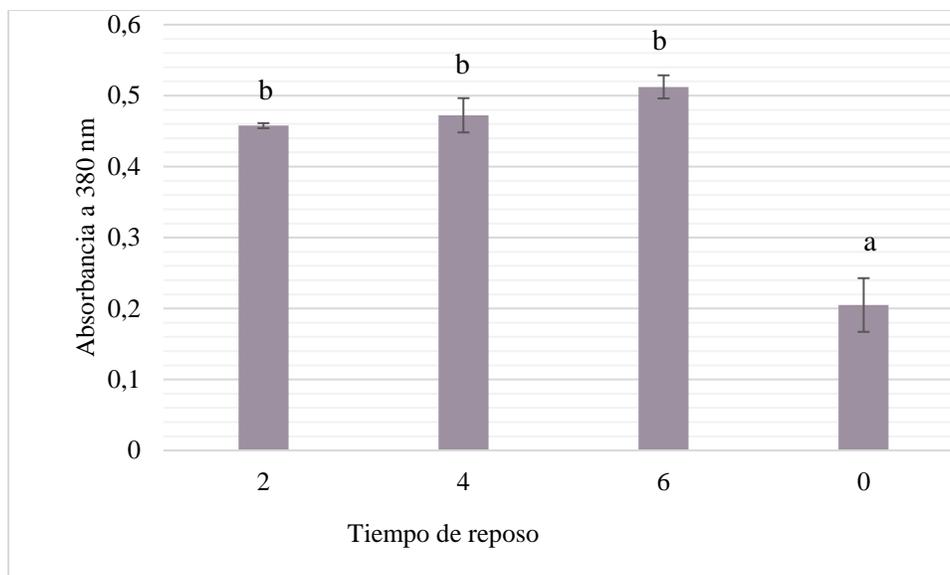


Figura 29. Absorbancia del extracto con agua de mar sintética a 0, 2, 4 y 6 h (media de tres repeticiones).

Tseng y col., (2000) indican varios métodos de extracción de pigmentos, entre ellos extracciones con alcohol, ácidos orgánicos, así como tratamientos con proteasas y amilasas. En estudios anteriores con la misma especie (*Stomolophus meleagris*) (Nopatitla, 2012?) se realizó la extracción del pigmento de muestras frescas y liofilizadas empleando diferentes solventes; sin embargo no se describe la naturaleza del pigmento. Esta autora también llevó a cabo una centrifugación para eliminar las células, encontrando que la mayor eficiencia de extracción se lograba con agua de mar sintética. En la extracción del pigmento azul de *Capsiosea xamachana*, el sobrenadante acuoso fue centrifugado obteniéndose una fracción coloreada que se precipitó con sulfato de amonio (Blanquet y Phelan, 1987). En el presente estudio, esta separación no fue posible ya que la muestra tiende a gelatinizar debido a las altas concentraciones de colágeno, por lo que se procedió a llevar a cabo otros métodos de purificación del pigmento azul.

En la Figura 30 se observan los extractos parcialmente purificados. En otras investigaciones se ha realizado una extracción muy similar pero con tiempos de extracción de 4 a 7 días a 4°C, utilizando la sonicación se puede llevar a cabo esta misma extracción reduciendo el tiempo de días a horas.

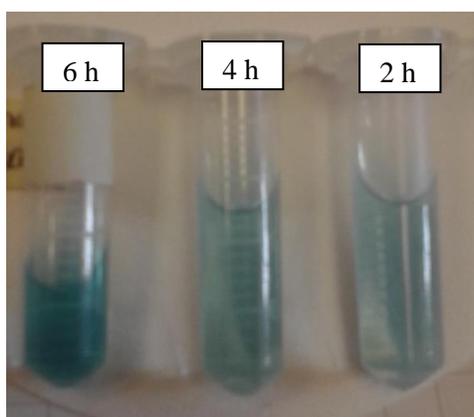


Figura 30. Extractos obtenidos con 2, 4 y 6 h de tratamiento

6.3.2. DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE ABSORCIÓN

El espectro de absorción del extracto semipurificado se muestra en Figura 31.

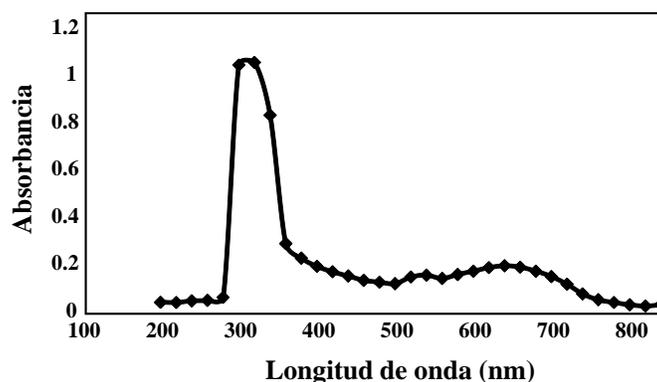


Figura 31. Espectro de absorción del pigmento semipurificado

Los valores máximos se observaron a longitudes de onda de entre 300 y 380 nm, en la región no visible del espectro y en la relacionada al color azul. A determinadas longitudes de onda la luz es selectivamente absorbida por la sustancia en la que incide, de acuerdo a su estructura molecular. Esta absorción se debe a que un fotón incidente promueve la transición de un electrón de un estado de menor a mayor energía. Las moléculas con electrones en compuestos aromáticos absorben luz cerca de la región UV (150-400 nm) (Gastineau y col., 2014). En especies como *R. pulmo* se ha reportado el espectro de absorción de un pigmento azul con un

máximo a 588 nm y un pico menor a 624 nm. Después de someterse a calentamiento se encontró un corrimiento de la longitud de onda a 390 nm, sin embargo, conservaba el característico color azul. En las muestras estudiadas en la presente tesis, los máximos encontrados fueron similares a los reportados por estos autores; sin embargo, a diferencia del estudio en *R. pulmo*, el tratamiento térmico producía la pérdida total del color azul.

6.3.3. PURIFICACIÓN POR ULTRAFILTRACIÓN

Al utilizar membranas con 30 y 50 kDa de diámetro de corte para determinar el peso aproximado del complejo pigmento-proteína, se observó que el retenido de >50 kDa estaba fuertemente pigmentado, mientras que el permeado de <30 kDa era incoloro, por lo que se concluyó que el pigmento está asociado a moléculas mayores a 50 kDa. De igual forma, el retenido con membrana de 100 kDa también estaba fuertemente pigmentado. La Tabla 7 presenta la absorbancia de 300 a 380 nm y la concentración de proteína en el extracto homogenizado y fracción obtenidas por ultrafiltración. La absorbancia se incrementó al aumentar el diámetro de corte concentrando el complejo pigmento-proteína y eliminando otros componentes de menor peso molecular.

Tabla 7. Concentración de proteína en el extracto homogenizado y en fracciones obtenidas por ultrafiltración. (P: permeado, R: retenido)

Fracción	Proteína (mg/mL)	Absorbancia				
		Longitud de onda (nm)				
		300	320	340	360	380
Extracto	2.644	1.464	1.673	1.370	0.622	0.492
R 30 kDa	1.742	1.793	1.925	1.596	0.794	0.659
P 30 kDa	1.150	> 0.01	> 0.01	> 0.01	> 0.01	> 0.01
R 50 kDa	0.042	1.882	2.021	1.716	0.902	0.879
P 50 kDa	0.635	> 0.01	> 0.01	> 0.01	> 0.01	> 0.01
R 100 kDa	0.144	1.982	2.091	1.761	0.972	0.819
P 100 kDa	0.042	>0.01	>0.01	>0.01	>0.01	>0.01

Al llevar a cabo la extracción de pigmentos azules de medusa en especies *R. pulmo* y *C. xamachan*, se encontró una proteína de aproximadamente 30 kDa (determinado por electroforesis SDS desnaturalizante) (Bulina y col., 2004; Phelan y col., 2005) asociada al pigmento. Sin embargo, de acuerdo con los datos obtenidos en nuestro estudio, la proteína asociada al pigmento puede ser incluso mayor a 100 kDa. Esto puede deberse a la asociación del pigmento con una proteína multimérica. Para confirmar lo anterior, se procedió a llevar a cabo el estudio de las proteínas asociadas al pigmento, como se describe en la Sección 5.2.14.

6.3.4. DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD DEL PIGMENTO POR POLARIDAD Y GRADIENTE OSMÓTICO

6.3.4.1. Polaridad

Se encontró que el pigmento fue significativamente más soluble ($P < 0.001$) en agua que en etanol (Tabla 8). Con el tratamiento con 10% de etanol se obtuvo una mayor absorbancia (Anexo 3).

Tabla 8. Absorbancia del extracto pigmentado tratado con etanol

Concentración de etanol (%)	Absorbancia (nm) Media (ds)
10	0.359 (0.0130)
20	0.196 (0.0015)
40	0.113 (0.0058)
60	0.097 (0.0009)
80	0.093 (0.0006)
100	0.065 (0.0024)

ds – desviación estándar

Además, el color cambió de azul a violeta al emplear etanol al 100%, posiblemente debido a la desnaturalización de la proteína asociada, o al cambio del ambiente electrónico del pigmento. El pH alcalino, así como solventes como el diclorometano, cloroformo, acetona y metanol producen isomerización trans-cis. En este caso el cambio de color se puede deber a este tipo de reacción en el cual existe una descolocación electrónica al usar etanol como solvente (Guerrero Legarreta y col., 2006). El disolvente actúa sobre el soluto que en este caso es el pigmento a extraer, solvatándolo y venciendo las fuerzas intermoleculares que lo mantienen unido. En función de la naturaleza del soluto y del disolvente, las fuerzas de solvatación entre ambos pueden ser de diferentes tipos: puentes de hidrógeno, interacciones polares y fuerzas de London. El disolvente idóneo tiene características químicas y estructurales similares a las del compuesto a disolver. La polaridad y, consecuentemente, la solubilidad de los compuestos orgánicos en disolventes polares aumenta con la disminución de la longitud de la cadena hidrocarbonada, la presencia de grupos funcionales polares y la capacidad de formación de puentes de hidrógeno. En pruebas preliminares se determinó el espectro de absorción del pigmento dependiendo del solvente. La mayor solubilidad se obtuvo en metanol acidificado y en agua, obteniéndose longitudes de onda de máxima absorbancia a 317 y 415 nm, respectivamente.

6.3.4.2. Gradiente osmótico

El análisis de varianza de los resultados para determinar el gradiente osmótico en varias osmolaridades mostró que estas son significativamente diferentes ($P < 0.001$) (Anexo 4.1.). La comparación múltiple de medias de Tukey mostró que a osmolaridades de 0.1 (0.1M) y de 0.2 (0.5M) se extrae la mayor cantidad de pigmento (Tabla 9), sin haber diferencia significativa entre ambas ($P > 0.01$) (Anexo 4.2.). El coeficiente osmótico ϕ es un valor que mide la desviación del comportamiento de un disolvente respecto de su comportamiento en condiciones ideales según la ley de Raoult. El coeficiente se define en función de concentraciones en la escala de molaridades (Bartlett y col., 2012). Una concentración osmótica adecuada permite por lo tanto la solvatación y la extracción de una molécula determinada. Esta prueba permite optar por sistemas de extracción más sencillos que el agua de mar; una vez conociendo la osmolaridad adecuada es posible reemplazar el solvente de

extracción para llevar a cabo la purificación del pigmento. Por lo que se concluyó que se obtiene mayor eficiencia de extracción al emplear agua de mar o solución de cloruro de sodio

Tabla 9. Absorbancia del extracto pigmentado tratado con etanol

Concentración de NaCl (M)	Absorbancia nm Media (ds)
0.002	0.127(0.0023)
0.010	0.250(0.0063)
0.020	0.332(0.0481)
0.100	0.376(0.0105)
0.200	0.463(0.0044)
1.000	0.439(0.0058)

ds – desviación estándar

6.3.5. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN

La cromatografía por filtración permitió separar las proteínas del extracto parcialmente purificado con agua de mar sintética en dos fracciones proteicas. El extracto azul, sin embargo, perdió por completo la pigmentación. Esta técnica, a pesar de que logró separar las proteínas, en dos fracciones (Fracción 2, 1150 kDa y fracción 9, 101.5 kDa) no resulta apta para la estabilidad de pigmento.

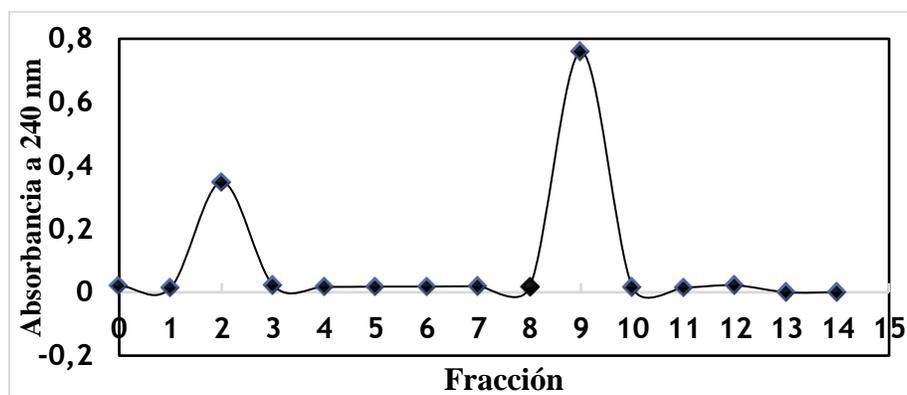


Figura 32. Absorbancia de las fracciones por cromatografía de filtración (los valores representan la media de tres experimentos independientes)

6.3.6. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La Figura 33 muestra el desarrollo del cromatograma en muestras en 0.1 y 05 N de NaCl

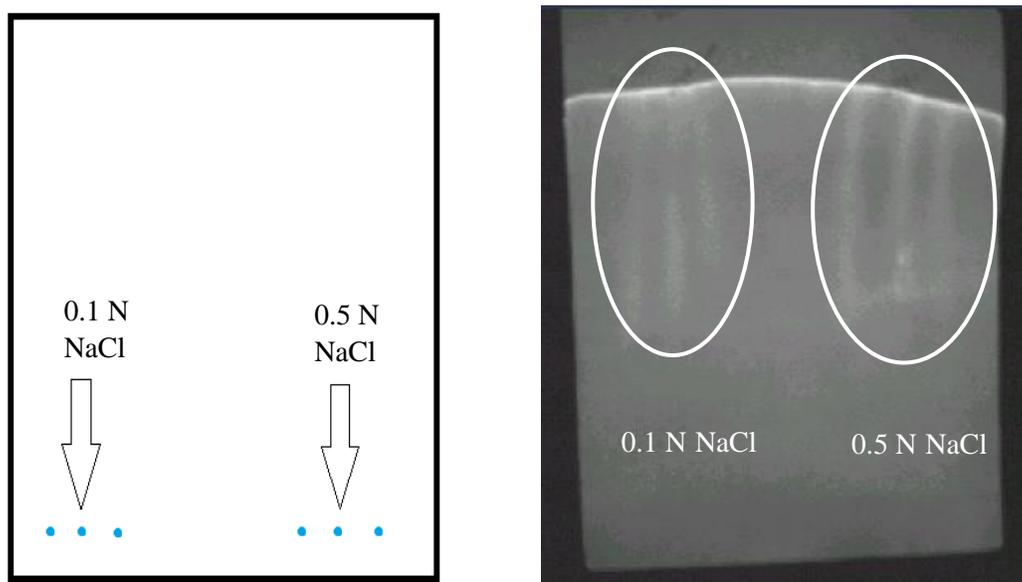


Figura 33. Cromatografía en capa fina de muestras del extracto pigmentado en 0.1 y 0.5 N NaCl

El tratamiento con ninhidrina reveló que la presencia de proteínas. Sin embargo, no fue posible encontrar la separación específica de la proteína. Por lo que esta técnica, si bien indica la presencia de proteínas, no permitió la purificación del pigmento, debido a su alta solubilidad. Las proteínas presentan similitud en cuanto a carga, masa y solubilidad. Por lo que se optó por utilizar otro tipo de purificación. En estudios previos se reporta que las proteínas asociadas a compuestos cromóforos en las medusas son de tipo multimérico, utilizando electroforesis desnaturizante para su separación y purificación (Bulina y col, 2004).

6.3.7. COLORIMETRÍA DE REFLECTANCIA (COORDENADAS L*A*B*)

La campana de la medusa no presentó un color uniforme. La zona inferior de la campana, donde se encontraban pequeñas partes más pigmentadas presenta un color azul más intenso. Las coordenadas de color de las regiones superior, media e inferior de la campana de *Stomolophus meleagris* se muestran en la Tabla 10.

La región inferior tuvo valores significativamente mayores ($P < 0.001$) de azul ($b^* = -31$), verde ($a^* = -15$) y luminosidad ($L^* = 58$) produciendo en su conjunto una percepción con mayor contribución de azul. No se observaron diferencias significativas para las coordenadas $L^*a^*b^*$ de las zonas media y superior de la campana ($P > 0.01$), siendo dominante el color azul-verde. La Figura 34 muestra los sólidos de color obtenidos.

Tabla 10. Coordenadas de color Hunter $L^*a^*b^*$ de la campana de *Stomolophus meleagris*

Coordenadas de color	Región de la campana ⁺		
	Superior	Media	Inferior
L*	41.99 ^{b++}	53.01 ^a	58 ^a
a*	-10.26 ^b	-14.23 ^a	-15 ^a
b*	-8,52 ^b	-1,23 ^c	-31 ^a

⁺ media de tres repeticiones

⁺⁺ medias con literales diferentes son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$)

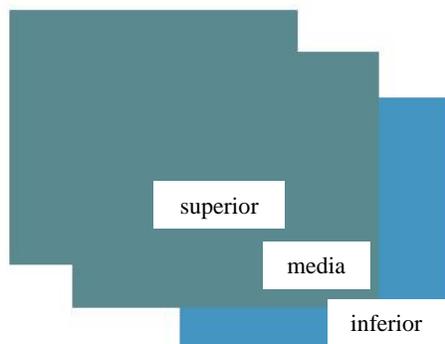


Figura 34. Sólidos de color de regiones de la campana de *Stomolophus meleagris*.

Además, los especímenes de *S. meleagris* también pueden presentar leves variaciones en las coordenadas de color, debido a las variaciones medioambientales (Jacobsen y col., 2007). El color de la campana, cuando se trató con metanol acidificado, no mostró diferencias significativa con las muestras tratadas con agua de mar sintética ($P > 0.01$), además el espectro de absorción es similar, ya que el pigmento es de naturaleza polar, y tiende a desnaturalizarse en compuestos no polares (Nopatitla, 2012).

Los pigmentos se producen por rutas biosintéticas que incluyen numerosas enzimas. En el caso de los invertebrados marinos, el color puede deberse tanto a pigmentos fotosintéticos como a simbiosis con algún tipo de zooplancton o cianobacterias presentes en las células (Bandaranayake, 2006). En comparación con los colores amarillo-rojo, los azules son escasos en la naturaleza; es necesario que exista un sistema de alta polaridad de electrones conjugados π^* (Bulina y col., 2004). Si el color no es derivado de centros metálicos, la presencia de color azul se relaciona con procesos físicoquímicos en los cuales se absorben longitudes de onda rojas o amarillas, que son de relativamente de baja energía. Estos procesos de baja energía involucran la excitación de electrones deslocalizados π a π^* . Para esto, más de 10 dobles cadenas deben tener energía reducida para absorber luz roja de manera que la molécula parezca azul. De manera similar ocurre con anillos aromáticos (Gastineau y col, 2014).

6.3.8. ESTABILIDAD DE LOS EXTRACTOS PURIFICADO Y CRUDO CON RESPECTO AL TIEMPO

La Figura 35 muestra la absorbancia de los extractos crudo y parcialmente purificado durante 35 días de almacenamiento a 4 y -20°C . Se observó que la absorbancia, tanto del extracto

crudo como del parcialmente purificado, disminuyó significativamente ($P < 0.001$) a los 2 días de almacenamiento a 4°C , mientras que hubo una reducción no significativa ($P > 0.01$) en 35 días de almacenamiento. Los extractos crudos almacenados a 4 y -20°C mostraron una reducción no significativa durante todo el tiempo de almacenamiento ($P > 0.01$), aunque los valores observados fueron menores que los obtenidos en extractos parcialmente purificados.

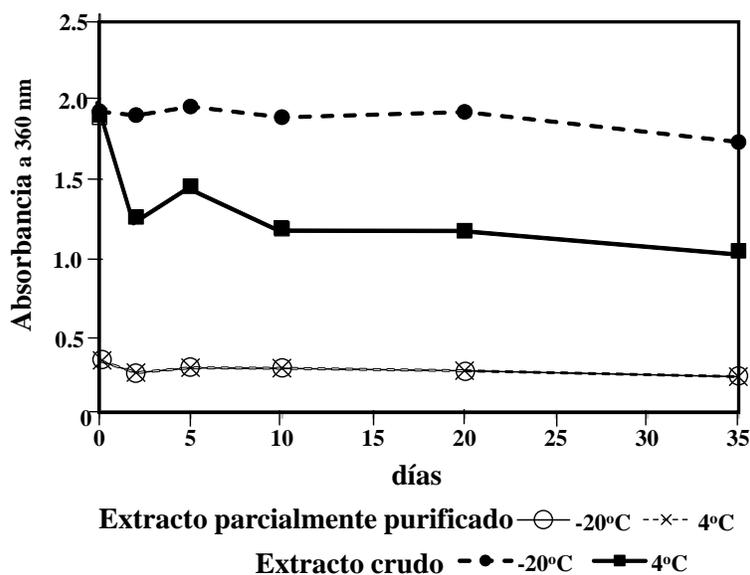


Figura 35. Absorbancia de extractos parcialmente purificado y crudo, almacenados a 4 y -20°C por 35 días

La estabilidad se relaciona con la unión a una proteína, haciendo que el complejo sea más estable al prevenir cambios electrónicos y, por tanto, disminuyendo la degradación del pigmento, según lo reportado en estudios de complejo caroteno-proteicos (Armenta López y Guerrero Legarreta, 2009). Contrariamente, si el cromóforo tiene una naturaleza polar, este promueve la inestabilidad (Hendry y Houghton, 1996). Por lo tanto, los pigmentos son más inestables al separar la fracción proteica por algún método, como se reportó en la inestabilidad del pigmento azul a 4°C en *Casiopea xamachana* (Bulina y col., 2004).

La purificación por ultrafiltración, al ejercer fuerzas tangenciales en el complejo pigmento-proteína, hace que este sea más lábil aún a temperaturas bajas. Los extractos crudos almacenados a -20°C mostraron mayor estabilidad debido a que la fracción proteica estaba asociada al pigmento, lo que permitió que no hubiera una reducción de absorbancia durante el almacenamiento. La presencia de proteasas se ha reportado como un factor que disminuye

la bioactividad de enzimas en cnidarios (Yu y col., 2007; Rocha y col., 2011) puede también afectar la estabilidad del pigmento al hidrolizar el complejo pigmento-proteína. En comparación con otros pigmentos de origen natural como carotenoides o flavonoides, (Castañeda, 2008) este pigmento parece ser más estable, sobre todo una que vez que es purificado.

6.3.9. Efecto del pH y temperatura sobre la estabilidad del extracto pigmenta

En el Anexo 5.1. se presentan los valores experimentales de absorbancia obtenidos. Al aplicar el Diseño Central Rotatorio de acuerdo a lo descrito en la Sección 5.2.18, para determinar el efecto del pH y la temperatura en la estabilidad del pigmento, se obtuvo la siguiente ecuación:

Ecuación 3

$$\text{Absorbancia} = -0.227 + 0.223(\text{pH}) - 2.95 \times 10^{-5}(\text{T}) - 1.76 \times 10^{-2}(\text{pH})^2 - 2.27 \times 10^{-5}(\text{pH} * \text{T}) - 5.25 \times 10^{-5}(\text{T})$$

$^2R^2=0.936$

El Anexo 5.2. muestra el Análisis de Varianza de los resultados. La ecuación 3 explica el 93.6% del efecto de la temperatura y el pH sobre la absorbancia del pigmento. La estabilidad del pigmento muestra una disminución lineal al aumentar la temperatura ($P > 0.0004$), mientras que el pH tiene un efecto cuadrático ($P > 0.0009$). La Figura 36 muestra la superficie de respuesta estimada y la Figura 37 los contornos de respuesta de sobre la absorbancia. Se concluyó que el pigmento es estable a temperaturas hasta de 46°C, si se mantiene un pH entre 5 y 8. Si las condiciones de temperatura o pH tienden a los extremos se pierde el color del pigmento hasta desnaturalizarse de forma irreversible. La absorbancia máxima se observó a pH 5-8. Cuando aumenta la temperatura y el pH se corre a valores menores, el color se pierde irreversiblemente.

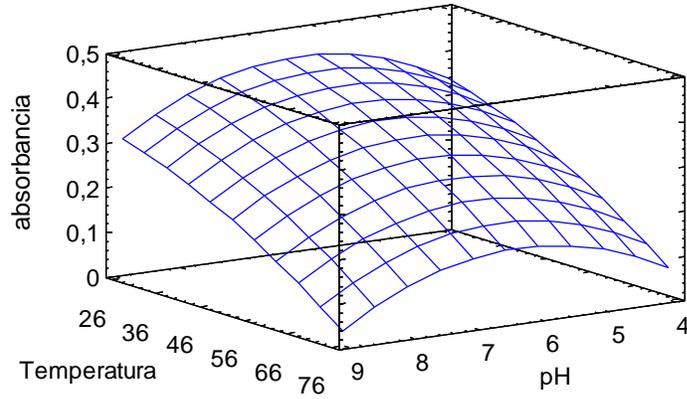


Figura 36. Efecto del pH y la temperatura sobre la absorbancia 360 nm del pigmento purificado de *Stomolophus meleagris*. Superficie de respuesta estimada

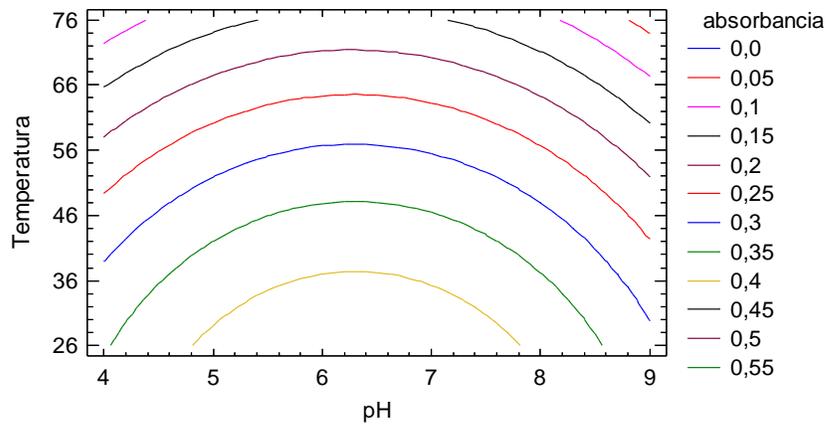


Figura 37. Contornos de respuesta estimados para la absorbancia en función del pH y la temperatura

6.3.10. Rendimiento del pigmento

La Tabla 11 muestran los resultados de contenido de proteína y absorbancia de las muestras después de cada etapa de purificación. Se observó un incremento en la absorbancia hasta 207.28 (Etapa 5) a medida que disminuye el tamaño de poro del medio filtrante, debido a una concentración del pigmento. La concentración de proteína disminuyó a 0.04 mg/mL después de ultrafiltración por membranas de 20 kDa NMWL, un decremento final de 31.53% con respecto al extracto homogenizado. En forma global, se estimó que el rendimiento del pigmento purificado fue de 2.68 %.

Tabla 11. Purificación y color del extracto crudo de *Stomolophus meleagris*

Etapa	Medio filtrante	Volumen (mL)	Absorbancia a 380 nm	Concentración de proteína (mg/mL)	Decremento en la concentración de proteína (%)	Proteína total (mg)	Incremento en la Absorbancia
1	Ninguno (Extracto Homogenizado crudo)	20.00*	1.78	1.49	--	29.89	1.00
2	Filtración en gasa	14.00	4.50	1.87	1.00	26.14	2.90
3	Filtración en papel filtro Whatman 4	10.20	4.50	0.50	26.73	5.06	14.95
4	Membranas Amicon (100 kDa)	9.80	2.53	0.05	29.40	0.52	81.62
5	Membranas Amicon (20 kDa)	9.80	4.50	0.04	31.53	0.37	207.28

* los valores representan la media de tres experimentos independientes

6.3.11. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA ASOCIADA AL PIGMENTO

6.3.11.1. Hidrólisis enzimática del complejo pigmento-proteína. Determinación de pesos moleculares y presencia de glucoproteínas

Los pigmentos naturales están frecuentemente ligados a una proteína (Bandaranayake, 2006). Para determinar que, efectivamente, el pigmento estuviera asociado a una proteína se realizó

una prueba con fenol; al observarse pérdida de color se comprobó la naturaleza proteica (Bulina y col., 2004). En algunos organismos la coloración azul se obtiene mediante la combinación de un cromóforo con una proteína específica, por ejemplo, carotenoproteínas como la crustacina, que ha sido estudiada como principal pigmento azul en la coraza de la langosta (Bulina y col., 2004).

La hidrólisis enzimática dio como resultado la pérdida completa del color (0.0032 a 360 nm). Las proteasas rompen las proteínas mediante las hidrólisis a péptidos. Al perderse estructuras específicas de las proteínas estas pierden su capacidad de emitir-absorber energía. La síntesis de cromóforos en las proteínas comienza desde el plegamiento de la proteína en su conformación inicial (Heim y col., 1994). El hecho que se pierda la coloración a la vez que se pierde la estructura del compuesto colorido, por acción de proteasas, comprobó la naturaleza del pigmento.

Se determinó un contenido de 66.57 mg/mL de azúcares totales en el extracto parcialmente purificado, valor inferior al reportado para *Rhopilema esculentum* de 126 mg/mL en los tentáculos orales (Ren y col., 2008).

El contenido de carbohidratos totales y de proteína en el extracto crudo fue 10% y 540 µg/mL, respectivamente, y es similar con datos previamente reportados para *Rhopilema esculentum* (Rocha y col., 2011). Otros autores encontraron que los azúcares más abundantes en esta especie eran ramnosa, fucosa, arabinosa, manosa y N-acetil galactosamina (Ren y col., 2009). Dado que en el retenido de la ultrafiltración de nuestras muestras se encontró una proteína de >100 kDa (Sección 6.3.4.), se concluyó que podría tratarse de una configuración multimérica o de un complejo proteico. Por tinción SDS-PAGE se encontró que el filtrado contenía cuatro proteínas de 138, 112, 75 y 53 kDa (Figura 38A). La banda de 53 kDa es posiblemente resultado de degradación proteica. La tinción PAS, específica para proteínas asociadas a carbohidratos, mostró bandas a 135, 111, 75 y 53 kDa (Figura 38B).

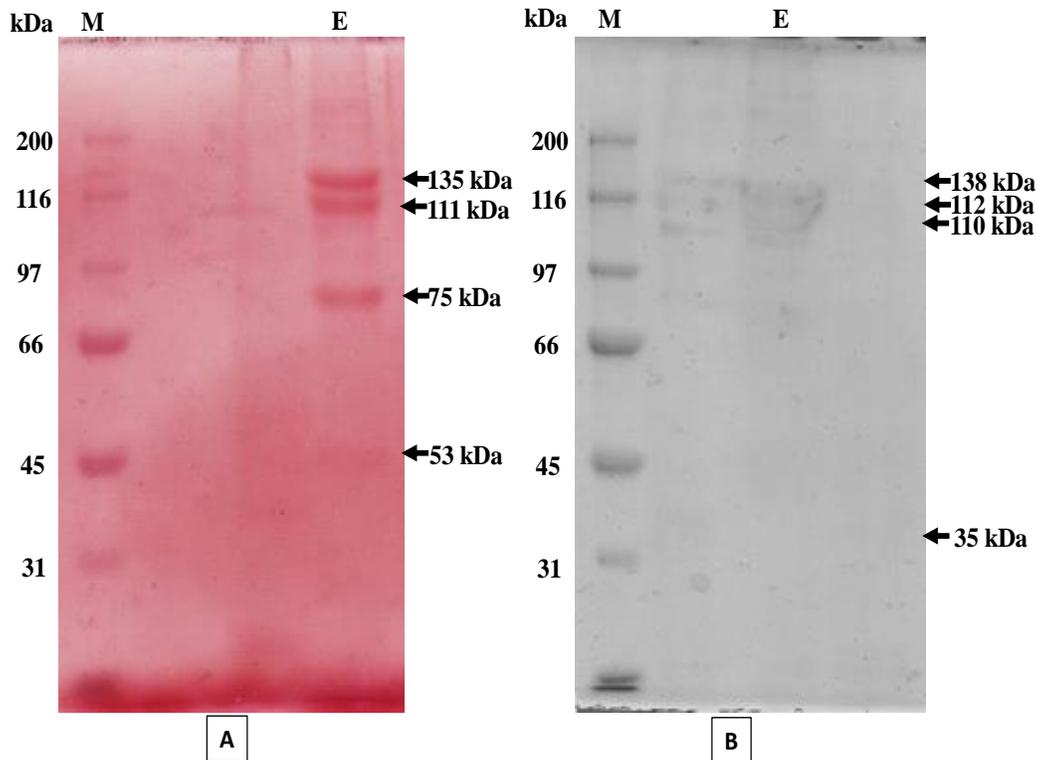


Figura 38. Glucoproteínas presentes en el extracto semipurificado. SDS-PAGE PAS (A) y Tinción plata (B)

La naturaleza de los pigmentos azules de medusas ha sido poco estudiada. La estructura se ha reportado parcialmente como relacionada a grupos nitrógeno (Carvalho-Saucedo y col., 2012). Sin embargo, se ha reportado al pigmento azul de *Rhizostoma pulmo* como una cromoproteína extracelular de 30 kDa llamada rpuLFKz1, que consiste en dos dominios insertados uno dentro del otro (Bulina y col., 2004).

Contrariamente, el pigmento formado por dos unidades de *Cassiopea xamachana* está relacionado a una cis-glucoproteína polimérica formada por monómeros de 30 kDa, caracterizada por especies múltiples con carga (Blanquet y Phelan, 1987; Phelan y col., 2006). Sin embargo, en ambos casos los pigmentos tienen características espectrales y bioquímicas similares. La presencia de glucoproteínas también ha sido reportada en otras medusas como *Rhopilema escuelemun* (Zhuang y col., 2010), incluyendo una glucoproteína de 107 kDa en los tentáculos orales (Masuda y col., 2007).

6.3.11.2. Análisis de aminoácidos en muestras de medusas

Las proteínas son uno de los componentes más importantes en el alimento ya que influyen en las características funcionales y nutricionales al proveer aminoácidos y al ser fuente de nitrógeno y de energía. La Figura 39 muestra el perfil de aminoácidos en los extractos de medusa crudo y semipurificado. Los extractos contienen aminoácidos esenciales y no esenciales. La concentración de algunos disminuyó después de la purificación, como la fenilalanina y la tirosina, mientras que la lisina y el triptófano se concentraron. Hay pocas investigaciones sobre los aminoácidos en *S. meleagris*, aunque se ha estudiado su potencial como alimento (Laskar y Robutel, 2000; Hsieh y col., 2001). Cys, Met, Tyr tuvieron las menores concentraciones tanto en el extracto crudo como en el semipurificado, mientras los aminoácidos más abundantes fueron Glu, Lys y Trp. El Puntaje Químico de las proteínas fue de 1.51, tomando en cuenta a la Tyr como el aminoácido limitante. Otros estudios que analizan solamente a la campana de *S. meleagris* reportan un valor de 0, debido a que no detectaron Trp (Khong y col., 2016), contrario a nuestro estudio en donde se encontró una concentración de 3.105 y 1.673 g/100g de proteína en el extracto purificado y crudo, respectivamente.

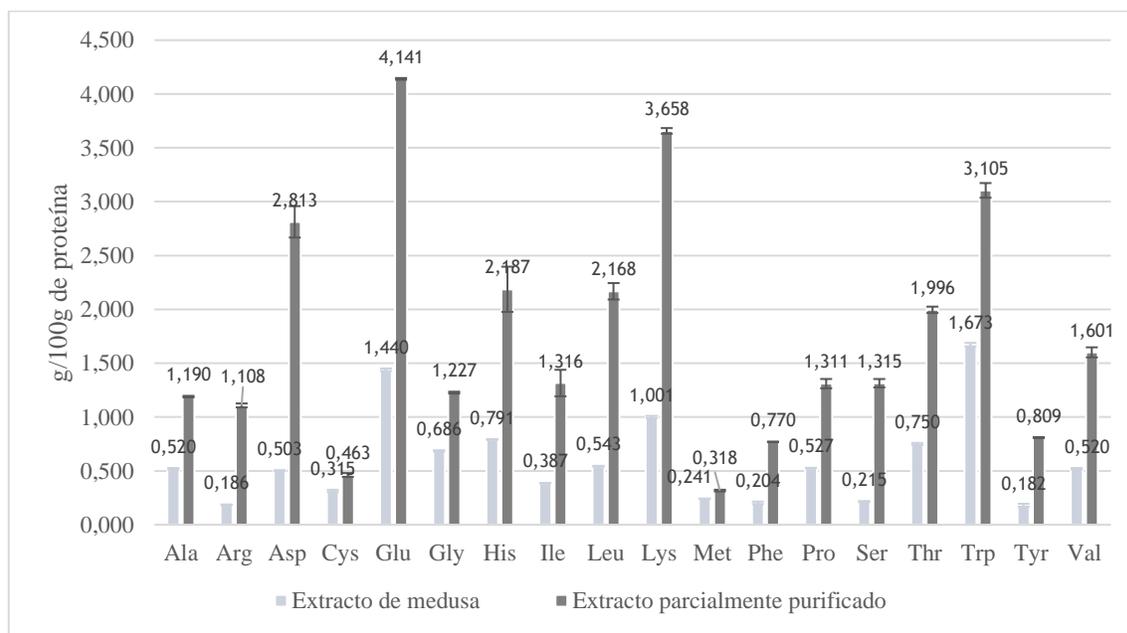


Figura 39. Perfil de aminoácidos del extracto pigmentado, purificado y semipurificado de *Stomolophus meleagris*

6.3.11.3. Hidroxiprolina en el extracto semipurificado

La prueba preliminar de contenido de hidroxiprolina en el extracto pigmentado de *S. meleagris* fue 12.52 mg/mL. Debido a su presencia en el extracto, puede suponerse que está también asociada al complejo pigmento-proteína. La hidroxiprolina es un aminoácido post traduccional asociado al tejido conectivo, cuya proteína mayoritaria es el colágeno (Reddy y Enwemeka, 1996). Este estudio se amplió con los experimentos reportados en la Sección 6.4 de colágeno en *Rophilema esculentum* y *Aurelia aurita*. La curva estándar para hidroxiprolina se muestra en el Anexo 6.

6.3.11.4. Determinación de péptidos por MALDI-TOF

La Figura 40 muestra el espectro de masas obtenido en MALDI-TOF de la proteína obtenida en la banda de 110 kDa debido a que en este tamaño molecular se encontraba la mayor absorbancia a 360 nm, después de la digestión con tripsina.

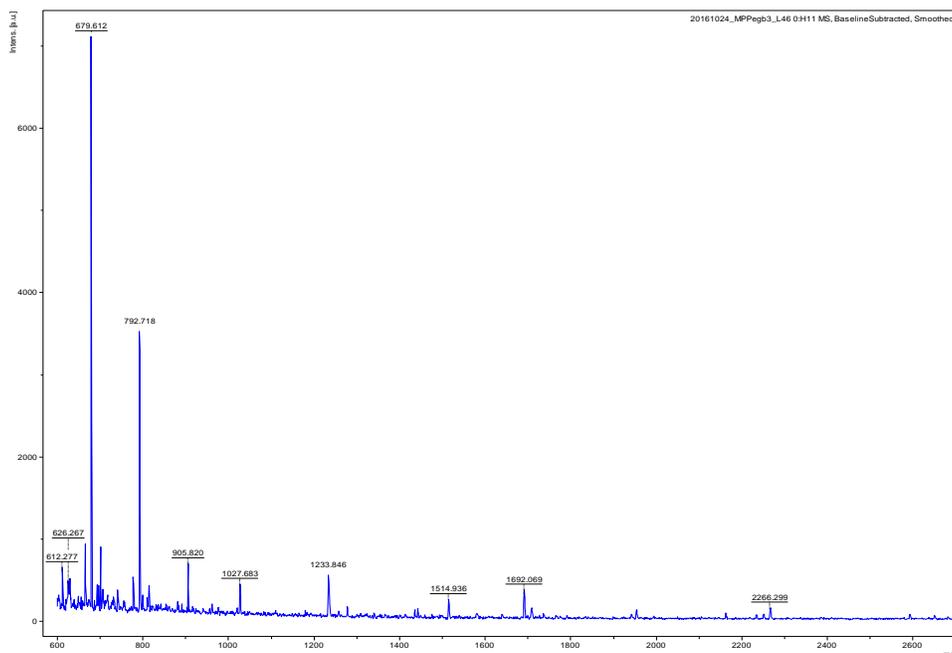


Figura 40. Espectro de fragmentación la banda de 110 kDa del extracto semipurificado de *Stomolophus meleagris*

Después de ser comparada el espectro mediante la base de datos MascotASCOT (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS) aplicando las modificaciones de amidación se realizaron búsquedas de similitud en las bibliotecas NCBIprot y Swiss prot. La Figura 41 muestra el puntaje proteico encontrado en la base de datos NCBI prot y en la base de datos Swiss prot. Sin embargo, no se encontró una similitud en la huella peptídica con alguna proteína previamente reportada.

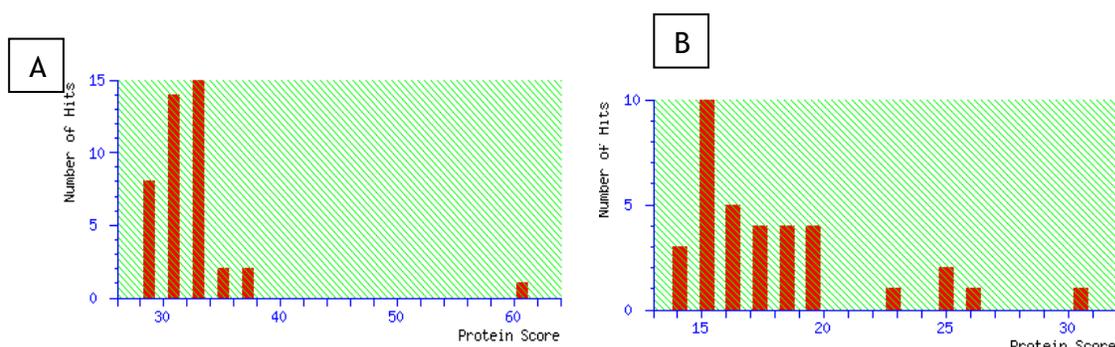


Figura 41. Puntaje proteico en la base de datos NCBI prot y en Swiss prot.

El histograma revela una lista de proteínas, cada una de estas coincide con algunas de las masas peptídicas experimentales pero el informe indica que no son estadísticamente significativas ($P > 0.01$). El umbral de puntuación para esta búsqueda fue 73% en NCBI prot y 48% en Swiss prot. La proteína con el puntaje más cercano fue de 61% y corresponde a la proteína Fotosistema I YCF1 (cloroplasto) perteneciente a *Asterionellopsis glacialis*, con la siguiente secuencia (las coincidencias se indican en rojo).

```

1  MGNFIDKTFT  VIADILLKVL  PASKQEKQAF  SYRAGMAAQ  SRGQYAEALE
51 NYYEALQVEE  DPYDRSYTLY  NIGLIYGNA  KYTQALEFYH  QALALNTNLP
101 QALNNIAVIY  HSQALRAQTF  DDDEYMELSK  ELFDKAAEYW  RQALKLAPDN
151 YPGARNWLKI  TGRLTETNS

```

Se encontró una similitud de aminoácidos que corresponden a la siguiente huella peptídica:

R.NSPGLLVSPGGMNKNMQTK.S + 4 Desaminación (NQ); Oxidación (M)

Esta secuencia tuvo una similitud del 39%.

Finalmente se llevó a cabo la fragmentación de los picos del espectro que obtuvieron las mayores áreas. Con esto, se separó un aminoácido con m/z específico, obteniendo los espectros de cada fragmento. Sin embargo, no se encontraron homologías. Por lo tanto, para la obtención de mayor información, es necesario hacer la secuenciación.

6.4. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE COLÁGENO DE *Rophilema esculentum*, *Aurelia aurita* Y *Rhizostoma pulmo*.

6.4.1. Análisis morfológicos

La Tabla 12 muestra los datos obtenidos de análisis morfológicos de los 10 especímenes de medusa *Aurelia aurita* empleados en este estudio. Esta especie tiene un diámetro de campana 2 a 30 cm, con un promedio de 7.5 cm en su estado adulto (Miyake y col., 1997). Por tanto, se estimó que los especímenes estudiados aún no llegan a dicho estado. La Figura 42 muestra la distribución considerada para determinar el número de tentáculos por octante. La muestra 6 se encontraba degradada por lo que fue imposible realizar el conteo de los tentáculos y octantes.

Tabla 12. Datos morfológicos básicos de especímenes de *Aurelia aurita*

Número de muestra	Diámetro de campana (cm)	Número de tentáculos por octante (8)	Peso (g)
1	7	9	15.915
2	6	7	6.679
3	9	9	14.988
4	6.5	8	8.04
5	9.5	9	13.703
6	--	--	10.879
7	5.9	7	7.353
8	8.2	8	11.731
9	8.5	9	8.431
10	6	5	7.677

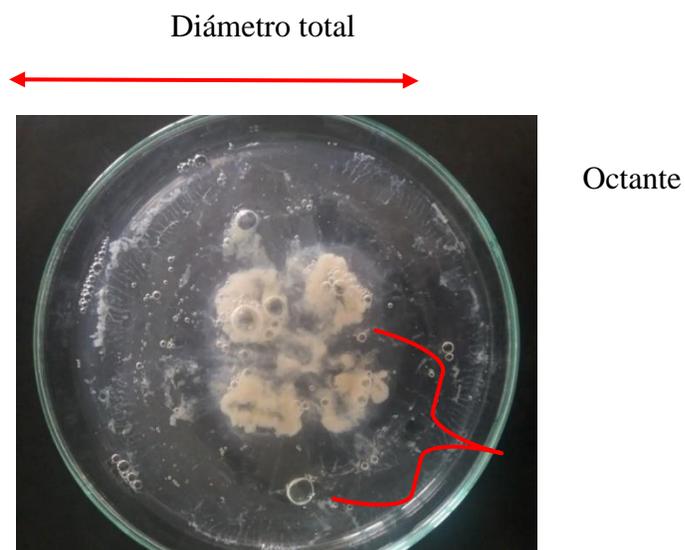


Figura 42. Especimen de *Aurelia aurita*, conteo de los octantes y los lóbulos. Conteo diferencial por el método de Miyake y col. (1997)

En el caso de *R. pulmo* se contó solamente con una muestra. Esta especie puede medir hasta 100 cm y es identificada por los ribetes azules en la orilla de la campana (Miyake y col. (1997) (Figura 43). La Tabla 13 muestran los datos morfológicos del organismos utilizado en este estudio.

Tabla 13. Datos morfológicos del espécimen de *R. pulmo*

Octantes	8
Tentáculos	8
Peso campana	636.7
Peso Tentáculos	500
Diámetro (cm)	35.6

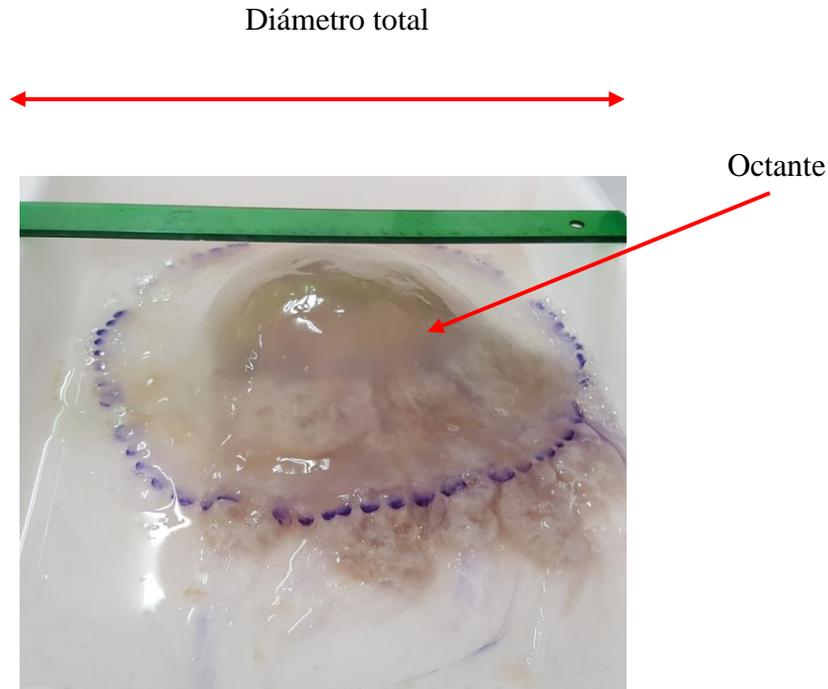


Figura 43. Especimen de *R. pulmo*, conteo de los octantes

6.4.2 Análisis proximal y contenido de colágeno.

La Tabla 14 muestra el análisis proximal de homogenizados de *Rhopilema esculentum*, *Aurelia aurita*, y tentáculos y campana de *Rhizostoma pulmo*.

Las medusas están constituidas principalmente por agua, seguido por proteínas y minerales. En las especies estudiadas se encontró de 92 a 98% de humedad. Los estudios de otras especies como *Lychnorhiza lucerca se* han obtenido de 96 a 82%, observando diferente concentración de humedad entre la campana y las gónadas (Schiariti y col., 2011). Por lo tanto, nuestros resultados se encuentran dentro del intervalo reportado. Sin embargo, la humedad en medusas de mar es mayor en comparación con otras especies marinas invertebradas, que registran valores de 78.54 a 82.62% en calamares y pulpos (Khong y col., 2016). Estos autores reportaron, además, que las proteínas se encuentran distribuida de forma diferente en el cuerpo de la medusa, encontrando que en los brazos orales se obtiene el doble del contenido en comparación con la campana.

Tabla 14. Análisis proximal (%) de muestras homogenizadas de *Rhopilema esculentum* y *Aurelia aurita*, y tentáculos y campana de *Rhizostoma pulmo*.

Muestra	Humedad	Cenizas (base seca)	Proteínas (base seca)	Colágeno
<i>R. esculentum</i> homogenizada	92.656*	0.217	2.089	3.738
<i>A. aurita</i> homogenizada	98.113	0.986	0.986	0.015
Tentáculos de <i>R. pulmo</i>	96.545	1.721	1.721	0.201
Campana de <i>R. pulmo</i>	95.930	2.985	2.985	0.032

*Muestra previamente procesada

Estas especies son ricas en minerales, principalmente en Na, K y Mg. El contenido de cenizas estuvo en el intervalo de 0.2 a 2.98 % en las tres especies, similar a la media reportada para otras especies, de 0.1 a 1.8% (Khong y col., 2016), La campana de *R. pulmo* presentó la mayor concentración de minerales (2.98%). La campana es la región responsable de la flotabilidad; el alto contenido de minerales tiene una acción de amortiguamiento en el organismo al mantener el equilibrio osmótico. Además, el contenido de cenizas está ligado a la concentración de los cuerpos de agua donde se encuentra la especie. Las medusas se han considerado como indicadores de la concentración de metales en un hábitat determinado, los cuales forman parte de las cenizas, ya que una alta concentración de minerales se ven reflejada en estos organismos (Hsieh y col., 2001).

Las proteínas y las cenizas son los componentes nutricionales predominantes, mientras que los lípidos se encuentran en cantidades traza (0.01% o menos) (Hsieh y col., 2001). Ren y col. (2009) reportan contenidos de proteína en *Rhopilema esculentum* de a 1 a 3% en base húmedo y hasta 60% en base seca, coincidiendo con los datos encontrados en este estudio donde se encontró que la especie con mayor contenido de proteína era *R. pulmo*, con un

cuerpo más rígido en comparación con las otras especies estudiadas. Esta rigidez probablemente la proporcionan proteínas estructurales estables. Al contener más proteína, es menor el contenido de humedad.

El colágeno es el principal constituyente del tejido conectivo y actúa como cementante entre varias células, así como unión entre órganos y protección de la superficie del organismo. Existe una estrecha relación entre la firmeza del músculo y el comportamiento del colágeno en organismos marinos. Asimismo, algunos autores (Nagai y Suzuki, 2000; Yunoki y col., 2003) reportan que la concentración de colágeno en músculo de pescado depende de la temperatura del agua. Este puede ser también el caso en medusas, aunque no se tiene conocimiento de reportes al respecto.

La hidroxiprolina es el aminoácido indicativo de la cantidad de colágeno en un organismo. Se ha reportado que el contenido total de hidroxiprolina en medusas como *A. hardenbergi*, *R. esculentum* y *R. hispidum* es entre 40.52 y 86.74 mg/g (0.0405-0.0867 %) (Reddy y Enwemeka, 1996). La Tabla 14 muestra que la muestra homogenizada de *R. esculentum* tuvo una concentración de colágeno muy superior a las otras muestras. Esto fue debido a que se trataba de un producto comercial previamente tratado para consumo humano, por lo tanto, con menor contenido de humedad.

6.4.3. SDS- PAGE de fracciones ASC y PSC de *Rophilema esculentum*

La extracción del colágeno a partir de un tejido es un proceso que debe ser controlado, ya que cualquier cambio en las condiciones de trabajo produce variaciones en la concentración de colágeno, que está directamente relacionado con el rendimiento del producto final y en las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del biomaterial (Gomez-Lizarraga, 2011). Se han diferenciado dos tipos de colágeno por su método de extracción: ASC (colágeno ácido soluble, por sus siglas en inglés *acid-soluble collagen*) y PSC (colágeno soluble en pepsina, por sus siglas en inglés *pepsin-soluble collagen*). Ambas fracciones parten del mismo procedimiento preparativo, en el cual el tejido es lavado en ácido acético de 2 a 4 días. Las fracciones son separadas por centrifugación, el precipitado es sometido a un tratamiento con

pepsina, mientras que el sobrenadante es saturado con NaCl, para la precipitación del colágeno (Krishnan y Perumal, 2013).

El estudio de los pesos moleculares de las fracciones purificadas de colágeno ASC y PSC se llevó a cabo con muestras de *R. escaletum*, La Figura 44 muestra el electroforetograma, con las bandas resultantes de cada tipo de extracción. Otros autores han reportado al colágeno nativo como un heteropolímero con un peso molecular de aproximadamente 300 kDa con dos bandas proteicas claramente diferenciadas y en posiciones próximas (Hoyer y col., 2014). En el caso de la fracción ASC se puede estudiar al colágeno nativo, mientras que en la fracción PCS se encuentra ya desnaturalizado. En nuestro estudio, el perfil electroforético de la fracción ASC se observan dos bandas con pesos moleculares de 116 y 97 kDa. Este patrón es semejante a lo reportado por otros autores para el colágeno de origen marino, incluyendo al calamar gigante (Kim y Park, 2004; Bower y col., 2006; Uriarte, 2007; Valencia-Pérez y col., 2008).

Los pesos correspondientes a 125 y 215 kDa corresponden a dos tipos de cadenas. La primera a cadenas α , cercanamente relacionadas al colágeno Tipo I, el principal constituyente de esta proteína y que también se relaciona con la estructura primaria. La proteína de 215 kDa corresponde a una cadena β formando dímeros. Según Gómez-Lizarraga (2013) estos entrecruzamientos entre moléculas de colágeno se encuentran en la región peptídica, impidiendo una completa solubilización de la proteína. Sin embargo, por acción de pepsina se puede realizar un corte y solubilizar a esta fracción (PSC) sin afectar la integridad de la proteína, pero con un menor peso molecular.

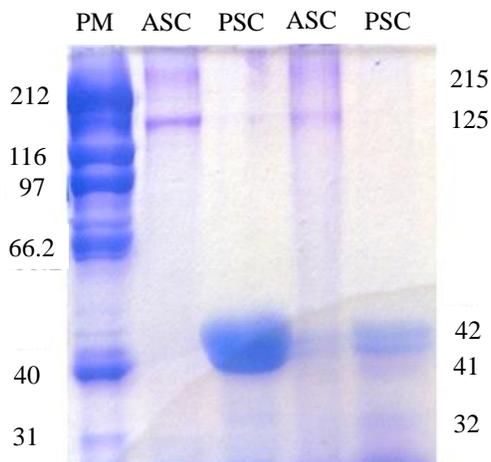


Figura 44. SDS-PAGE de fracciones ASC y PSC
 Carriles 2 y 3 – Estándar de colágenos ASC y PSC;
 Carriles 4 y 5 - fracciones ASC y PSC de muestras de colágeno de *R. esculentum*

6.4.4. Determinación de la temperatura de desnaturalización de colágeno PSC de *R. esculentum*.

En el Anexo 7 se presentan los resultados estadísticos de los niveles de temperatura estudiados. Se observó una diferencia significativa entre las temperaturas ($P > 0.0001$), medida a 300 nm. La Figura 45 muestra el efecto de la temperatura, registrando la absorbancia de la muestra a tres longitudes de onda (240, 250 y 300 nm). Se encontró que la temperatura afecta directamente a la desnaturalización del colágeno. Por lo anterior se estimó que existe un efecto de temperatura sobre la concentración del colágeno en solución y, por lo tanto, al aumentar la temperatura la Temperatura de desnaturalización (T_d) aumenta.

La temperatura de desnaturalización del colágeno es un parámetro ligado a la fuente biológica. Mientras que en muestras de colágeno de porcino la T_d se encuentra entre los 37°C, la T_d de colágeno extraído de especies de medusa se encuentra entre los 24°C (Nagai y col. 1999).

Para caracterizar de una forma completa el proceso de desnaturalización de una proteína es necesario conocer algunos parámetros característicos, como temperatura, entalpía y entropía

de desnaturalización. Si se tiene en cuenta que la temperatura de desnaturalización de una proteína se define como aquella temperatura a la que se ha desnaturalizado el 50% de las moléculas, lo que corresponde a un 50% de variación reducida, es posible calcular la temperatura de desnaturalización del colágeno representando el porcentaje de disminución de la viscosidad reducida frente a la temperatura y determinando, en la gráfica obtenida, la temperatura a la que se ha producido el 50% de disminución. Los resultados obtenidos demuestran la dependencia entre el valor de la temperatura de desnaturalización observando que al aumentar éste disminuye la temperatura de desnaturalización, estimando este valor a los 23°C donde se encuentra el momento de inflexión en la absorbancia, temperatura similar a lo reportado en otras especies de medusa.

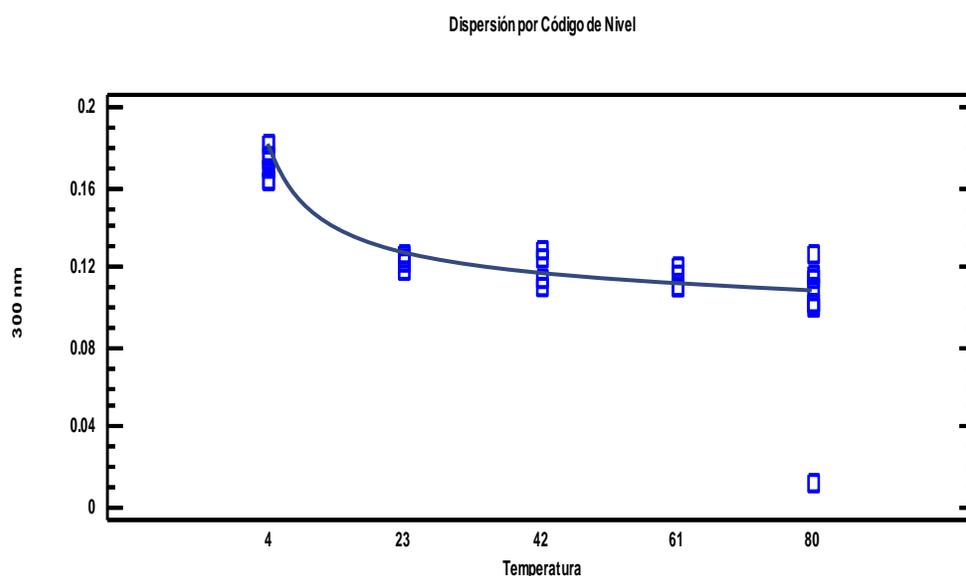


Figura 45. Modelo ajustado de la temperatura de desnaturalización a 300 nm de colágeno de medusa *R. esculetum*.

6.4.5 Determinación del mapa peptídico mediante hidrólisis enzimática

Al tratar muestras de ASC de *R. esculentum* con tripsina y endoproteasa, se obtuvieron tres fracciones: la fracción ASC1 fue producto de hidrólisis con tripsina, mientras que las fracciones ASC2 y ASC3 se obtuvieron por hidrólisis con endoproteasa. La Figura 46

muestra el electroforetograma resultante. La proteólisis ocurrida en todos los casos muestran bandas de peso molecular entre 200 y 95 kDa. Estos resultados pueden indicar el efecto de las enzimas en los entrecruzamientos de las cadenas α y β presentes en mayor medida. Se observan además proteínas de menor peso molecular, entre 55 y 95 kDa, las cuales pueden ser péptidos liberados de las cadenas α o proteínas expuestas en la estructura espacial de la molécula de colágeno. La hidrólisis proteolítica no se desarrolla en una sola reacción, se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces con distintas especies cargadas en equilibrio.

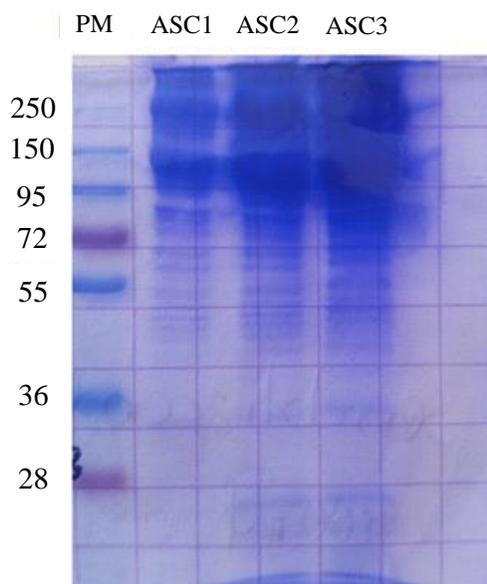


Figura 46. SDS-PAGE de la fracción ASC hidrolizadas con tripsina (ASC1) y con endoproteasa (ASC2 y ASC3).

7. CONCLUSIONES

El medio ambiente marino es una fuente de recursos de suma importancia, tanto por su diversidad biológica como por su riqueza de compuestos químicos. El objetivo de esta tesis fue la obtención y caracterización de algunas biomoléculas de importancia en las industrias alimentaria y farmacéutica, entre otras, a partir de medusas. En particular, el complejo pigmento azul-proteína a partir de *Stomolophus meleagris*, y el colágeno a partir de *Rophilema esculentum*, *Aurelia aurita* y *Rhizostoma pulmo*. Entre las aportaciones de la presente tesis consistió en definir con detalle el método de extracción y purificación de un pigmento azul. Iniciando con procesos de purificación físicos como ultrafiltración, es posible extraer este pigmento logrando mantener su estabilidad. Se constató que este pigmento se encuentra distribuido en todo el organismo, principalmente en la campana, y concentrado en el epitelio umbrelar. Este pigmento tiene características que pueden ser de utilidad en la industria alimentaria. Poseer un color azul característico, poco común en la naturaleza, pero estable al pH, lo que permite su uso en diferentes matrices. Aunque este pigmento puede ser lábil a altas temperaturas, es posible emplearlo en alimentos que no requieran tratamientos térmicos por periodos de tiempo extensos. Además, posee la ventaja de mantener el color azul hasta el momento en que se inicie la desnaturalización de la fracción proteica. Es soluble en compuestos polares, es altamente soluble en agua lo que representa una ventaja más para su uso como aditivo en alimentos. Se encontró que la proteína asociada al pigmento es una glucoproteína de alto peso molecular, la cual le proporciona estabilidad a la molécula pigmento-proteína. Asimismo, las medusas son una fuente alternativa para la obtención de colágeno. Además de contener agua en un alto porcentaje, uno de sus componentes mayoritarios son las proteínas, destacando el colágeno el cual se tiene un alto rendimiento de extracción. El colágeno extraído de las especies estudiadas, *Rophilema esculentum*, *Aurelia aurita* y *Rhizostoma pulmo*, tiene un peso molecular al colágeno del Tipo I. Por tanto, las medusas son una alternativa viable para la extracción de este compuesto, tanto por su facilidad en la extracción como por la pureza final, el cual puede ser destinado para usos alimenticios, cosméticos y biomédicos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Okuma, E. (1991). Rigor-mortis progress of carp acclimated to different water temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(11), 2095–2100.
- Afford, H., Patel, T. (2013). *Stomolophus meleagris*. Consultado en: http://animaldiversity.org/accounts/Stomolophus_meleagris/
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- Alejandre, F. (1999). La espectrofotometría UV-VIS aplicada al estudio del color y estabilidad en morteros coloreados. *Materiales de construcción*, 49. 19-29.
- Álvarez-Tello, F. J., Rodríguez-Romero, J. L. J. (2013). Primer registro de la asociación entre *Stomolophus meleagris* (Cnidaria : Scyphozoa : Rhizostomeae) y *Conchoderma cf virgatum* (Crustacea:Cirripedia:Thoracica) en el Golfo de California. *Hidrobiológica*, 23 (1): 138-142 ISSN para version electronica 2448-7333
- Ansorena, D., De Peña, M. P., Astiasarán, I., Bello, J. (1997). Colour evaluation of chorizo de Pamplona, a Spanish dry fermented sausage: Comparison between the CIE L*a*b* and the Hunter lab systems with illuminants D65 and C. *Meat Science*, 46(4), 313–318. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00025-9)
- Armenta López, R., Guerrero Legarreta, I. (2009). Stability studies on astaxanthin extracted from fermented shrimp by-products, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 6095-6100. DOI: 10.1021/jf901083d
- AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists International Methods, 2–66. <https://doi.org/10.3109/15563657608988149>
- Baldasso, C., Barros, T. C., Tessaro, I. C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, 278(1-3), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.05.055>
- Bandaranayake, W. M. (2006). The nature and role of pigments of marine invertebrates. *Natural Product Reports*, 23(2), 223–55. <https://doi.org/10.1039/b307612c>
- Bartlett, M. K., Scoffoni, C., Ardy, R., Zhang, Y., Sun, S., Cao, K., Sack, L. (2012). Rapid determination of comparative drought tolerance traits: Using an osmometer to predict

- turgor loss point. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 880–888.
<https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00230.x>
- Bechtold, T., Mussak, R. (2009). *Handbook of Natural Colorants*. Jonh Wiley and Sons Ltd-United Kingdom. <https://doi.org/10.1002/9780470744970>
- Blanquet, R.S. y Phelan, M.A. (1987). An unusual blue campanal protein from the mangrove Jellyfish *Cassiopea xamachana*, *Marine Biology*, 94, 423-430.
<https://doi.org/10.1007/BF00428249>
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (2008). *Carotenoids–Natural functions*, Vol. 4. Consultado en:
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Carotenoids?Natural+functions,+Vol.+4#2>
- Brusca, R. C., Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates*. Consultado en:
<http://books.google.com.ar/books/about/Invertebrates.html?hl=es&id=ISggPQAACA-AJ&pgis=1>
- Bulina, M. E., Lukyanov, K. A, Yampolsky, I. V, Chudakov, D. M., Staroverov, D. B., Shcheglov, A. S., Gurskaya, N.G., Lukyanov, S., Lukyanov, S. (2004). New class of blue animal pigments based on frizzled and krigle protein domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43367–43370.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C400337200>
- Burgess, R. R., Thompson, N. E. (2002). Advances in gentle immunoaffinity chromatography. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 304–308.
[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00340-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00340-3)
- Cai, Z., Wu, J., Chen, L., Guo, W., Li, J., Wang, J., Zhang, Q. (2011). Purification and characterisation of aquamarine blue pigment from the shells of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino). *Food Chemistry*, 128(1), 129–133.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.006>
- Calder, R. D. (1982). Life history of the cannonball jellyfish *Stomolophus meleagris* L. agassiz, 1860 (Scyphozoa, Rhizostomida). *Biological Bulletin*, 162(January).
<https://doi.org/10.2307/1540810>
- Cannon-Carlson, S., Tang, J. (1997). Modification of the Laemmli sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and nonreducing gels. *Analytical Biochemistry*, 246, 146–148.
<https://doi.org/10.1006/abio.1997.2002>
- Carvalho-Saucedo, L., López-martínez, J., García-Domínguez, F. (2011). Biología reproductiva de la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris* en la laguna Las Guásimas, Sonora , México. *Hidrobiológica*, 21(1), 77–88.

- Carvalho-Saucedo, L., López-Martínez, J. and García-Domínguez, F. (2012). Fecundidad de la medusa *Stolomophus meleagris* (Rhizostomeae: Stomolophidae) en el Golfo de California. *Revista de Biología Tropical*, 60, 1721-1729. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i4.2176>
- Castañeda, A. (2008). Estudio de efectos que afectan la estabilidad de antocianinas y piranoantocianinas en solución acuosa. *Memorias in extensio XXII Congreso nacional de Química Analítica*. (1), 177–182. https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_FisicAlim/Araceli_Ovan/8.pdf
- Cegolon, L., Heymann, W. C., Lange, J. H., Mastrangelo, G. (2013). Jellyfish stings and their management: a review. *Marine Drugs*, 11(2), 523–50. <https://doi.org/10.3390/md11020523>
- Chapman, D. M. (1999). Microanatomy of the bell rim of *Aurelia aurita* (Cnidaria : Scyphozoa) , *Can J Zool* 7, 46, 34–46.
- Conway, G. C., Smole, S. C., Sarracino, D. A., Arbeit, R. D., Leopold, P. E. (2001). Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(1), 103–112. Consultado en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11200222
- Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2):380-407 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>
- Cuadras, C.M. (2014). *Nuevos Métodos de Análisis Multivariante*. CMC Editions, Barcelona, España.
- Cunniff, P. A. (1998). Official Methods of Analysis of AOAC International. *Association of Official Analysis Chemists International*, 9 (3), 471 <https://doi.org/10.3109/15563657608988149>
- Hernandez- Samano, A. (2010). *Identificación y caracterización de proteasas del pepino de mar*. Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis de maestría, biotecnología. <http://www.remeri.org.mx/portal/REMERI.jsp?id=oai:tesiuami.izt.uam.mx:UAMI14698>
- Demirev, P. A., Lin, J. S., Pineda, F. J., Fenselau, C. (2001). Bioinformatics and mass spectrometry for microorganism identification: proteome-wide post-translational modifications and database search algorithms for characterization of intact *H. pylori*. *Analytical Chemistry*, 73(19), 4566–4573. <https://doi.org/10.1021/ac010466f>
- Doerner, K.C., White, B.A. (1990) Detection of glycoproteins separated by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis using the periodic acid-Schiff stain, *Analytical*

Biochemistry, 187 (15), 147–50. PubMed PMID: 2196831

- Fan, J., Zhuang, Y., Li, B. (2013). Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish umbrella on histological and immunity changes of mice photoaging. *Nutrients*, 5(1), 223–33. <https://doi.org/10.3390/nu5010223>
- Fennema, O. R. (2000). *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia Zaragoza, España. Capítulo 9.
- Fenselau, C., Demirev, P. A. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 40 (4), 157-171. <https://doi.org/10.1002/mas.10004>
- Francis, F. J. (1997). *Colorants*. 1a. Edición. Eagan Press. St, Paul Minnesota, EEUU. 9-24.
- Frazão, B. Antunes, A. (2016). Jellyfish bioactive compounds: Methods for wet-lab work. *Marine Drugs*, 14(4), 75. <https://doi.org/10.3390/md14040075>
- Fuentes, V., Straehler-Pohl, I., Atienza, D., Franco, I., Tilves, U., Gentile, M Gili, Acevedo M., Olariaga A.(2011). Life cycle of the jellyfish *Rhizostoma pulmo* (Scyphozoa: Rhizostomeae) and its distribution, seasonality and inter-annual variability along the Catalan coast and the Mar Menor (Spain, NW Mediterranean). *Marine Biology*, 158(10), 2247–2266. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1730-7>
- García-Barrientos, R., Nopaltitla-Delgadillo, M., Cira-Chávez, L., Guerrero-Legarreta, I. (2001). Análisis espectral y de color del pigmento de medusa comestible “bola de cañón ” (*Stomolophus meleagris*). XIV Congreso Nacional de Biotecnología Y Bioingeniería, p. 430. Querétaro, Mexico 19 al 20 junio 2011.
- Gardiner, M. (1977). *Biología de los invertebrados*. Editorial Omega. Barcelona. España 334-350.
- Gastineau, R. Turcotte, F., Pouvreau, J.-B., Moraçais, M., Fleurence, J., Windarto, E., Prasetya, F.S., Arsad, S.; Jaouen, P., Babin, M.; Coiffard, L., Couteau, C., Bardeau, J.-F., Jacquette, B. Leignel, V., Hardivillier, Y. Marcotte, I., Bourgougnon, N. Tremblay, R., Deschênes, J.-S., Badawy, H., Pasetto, P. Davidovich, N., Hansen, G. Dittmer, J., Mouget, J.-L. Marennine, L. (2014). Marennine, promising blue pigments from a widespread *Haslea* diatom species complex. *Marine Drugs*, 12, 3161–3189. <https://doi.org/10.3390/md12063161>
- Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T. (2003). Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28;55(12):1531-46. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>
- Geneser, F. (2003). *Histologi - på molekylærbiologisk grundlag*. Consultado en: http://www.saxo.com/dk/histologi-paa-molekylaerbiologisk-grundlag_finn-geneser_indbundet_9788762801370

- Gershwin, L., Richardson, A. J., Winkel, K. D., Fenner, P. J., Lippmann, J., Hore, R., Avila-Soria, G., Brewer, D., Kloser, R.J., Steven, A., Condie, S., Condie, S. (2013). Biology and ecology of Irukandji Jellyfish (Cnidaria: Cubozoa). *Advances in Marine Biology*, 66, 1–85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408096-6.00001-8>
- Gomez-Lizarraga, K., Piña-Barba, C., Rodríguez-Fuentes, N. (2011). Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino. *Superficies y Vacío*, 24(4), 137–140.
- Griffin, C. D. B., Scdnr, T. M. M. (1983). Cannonball jellyfish *Stomolophus meleagris*. Consultado en: <http://www.dnr.sc.gov/cwcs/pdf/Cannonballjellyfish.pdf>
- Guerrero Legarreta, I., López Hernández, E., Armenta López, R. 2006. Capítulo 7. Pigmentos. En: Badui Dergal, S. (ed.). *Química de los Alimentos*. Ed. Pearson Educación. Ciudad de México. pp. 401-444.
- Hargitt, C. W. (1904). Regeneration in *Rhizostoma pulmo*. *Journal of Experimental Zoology*, 1(1), 73–94. <https://doi.org/10.1002/jez.1400010103>
- Hendry, G., Houghton, J. (1996). *Natural Food Colorants*. Blackie Academic and Professional. Glasgow, Escocia.
- Hickman, A. C. P., Roberts, L. S., Larson, A. (2003). *Animal Diversity. Zoology*. Capítulo 7. - McGraw-Hill Education, Columbia, Grab Bretaña.
- Hinková, A., Bubník, Z., Pour, V., Henke, S., Kadlec, P. (2005). Application of cross-flow ultrafiltration on inorganic membranes in purification of food materials. *Czech Journal of Food Sciences*, 23, 103–110. ISSN : 1212-1800
- Hoyer, B., Bernhardt, A., Lode, A., Heinemann, S., Sewing, J., Klinger, M., Notbohm, H., Gelinsky, M.. Gelinsky, M. (2014). Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 883-92. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.022>
- Hsieh, Y. H. P., Leong, F. M., Rudloe, J. (2001). Jellyfish as food. *Hydrobiologia*, 451, Issue 1–3, pp 11–17 <https://doi.org/10.1023/A:1011875720415>
- Hsieh, Y.-H., Leong, F., Rudloe, J. (2001). Jellyfish as food. *Hydrobiologia*, 451(1/3), 11–17. <https://doi.org/10.1023/A:1011875720415>
- Institut de Cienciés del Mar, Barcelona. (2013). Guía de identificación de medusas y otros organismos gelatinosos de la Costa Mediterránea Española. Proyecto RECLAIMED (Repercusiones Clínicas y Medioambientales de las Medusas en el Mediterráneo). (http://jellyrisk.eu/media/cms_page_media/115/Spain_GuiaMedusas_2013_espanol.pdf)

- Jacobsen, B., Gårdsvoll, H., Juhl Funch, G., Ostergaard, S., Barkholt, V., Ploug, M. (2007). One-step affinity purification of recombinant urokinase-type plasminogen activator receptor using a synthetic peptide developed by combinatorial chemistry. *Protein Expression and Purification*, 52(2), 286–96. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.08.011>
- Johansen, S. D., Emblem, Å., Karlsen, B. O., Okkenhaug, S., Hansen, H., Coucheron, D.D., Moum, T., Seternes, O. M. (2010). Approaching marine bioprospecting in hexacorals by RNA deep sequencing. *New Biotechnology*, 27(3):267-75. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.02.019>
- Khong, N. M. H., Yusoff, F. M., Jamilah, B., Basri, M., Maznah, I., Chan, K. W., Nishikawa, J. (2016). Nutritional composition and total collagen content of three commercially important edible jellyfish. *Food Chemistry*, 196, 953–960. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.094>
- Klimová, Z., Lucová, M., Hojerová, J., Paz, S. (2013). Absorption of triphenylmethane dyes Brilliant Blue and Patent Blue through intact skin, shaven skin and lingual mucosa from daily life products, *Food Chemistry Toxicology*, 52, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.027>
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Laskar, J., Robutel, P. (2000). High order symplectic integrators for perturbed Hamiltonian systems. *Hydrobiologia*, 451, 11–17. <https://doi.org/10.1023/A:1011875720415>
- Leone, A., Lecci, R. M., Durante, M., Meli, F., Piraino, S. (2015). The bright side of gelatinous blooms: Nutraceutical value and antioxidant properties of three Mediterranean jellyfish (Scyphozoa). *Marine Drugs*, 13(8), 4654–4681. <https://doi.org/10.3390/md13084654>
- Lu, Q., Ganesan, K., Simionescu, D. T., Vyavahare, N. R. (2004). Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 25(22), 5227–5237. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.019>
- Lucas, C. H., Graham, W. M., Widmer, C. (2012). Jellyfish Life Histories: Role of Polyps in Forming and Maintaining Scyphomedusa Populations. *Advances in Marine Biology*, ;63:133-96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394282-1.00003-X>
- Maoka, T., Kuwahara, T., Narita, M. (2014). Carotenoids of sea angels *Clione limacina* and *Paedoclione doliiformis* from the perspective of the food chain. *Marine Drugs*, 12(3), 1460–70. <https://doi.org/10.3390/md12031460>
- Marques, R., Bouvier, C., Darnaude, A. M., Molinero, J. C., Przybyla, C., Soriano, S., Tomasini, J. Bonnet, D. (2016). Jellyfish as an alternative source of food for opportunistic fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 485, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.08.008>

- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., Heredia, (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57, 109–117. Consultado en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-37249010544&partnerID=40&md5=3fb49b0ec271b70a2c7da78cd5a22d97>
- Masuda, A., Baba, T., Dohmae, N., Yamamura, M., Wada, H., Ushida, K. (2007). Mucin quini mucin a glycoprotein from jellyfish and determination of its main chain structure, *Journal of Natural Products*, 70, 1089-1092. 10.1021/np060341b
- Miyake, H., Iwao, K., Kakinuma, Y. (1997). Life, history and environment of *Aurelia aurita*. *South Pacific Study*, 17(2), 273–285. [http://cpi.kagoshima-u.ac.jp/publications/southpacificstudies/sps/sps17-2/SouthPacificStudies17\(2\)pp273-285.pdf](http://cpi.kagoshima-u.ac.jp/publications/southpacificstudies/sps/sps17-2/SouthPacificStudies17(2)pp273-285.pdf)
- Moran, Y., Praher, D., Schlesinger, A., Ayalon, A., Tal, Y., Technau, U. (2013). Analysis of soluble protein contents from the nematocysts of a model sea anemone sheds light on venom evolution. *Marine Biotechnology*, 15(3), 329–39. <https://doi.org/10.1007/s10126-012-9491-y>
- Mortensen, A. (2006). Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry*, 78(8), 1477–1491. <https://doi.org/10.1351/pac200678081477>
- Morton, B. (2015). More jellyfish everybody? *Marine Pollution Bulletin*, 90(1-2), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.024>
- Nagai, T., Suzuki, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins. *Food Chemistry* 68(3) 277-281. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00188-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00188-0)
- Nagai, T., Ogawa, T., Nakamura, T., Ito, T., Nakagawa, H., Fujiki, K., Nakao, M., Yano, T. (1999). Collagen of edible jellyfish exumbrella. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(6), 855–858. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(19990501\)79:6<855::aid-jsfa299>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(19990501)79:6<855::aid-jsfa299>3.0.co;2-n)
- Nawroth, J. C., Lee, H., Feinberg, A. W., Ripplinger, C. M., McCain, M. L., Grosberg, A., Dabiri, J., Parker, K. K. (2012). A tissue-engineered jellyfish with biomimetic propulsion. *Nature Biotechnology*, 30(8), 792–797. <https://doi.org/10.1038/nbt.2269>
- Nopatitla, M. (2012). Extracción del pigmento azul de la medusa comestible “Bola de cañón” *Stolomophus meleagris* y su actividad antioxidante. Universidad Autónoma Metropolitana. Reporte de Especialización en Biotecnología, Departamento de Biotecnología.

- O'Fágáin, C., Cummins, P. M., O'Connor, B. F. (2011). Gel-filtration chromatography. *Methods in Molecular Biology*, 681, 25–33. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_2
- Omori, M., Nakano, E. (2001). Jellyfish fisheries in southeast Asia. *Hydrobiologia*, 451, 19–26. <https://doi.org/10.1023/A:101187982>
- Onega Pagador, M. (2003). Evaluación de la Calidad de Carnes Frescas: Aplicación de Técnicas Analíticas, Instrumentales y Sensoriales. Memoria para otorgar el grado de Doctor. de Universidad Complutense, Madrid.
- Onodera, K.-I., Konishi, Y., Taguchi, T., Kiyoto, S., Tominaga, A. (2014). Peridinin from the marine symbiotic dinoflagellate, *Symbiodinium* sp., regulates eosinophilia in mice. *Marine Drugs*, 12(4), 1773–87. <https://doi.org/10.3390/md12041773>
- Pauly, D., Graham, W., Libralato, S., Morissette, L., Deng Palomares, M. L. (2008). Jellyfish in ecosystems, online databases, and ecosystem models. *Hydrobiologia*, 616(1), 67–85. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9583-x>
- Phelan, M. A., Matta, J. L., Reyes, Y. M., Fernando, R., Boykins, R. A., Blanquet, R. S. (2005). Associations between metals and the blue campanal protein of *Cassiopea xamachana*. *Marine Biology*, 149(2), 307–312. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0189-9>
- Ponce, D., López-Vera, E., Aguilar, M. B., Sánchez-Rodríguez, J. (2013). Preliminary results of the *in vivo* and *in vitro* characterization of a tentacle venom fraction from the jellyfish *Aurelia aurita*. *Toxins*, 5(12), 2420–2433. <https://doi.org/10.3390/toxins5122420>
- Rafael, B., Vielma, M., Mora, A., Musa, P. (2006). Aplicación del Diseño Compuesto Central Rotable en el establecimiento *in vitro* de ápices de plátano *Musa* sp. variedad Harton (AAB) Agroalimentación y Desarrollo Sustentable. 1-7. https://www.researchgate.net/publication/275833767_Aplicacion_del_Disenio_Compuesto_Central_Rotable_en_el_Establecimiento_In_Vitro_de_Apices_de_Platano_Musa_sp_variedad_Harton_AAB
- Ramírez, C., Casas, F., Sarmiento, A., Delgado, Á. (2015). En busca de los colores ocultos del arrecife. *Apuntes Científicos Uniandinos*, 14, 59–70.
- Ramšak, A., Stopar, K., Malej, A. (2012). Comparative phylogeography of meroplanktonic species, *Aurelia* spp. and *Rhizostoma pulmo* (Cnidaria: Scyphozoa) in European Seas. *Hydrobiologia*, 690(1), 69–80. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1053-9>
- Reddy, G. K., Enwemeka, C. S. (1996). A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clinical Biochemistry*, 29(3), 225–229. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0009-9120\(96\)00003-6](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0009-9120(96)00003-6)

- Redi, C. (2010). Histology protocols. *European Journal of Histochemistry*, 54(2), 211–225. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-345-9>
- Ren G.Y., Li, B.F., Zhao, X., Zhuang, Y., Yan, M., Hou, H., Zhang, X., Chen, L. (2009). Screening of extraction methods for glycoproteins from Jellyfish (*Rhopilema esculentum*) oral-arms by High Performance Liquid Chromatography, *Journal of Ocean University of China*, 8, 83-88. <https://doi.org/10.1007/s11802-009-0083-z>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N.C.M., Calado, R. (2011), Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds. An overview of the last decade and future steps for bioprospecting, *Marine Drugs*, 9, 1860-1886. <https://doi.org/10.3390/md9101860>
- Ross, M. H., Pawlina, W. (2011). *Histology - A Text and Atlas*. 6a. Edición. Lippincott Williams y Wilkins - Wolters Kluwer. Gran Bretaña. 515-519
- Schiariti, A., Vittone, M., Fernández Herrero, A., Manca, E., Giberto, D., Gaitan, E., (2011). Composición proximal de la medusa *Lychnorhiza lucerna* (Cnidaria: Scyphomedusae). *Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero*, 16, 7-15 <https://doi.org/10.13140/rg.2.2.12591.23201>
- Selvameenal, L., Radhakrishnan, M., Balagurunathan, R. (2009). Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71, 499–504. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.58174>
- Seng, P., Rolain, J.-M., Fournier, P. E., La Scola, B., Drancourt, M., Raoult, D. (2010). MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiology*, 5(11), 1733–1754. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.127>
- Shaposhnikova, T., Matveev, I., Napara, T., Podgornaya, O. (2005). Mesoglea cells of the jellyfish *Aurelia aurita* are involved in the formation of campanal fibres. *Cell Biology International* 29, 952–958. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.08.008>
- Soliev, A. B., Hosokawa, K., Enomoto, K. (2011). Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 670349. <https://doi.org/10.1155/2011/670349>
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A. (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(7), 952–965. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2057-0>

- Toom, P. M., Chan, D. S. (1972). Preliminary studies of nematocysts from the jellyfish *Stomolophus meleagris*. *Toxicon*, 10(6). 605-606 [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(72\)90122-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(72)90122-5)
- Tseng, Y. Y., Chen, M. T., Lin, C. F. (2000). Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 31–37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00821.x>
- Vargha, M., Takáts, Z., Konopka, A., Nakatsu, C. H. (2006). Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.01.006>
- Vílchez, C., Forján, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I., Vega, J. M. (2011). Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Marine Drugs*, 9(3), 319–33. <https://doi.org/10.3390/md9030319>
- Voet, D., Voet, J. G. (2010). *Biochemistry. Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki*. Consultado en: <http://www.alibris.com/search/books/isbn/9780470570951>
- Wang, L., Yan, J., Fu, P., Parekh, K. A., Yu, H. (2003). Photomutagenicity of cosmetic ingredient chemicals azulene and guaiazulene. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 530(1-2), 19-26. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(03\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(03)00131-3)
- Waterborg, J. H., Matthews, H. R. (1984). The Lowry method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology*, 1, 1–3. <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:7>
- Young, B., Woodford, P., Gerladine, O. (2013). *Functional histology. Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*. Elsevier Churchill Livingstone. 159-180 EEUU. <https://doi.org/0702047473>
- Yu, H., Li, C., Li, R., Xing, R., Liu, S., Li, P. (2007). Factors influencing hemolytic activity of venom from the jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1173–1178. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.12.025>
- Yunoki, S., Suzuki, T., Takai, M. (2003). Stabilization of low denaturation temperature collagen from fish by physical cross-linking methods. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96(6)575-577. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70152-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70152-8)
- Zhang, J., Duan, R., Huang, L., Song, Y., Regenstein, J. M. (2014). Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii* Kishinouye). *Food Chemistry*, 150, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.116>
- Zhuang, Y., Sun, L., Zhao, X., Hou, H., Li, B-F. (2010). Investigation of gelatin polypeptides of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) for their antioxidant activity in vitro. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 222–228. <https://hrcak.srce.hr/53632>

ANEXOS

ANEXO 1.

FORMULACIÓN DE AGUA DE MAR SINTÉTICA

Norma Oficial Mexicana (www.conagua.gob.mx)

Sal	(g/L)
NaCl	22.0
MCl ₂ .6H ₂ O	9.7
Na ₂ SO ₄ anhidro	3.7
CaCl ₂ anhidro	1.0
KCL	0.65
H ₃ BO ₃	0.023

Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$; 20.0 °C) $47\ 000 \pm 1\ 000$

Salinidad (20.0 °C) 31.0 ± 1.0

ANEXO 2.

CONDICIONES DE ANÁLISIS ELEMENTAL DE METALES

Elemento	Lámpara	Gas	Soporte	Longitud de onda	Rango de trabajo de ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Estequiometría de llama
Ag	4 mA	acetileno	Aire	333.3	0.06-20	oxidante
Al	10 mA	acetileno	óxido nitroso	396.1	0.5-250	reductor
Cr	7 mA	acetileno	Aire	428.9	1-100	reductor
Cu	4 mA	acetileno	Aire	217.9	0.2-60	oxidante
Fe	5 ma	acetileno	Aire	372	1-100	oxidante
Mn	5 ma	acetileno	óxido nitroso	403.1	0.5-60	oxidante
Pb	5 mA	acetileno	Aire	261.4	5-800	oxidante
Sn	7 ma	acetileno	óxido nitroso	286.3	10-300	reductor
Zn	5 mA	acetileno	Aire	307.6	100 -14000	oxidante

ANEXO 3.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ETANOL EN LA SOLUBILIDAD DEL PIGMENTO

3.1. Absorbancia de extractos tratados con etanol: Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P>
Intergrupos	.221	5	.044	960.589	.0001
Intragrupos	.001	13	.000		
Total	.222	18			

3.2. Absorbancia de extractos tratados con etanol: Comparación múltiple de medias de Tukey

Concentración de Etanol (%)	N	Subconjunto $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
100	3	0.065				
80	3		0.093			
60	3		0.097			
40	3			0.113		
20	3				0.196	
10	4					0.359

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño de muestra de la media armónica = 3.130.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de los grupos.

ANEXO 4.

EFECTO DE LA OSMOLARIDAD EN LA SOLUBILIDAD DEL PIGMENTO

4.1. Absorbancia de extractos variando la osmolaridad del medio: Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P>
Inter-grupos	.185	5	.037	73.960	.0001
Intra-grupos	.005	10	.001		
Total	.190	15			

4.2. Absorbancia de extractos variando la osmolaridad del medio: Comparación múltiple de medias de Tukey

Concentración de Etanol (%)	N	Subconjunto $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
0.002	2	0.127				
0.010	2		0.250			
0.020	3			0.332		
0.100	3			0.376	0.376	
1.000	3				0.439	0.439
0.200	3					0.463

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño de muestra de la media armónica = 3.130.
- b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de los grupos.

ANEXO 5.

5.1. Efecto de temperatura y pH sobre la absorbancia del pigmento. Datos experimentales

	pH	Temperatura	Absorbancia a 360nm
1	9	70	0.093
2	6.5	48	0.332
3	4	70	0.13
4	6.5	48	0.354
5	9	26	0.367
6	4	16	0.399
7	2.99	48	0.122
8	10	48	0.07
9	6.5	70	0.123
10	6.5	79	0.133
11	6.5	48	0.358
12	6.5	48	0.356

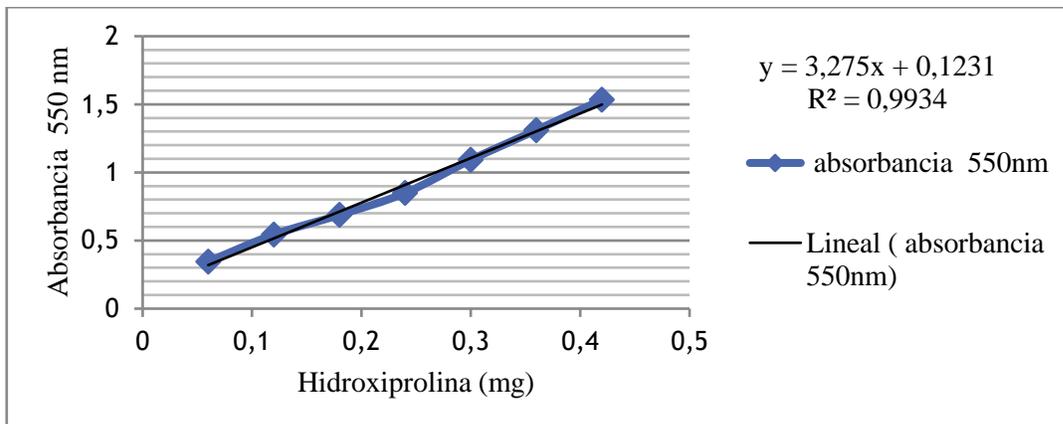
5.2. Efecto de temperatura y pH sobre la absorbancia del pigmento. Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	P>
A:pH	0.00253985	1	0.0025	1.20	0.3153
B:Temperatura	0.105612	1	0.1056	49.90	0.0004*
AA	0.078057	1	0.0780	36.88	0.0009*
AB	0.00000625	1	6.25x10 ⁻⁶	0.00	0.9584
BB	0.00414111	1	41.41x10 ⁻⁴	1.96	0.2114
Error total	0.0126996	6	21.16x10 ⁻⁴		
Total	0.198989	11			

$$R^2 = 93.61$$

$$R^2 \text{ (ajustada)} = 88.29$$

ANEXO 6.
CURVA ESTÁNDAR DE HIDROXIPROLINA



ANEXO 7.

7.1. Temperaturas de desnaturalización del colágeno

Número de niveles: 5

Temperatura	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo
4	8	0.95755	0.0187978	1.96%	0.9185	0.9784
23	4	0.86145	0.00433013	0.50%	0.858	0.8676
42	4	0.8678	0.0258291	2.98%	0.8312	0.8918
61	4	0.7841	0.0159338	2.03%	0.7633	0.8015
80	8	0.7197	0.0269052	3.74%	0.6884	0.7569
Total	28	0.838264	0.096997	11.57%	0.6884	0.9784

7.2. Análisis de Varianza

Fuente	gl	Cuadrado Medio	F	P>
Temperatura	4	0.0609	135.24	0.0001
Error	23	4.504×10^{-4}		
Total	27			

ARTÍCULO CIENTÍFICO

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РЕДАКЦИЯ ЖУРНАЛА

БИОЛОГИЯ МОРЯ

690041 Владивосток-41

Институт биологии моря им. А.В.
Жирмунского ДВО РАН

ул. Пальчевского, 17

тел.: (423) 231-09-05 (гл. редактор)

(423) 231-11-72 (редакция)

факс: (423) 231-09-00

эл. почта: biolm@imb.dvo.ru

Letter of publication

This letter confirms that the paper «**Purification and preliminary characterization of a blue pigment extracted from “cannon ball” jellyfish (*Stomolophus meleagris*)**» has been accepted for publication in the **Russian Journal of Marine Biology** May 31, 2018, and will presumably be published in Vol. 47, no. 1, 2019.

Authors: *O. Lugo Magaña^a, X. Guzmán García^b, R. García Barrientos^c, I. Guerrero Legarreta^{a,*}*

^a Department of Biotechnology, Metropolitan Autonomous University-Iztapalapa Campus, Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, Apartado Postal 55-535, C.P. 09340, Mexico City; galugo@hotmail.com, isabel_guerrero_legarreta@yahoo.com.

^b Department of Hydrobiology, Metropolitan Autonomous University-Iztapalapa Campus, Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, Apartado Postal 55-535, C.P. 09340, Mexico City; xochitlguga@gmail.com.

^c Polytechnic University of Tlaxcala, Avenida Universidad Politécnica No.1, San Pedro Xalcaltzinco, C.P. 90180, *San Pedro Xalcaltzinco, Tepeyanco, Tlaxcala, Mexico*; raquelgaba@hotmail.com.

*(Corresponding author)

Aïssi Mehdi

Received July 10, 2017

Accepted May 31, 2018
Executive Editor in Chief

Andrei V. Adrianov

Russian Journal of Marine Biology,

Dated: July 26, 2018



Preliminary characterization of a blue pigment extracted from “cannon ball” jellyfish *Stomolophus meleagris*

O. Lugo Magaña^a, X. Guzmán García^b, R. García Barrientos^c, I. Guerrero Legarreta^{a,*}

^a Department of Biotechnology, Metropolitan Autonomous University-Iztapalapa Campus, Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, Apartado Postal 55-535, C.P. 09340, Mexico City; galugo@hotmail.com, isabel_guerrero_legarreta@yahoo.com.

^b Department of Hydrobiology, Metropolitan Autonomous University-Iztapalapa Campus, Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, Apartado Postal 55-535, C.P. 09340, Mexico City; xochitluga@gmail.com.

^c Polytechnic University of Tlaxcala, Avenida Universidad Politécnica No.1, San Pedro Xalcaltzinco, C.P. 90180, San Pedro Xalcaltzinco, Tepeyanco, Tlaxcala, Mexico; raquelgaba@hotmail.com.

*Corresponding autor: Isabel Guerrero Legarreta. Department of Biotechnology, Metropolitan Autonomous University.Iztapalapa Campus, Mexico City, Mexico. Tel.: +52 55 580447; e-mail: isabel_guerrero_legarreta@yahoo.com.

ABSTRACT

Due to consumers' demand for natural pigments new sources have been explored, the marine environment among others. This paper studied the optimal extraction conditions and preliminary characterize a blue pigment obtained from *Stomolophus meleagris* jellyfish. Specimens were collected from State of Sonora seashore, at the Gulf of California, Mexico. The umbrella color was not homogeneous where a more intense blue color was observed at the edge. The pigment was obtained after tissue sonication at 35 kHz and extraction with artificial seawater, and purified by ultrafiltration through 30 and 100-kDa MCD membranes. The pigment is not a carotenoid, as concluded by its insolubility in non-polar solvents. A 100 kDa protein was associated to the chromophore, conversely with other jellyfish species where the protein moiety is around 30 kDa. This higher protein molecular weight was possible due to a multimeric glycoprotein. By using PAS staining it was concluded that this pigment is a glycoprotein, showing similar characteristics to the blue pigment extracted from *Casiopea xamachana* and *Rizostoma pulmo*. The associated protein was separated from the pigment-protein complex using two commercial proteases. Pigment stability was followed during storage for 35 days at 4 and -20°C. The obtained partially purified pigment was efficiently extracted with 10% ethanol, stable at pH 3 to 9, but not stable to heating.

Key words: blue pigment, jellyfish, *Stomolophus meleagris*, artificial seawater, solvent extraction, pigment-protein complex, pigment stability.

INTRODUCTION

Pigments in nature play a fundamental role in several aspects of plants, animal and microbial metabolism and biodiversity, such as stability of other chemical compounds associated to the chromophore [23]. Most natural pigments are sensitive to pH, heating, and radiation including solar light. Among the sources of natural pigments, marine organisms include a wide range of colors. In particular, those living in tropical seas show bright colors varying according to their metabolism and habitat [1]. Phylum Cnidaria, including jellyfishes, anemones, corals and hydrozoas possess intense colors [4, 31].

Stomolophus meleagris jellyfish (Scyphozoa: Rhizostomeae), known as “cannon ball” for its round shape and short tentacles, shows an attractive blue color [25]. This cnidarian colonize estuarine waters, mainly at 23°C and 34 ppm salinity, consuming zooplankton such as bivalves and mollusk larvae. It is a valuable raw material for medical uses in Southeast Asia, as well as a food delicacy [12, 17, 18]. However, its rapid and abundant growth in subtropical seawaters, such as the Mexican coastal line, causes displacement of commercial fish populations resulting in considerable profit reduction for the fishing industry [21]. The objective of this work was to study biochemical characteristics of the blue pigment of *Stomolophus meleagris*, collected in the Gulf of California, Mexico, for its possible further utilization.

MATERIALS AND METHODS

Specimens of *Stomolophus meleagris* were collected at Bahía de Lobos, State of Sonora, Mexico (27°21' North, 110°27' West). The hemispherical bells were 150 to 180 mm width, 80.2 g average live weight; no age or pre-catching conditions were recorded. According to the size, all specimens were adults. Samples were stored in artificial seawater [5] at 4°C and transported to our laboratory.

Tissue samples for colorimetry analysis were taken from the pigmented upper, middle and edge regions. Color was measured using a portable Hunter Lab colorimeter (MiniScan EZ 4500L, Reston, Virginia, USA) fitted with an Easy Match QC software (Hunter Lab, Reston, Virginia, USA). All samples were analyzed in triplicate.

The pigment was extracted from the colored sections of the umbrella [7]. Ten gram-sample were homogenized with artificial seawater [5] and vacuum filtered through Whatman 4 paper [30]; the liquid pigment extract was kept at 4°C until further use. The remaining solid tissue was sonicated at 37 kHz for 30 min at room temperature (18°C), and extracted with artificial seawater for 2 h at 4 °C, the liquid extracts washed twice with chloroform, and the aqueous fraction decanted to obtain a crude extract. Pigment extraction with ethanol was carried out from the homogenized tissue (0.02-g sample mixed with 10, 20, 40, 60, 80 and 100% ethanol). The extraction yield was calculated by absorbance at 360 nm [20].

Pigment-protein preliminary characterization. Preliminary characterization was carried out according to previously reported techniques [4, 5, 12, 26]. Due that proteins denatured in the presence of phenol, the pigmented extract was mixed 5 mL 5%-phenol; sample discoloration indicated the presence of a protein moiety. Presence of carotenoids was analysed by mixing the extract with chloroform and acetone [7, 20].

Pigment partial purification. Ten-milliliter crude extract was homogenized and filtered through 30 and 100-kDa MCD Amicon membranes (Amicon Ultra-4, PLQK Ultracel-PL, Darmstadt, Germany), and centrifuged at 10,000 rpm, 4°C in a Beckman J2-MI centrifuge (Fullerton, California, USA). The colored extract was dialyzed through a 200- μ m membrane against distilled water. The supernatant contained the partially purified extract; absorbance was scanned from 200 to 840 nm; protein concentration in the extract was analyzed [19]. Samples were lyophilized and stored at 4°C until use.

Pigment-protein complex hydrolysis. The pigment-protein complex was split by hydrolysis using two commercial proteases: 5 U/mg bovine pancreas protease P4630 (Sigma, Steinheim, Germany) and 30 U/mg Proteinase K (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA). Five milliliter partially purified extract was mixed with 1 mg/mL of each enzyme. Samples were incubated for 30 min at optimal pH previously determined for each enzyme (pH 7.5 for bovine pancreas protease, and pH 8.0 for Proteinase K). The reaction was stopped by heating at 70°C for 10 min. Sample absorption was read at 360 nm.

Molecular weight determination of the pigment-bound protein. It was analyzed by SDS-PAGE [19] using a Mini-Protean II slab cell (Bio-Rad, Richmond, California), in 10% polyacrylamide separation gels (0.375 M Tris, pH 8.8) and 5% stacking gels (0.15 M Tris, pH 6.8). The molecular weight markers were: 200 kDa myosin; 116 kDa β -galactosidase; 97 kDa phosphorylase b; 66 kDa bovine serum albumin; 45 kDa egg albumin; 31 kDa carbonic anhydrase; 21 kDa trypsin inhibitor; 14 kDa lysozyme; 6 kDa, aprotinin (Sigma C 161-0317).

Glycoproteins were analyzed using a modification of a previously reported technique [2]. One-milliliter pigment extract was placed in Erlenmeyer flasks and mixed with phenol. Fifty milliliter 80% H₂SO₄ were slowly added on the liquid surface, and allowed to cool down to room temperature (18°C). Absorbance was read at 490 nm, carbohydrate concentration was obtained by interpolation in a glucose standard curve. Once carbohydrate presence was confirmed, the glycoprotein molecular weight was analyzed by SDS-PAGE using PAS (Periodic Acid-Schiff's reagent) staining (3% periodic acid), specific for carbohydrate-bound proteins [11]. Analysis was carried out at 200 V constant voltage, 4°C. The gels were stained with 0.1% Coomassie R-250+40% methanol+10% acetic acid for 30 min, and destained in 40% methanol+10% acetic acid. All gels were fixed in 12% trichloroacetic acid for 30 min and acid excess washed out with deionized water. The gels were scanned in a Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, Mexico City) fitted with a Quantity Onesoftware, version 4 (Bio-Rad, Mexico City) to obtain the protein band densitogram.

Pigment-protein stability during storage. pH and temperature effect. Crude extracts and partially purified extracts were stored at 4 and -20°C, and absorbance read at 360 nm at day 0, 2, 5, 10, 20 and 35. Five milliliters of partially purified extract was taken to pH 4 to 9 using 1 M NaOH or 1 M HCl. Samples were stored for 15 min at 26 to 76°C, and read at 360 nm.

Experimental designs and statistical analysis. Color coordinates L*a*b* read at center, upper and edge regions of the umbrella were subjected to analysis of variance and Tukey's multiple range test ($\alpha=0.05$) [29]. Absorbance during refrigerated and frozen storage was also subjected to analysis of variance and Tukey's multiple range tests ($\alpha=0.05$). The effect of pH and temperature was studied using a Central Composite Rotatable Design (CCRD) [10] of two variables and five levels (pH 4 to 9; 26 to 79°C, giving 12 factorial experiments, four axial points and quadruplicate axial points). The regression equation was:

$$x_i = (X_i - X_o) / \partial X_i$$

where:

x_i independent variable

X_i natural value of i^{th} variable

X_o natural value of i^{th} independent variable at the central point

∂X_i step change value

The experimental results were adjusted to the second order polynomial function:

$$Y = b_0 + b_1 x_1 - b_2 x_2 + b_1^1 x_{12} + b_2^2 x_2^2 + b_1^2 x_1 x_2$$

All statistical analyses were carried out using a Statgraphics Centurion program (Scientec, Mexico City).

RESULTS AND DISCUSSION

Color coordinates. Color coordinates of the upper, central and edge regions of *Stomolophus meleagris* umbrella are shown in Table 1. The edge region had the highest blueness ($b = -31$), greenish ($a = -15$) and lightness ($L^* = 58$) values, giving a more intense blue perception. Conversely, significant differences were observed for L*a*b* coordinates for the umbrella middle and upper parts ($P > 0.0041$, $P > 0.0021$, $P > 0.0047$, respectively), where the dominant color perception was blue-green.

Pigment extraction. Fig. 1 shows the absorption spectra of partially purified pigment extracts after ultrafiltration through a 100-kDa membrane, and dialyzed through a 200- μ m membrane against distilled water. Maximum peaks were at 369 and 649 nm, giving a blue perception. Absorption spectra reported for other blue jellyfish pigments showed similar peak wavelength as compared to *Stomolophus meleagris*. *Rhizostoma pulmo* pigment peaks were at 588, 624 and 420 nm, shifting to 395 nm after heating [7]. Pigment extraction with cold acetone renders an insoluble fraction in the organic phase, leading to the conclusion that the chromophore was not a carotenoid. In our study, pigment extraction with 10% ethanol was significantly more efficient than other ethanol concentrations ($P > 0.012$) (Fig. 2), confirming the pigment's intermediate polarity. However, ethanol

extraction reduced the blue color intensity due to cis-trans isomerization [4]. Similar effect was observed in other low-polar pigments extracted with solvents, such as acetone and methanol [15].

Pigment extraction and preliminary characterization. Blue is a rarity among plants and animals; when it does occur in nature, it is a result of light diffraction or scattering. In the marine environment, photosynthetic pigments of zooplankton or cyanobacteria colonizing the animal cells can produce blue colors [4]. Even though, blue tonalities are uncommon probably because they are a result of light absorption at long wavelength (>600 nm) [7]. Conversely as yellow and red colors, blue requires a considerable absorption of energy liberated by the abundant red or yellow-producing compounds [14]. In general, energy-absorbing compounds must include a polar conjugated π electron system [7].

Other authors previously reported pigment extraction methods from jellyfish, but did not report the probable chemical structure of these coloring compounds [13, 24]. In our work, initial cell disruption was achieved by tissue sonication [8]. Although high extraction yields were obtained from *Rhizostoma pulmo* using chloroform and further ammonium sulfate fractionation [7], in our study samples treated with chloroform gelified due to the high collagen content. The presence of a protein moiety bound to the chromophore was demonstrated by the complete bleaching of samples extracted with phenol [7]. This agrees with other authors reporting similar effect when studying extracts obtained from *Cassiopea xamachana* [6]. Conversely, the blue pigment in *Verella* was reported as containing a carotenoid moiety [32].

Molecular weight of the protein moiety. Carbohydrate and protein contents of the crude extract were 10% and 540 $\mu\text{g/mL}$, respectively, in agreement to data previously reported for *Rhopilela esculentum* [27] where the most abundant sugars are rhamnose, fucose, arabinose, mannose and N-acetyl galactosamine [22]. The retentate contained a >100 kDa protein fraction, probably a multimeric protein configuration or a complex. The filtrate contained four proteins: 138, 112, 75 and 53 kDa (Fig. 3A), as shown by SDS-PAGE. The 53 kDa band was possibly the result of protein degradation. PAS staining, specific for carbohydrate-bound proteins, showed bands at 135, 111, 75 and 53 kDa (Fig. 3B).

The nature of blue jellyfish pigments is scarcely studied. The structure was reported as partly being a nitrogen-related group [9]. However, *Rhizostoma pulmo* blue pigment was reported as an extracellular 30-kDa chromoprotein, named rpulFKz1, consisting in two domains inserted into one another [7]. Conversely, the mesoglea two-unit pigment of *Cassiopea xamachana* is related to a polymeric cys-glycoprotein of 30 kDa-monomers, characterized by multiple charged species [6, 26]. However, in both cases pigments showed similar spectral and biochemical characteristics. Glycoproteins were previously reported in other jellyfish such as *Rhopilela esculemun* [33], including a 107 kDa glycoprotein in the oral tentacles [22].

Storage stability. Storage at 4°C significantly reduced absorbance after the first 2 days (1.885 to 1.214 at 0 and 2 days, respectively) ($P > 0.008$) whereas at -20°C absorbance had a non-significant reduction after 35

days ($P>0.384$) (1.885 to 1.891 at 0 and 35 days, respectively) (Fig. 5). Crude extracts stored at 4 and -20°C showed non-significant differences in absorbance throughout storage ($P>0.734$, $P>0.372$, respectively), although values were lower than for partially purified extracts.

Stability is related to protein attachment to the pigment moiety making the complex more stable by preventing electronic changes and reducing pigment degradation, as reported for carotenoid-protein complexes [3]. Conversely, the chromophore polar nature can promote instability [16]. Therefore, pigments tend to become unstable when dissociated from the protein moiety. The blue pigment instability was also reported at 4°C in *Casiopea xamachana* [7]. As the protein detached from the pigment-protein complex during ultrafiltration, due to tangential forces, the extracts were more labile at lower temperatures. Crude extracts stored at -20°C showed the highest stability due to protein attachment, although no absorbance reduction was observed throughout storage. Protease presence, previously reported as a factor for bioactivity loss in cnidarians [28] can also affect pigment stability by hydrolyzing the pigment-protein complex.

Effect of temperature and pH on pigment stability. The following equation was obtained from data subjected to a Central Rotatable Design, describing the effect of pH and temperature on pigment stability (Fig. 5):

$$\text{Absorbance} = -0.227 + 0.223(\text{pH}) - 2.95 \times 10^{-5}(\text{T}) - 1.76 \times 10^{-2}(\text{pH})^2 - 2.27 \times 10^{-5}(\text{pH} \times \text{T}) - 5.25 \times 10^{-5}(\text{T})^2; R^2=0.936$$

The equation explained 93.6% of temperature and pH effect on pigment absorbance. Pigment stability showed a linear decrease with increasing temperature ($P>0.121$), whereas pH had a quadratic effect ($P>0.067$), the maximum absorbance occurred at pH 5-8. When temperature increased and pH shifted to higher or lower values, color was irreversible lost. A non-significant effect was observed for pH ($P>0.753$) on color.

ACKNOWLEDGEMENTS

Olivia Lugo-Magaña thanks the National Council of Science and Technology, Mexico, for a graduate scholarship. This research was funded by Metropolitan Autonomous University, Mexico City.

REFERENCES

1. Aberoumand, A., A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry, *World J. Dairy Food Sci.*, 2011, vol. 6, pp. 71–78.
2. Albalasmeh, A.A., Berhe, A.A. and Ghezzehei, T.A., A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry, *Carb. Polym.*, 2013, vol. 97, pp. 253–261.
3. Armenta López, R. and Guerrero Legarreta, I., Stability studies on astaxanthin extracted from fermented shrimp by-products, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, vol. 57, pp. 6095-6100.
4. Bandaranayake, W.M., The nature and role of pigments of marine invertebrates, *Nat. Prod. Rep.*, 2006, vol. 23, pp. 223–55.
5. Berges, J.A., Franklin, D.J., Harrison, P.J., Evolution of an artificial seawater medium: improvement in enriched seawater, artificial water over the last two decades, *J. Phycol.*, 2001, vol. 37, 1138-1145.
6. Blanquet, R.S. and Phelan, M.A., An unusual blue mesogleal protein from the mangrove Jellyfish *Cassiopea xamachana*, *Marine Biol.*, 1987, vol. 94, pp. 423-430.
7. Bulina, M.E., Lukyanov, K.A., Yampolsky, I.V., *et al.*, New class of blue animal pigments based on frizzled and krigle protein domains, *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, pp. 43367–43370.
8. Cai, Z., Wu, J., Chen, L., *et al.*, Purification and characterisation of aquamarine blue pigment from the shells of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino), *Food Chem.*, 2011, vol. 128, pp. 129–133.
9. Carvalho-Saucedo, L., López-Martínez, J. and García-Domínguez, F., Fecundidad de la medusa *Stolomophus meleagris* (Rhizostomeae: Stomolophidae) en el Golfo de California (*Fecundity of Stolomophus meleagris, Rhizostomeae: Stomolophidae, jellyfish in the Gulf of California*), *Int. J. Trop. Biol.*, 2012, vol. 60, pp. 1721-1729.
10. Cuadras, C.M., *Nuevos Métodos de Análisis Multivariante (New Methods in Multivariate Analysis)*, Barcelona: CMC Editions 2014.
11. Doerner, K.C. and White, B.A., Detection of glycoproteins separated by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis using the periodic acid-Schiff stain, *Anal. Biochem.*, 1990, vol. 187, pp. 147–50.
12. García-Barrientos, R., Nopaltitla-Delgadillo, M., Cira-Chávez, L., *et al.*, Análisis espectral y de color del pigmento de medusa comestible “Bola de Cañón” *Stomolophus meleagris* (*Spectral and color analysis of the edible jellyfish “Canonball” Stomolophus meleagris*), Loera Corral, O., Ed, (*Proc XIV Nat. Cong. Biotechnol. Bioeng.*), Querétaro, Mexico, 2011.
13. García Barrientos, R., Nopaltitla, M., Cira Chávez, L., *et al.*, Pigmentos azul de medusa comestible “bola de cañón” *Stomolophus meleagris*, como una alternativa antioxidante en la industria de alimentos (*Blue pigments of the edible “cannon ball” jellyfish Stomolophus meleagris, as an antioxidant alternative for the food industry*), (*Proc. VIII Cong. Iberoamer. Ing. Alim.*), Lima, Peru, 2011.
14. Gastineau, R., Turcotte, F., Pouvreau, J.B., *et al.*, Marennine, promising blue pigments from a widespread *Haslea* diatom species complex, *Marine Drugs*, 2014, vol. 12, pp. 3161–3189.
15. Guerrero Legarreta, I., López, E. and Armenta, R., Pigmentos, in *Química de Alimentos (Food Chemistry)*, Mexico City: Pearson Educación, 2006, pp. 401-443.
16. Hendry, G.A.F. and Houghton, J.D., *Natural Food Colorants*, Glasgow, Scotland: Blackie Academic and Professional, 1996.
17. Hsieh Y.H.P. and Ming F., Rudloe J., Potential of utilizing jellyfish as food in Western Countries, *Trends Food Sci. Technol.*, 1994, vol. 5, pp. 225-229.
18. Huang Y.W. Cannonball jellyfish, *Stomolophus meleagris* as a food resource, *J. Food Sci.*, 1988, vol. 53, pp. 341–343.

19. Laemmli U.K. Cleavage of structure proteins during the assembly of head of bacteriophage T4, *Nature*, vol. 1970, pp. 680-685.
20. Leone, A., Leci, R.A., Durante, L.M., et al., 2013. Extract from the Zooxanthellate Jellyfish *Cotylorhiza tuberculata* modulates gap junction intercellular communication in human cell cultures, *Marine Drugs*, 2013, vol. 11, pp. 1728–1762.
21. Masuda, A., Baba, T., Dohmae, N., et al., Mucin (qni mucin), a glycoprotein from jellyfish, and determination of its main chain structure, *J. Nat. Prod.*, 2007, vol. 70, pp. 1089–1092.
22. Masuda, A., Baba, T., Dohmae, N., et al., Mucin qni mucin a glycoprotein from jellyfish and determination of its main chain structure, *J. Nat. Prod.*, 2007, vol. 70, pp. 1089-1092.
23. Mortensen, A., Carotenoids and other pigments as natural colorants, *Pure Appl. Chem.*, 2006, vol. 78, pp. 1477–1491.
24. Nopatitla, M. Extracción del Pigmento Azul de la Medusa Comestible “Bola de cañón” *Stolomophus meleagris* y su Actividad Antioxidante (*Extraction of the blue pigment of the edible jellyfish “cannon ball” Stolomophus meleagris and its antioxidant activity*) . Final Report in Food Engineering. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa Campus, Mexico City, 2012.
25. Omori, M. and Nakano, E. Jellyfish fisheries in southeast Asia, *Hydrobiol.*, 2001, vol. 451, pp.19–26.
26. Phelan, M.A., Matta, J.L., Reyes, Y.M. et al., Associations between metals and the blue mesogleal protein of *Cassiopea xamachana*, *Marine Biol.*, 2006, vol. 149, pp. 307–312.
27. Ren G.Y., Li, B.F., Zhao, X. et al., Screening of extraction methods for glycoproteins from Jellyfish (*Rhopilema esculentum*) oral-arms by High Performance Liquid Chromatography, *J. Ocean Univ. China*, 2009, vol. 8, pp. 83-88.
28. Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N.C.M., et al., Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds. An overview of the last decade and future steps for bioprospecting, *Marine Drugs*, 2011, vol. 9, pp. 1860-1886.
29. Steel, R.G. and Torrie, J.H. Bioestadística: Principios y Procedimientos (*Biostatistics: Principles and Procedures*), Bogota, Colombia: McGraw-Hill, 1988.
30. Tseng, Y.Y., Chen, M.T. and Lin, C.F, Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars, *J. Appl. Microbiol.*, 2000, vol. 88, pp. 31–37.
31. Yanushevich, Y.G., Shagin, D.A., Fradkov, et al., Spectral diversity among members of the green fluorescent protein family in hydroid jellyfish (Cnidaria, Hydrozoa), *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2005, vol. 31, pp. 43–47.
32. Zagalsky, P.F. Crystallisation of astaxanthin-proteins of *Velella velella* (Coelenterata: chondrophora), *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Comp. Biochem.*, 1982, vol. 71, pp. 235-236.
33. Zhuang, Y., Sun, L., Zhao, X., et al., Investigation of gelatin polypeptides of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) for their antioxidant activity *in vitro*. *Food Technol. Biotechnol.*, 2010, vol. 48, pp. 222–228.

Table 1. Hunter L*a*b* color coordinates of the specimen umbrella

color coordinates	umbrella's region ⁺		
	upper	middle	edge
L*	41.99 ^{b++}	53.01 ^a	58 ^a
a*	-10.26 ^b	-14.23 ^a	-15 ^a
b*	-8,52 ^b	-1,23 ^c	-31 ^a

⁺ mean of three replicates

⁺⁺ means with different letter are significantly different ($\alpha=0.05$)

Figure Captions

Figure 1. Absorbance of *S. meleagris* ethanol extracts

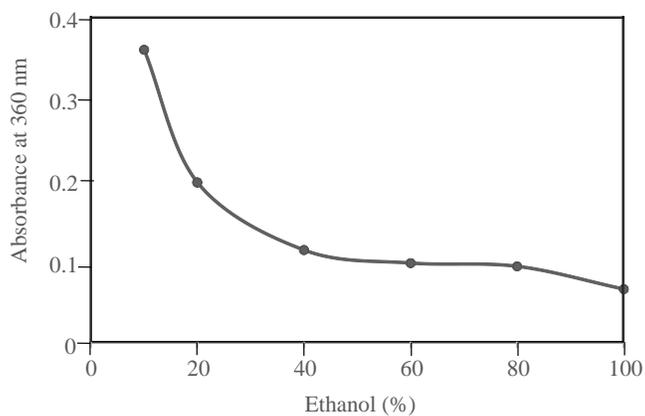


Figure 2. Absorbance of crude and partially purified pigment extracts of *S. meleagris* during storage at -20 and 4°C

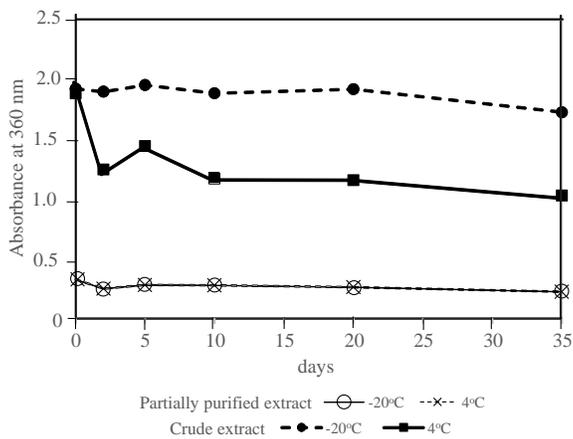


Figure 3. SDS-PAGE of the hydrolyzed protein moiety. A: PAS staining; M-molecular weight markers; B: Coomassie blue staining; M-molecular weight markers; 1,2 – samples

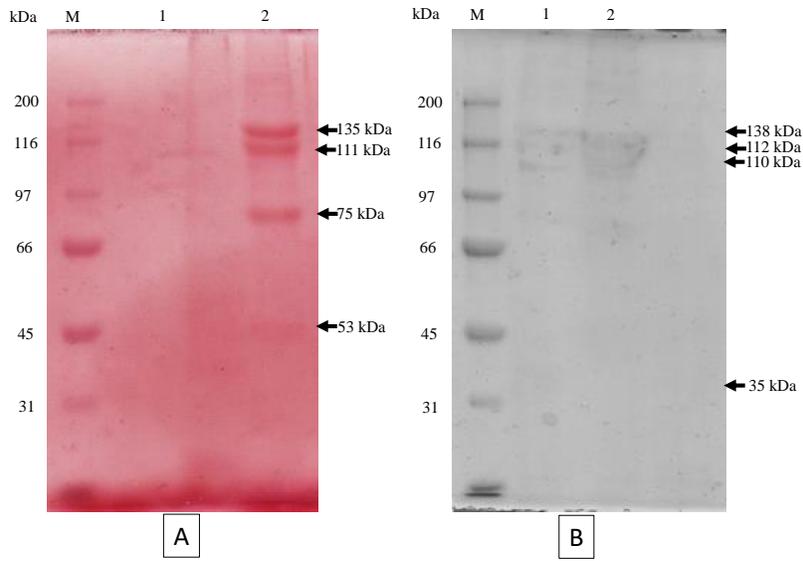
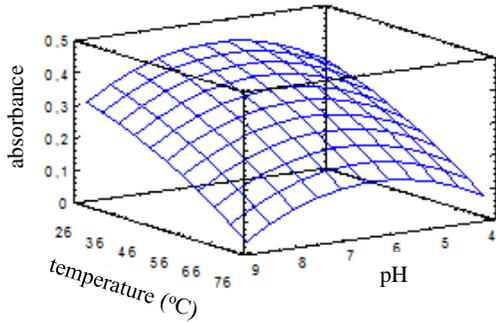


Figure 4. Effect of pH and temperature on *S. meleagris* pigment at 360 nm



PRODUCTIVIDAD

Artículo científico

Olivia Lugo Magaña, Raquel García Barrientos, Xochitl Guzmán García, Isabel Guerrero Legarreta, I. 2018. Purification and preliminary characterization of a blue pigments from “cannon ball” jellyfish *Stolomophus meleagris*. Russian Journal of Marine Biology (en prensa).

Capítulos de libro

Arisaí C. Hernández Sámano, **Olivia Lugo Magaña**, Miriam Franco Zavaleta, Xóchitl Guzmán García, Roberto E. Armenta López, Raquel García Barrientos e Isabel Guerrero Legarreta. 2018. Capítulo 2. Potencial bioactivo y nutricional de los recursos pesqueros. En: Tecnología de pescado y otros recursos acuáticos. Isabel Guerrero, Marcelo Rosmini, Roberto Armenta (compiladores). Editorial Académica Española. P. 33. ISBN: 978-620-2-13958-8

Raquel García Barrientos, **Olivia Lugo Magaña** e Isabel Guerrero Legarreta. 2018. Capítulo 7. Utilización comercial de medusas. En: Tecnología de pescado y otros recursos acuáticos. Isabel Guerrero, Marcelo Rosmini, Roberto Armenta (compiladores). Editorial Académica Española. P. 194. ISBN: 978-620-2-13958-8

Congresos

Olivia Lugo Magaña, Xochitl Guzmán García, Raquel García Barrientos, Isabel Guerrero Legarreta, 2015. Partial Characterization of a Blue Pigment Extracted From Jellyfish (*Stolomophus meleagris*). Institute of Food Technologists Annual Meeting. 11-14 Julio, Chicago, Ill.

Olivia Lugo Magaña, Raquel García Barrientos, Xóchitl Guzmán García, Isabel Guerrero Legarreta, I. 2016. Identificación de glucoproteínas en medusa “Bola de Cañón” (*Stolomophus meleagris*). XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ 3 al 6 de Junio, Puerto Vallarta, Jal. México.

Olivia Lugo Magaña, Xóchitl Guzmán García, Raquel García Barrientos, Isabel Guerrero Legarreta, 2016. Stability prediction using a central rotatable design of a blue pigment extracted from *Stomolophus meleagris* jellyfish. 18th World Congress of Food Science and Technology. 21-25 agosto, Dublín, Irlanda.

Olivia Lugo Magaña, Raquel García Barrientos, Xóchitl Guzmán García, María del Carmen González Sotelo, Miriam Franco Zavaleta, Isabel Guerrero Legarreta. 2018. Extracción de colágeno de diferentes especies de medusas. XXXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ 1 a 4 de Mayo. San José del Cabo, B.C.S.



EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN
PRELIMINAR DE PIGMENTOS Y
COLÁGENO A PARTIR DE MEDUSAS
STOMOLOPHUS MELEAGRIS,
AURELIA AURITA, RHIZOSTOMA
PULMO Y ROPHILEMA ESCULENTUM

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 29 del mes de octubre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. CLARA PELAYO ZALDIVAR
DRA. XOCHITL GUZMAN GARCIA
DRA. RAQUEL GARCIA BARRIENTOS
DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO



OLIVIA LUGO MAGAÑA
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: OLIVIA LUGO MAGAÑA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

[Signature]
LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

[Signature]
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

[Signature]
DRA. CLARA PELAYO ZALDIVAR

VOCAL

[Signature]
DRA. XOCHITL GUZMAN GARCIA

VOCAL

[Signature]
DRA. RAQUEL GARCIA BARRIENTOS

SECRETARIA

[Signature]
DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO