Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Annemarie Nielsen S.
INSTITUTO: Farmacia
FACULTAD: Ciencias

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Alejandro Jerez M.
INSTITUTO: Farmacia
FACULTAD: Ciencias

"DETERMINACIÓN DE ALANTOÍNA EN SECRECIÓN DE CARACOL CHILENO (*Helix aspersa* Müller). VARIACIONES EN SU CONCENTRACIÓN SEGÚN TIPO DE ALIMENTACIÓN Y ÉPOCA DE OBTENCIÓN EN EL AÑO".

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Químico Farmacéutico.

ADOLFO JOSÉ LIRA CORTÉS

VALDIVIA-CHILE

2008

Dedicado a mi madre Gladys, mi hermano Claudio, mi sobrina Cony y a mi padre (Q.E.P.D). Del mismo modo dedico este trabajo al amor de mi vida….mi Pauly.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por el esfuerzo, amor y apoyo incondicional que me han brindado durante la vida, especialmente a mi madre, hermano y sobrina, quienes han sido mi fuente de inspiración para luchar por cada una de las metas que me he propuesto en la vida. En forma muy especial quiero agradecer a mi padre, a quien siempre he sentido a mi lado, a pesar de que Dios y la vida no permitieran que estuviera junto a nosotros.

Quiero agradecer a la profe Carin Akkeson (Q.E.P.D) por confiar en mí para llevar adelante este trabajo. Lamentablemente el destino tenía otros planes para usted y no me permitió disfrutar de su experiencia académica y personal. Profe, sentí su apoyo en cada momento de este trabajo.

Profe Annemarie, las vueltas de la vida me permitieron conocerla, aprender y disfrutar de su amistad. Agradezco su cariño, confianza, apoyo, paciencia y todas aquellas experiencias de vida y académicas que compartió conmigo.

Profe Alejandro, he tenido la suerte de conocer a una gran persona y excelente profesional, que compartió conmigo no solo sus conocimientos académicos y experiencias de vida, sino también una gran amistad. Gracias por su apoyo, confianza, amistad y sentido del humor que siempre voy a recordar.

Joel, gracias por tu apoyo, amistad y sentido del humor que hicieron de los largos días de trabajo momentos de alegría, aprendizaje. Tu colaboración fue fundamental en el desarrollo de esta Tesis, muchas gracias por todo.

Eduardinho, gracias por tu sencillez, apoyo, colaboración, amistad y por todas aquellas charlas que distendieron en más de una oportunidad las extensas jornadas de trabajo.

Carolina Manosalva, gracias por tu apoyo y por la amistad que me has brindado durante el tiempo que hemos compartido.

Profe Guido, gracias por su disposición y ayuda brindada. Usted fue una persona muy importante en la finalización de este trabajo y logros obtenidos con el mismo.

Agradezco al Dr. Humberto Dölz por sus palabras de apoyo, por compartir sus experiencias de vida y por las oportunidades brindadas durante mi vida académica, las que han ayudado en mi formación humana y profesional.

Profe Adela, gracias por aceptar participar de este trabajo.

A la Familia EJE Corral, quienes han sido un regalo de la vida. Gracias por el cariño y amistad que me han entregado.

Finalmente quiero agradecer a la mujer que llena mi vida de alegría y amor. Pauly, gracias por compartir tu vida junto a mí, por el amor que incondicionalmente me regalas cada día, eres un pilar en mi vida. Te amo mxo too el rato.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1 RESUMEN 1

SUMMARY 2

2 INTRODUCCIÓN 3

2.1 Anatomía del caracol 3
2.1.1 Estructura externa del caracol 3
2.1.2 Estructura interna del caracol 4

2.2 Ciclo de vida del caracol 6

2.3 Alimentación del caracol 9

2.4 Secreción del caracol 11

2.5 Usos de la baba de caracol 14

2.6 Métodos de preservación de la secreción 17

2.7 Alantoína 18

2.8 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia 20

2.9 Fundamentación del problema 21

3 HIPÓTESIS 22

4 OBJETIVOS 22

4.1 Objetivo General 22

4.2 Objetivos Específicos 22

5 MATERIALES Y MÉTODOS 23

5.1 Instrumental y equipos 23

5.2 Reactivos 24

5.3 Muestras 24

5.4 Metodología analítica 26

5.5 Tratamiento de las muestras para la determinación por HPLC 26

5.6 Condiciones cromatográficas para la determinación 28

5.7 Preparación de estándares y curva de calibración 28

5.8 Determinación del parámetro de Sensibilidad 29

5.9 Tratamiento de resultados 30

6 RESULTADOS 30

6.1 Condiciones cromatográficas 30
6.1.1 Curva de calibración 30
6.1.2 Sensibilidad del método 32

6.2 Tratamiento de las muestras 35
6.2.1 Análisis de las muestras 36
6.2.1.1 Alimentación con harina de soya más suplemento de cal 37
6.2.1.2 Alimentación con harina de maíz más suplemento de cal 41
6.2.1.3 Alimentación con vegetales 45
6.2.1.4 Alantoína total por alimentación 49
6.2.1.5 Alantoína según mes de extracción. 50
6.2.1.6 Alantoína total por alimentación 51

7 DISCUSIÓN 53

7.1 Efecto de la alimentación 53

7.2 Efecto del período de extracción 55

8 CONCLUSIONES 59

9 PROYECCIONES 61

10 REFERENCIAS 62

11 ANEXOS 69

11.1 Anexo Nº 1: Figuras 69

11.2 Anexo Nº 2: Tablas 76

11.3 Anexo Nº 3: Glosario de abreviaturas 78

1 RESUMEN

La pared del cuerpo del caracol *Helix aspersa* Müller libera una secreción mucosa que utiliza para lubricar su pie, facilitar su desplazamiento y neutralizar sustancias tóxicas. Hoy en día esta secreción, conocida como “baba de caracol”, es utilizada con fines comerciales para elaborar una variedad de productos cosméticos que ayudan a mejorar o recuperar el aspecto de la piel deteriorada por el paso de los años o por daños físicos o ambientales. Por ello, la calidad y cantidad de los componentes presentes en la secreción son de gran importancia para asegurar que el producto cumplirá con la función para la cual fue elaborado.

En esta investigación se determinó, por medio de la cuantificación de alantoína, la influencia que la alimentación y el período de extracción de la secreción pueden tener en la composición de ésta. Se utilizaron tres grupos de caracoles y tres tipos de alimentación: harina de soya, harina de maíz y dieta de vegetales (lechuga y repollo). Cada grupo de caracoles recibió un único tipo de alimentación durante el período de septiembre a marzo y la secreción les fue extraída en los meses de octubre, diciembre y marzo, que corresponden al inicio, mitad y término del ciclo activo de los caracoles.

Las mayores concentraciones de alantoína fueron obtenidas con la alimentación a base de harina de soya, mientras que las menores correspondieron a la alimentación a base de vegetales. El mes de octubre fue el período donde se obtuvo la mayor concentración de alantoína, influenciada por la alimentación a base de harina de soya. Estos resultados sugieren una influencia de la alimentación y período estacional de extracción en la concentración de alantoína en la secreción de caracol *Helix aspersa* Müller.

SUMMARY

The snail, *Helix aspersa* Müller, releases a mucus secretion from its body wall which is used to lubricate its foot, aid movement and neutralize toxic substances. This secretion, also known as “snail mucus”, is used for commercial purposes to produce a variety of cosmetic products. These help to improve and regenerate the aspect of damaged skin over the years or from physical and environmental damage. For this reason, the quality and quantity of components present in the secretion are very important to ensure that the product meets its objectives.

Using the quantification of allantoin, this research determined the influence of food and the extraction period of secretion on its composition. Three groups of snails and three groups of food were used, including soya flour, corn flour and a vegetable based diet (lettuce and cabbage). Each group of snails received one food type during the September-March period. The secretions were extracted during the months of October, December and March, corresponding to the start, middle and end of the active cycle in snails.

The greatest concentrations of allantoin were recorded for the soya flour based diet, whilst the lowest corresponded to the vegetable based diet. The greatest concentration of allantoin was recorded during October, influenced by a soya flour based diet. These results suggest an influence of the food and stationary period of extraction on the concentration of allantoin in snail secretions of *Helix aspersa* Müller.

2 INTRODUCCIÓN

El reino animal se clasifica en dos grandes grupos, los vertebrados y los invertebrados. Los primeros poseen un esqueleto interno mientras que los segundos no lo poseen, sin embargo, el cuerpo de estos últimos puede estar protegido por una estructura llamada exoesqueleto.

El caracol de tierra *Helix aspersa* Müller (Anexo Nº 1, figura Nº 1) pertenece al *filum* moluscos, clase Gasterópodos, orden pulmonados, familia Helicidae caracterizada por tener una concha enrollada (espiralada). Los gasterópodos forman la clase más diversa de todos los moluscos y es posible encontrar ejemplares tanto terrestres como marinos e incluso de agua dulce (Manosalva, 2005). En Chile se encuentra principalmente el caracol común *Helix aspersa* Müller, especie de mayor consumo humano (Benito, 2004) y que hoy presenta otra gran utilidad, además de ser un producto de consumo gastronómico, como productor de materia prima para la elaboración de productos cosméticos a base de su secreción mucosa, más conocida como baba de caracol.

2.1 Anatomía del caracol

2.1.1 Estructura externa del caracol

La visión externa del caracol (Anexo Nº 1, figura Nº 2) está formada por la concha (caparazón) y el cuerpo, unidos entre sí. El caparazón (Anexo Nº 1, figura Nº 3) sirve como defensa ante las agresiones del medio ambiente (viento y sol) y también contra los predadores. El cuerpo está formado por un pie (que es la parte visible del

caracol cuando se desplaza), una masa visceral que está protegida por la concha y la cabeza, todo recubierto por el tegumento.

En la cabeza se encuentran cuatro tentáculos, dos oculares que le permiten percibir luz y objetos, y dos táctiles; la boca, estructura limitada por un labio superior bilobulado, dos labios laterales y un labio inferior; y el orificio genital, que se sitúa sobre la región lateral derecha detrás de los tentáculos.

El pie (Anexo Nº 1, figura Nº 4), es de forma alargada y representa la mitad del peso corporal, tiene la capacidad de secretar una sustancia mucosa (baba de caracol) procedente de las glándulas del pie y que permite a los caracoles poseer una lenta, pero potente, capacidad de desplazamiento mediante reptación (Benito, 2004).

El tipo de traslado, utilizado por el caracol, se denomina locomoción adhesiva, ya que se realiza sobre superficies sólidas, que son lubricadas con una delgada capa de secreción mucosa producida por el pie de éste (Chan *et al.*, 2007).

2.1.2 Estructura interna del caracol

Cockrum y McCauley (1967) describieron la estructura interna de los gasterópodos (Anexo Nº 1, figura Nº 5) de la siguiente manera:

- Sistema digestivo: compuesto por la boca; la faringe muscular, que tiene una rádula ventral y una mandíbula córnea por sobre la rádula; los orificios de dos glándulas salivales aplanadas que se originan a lo largo de los lados del buche; el esófago alargado; buche semejante a una bolsa, con paredes delgadas, utilizada para almacenar alimento; estómago; intestino largo, recurvado y

rodeado en casi toda su longitud por una glándula digestiva lobular de color oscuro y ano terminal.

- Sistema respiratorio: se ubica dentro de la cavidad paleal. En *Helix* es una modificación de las branquias que tienen los caracoles acuáticos. Los caracoles pulmonados terrestres tienen las paredes de la gran cavidad paleal muy vascularizadas. El aire entra y sale del pulmón a través del poro respiratorio, el pneumostoma.
- Sistema nervioso: consta de ganglios cerebrales, compuestos por dos ganglios supraesofágicos íntimamente fusionados; los nervios cerebrales que van desde los ganglios cerebrales hasta la faringe y los tentáculos; las comisuras circumesofágicas, que van desde los ganglios cerebrales a cada lado del esófago; y los ganglios subesofágicos, que se encuentran en la cara ventral del esófago. Esta estructura es resultado de la fusión de un par de ganglios pedios y un par posterior de ganglios subesofágicos.
- Sistema circulatorio: éste colecta la sangre oxigenada de las paredes del manto y la conduce hacia el corazón y de aquí a través de la aorta a la cabeza, al pie y la masa visceral.
- Sistema excretor: consta de un sólo riñón, el que se encuentra al fondo de la cavidad paleal (manto) emitiendo un uréter anterior, el cual corre a lo largo de la porción posterior del intestino y se vacía al exterior a través del nefridiostoma.

  Los caracoles terrestres operculados retienen agua de la orina transformando el amoníaco en ácido úrico, el que es relativamente insoluble en agua.

- Sistema reproductor: en los caracoles se encuentra el aparato reproductor femenino y masculino a la vez, son hermafroditas simultáneos, pero su gónada, el ovotestis, no es capaz de producir espermatozoides y óvulos al mismo tiempo. Normalmente hay una cópula con transferencia mutua de esperma. La vagina posee una bolsa de dardo ovalada que secreta una espícula calcárea. Cuando dos caracoles se “abrazan” uno clava su dardo en el cuerpo del otro, y la cópula sólo se produce luego de esta manera de estimularse (Ruppert y Barnes, 1995).

2.2 Ciclo de vida del caracol

El ritmo circadiano, o ciclo relativo a 24 horas, de actividad locomotora en el caracol *Helix aspersa* Müller se produce cuando las condiciones de oscuridad, temperatura y alta humedad son constantes, lo cual depende de las condiciones climáticas del lugar en que se desarrolla el caracol (Bailey, 1981).

Los ritmos de comportamiento circadiano y anual del caracol *Helix aspersa*, en condiciones silvestres, han sido muy bien descritos, no así los mecanismos internos subyacentes a estos ritmos que sólo están comenzando a ser entendidos. Es así como algunos estudios de laboratorio han demostrado la existencia de un componente endógeno para estos ritmos (Biannic *et al*., 1995; Bailey y Lazaridou-Dimitriadou, 1986). Los factores ambientales también son causantes de múltiples efectos en las actividades del caracol: ciclos de luz/oscuridad y frío/calor sincronizan los ritmos de comportamiento. Asimismo, se ha observado que la lluvia es un efecto que enmascara este ritmo, puesto que los animales permanecen activos durante las 24 horas del día

(Attia, 2004; Biannic *et al*., 1995). Por el contrario, una alta temperatura y la disminución de la humedad relativa causan una interrupción completa de su actividad (Biannic *et al*., 1995).

Durante el ciclo de vida anual del caracol se pueden distinguir claramente los estados de actividad e inactividad (Iglesias *et al*., 1996; Herreid, 1977) (Anexo Nº 1, figura Nº 6):

- Ciclo activo: se lleva a cabo en dos fases. En la primera de éstas, el inicio del ciclo puede comenzar de dos maneras, la primera, cuando el caracol despierta de la hibernación y vuelve a ser activo, lo cual ocurre normalmente a finales del invierno y comienzo de la primavera (Aupinel y Bonnet, 1996), caracterizándose por la ruptura del epifragma de la concha, que sirvió para protegerse de las condiciones ambientales adversas y de la pérdida de agua durante la hibernación. La segunda ocurre cuando el caracol despierta luego de un período de estivación, el que en *Helix aspersa* es generalmente acompañado de un aumento en el consumo de oxígeno, pudiendo esto aumentar la producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Ramos-Vasconcelos *et al*., 2005). Observaciones, realizadas en *Otala Lactea* y *Helix aspersa* demostraron un incremento transitorio de la peroxidación lipídica en el hepatopáncreas de ambas especies, durante algunos minutos, luego de despertar (Ramos-Vasconcelos *et al*., 2003). En la especie *Otala lactea* se determinó que un aumento de la humedad ambiental hasta 85% a 20º C induce el despertar del caracol (Herreid, 1977). La segunda fase, o actividad propiamente tal, implica cuatro funciones importantes en la vida de todo animal: la locomoción, la alimentación, el crecimiento de los jóvenes y la reproducción de

los adultos (Aupinel y Bonnet, 1996) (Anexo Nº1 figura Nº 7). Esta fase se puede ver afectada por factores endógenos y por la interacción de éstos con diversos factores ambientales (Iglesias *et al*., 1996; Lizaridou-Dimitriadou y Saunders, 1986) como la humedad (Biannic *et al*., 1995).

- Ciclo inactivo: es el estado en que los caracoles pasan la mayor parte de su vida. Puede durar meses o hasta que las condiciones sean favorables. Se caracteriza por la disminución del metabolismo, del ritmo cardíaco, del consumo de oxígeno y la pérdida de agua (Herreid, 1977; Ansart *et al*., 2001).

  Este ciclo puede diferenciarse según la estación del año en que se produce, denominándose hibernación cuando ocurre en invierno y estivación cuando ocurre en verano. El primero de ellos puede ser controlado por diferentes componentes, como el fotoperíodo en *Helix aspersa* (Ansart *et al*., 2001), lo cual sugiere que es un proceso muy adaptado para el invierno. Una de las principales características de la inactividad, durante el invierno, es la secreción de una membrana mucosa calcificada llamada epifragma (Anexo Nº 1, figura Nº 8). Esta membrana es formada por glándulas especializadas del collar del manto, y cuya función es cerrar la apertura de la concha (Herreid, 1977; Ansart *et al*., 2001). Cuando los factores endógenos y condiciones ambientales son adecuados, el epifragma es disuelto por una enzima que se encuentra en la secreción.

  La estivación de los caracoles es causada por una ausencia estacional de agua, humedad o alimento y es acompañada por una disminución de la tasa metabólica. Esta última característica incluye alteraciones del patrón de fosforilación de proteínas y enzimas regulatorias, además de aumentar los

niveles de ciertos antioxidantes endógenos, como glutatión y/o enzimas antioxidantes, en especies como el caracol *Otala lactea*, *Helix aspersa* y el caracol *Biomphalaria tenagophila* (Ramos-Vasconcelos *et al*., 2005).

2.3 Alimentación del caracol

Una de las funciones que debe realizar el caracol luego del período de hibernación es alimentarse para reponer las pérdidas energéticas sufridas durante el período inactivo. En Chile, el caracol es una especie considerada plaga, debido a los daños causados en huertas, jardines y frutales. Por lo tanto, es posible deducir, que le agradan prácticamente todos los vegetales frescos y frutas. Sin embargo, caracoles de la misma especie, recogidos en diferentes lugares, pueden tener diferentes preferencias alimenticias, de modo que es necesario ir acostumbrando, paulatinamente, los caracoles a una dieta determinada cuando estos son criados con fines comerciales. Algunos de los alimentos que reciben los caracoles de criadero son: repollo, zanahoria, lechuga, espinaca, perejil, además de harinillas y suplemento de cal.

En el criadero, los platos o comederos no deben permanecer por más de dos días, debiéndose limpiar y desinfectar permanentemente. En lo posible se debe aportar alimento de manera diaria y desechar los restos de comida del día anterior (Bustamante, 2004).

El tipo de alimentación cumple un rol fundamental en el desarrollo del caracol, debiendo suministrárseles los alimentos necesarios para un óptimo crecimiento y reproducción, con el fin de obtener caracoles de óptima calidad para el uso que se les destine. El

calcio es uno de los componentes principales que debe contener la alimentación, debido a que constituye un factor limitante en el crecimiento de los caracoles terrestres, ya que es el principal componente de las sales que forman la concha (Metref *et al*., 2003), encontrándose, incluso, en el epifragma, células epiteliales, tejido conectivo, células de la glándula digestiva, células glandulares de calcio y en la baba del caracol (Fournié y Chétail, 1984). Estudios realizados en caracoles de la especie *Helix aspersa* Müller demostraron que una dieta complementada con un 22,5% de carbonato cálcico proporcionó un mayor crecimiento y menor mortalidad que una dieta complementada con un 12,5% de este componente (Perea *et al*., 2004). Otros aspectos que se deben considerar para obtener buenos resultados en el crecimiento, además del tipo de alimento, son la frecuencia de alimentación y temperatura de manutención (Selck *et al*., 2006). Las harinillas utilizadas en los criaderos, también cumplen un rol fundamental en la alimentación de los caracoles. Dentro de éstas, las más utilizadas son la harina de soya y la harina de maíz.

El poroto de soya (*Glicine max*) se obtiene de una planta leguminosa con gran capacidad para fijar nitrógeno mediante simbiosis con bacterias del suelo, pudiendo fijar un 50% del nitrógeno total por esta vía. Su calidad nutricional, en cuanto al contenido de aminoácidos esenciales, es considerada incluso superior al estándar de referencia representado por los aminoácidos de la proteína del huevo entero (Berk ,1992). Dentro de los aminoácidos con importancia en la síntesis de purinas y pirimidinas, presentes en la harina de soya están el ácido glutámico, ácido aspártico y glicina (FAO, 1970). (Anexo Nº 2, tabla Nº 2).

El grano del maíz (*Zea maize*) se desarrolla mediante la acumulación de productos de la fotosíntesis, la absorción a través de las raíces y el metabolismo de la planta de maíz. Las principales partes del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química. Así, los principales aportes nutricionales del grano de maíz son el almidón, las proteínas y los aminoácidos (FAO, 1970) (Anexo Nº 2, tabla Nº 1). Entre estos últimos destacan el ácido glutámico, ácido aspártico y glicina, debido a que son precursores de la síntesis de purinas y pirimidinas.

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es nutricionalmente pobre en calorías, pero sus hojas exteriores son ricas en vitamina C. Dentro de los componentes de la lechuga, los aminoácidos ocupan un lugar muy importante, destacándose el contenido de ácido aspártico y ácido glutámico principalmente y en menor cantidad que los anteriores se encuentra la glicina. (FAO, 1970) (Anexo Nº 2, tabla Nº 3).

El repollo (*Brassica oleracea capitata*), es una hortaliza cuyo color varía entre verde, azul-verdoso y morado. Dentro de los componentes del repollo, los aminoácidos ocupan un lugar muy importante, destacándose el contenido de ácido glutámico y ácido aspártico, en menor cantidad que los anteriores se encuentra la glicina (www.fao.org) (Anexo Nº 2, tabla Nº 4).

2.4 Secreción del caracol

Durante su ciclo activo, los caracoles deben recorrer diferentes distancias para poder encontrar su alimento y para llevar a cabo su traslado deben generar una secuencia de ondas de movimiento a lo largo del pie (Lissmann, 1945). Dependiendo

del tipo de caracol, éstas pueden ser ondas compresivas que se mueven desde la cola a la cabeza (ondas directas) (Lissmann, 1945; Moffet, 1979) o desde la cabeza a la cola (ondas retrogradas) (Moffet, 1979). Los caracoles de tierra utilizan ondas directas principalmente, mientras que los caracoles acuáticos utilizan repulsión retrógrada, sugiriendo esto que ambas especies han desarrollado diferentes mecanismos físicos para trasladarse (Chan, 2007).

El pie de un caracol está cubierto por una delgada capa de secreción mucosa (Anexo Nº 1, figura Nº 9) que utiliza en una gran variedad de procesos fisiológicos que van desde la alimentación y digestión, locomoción y adherencia a la reproducción y disminución de las tensiones ambientales (Davies *et al*., 1990). Esta secreción es liberada en forma de gel y está compuesta en un 91-98 % de agua combinada con una pequeña cantidad (2-9 %) de glicoproteínas de alto peso molecular (Denny, 1984). El mecanismo propuesto para la liberación de la secreción mucosa en los gasterópodos, se ha estudiado en la babosa de tierra *Ariolimax Columbianus*, determinándose que la liberación de la secreción se debe al bloqueo de los canales iónicos localizados en la membrana granular o por exocitosis celular (Verdugo *et al*., 1987). También se ha sugerido que el control de la secreción pedia es mediante regeneración de una señal sensorial a través del sistema nervioso central, permitiendo que la secreción se adapte al tipo de estímulo que la provoca, pudiendo ser un cambio mecánico, químico o amenazas de predadores (Skingsley *et al*., 2000). Algunas observaciones en especímenes vivos de *Helix aspersa* sugieren que esta secreción mucosa no es constante en su composición. Estudios histológicos de las estructuras implicadas en la producción y liberación del mucus han confirmado una diferencia en las secreciones.

Las principales descripciones se han referido a la histología de las glándulas y el aspecto de la secreción, con un enfoque especial en la naturaleza física y química del producto (Campion, 1961). Pawlicki *et al*. (2004) identificaron la presencia de proteínas con función adherente (Anexo Nº 1, figura Nº 10) en la secreción pedia de caracoles de la especie *Helix aspersa* (82, 97 y 175 KDa) y en la babosa *Arion subfuscus*. Al mismo tiempo, determinaron que el efecto de éstas sobre la adhesividad del gel mucoso es dependiente de la concentración.

Este gel adhesivo producido por los moluscos, le es un instrumento de mucha utilidad en ambientes húmedos e irregulares, y que requiere un mínimo de material orgánico.

El caracol *Helix aspersa* presenta, en el tejido conectivo de su epitelio, diferentes tipos y formas de glándulas secretoras. Algunas de estas glándulas mucosas son unicelulares y descargan su contenido a través de poros ubicados entre las células epidérmicas; otras glándulas se encuentran agrupadas, mientras que otras son poligonales y poseen un conducto propio, generalmente largo, para descargar su producto. Se han descrito al menos 8 tipos de glándulas secretoras y se les ha clasificado en cuatro tipos acorde al tipo de producto que puedan contener: proteínas, gránulos de carbonato de calcio, secreción pigmentada con contenido de flavonas y otra que secreta glóbulos grasos respectivamente. Las glándulas de la planta del pie son en su mayoría diferentes y producen una secreción mucosa combinada con proteínas. Otros componentes que forman parte de la secreción mucosa son el hierro, estroncio, cobre, zinc, fósforo y los mucopolisacáridos. Estos últimos, actuarían como lubricantes sobre la superficie de adhesión, los gránulos de carbonato cálcico y las proteínas pueden ser usadas para su

defensa y las flavonas son un producto de desecho que varía según la cantidad de alimento verde que consuma el caracol. Por otro lado, el aspecto de la secreción cambia cuando el caracol está irritado, pudiendo variar el color y la viscosidad, a amarillo y acuosa; tornarse levemente alcalina y sin poder inhibir el crecimiento de microorganismos (Campion, 1961). Estudios realizados en *Helix pomatia* sugirieron que la secreción mucosa producida por la estimulación del pie del caracol estaba constituida parcialmente por secreción celular y filtración de la sangre (Martin y Deyrup-Olsen, 1986).

En la actualidad, se han utilizado métodos específicos para determinar los grupos químicos presentes en los componentes de la secreción de diferentes especies de gasterópodos (Skinsley *et al*., 2000), así como otros destinados a determinar la presencia de componentes específicos y cuantificarlos en *Helix aspersa* Müller, como es el caso de la alantoína (Manosalva, 2005; Ferrer y Valenzuela, 2006) y ácido glicólico en un estudio en desarrollo.

2.5 Usos de la baba de caracol

Hoy en día esta secreción es utilizada para elaborar una variedad de productos cosméticos que se comercializan publicitando su capacidad de mejorar o recuperar el aspecto de la piel deteriorada por el paso de los años o por daños físicos o ambientales. Es así, como surgió en Chile, Elicina Cosméticos, empresa pionera en patentar y desarrollar productos cosméticos a base de baba del caracol *Helix aspersa* Müller, y cuyo primer producto de su línea productiva, en el año 1995, fue Elicina® crema de

caracol, el cual declara contener un 80% de baba de caracol. Otro producto que elabora dicha empresa, también con baba de caracol como materia prima principal, es un bálsamo para después de afeitar y que recomiendan para hombres con piel sensible a la afeitada (Elicina, 2007).

Si bien, la composición de la baba de caracol no está del todo definida y sólo se conoce la presencia de algunos componentes, Elicina Cosméticos argumenta que los beneficios de sus productos se deben a componentes presentes en ella como alantoína, ácido glicólico, proteínas, colágeno y elastina, los que estarían debidamente identificados y cuantificados por el Laboratorio Cosmetológico y Farmacéutico Lacofar Ltda. Chile (autorizado como laboratorio externo por el Instituto de Salud Pública de Chile el 03.06.1981) (Elicina, 2007). Sin embargo, no se han encontrado publicaciones científicas que sustenten esta información. Este laboratorio está a cargo de los análisis que certifican que la secreción cumple con la calidad necesaria para elaborar la crema Elicina®. Si bien, la elaboración de productos cosméticos con baba de caracol está masificándose, no ha ocurrido lo mismo con los estudios científicos, vinculados a respaldar las propiedades que se otorgan a ésta secreción y al uso de ella sobre la piel humana y las alteraciones que sufre por el paso del tiempo y por factores ambientales. Son pocos los estudios que afirman que el uso de la secreción de caracol en preparaciones cosméticas puede utilizarse como apoyo en tratamientos dermatológicos. Uno de ellos, utilizó Elicina® crema de caracol en cicatrices recientes e injertos por quemaduras en pacientes quemados de la Corporación de Ayuda al Niño Quemado (COANIQUEM), obteniéndose buenos resultados en cuanto a la mejoría en la pigmentación, textura y altura de las cicatrices e injertos, además no se observaron

efectos adversos en los pacientes tratados con la crema (Elicina, 2007). Por otra parte, se ha evaluado el efecto de diferentes preparados cosméticos (gel, ampollas, contorno de ojos y labios) de la línea Endocare® del Instituto Farmacéutico Labomed S.A. que contiene en su composición secreción de *Crypthophalus aspersa* (*Helix aspersa)* y que demostró que el uso intensivo del preparado ofrece mejorías muy significativas en el tratamiento del fotoenvejecimiento cutáneo luego de tres meses de tratamiento, mientras que la mejoría del aspecto, tersura y firmeza de la piel se pudo observar desde el primer mes de tratamiento. Asimismo, logró disminuir la profundidad de las arrugas, superficie arrugada y mejorar el microrrelieve cutáneo de los pacientes tratados (Tribó-Boixareu *et al*., 2004).

Actualmente la producción de baba de caracol se ha extendiendo a muchos criaderos, los que ya no ven a los caracoles, exclusivamente, como un elemento gastronómico, sino como una fuente de materia prima de alto valor comercial. Por ello, la calidad y cantidad de los componentes activos presentes en la secreción es de gran importancia para asegurar que el producto cumplirá con la función para la cual fue elaborado. Una manera de manejar esto es aportando, a los caracoles, una dieta adecuada y manteniéndolos bajo condiciones ambientales óptimas para su desarrollo.

La extracción de la baba es un proceso muy minucioso, que requiere de preparación y conocimientos.

Las formas mediante las cuales se puede obtener esta secreción desde el pie del caracol son:

- Estimulación manual del pie
- Estimulación del caracol con agua y posterior frotación manual

- Adición de sal para su excitación y posterior liberación de baba
- Estimulación eléctrica con bajo voltaje.

Lo más importante, independiente del método de obtención de la secreción, es que ésta mantenga sus características naturales en cuanto a estabilidad, composición y aspecto. Para lograr esto, se debe poner especial énfasis en las características e higiene del lugar en que se realiza la extracción, los materiales a utilizar, operadores y envases, sin dejar de lado la forma de preservar la secreción hasta su utilización.

2.6 Métodos de preservación de la secreción

Dentro de los métodos que pueden utilizarse para preservar la baba de caracol está la congelación y el secado. El primero tiene las desventajas de que precipita las proteínas y el tiempo de descongelamiento puede ser muy prolongado y diferir de una muestra a otra, lo que puede alterar la estabilidad química y física de los componentes, afectando sus análisis. Lo anterior puede ser mucho más significativo cuando se dispone de una sola muestra congelada, que requiera más de un análisis y deba someterse a procesos de congelación y descongelación sucesivos, pudiendo afectar esto la estabilidad del producto. Por otra parte, el secado es una manera muy utilizada para preservar alimentos y productos biológicos. Si bien existen diferentes métodos de secado, hay uno que ha mostrado ser más conveniente y adecuado dada las características de este tipo de muestras. Este proceso se denomina liofilización, el cual consiste en la eliminación del agua mediante congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío, lo que no alteraría la

composición y propiedades de la baba. Este proceso ha sido usado exitosamente para la preservación y almacenamiento de muchas vacunas, cultivos microbiológicos y otros productos biológicos inestables. Además, se liofilizan algunos productos biológicos con la finalidad de mantener su integridad, potencia y otras propiedades del producto, que por otro método de preservación, como la exclusiva congelación o adición de preservantes no proporcionan la suficiente estabilidad (FDA, 1990).

2.7 Alantoína

La alantoína (Anexo Nº 1, figura Nº 11) es un producto derivado del metabolismo de las purinas. En el caracol, el hepatopáncreas es el principal órgano de síntesis y catabolismo de purinas y pirimidinas. Este molusco es una especie uricotélica que excreta ácido úrico, xantina y guanina como productos principales del metabolismo del nitrógeno, en donde el riñón es el principal sitio de acumulación de estos, encontrándose el 90% en forma de purinas y dos tercios de éste en forma de ácido úrico y el tercio restante en cantidades iguales de xantina y guanina. Las vías en que se realizan estos procesos han sido evaluadas utilizando un precursor metabólico marcado y determinando la distribución del marcaje en las purinas sintetizadas en el hepatopáncreas (Clark y Rudolph, 1979). Las purinas inosina monofosfato (IMP) y guanina monofosfato (GMP) son formadas a partir de tres aminoácidos precursores, glicina, glutamina y aspartato. La degradación de purinas se realiza por una vía que involucra como primer paso la pérdida de un fosfato por acción de la 5`-nucleotidasa. El adenilato produce adenosina, la que se desamina a inosina por la adenosina

desaminasa, y la inosina es hidrolizada a hipoxantina (base purínica) y D-ribosa. La hipoxantina es oxidada sucesivamente a xantina y ésta a ácido úrico por la xantina oxidasa, una flavoenzima con un átomo de molibdeno y cuatro centros sulfuro-ferrosos en este grupo prostético. El catabolismo del GMP también produce ácido úrico como producto final. El GMP es hidrolizado a guanosina y ésta libera una guanina que sufre una sustracción hidrolítica para producir xantina, la que es convertida en ácido úrico por acción de la xantina oxidasa (Nelson y Cox, 2005).

El ácido úrico es excretado como producto final del metabolismo de las purinas en primates, aves y algunos otros animales. En la mayoría de los mamíferos y muchos otros vertebrados, el ácido úrico es posteriormente degradado a alantoína por la acción de la urato oxidasa (Ferrer y Valenzuela, 2006).

En cosmética, la alantoína tiene las ventajas de no ser tóxica ni irritante sobre la piel y de ser efectiva a bajas concentraciones. La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos establece que la alantoína actúa como protector de la piel en preparaciones que la contengan entre un 0,5 a 2,0 % (FDA, 2007). El principal efecto de la alantoína es la fuerte estimulación de la proliferación celular y la reconstrucción de tejido de granulación intacto. En preparaciones farmacéuticas, la alantoína se usa, por ejemplo, para el tratamiento de úlceras, heridas de curación lenta y quemaduras (Merck, 2007).

2.8 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se ha transformado en una herramienta útil para analizar cuantitativamente mezclas de sustancias, pudiendo cuantificar tanto impurezas en muy bajas concentraciones como macrocomponentes con niveles de precisión tan bajos como 0,5% e incluso menores (Quattrochi *et al*., 1992). Entre las ventajas que presenta la utilización de la técnica de HPLC en el análisis de muestras de baba de caracol se debe destacar la posibilidad de cuantificar componentes que se encuentran en bajas concentraciones como ocurre con la alantoína (Manosalva, 2005) y el ácido glicólico. Además, la complejidad de la matriz de la muestra requiere de procedimientos que permitan aislar el componente de interés y así facilitar su identificación y cuantificación mediante HPLC.

Dentro de las etapas fundamentales en todo método de análisis se encuentra la preparación de la muestra, especialmente cuando se determinan componentes en pequeñas cantidades. La extracción del analito desde la matriz es un paso crítico, debido a la interferencia que otros componentes presentes en ella pueden causar en el pico del analito o por el daño que estos pueden causar en los instrumentos o la columna cromatográfica. Las proteínas son uno de los componentes que deben eliminarse antes de inyectar la muestra en el equipo HPLC, debido a que pueden precipitar dentro del equipo cromatográfico (Quattrochi *et al*., 1992).

2.9 Fundamentación del problema

Durante los últimos años la utilización de la baba de caracol ha experimentado un auge en el área cosmética debido a las propiedades dermatológicas que a ésta se le atribuyen. Las responsables de estas propiedades serían las sustancias contenidas en la baba, dentro de las cuales se mencionan especialmente sustancias como alantoína, ácido glicólico, proteínas, vitaminas y antioxidantes.

Sin embargo, son pocos los antecedentes científicos que respaldan esta información.

Actualmente, se ha identificado y cuantificado la alantoína (Manosalva, 2005) y un estudio similar con ácido glicólico se encuentra en etapa de finalización. Los resultados de estos estudios han demostrado que las concentraciones de ambas sustancias son bajas respecto a las concentraciones dermatológicamente útiles, del orden de µg/mL. También se ha visto, que estos valores pueden variar entre babas de distintos criaderos, lo cual hace pensar que podrían existir factores ambientales y/o nutricionales que pudieran influir en la calidad de la composición de esta secreción.

Esto resulta de especial interés, si consideramos que dependiendo de cada criadero, la dieta y las condiciones de mantención de los caracoles pueden ser variables y que además el ciclo de actividad del caracol no es igual a lo largo del año.

3 HIPÓTESIS

El tipo de alimentación y el período estacional de obtención de la baba de caracol chileno (*Helix aspersa* Müller) inducen cambios en la concentración de alantoína presente en ésta.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la influencia del tipo de alimentación y la época de obtención en la composición de la baba del caracol chileno *Helix aspersa* Müller por medio de la cuantificación de la alantoína presente en ésta.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración de alantoína, por medio de una técnica de HPLC, en la secreción de caracol chileno según época del año (octubre, diciembre y marzo) las cuales corresponden al inicio, mitad y término del período activo del caracol.
- Determinar la concentración de alantoína, por medio de una técnica de HPLC, en la secreción de caracol chileno según tres diferentes tipos de alimentación.
- Establecer la época de extracción en que se presentan las mayores concentraciones de alantoína y la alimentación que la produce.
- Establecer el tipo alimentación y el período estacional que produce mayores concentraciones de alantoína.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Para cuantificar la alantoína en la baba de caracol chileno *Helix aspersa* Müller Se utilizó una metodología por HPLC validada (Manosalva, 2005).

5.1 Instrumental y equipos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) Jasco.
- Detector UV-Visible Jasco con lámpara de Deuterio modelo UV-2075 plus.
- Bomba cuaternaria Jasco modelo PU-2089 plus.
- Columna Phenomenex® C-18 4,6 x 250 mm, 5 µ.
- Liofilizador VIRTIS 10-145 MR-BA.
- Balanza analítica digital Denver Instrument Company® modelo AA200.
- Medidor de pH Hanna Instrument® modelo HI9321.
- Vortex Genie-2 VWR scientific.
- Sistema Filtrante para fase móvil membrana tamaño de poro 0,2 µm.
- Jeringa 100 µL Hewlett Packard.
- Jeringa 60 mL.
- Filtros de membrana Advantec®, tamaño poro 0,2 µm.
- Material de laboratorio de vidrio clase A.
- Centrífuga P. Selecta Mixtasel 96.

5.2 Reactivos

- Agua, Grado HPLC Merck®.
- Metanol, Grado HPLC Merck®.
- Fosfato de amonio dihidrogenado ($NH_4H_2PO_4$) para análisis Merck®.
- Diclorometano para análisis Merck®.
- Hexano para análisis Merck®.
- Ácido tricloroacético 10% (TCA) Merck®.
- Estándar alantoína ≥ 98% Sigma®.
- Fase móvil: Buffer fosfato de amonio dihidrogenado 5mM pH 3,2.

5.3 Muestras

Secreción pura de caracol chileno (*Helix aspersa* Müller) obtenida de un criadero ubicado en Caulín, comuna de Ancud, Isla de Chiloé, Región de los Lagos, Chile. Los caracoles se seleccionan al azar y según el tamaño de su caparazón, el que debe ser mayor a 1cm diámetro, procurando no utilizar dos veces el mismo caracol para dos extracciones en el mismo período, debido a que el estrés a que son sometidos es muy alto en cada proceso, pudiendo morir muchos de ellos luego de cada etapa extractiva.

El criadero dispuso de 900 caracoles que fueron divididos en tres grupos, de 300 individuos cada uno, y alimentados en forma separada de la siguiente manera:

- Grupo I: concentrado que contenía harina de soya, además de una cantidad de cal que aporta la cantidad necesaria de calcio.

- Grupo II: concentrado que contenía harina de maíz, además de una cantidad de cal que aporta la cantidad necesaria de calcio.
- Grupo III: alimentados con vegetales (lechuga y repollo).

Cada grupo fue depositado en su respectiva bandeja plástica y tratado de la misma manera que el resto de los caracoles del criadero, o sea, sometidos a aseo diario para evitar infecciones, mantenidos a la temperatura y humedad que requieren para su óptimo desarrollo; y alimentados con su respectivo alimento, según dispuso el estudio. Previo a la extracción de la secreción, los caracoles fueron sometidos a ayuno por un día, con el fin de evitar la contaminación de las muestras con sus propias deposiciones durante la estimulación a que se les sometió.

De cada bandeja se seleccionaron, bajo el mismo criterio del criadero, los caracoles necesarios para obtener un volumen de secreción suficiente y así poder realizar ensayos previos a las determinaciones finales. Este proceso fue repetido en cada etapa de muestreo, correspondiente a los meses de octubre y diciembre del año 2005 y marzo del año 2006. Los meses en que se realizaron los muestreos corresponden al inicio, mitad y final del período activo del caracol respectivamente.

La extracción de la secreción de caracol chileno (*Helix aspersa* Müller) se realizó mediante estimulación manual del pie y raspado con espátula.

A partir del segundo muestreo realizado, se pudo comprobar que la mortalidad de los caracoles que son sometidos al proceso de extracción de la baba llegó al 15% aproximadamente, lo cual puede atribuirse no sólo al procedimiento realizado, sino también, a que la alimentación que recibieron no proporcionaba los requerimientos nutricionales mínimos necesarios para el desarrollo y crecimiento de los caracoles.

5.4 Metodología analítica

El proceso de cuantificación de alantoína en las muestras de secreción de caracol *Helix aspersa* Müller se realizó por HPLC y se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Tratamiento de las muestras para la determinación por HPLC.
- Condiciones cromatográficas para la determinación.
- Determinación del parámetro de sensibilidad.
- Análisis de muestras.

5.5 Tratamiento de las muestras para la determinación por HPLC

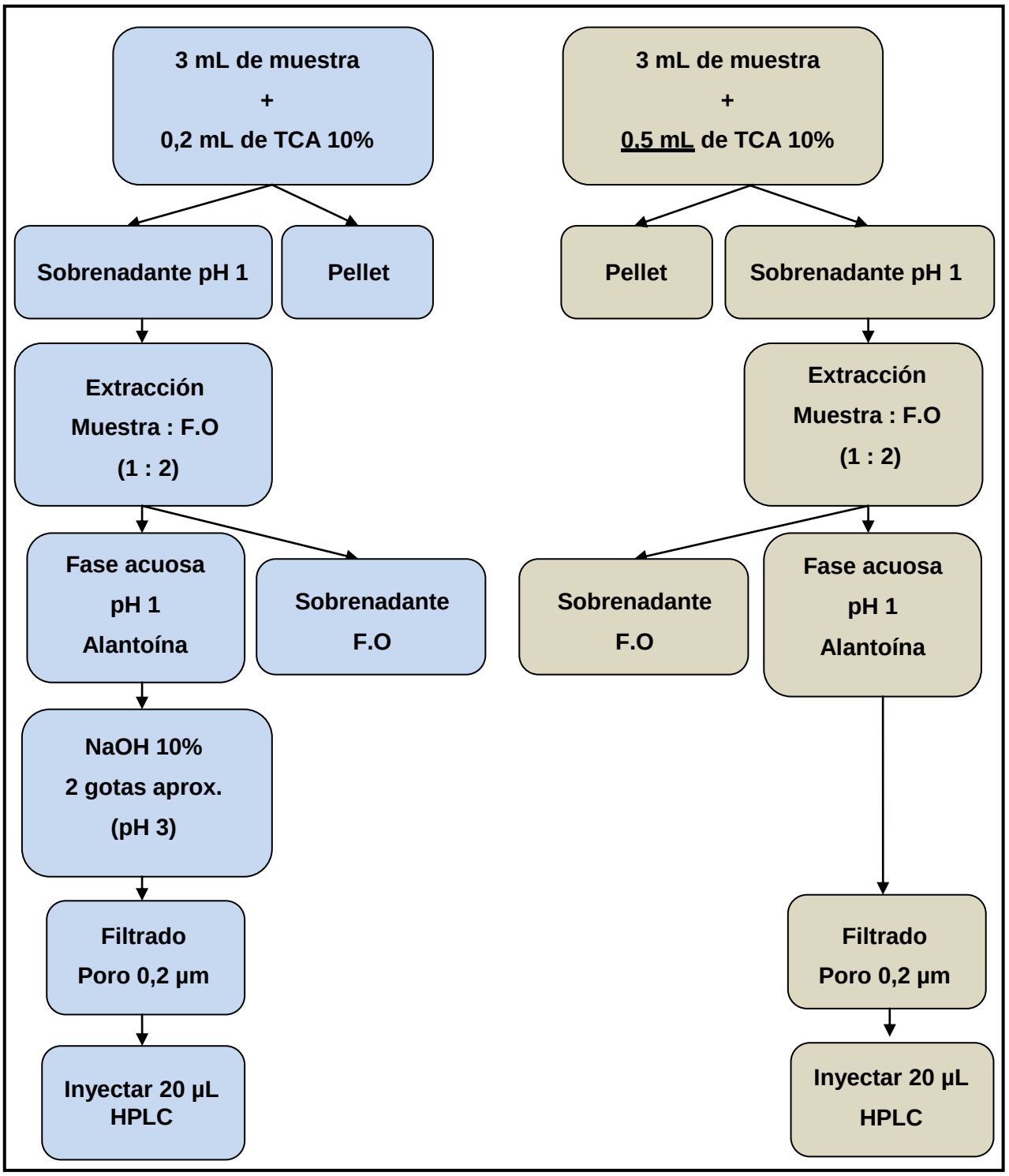
Las muestras obtenidas, durante cada etapa de muestreo, fueron fraccionadas y depositadas en envases plásticos estériles envueltos con papel aluminio alusa, para evitar oxidación por luz, y fueron congeladas a -21º C. Posteriormente las muestras fueron sometidas a liofilización durante 53,5 horas y el producto seco que se obtuvo fue pesado y homogeneizado para su posterior análisis.

Para analizar el liofilizado, se debió pesar y resuspender en agua desionizada grado HPLC la cantidad de producto seco correspondiente a 3 mL de baba, relación que fue previamente determinada. Dentro del protocolo se debieron realizar dos modificaciones:

- Aumentar volumen de TCA 10%, debido a que el volumen indicado en el protocolo no fue suficiente para obtener pH 1.
- No adicionar NaOH 10%, ya que el pH aumentaba a 13 provocando la degradación de la alantoína.

A continuación se presenta el protocolo de análisis y las modificaciones realizadas:

- **Diagrama de protocolo de tratamiento de muestras para ser inyectada al equipo de HPLC y modificaciones realizadas.**



5.6 Condiciones cromatográficas para la determinación

El análisis cromatográfico se llevó a cabo bajo las condiciones establecidas en la metodología (Manosalva, 2005) y con las variaciones necesarias para obtener los valores descritos para el método.

El análisis fue realizado bajo condiciones isocráticas a una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. La separación se llevó a cabo a temperatura ambiente, aproximadamente 20ºC, con un tiempo total de análisis de 10 minutos. La fase móvil fue monitoreada a 214 nm. El volumen de inyección fue de 20 µL.

Previo a la inyección de los estándares y muestras la columna fue equilibrada con la fase móvil.

5.7 Preparación de estándares y curva de calibración

La solución estándar de alantoína fue preparada disolviendo 0,0250g en fase móvil para un volumen de 25 mL (concentración 0,1%). Posteriormente se filtró por filtros de tamaño 0,2 µm y fue almacenada a 4º C hasta su utilización.

Las soluciones estándares de 1, 5, 10, 15 y 20 µg/mL fueron preparadas mediante dilución de la solución stock con fase móvil. Las concentraciones utilizadas en la curva de calibración fueron seleccionadas utilizando como parámetro el valor obtenido en el montaje del método (Manosalva, 2005) y a la ausencia de estudios que permitieran estimar un rango de concentración probable. Considerando lo anterior, se determinó nuevamente el parámetro de sensibilidad (límite de detección y límite de cuantificación), debido a las diferencias que pudieran producirse en la elaboración y manipulación de

reactivos y muestras. La pendiente de la curva de calibración utilizada para cuantificar alantoína, en las muestras de secreción, debe tener la particularidad de pasar por el origen para poder determinar el parámetro de sensibilidad con el método seleccionado.

5.8 Determinación del parámetro de Sensibilidad

Para la determinación del parámetro de sensibilidad se utilizó el método de la curva de regresión, para el cual se deben considerar concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero.

Con los valores obtenidos se obtuvo una ecuación de la recta del tipo: **y = bx + a**, donde **b** es la pendiente.

Primero de determinó la pendiente (b) de la curva de calibración en el rango apropiado. Luego, se elaboró una segunda curva de calibración, a partir de la solución stock de alantoína, pero con bajas concentraciones de analito: 0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 µg/mL. Cada uno de estos estándares fue inyectado por triplicado. Con esta nueva recta de calibración se obtiene una ecuación y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco (Ybl). Finalmente se determinó la desviación estándar (DS) correspondiente a cada concentración del paso anterior, se calcula la recta correspondiente a concentración v/s s y se extrapoló, como en el paso anterior, la desviación estándar a concentración cero, obteniendo con esto el estimado Sbl, correspondiente a la desviación estándar del blanco.

Se calculó el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de

cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco) (Quattrochi *et al*., 1992).

5.9 Tratamiento de resultados

Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de alantoína obtenidas en la baba de caracol *Helix aspersa* Müller con las diferentes alimentaciones y períodos de extracción a que fueron sometidos se realizó el análisis estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni, utilizando para ello el programa estadístico GraphPad Prism Version 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California, USA.

6 RESULTADOS

6.1 Condiciones cromatográficas

6.1.1 Curva de calibración

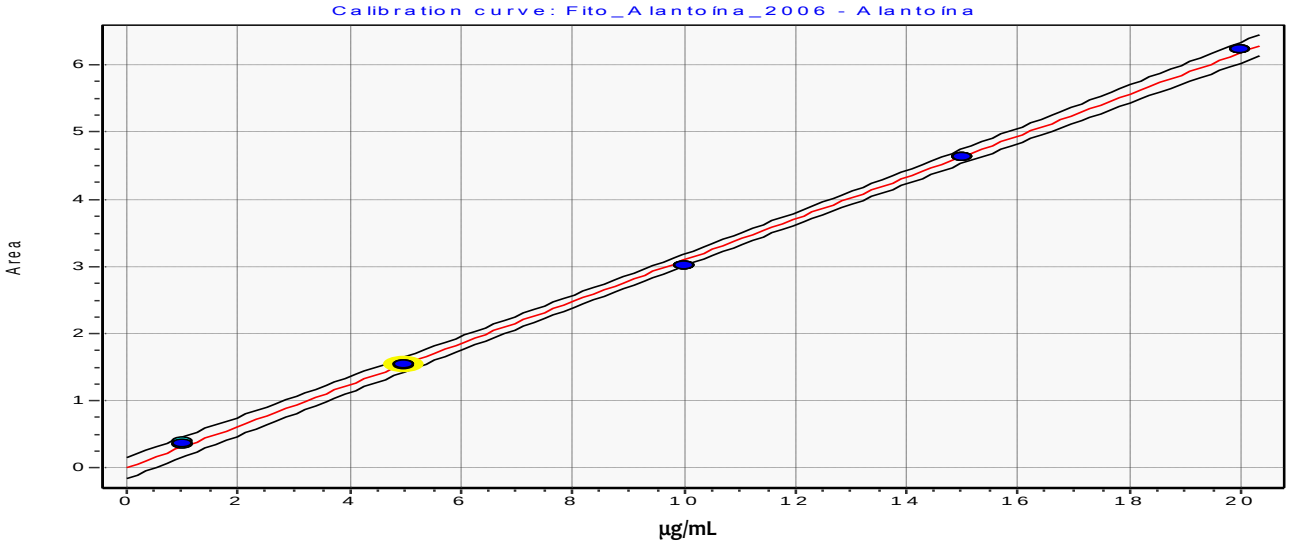
Se elaboró una curva de calibración con cinco puntos a partir de una solución estándar de alantoína de concentración 0,1% según metodología analítica. Ésta, abarcó concentraciones altas, medias y bajas del analito debido a que no se podía estimar el rango de concentración en que se encontraría la alantoína, en las diferentes muestras, además, se desconocía si la concentración de ésta sería mayor o menor a la determinada en las muestras utilizadas en el montaje de la técnica utilizada. Cada una de las concentraciones fue inyectada por triplicado, realizándose 15 inyecciones. Los datos de la curva de calibración, concentración y área, se presentan en la tabla Nº 1, y en el gráfico Nº 1 se muestra la curva de calibración que entrega el programa

computacional Jasco ChromPass Chromatography Data System del equipo HPLC utilizado, además se presenta la ecuación de la recta y coeficiente de correlación de la curva obtenida.

Tabla Nº 1: Curva de calibración alantoína.

Nº Punto	Concentración [µg/mL]	Área [mVxMin]	$\overline{X}$ Área [µg/mL]
1	1,00	0,35	0,37
	1,00	0,40	
	1,00	0,35	
2	5,00	1,53	1,53
	5,00	1,53	
	5,00	1,52	
3	10,00	3,01	3,01
	10,00	3,01	
	10,00	3,02	
4	15,00	4,62	4,62
	15,00	4,62	
	15,00	4,63	
5	20,00	6,23	6,23
	20,00	6,23	
	20,00	6,23	

Gráfico Nº 1: Curva de calibración Concentración [µg/mL] v/s Área [mVxMin].



La ecuación de la recta obtenida es:

y = 0,30903x+ 1,23514

Donde:

b= 0,30903
a= 1,23514
Coeficiente de Correlación= 0,9995

6.1.2 Sensibilidad del método

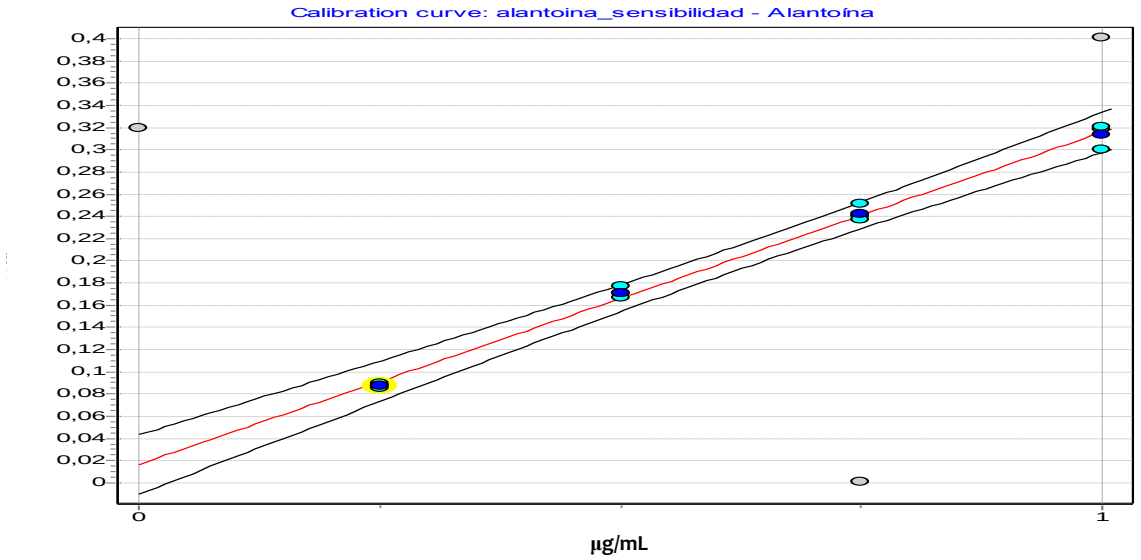
Los límites de detección y cuantificación fueron determinados a partir de la curva de regresión, considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero.

Los resultados de la curva de calibración obtenida al inyectar, por triplicado, bajas concentraciones de alantoína, 0,25, 0,50, 0,75 y 1,00 µg/mL, son presentados en la tabla Nº 2, además se muestran la ecuación de la recta y coeficiente de correlación de la curva obtenida. En gráfico Nº 2 se presenta la curva de calibración obtenida al inyectar concentraciones bajas de alantoína y que se utilizó para determinar el parámetro de sensibilidad.

Tabla Nº 2: Curva de calibración para determinar el parámetro de sensibilidad.

Nº Punto	Concentración [µg/mL]	Área [mVxMin]	$\overline{X}$ Área [µg/mL]	DS (n-1)
1	0,25	0,08	0,087	0,0058
	0,25	0,09		
	0,25	0,09		
2	0,50	0,17	0,173	0,0058
	0,50	0,17		
	0,50	0,17		
3	0,75	0,24	0,243	0,0058
	0,75	0,24		
	0,75	0,25		
4	1,00	0,32	0,313	0,0115
	1,00	0,32		
	1,00	0,30		

Gráfico Nº 2: Curva calibración Sensibilidad del método Concentración [µg/mL] v/s Área [mVxMin].



La ecuación de la recta obtenida es:

y = 0,29939x + 0,01642

Donde:

b= 0,29939
a (ybl)= 0,01642

Coeficiente de Correlación= 0,9982

Se determinó la desviación estándar (DS) correspondiente a cada concentración de la curva de calibración. El cálculo de la recta correspondiente a concentración v/s DS (n-1) y se extrapola la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado Sbl, correspondiente a la desviación estándar del blanco.

La ecuación de la recta obtenida es:

y = 6,84E-3x + 2,95E^{-3}

Donde:

b= 6,84E^{-3}
a (Sbl) = 2,95E^{-3}

Límite de detección= $\frac{Ybl + (3 \cdot Sbl)}{b} = \frac{0,01642 + (3 \cdot 2,95E\text{-}3)}{0,30903}$ = 0,08 µg/mL

Límite de cuantificación= $\frac{Ybl + (10 \cdot Sbl)}{b} = \frac{0,01642 + (3 \cdot 2,95E\text{-}3)}{0,30903}$ = 0,15 µg/mL

6.2 Tratamiento de las muestras

En la tabla Nº 3 se presentan las cantidades de muestra pura y liofilizada, obtenidas en el proceso de extracción y liofilización respectivo.

Tabla Nº 3: Gramos de baba de caracol obtenida por período y tipo de alimentación durante la extracción y posterior liofilización.

Muestra	Período	Cantidad Muestra Liofilizada (mL)	Cantidad Liofilizado Obtenido (g)	Relación g/mL Muestra	g liofilizado para 3 mL solución
Maíz	Octubre	127,0	3,7016	0,0291	0,0874
Maíz	Diciembre	86,0	2,8567	0,0332	0,0997
Maíz	Marzo	49,0	1,4755	0,0301	0,0903
Soya	Octubre	100,0	2,9316	0,0293	0,0879
Soya	Diciembre	50,0	1,6503	0,0330	0,0990
Soya	Marzo	82,0	2,8687	0,0350	0,1050
Vegetal	Octubre	30,0	0,9593	0,0320	0,0959
Vegetal	Diciembre	75,0	1,6217	0,0216	0,0649
Vegetal	Marzo	113,0	2,9868	0,0264	0,0793

En el ensayo de precipitación de proteínas se determinó que el volumen necesario de TCA 10% para precipitar las proteínas y obtener pH 1 en cada una de las muestras fue de 0,50 mL.

En la determinación del efecto del TCA 10% en la muestra, indicó que la adición de cantidades mayores de TCA 10%, que la establecida por el método utilizado, causa una disminución de su concentración en función de la dilución que se provoca en la muestra. Esto fue comprobado sometiendo un estándar de 5,00 g/mL a la metodología analítica, utilizando el nuevo volumen de TCA 10%, obteniéndose resultados similares a

los obtenidos al inyectar el estándar acidificado con 0,5 mL del agente precipitante, pero sin someter a la metodología analítica. El único proceso al que fueron sometidas ambas muestras fue la filtración previa a la inyección al equipo cromatográfico. El factor de dilución (FD) calculado fue de 1,17.

Si bien, los métodos analíticos de cuantificación, que incluyan procesos de precipitación de proteínas, extracciones o que sean muy laboriosos, deben entregar información sobre porcentajes recuperación, esto no fue aplicable en este estudio, debido a que los valores de recuperación van disminuyendo a medida que disminuye la concentración del analito en la muestra y para este caso los valores de concentración están en el rango de 0,30 y 1,70 µg/mL y el método utilizado describe valores de recuperación con concentraciones mínimas de 5,00 µg/mL.

6.2.1 Análisis de las muestras

Cada una de las 9 muestra fue inyectada por quintuplicado, realizándose un total de 45 inyecciones. El programa computacional Jasco ChromPass Chromatography Data System del equipo HPLC entregó, para cada inyección, un cromatograma con información sobre la concentración del analito, tiempo de retención, área y altura de los picos obtenidos. Estos últimos fueron intervenidos en forma manual con la finalidad de corregir la cuantificación de la alantoína, debido a que los resultados cromatográficos no fueron óptimos y se produjeron algunas interferencias que provocaban errores de cuantificación, los que pudieron ser causados por la presencia de impurezas en las muestras o en el equipo cromatográfico.

6.2.1.1 Alimentación con harina de soya más suplemento de cal

En las tablas Nº 4, Nº 5 y Nº 6 se presentan las concentraciones de alantoína obtenidas al inyectar la muestra de baba de caracoles, extraída durante los meses de octubre, diciembre y marzo respectivamente, y correspondiente al grupo de caracoles alimentados a base de harina de soya y suplemento de cal.

En la figura Nº 1, Nº 2 y Nº 3 se presentan los cromatogramas obtenidos al inyectar las muestras de baba de caracoles, alimentados con harina de soya más suplemento de cal, y que les fue extraída en los meses de octubre, diciembre y marzo respectivamente.

En el gráfico Nº 3 se presentan los resultados de concentración de alantoína en las muestras de baba de caracol, alimentados con harina de soya más suplemento de cal, extraída en los meses de octubre, diciembre y marzo.

Tabla Nº 4: Concentración de alantoína en la baba de caracoles alimentados con harina de soya más suplemento de cal, extraída en el mes de octubre.

Nº Análisis	Concentración [µg/mL]	Área [mVxMin]	Concentración x FD [µg/mL]
1	1,32	0,41	1,54
2	1,36	0,42	1,59
3	1,19	0,37	1,39
4	1,19	0,37	1,39
5	1,30	0,40	1,49
Promedio			1,49

Figura Nº 1: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba de caracoles alimentados con harina de soya más suplemento de cal, extraída en el mes de octubre.

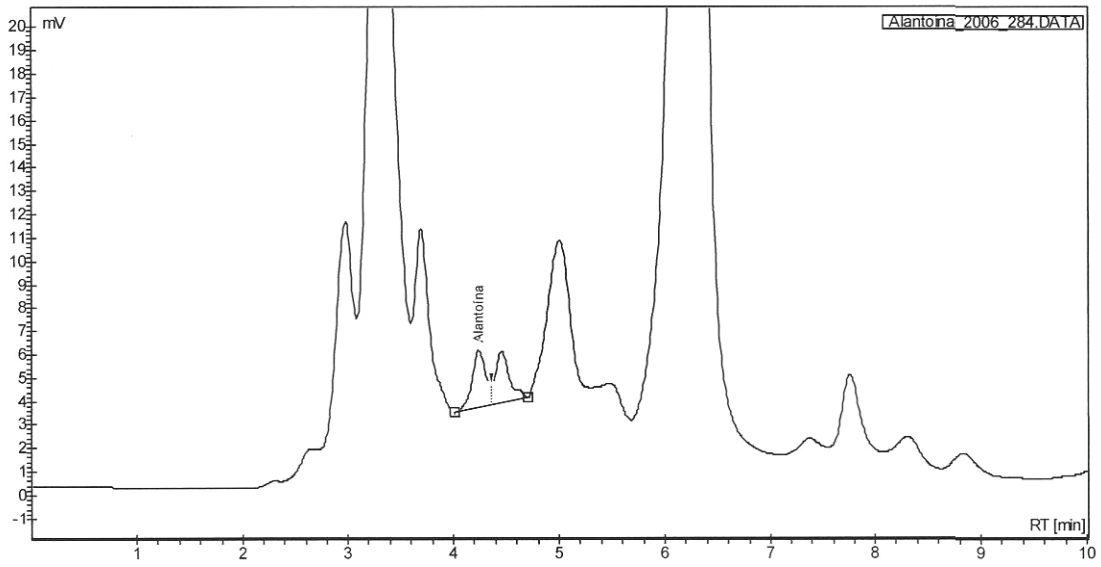


Tabla Nº 5: Concentración de alantoína en la baba de caracoles alimentados con harina de soya más suplemento de cal, extraída en el mes de diciembre.

Nº Análisis	Concentración [µg/mL]	Área [mVxMin]	Concentración x FD [µg/mL]
1	1,22	0,38	1,43
2	1,27	0,39	1,49
3	1,34	0,41	1,57
4	1,34	0,41	1,57
5	1,43	0,44	1,67
Promedio			1,54

Figura Nº 2: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba de caracoles alimentados con harina de soya más suplemento de cal, extraída en el mes de diciembre.

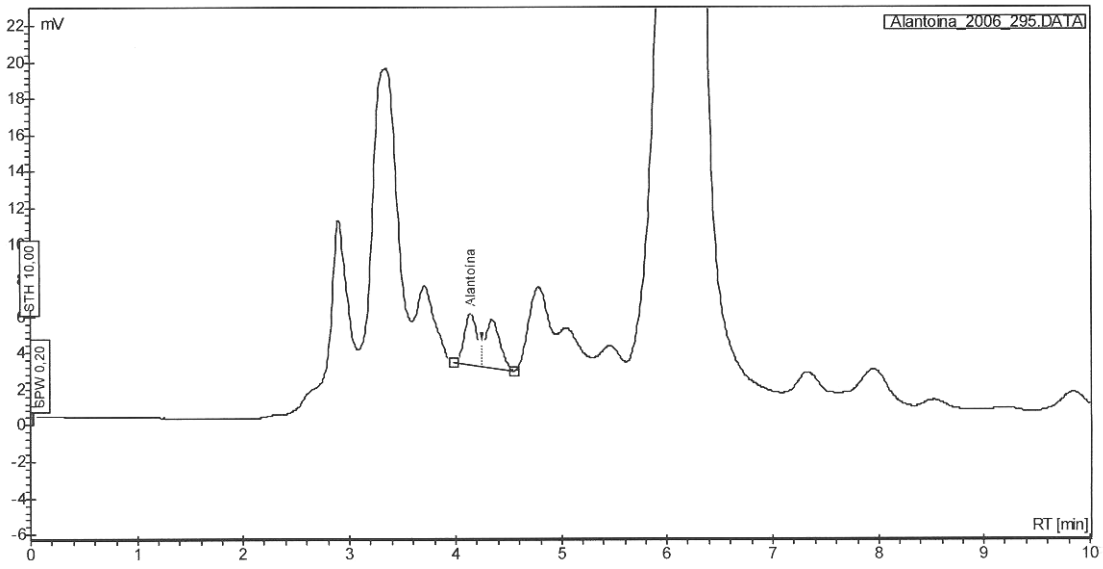


Tabla Nº 6: Concentración de alantoína en la baba de caracoles alimentados con harina de soya más suplemento de cal, extraída en el mes de marzo.

Nº Análisis	Concentración [µg/mL]	Área [mVxMin]	Concentración x FD [µg/mL]
1	0,76	0,23	0,89
2	0,85	0,26	0,99
3	0,84	0,26	O,98
4	0,78	0,24	0,91
5	0,88	0,27	1,03
Promedio			0,96

Figura Nº 3: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba de caracoles alimentados con harina de soya más suplemento de cal, extraída en el mes de marzo.

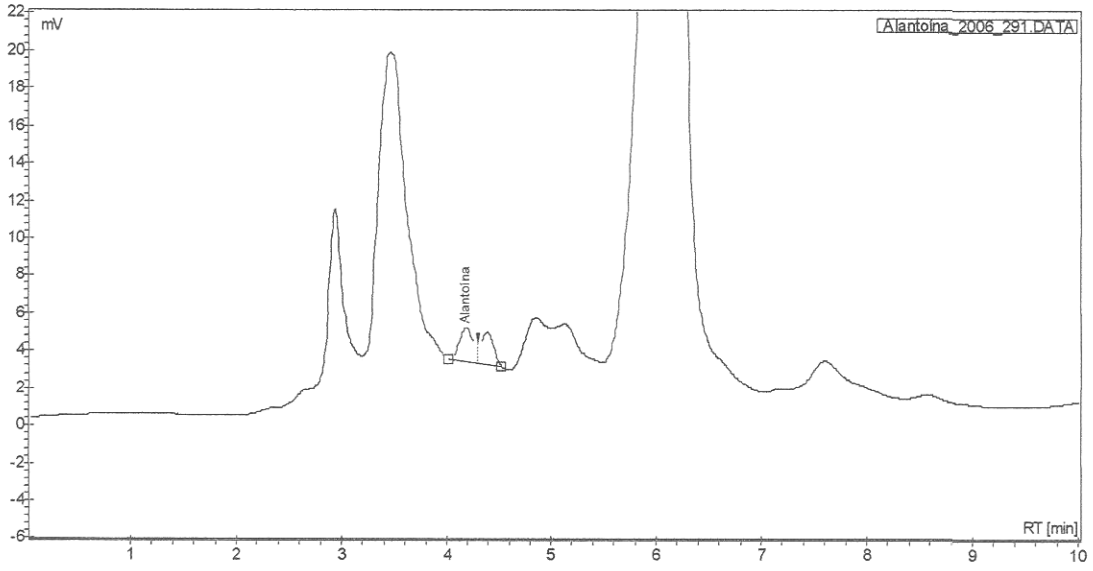
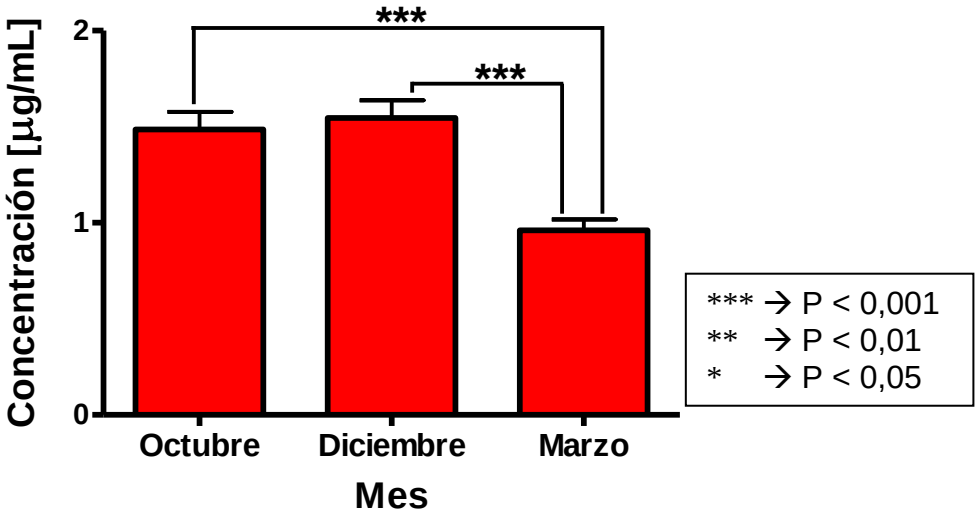


Gráfico Nº 3: Concentración de alantoína en baba de caracoles *Helix aspersa* Müller alimentados con harina de soya y suplemento de cal, según mes de extracción



6.2.1.2 Alimentación con harina de maíz más suplemento de cal

En las tablas Nº 7, Nº 8 y Nº 9 se presentan las concentraciones de alantoína obtenidas al inyectar la muestra de baba de caracoles, extraída durante los meses de octubre, diciembre y marzo respectivamente, y correspondiente al grupo de caracoles alimentados a base de harina de maíz y suplemento de cal.

En la figura Nº 4, Nº 5 y Nº 6 se presentan los cromatogramas obtenidos al inyectar las muestras de baba de caracoles, alimentados con harina de maíz más suplemento de cal, extraída en los meses de octubre, diciembre y marzo respectivamente.

En el gráfico Nº 4 se presentan los resultados de concentración de alantoína en las muestras de baba de caracoles, alimentados con harina de maíz más suplemento de cal, extraída en los meses de octubre, diciembre y marzo.

Tabla Nº 7: Concentración de alantoína en baba de caracoles alimentados con harina de maíz más suplemento de cal, extraída en el mes de octubre.

Nº Análisis	Concentración [µg/mL]	Área [mVxMin]	Concentración x FD [µg/mL]
1	O,97	0,30	1,13
2	0,91	0,28	1,06
3	0,83	0,26	0,97
4	0,91	0,28	1,06
5	0,84	0,26	0,98
Promedio			1,04

Figura Nº 4: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba de caracoles alimentados con harina de maíz más suplemento de cal, extraída en el mes de octubre.

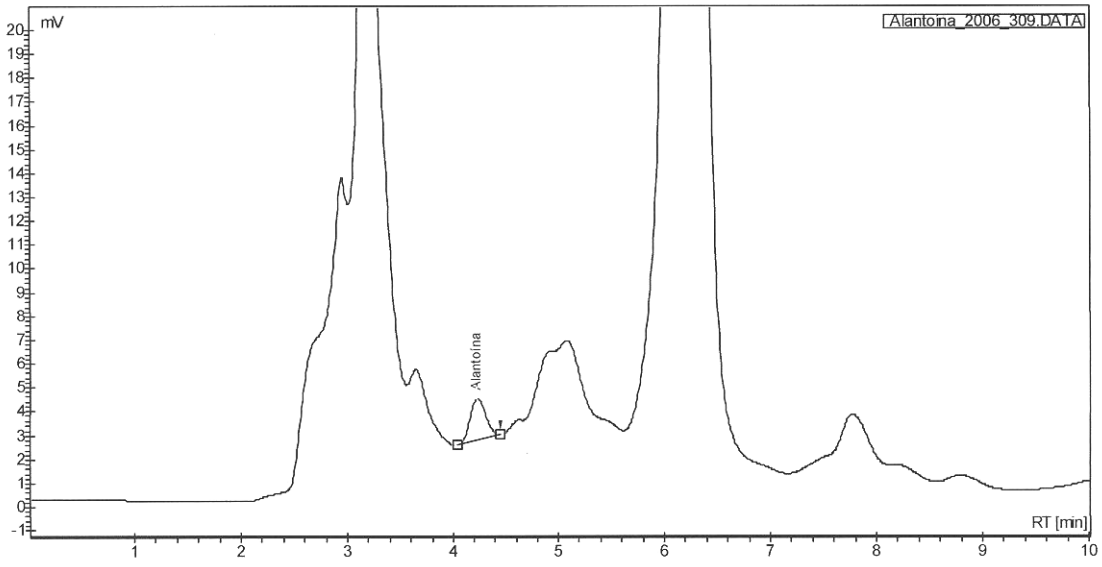


Tabla Nº 8: Concentración de alantoína en baba de caracoles alimentados con harina de maíz más suplemento de cal, extraída en el mes de diciembre.

Nº Análisis	Concentración [µg/mL]	Área [mVxMin]	Concentración x FD [µg/mL]
1	0,80	0,25	0,94
2	0,83	0,26	0,97
3	0,84	0,26	0,98
4	0,88	0,27	1,03
5	0,70	0,22	0,82
Promedio			0,95

Figura Nº 5: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba de caracoles alimentados con harina de maíz más suplemento de cal, extraída en el mes de diciembre.

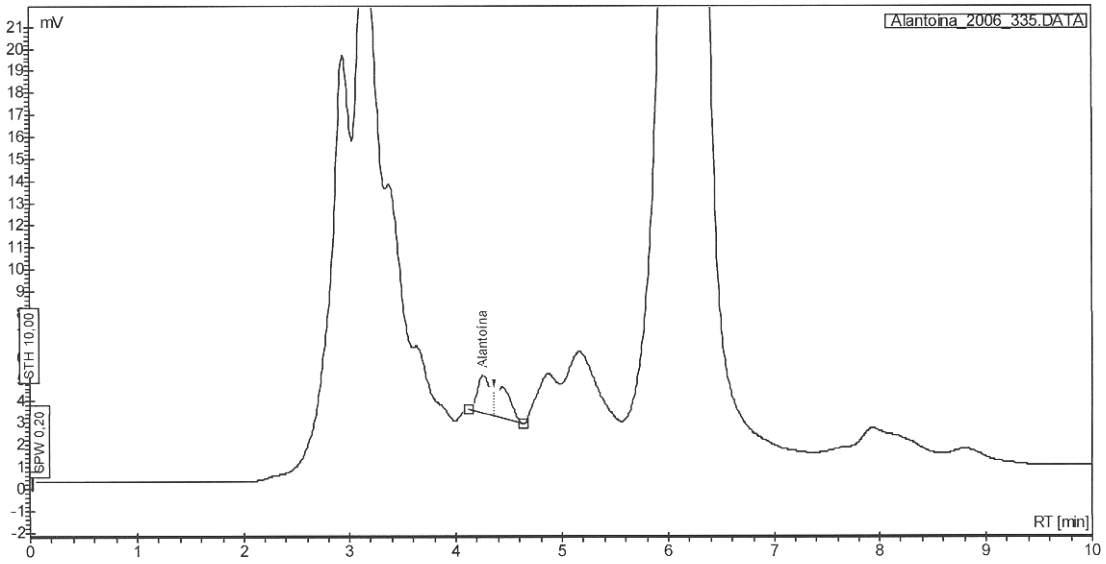


Tabla Nº 9: Concentración de alantoína en baba de caracoles alimentados con harina de maíz más suplemento de cal, extraída en el mes de marzo.

Nº Análisis	Concentración [µg/mL]	Área [mVxMin]	Concentración x FD [µg/mL]
1	1,06	0,33	1,24
2	0,98	0,30	1,15
3	1,11	0,34	1,30
4	1,11	0,34	1,30
5	1,08	0,33	1,26
Promedio			1,25

Figura Nº 6: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba de caracoles alimentados con harina de maíz más suplemento de cal, extraída en el mes de marzo.

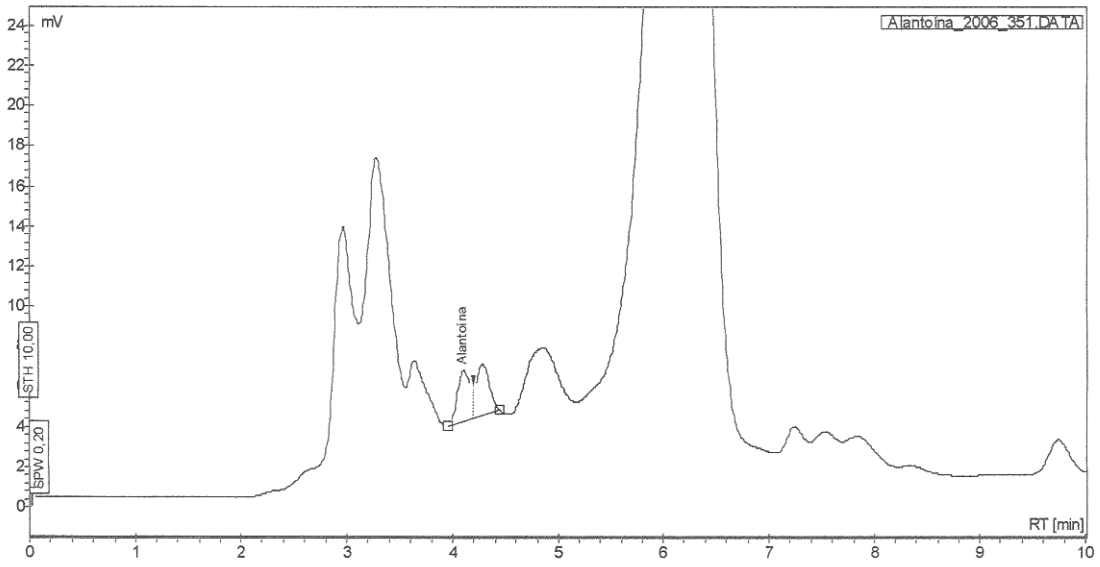
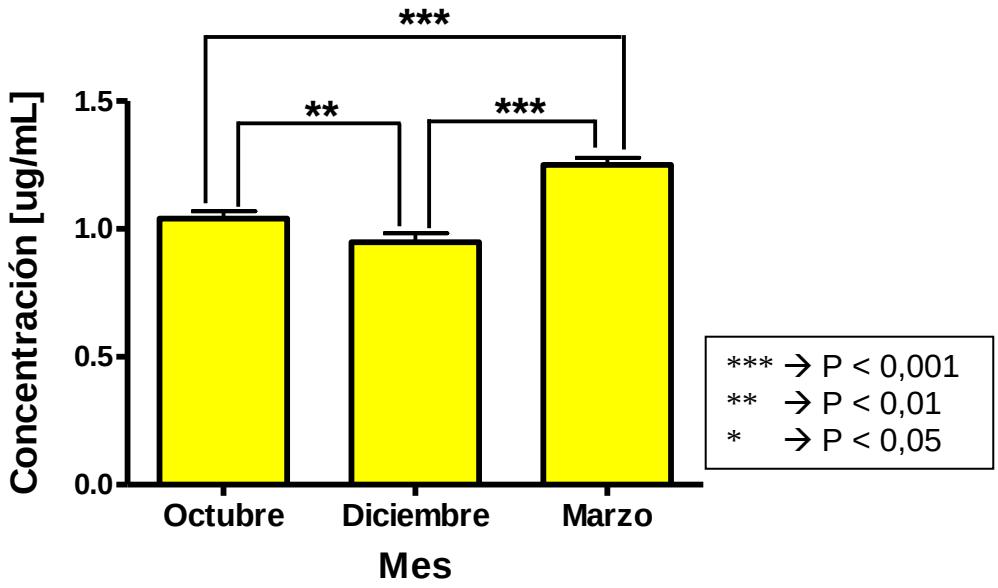


Gráfico Nº 4: Concentración de alantoína en baba de caracoles *Helix aspersa* Müller alimentados con harina de maíz y suplemento de cal, según mes de extracción.



6.2.1.3 Alimentación con vegetales

En las tablas Nº 10, Nº 11 y Nº 12 se presentan las concentraciones de alantoína obtenidas al inyectar la muestra de baba de caracol, es extraída durante los meses de octubre, diciembre y marzo respectivamente, y correspondiente al grupo de caracoles alimentados a base de lechuga.

En la figura Nº 7, Nº 8 y Nº 9 se presentan los cromatogramas obtenidos al inyectar las muestras de baba de caracoles, alimentados con lechuga, extraída en los meses de octubre, diciembre y marzo respectivamente.

En el gráfico Nº 5 se presentan los resultados de concentración de alantoína en las muestras de baba de caracoles, alimentados con lechuga, extraída en los meses de octubre, diciembre y marzo.

Tabla Nº 10: Concentración de alantoína en baba de caracoles alimentados con lechuga y extraída en el mes de octubre.

Nº Análisis	Concentración [µg/mL]	Área [mVxMin]	Concentración x FD [µg/mL]
1	0,57	0,17	0,67
2	0,65	0,20	0,76
3	0,66	0,20	0,77
4	0,68	0,21	0,80
5	0,78	0,24	0,91
Promedio			0,78

Figura Nº 7: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba de caracoles alimentados con lechuga, extraída en el mes de octubre.

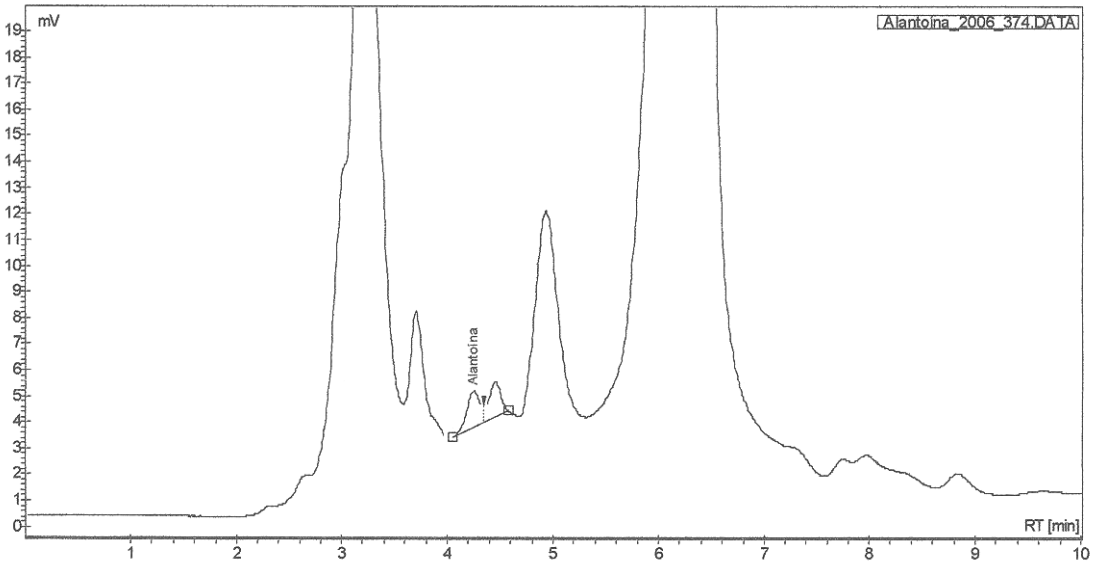


Tabla Nº 11: Concentración de alantoína en baba de caracoles alimentados con lechuga, extraída en el mes de diciembre.

Nº Análisis	Concentración [µg/mL]	Área [mVxMin]	Concentración x FD [µg/mL]
1	0,26	0,08	0,30
2	0,36	0,11	0,42
3	0,39	0,12	0,46
4	0,33	0,10	0,39
5	0,35	0,11	0,41
Promedio			0,40

Figura Nº 8: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba de caracoles alimentados con lechuga, extraída en el mes de diciembre.

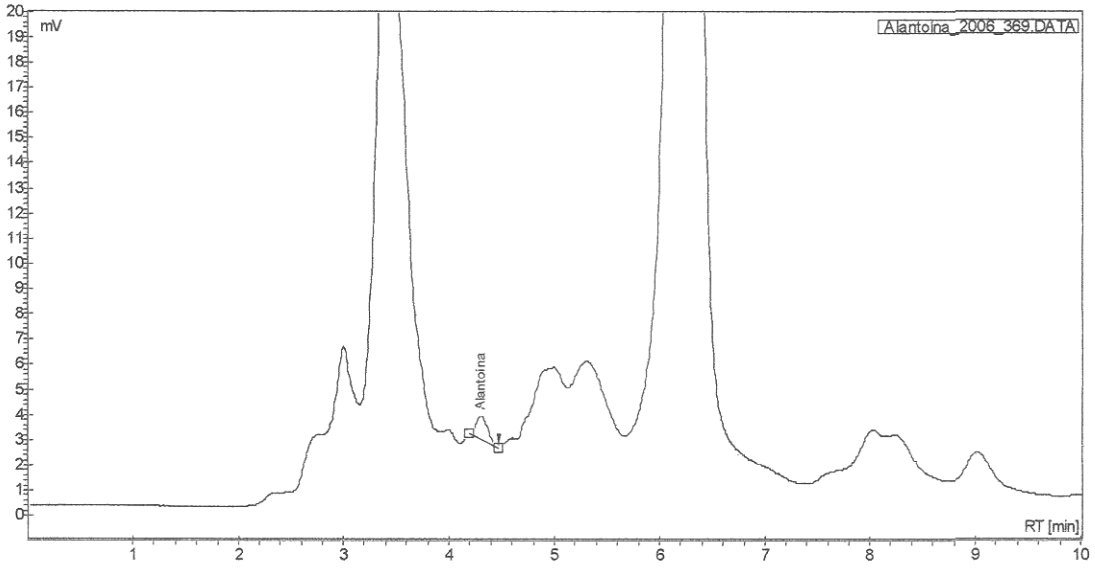


Tabla Nº 12: Concentración de alantoína en baba de caracoles alimentados con lechuga, extraída en el mes de marzo.

Nº Análisis	Concentración [µg/mL]	Área [mVxMin]	Concentración x FD [µg/mL]
1	0,81	0,25	0,95
2	0,82	0,25	0,96
3	0,80	0,25	0,94
4	0,81	0,26	0,95
5	0,83	0,26	0,97
Promedio			0,95

Figura Nº 9: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba de caracoles alimentados con lechuga, extraída en el mes de marzo.

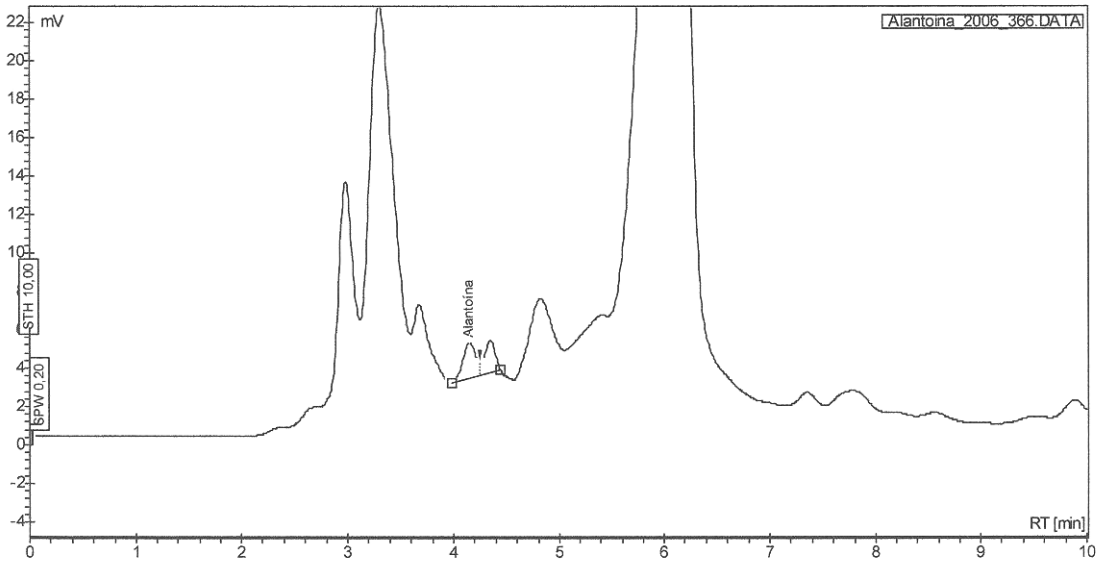
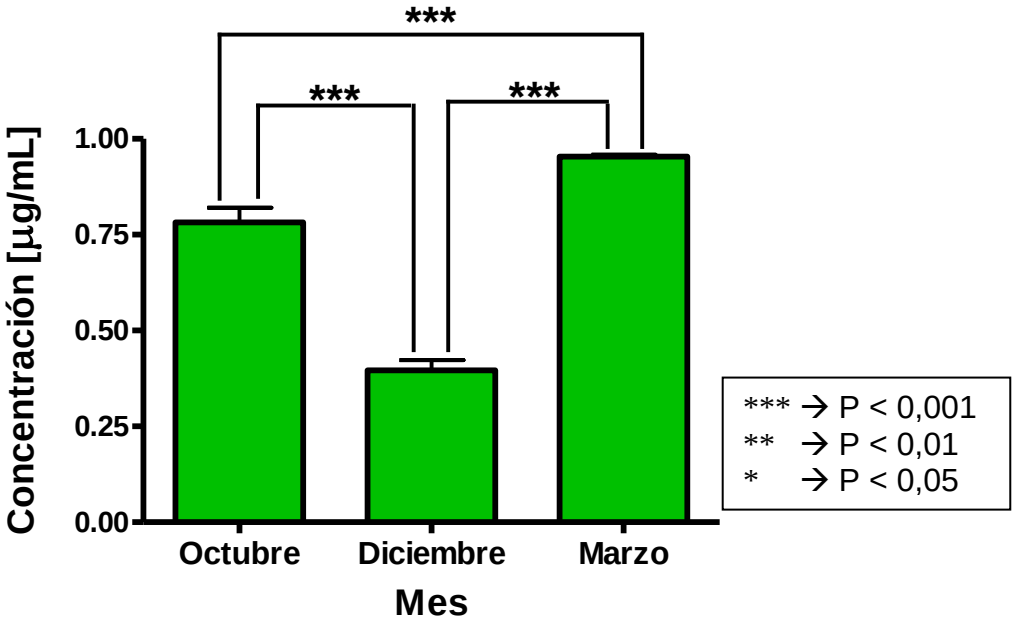


Gráfico Nº 5: Concentración de alantoína en baba de caracoles *Helix aspersa* Müller alimentados con vegetales, según mes de extracción.



6.2.1.4 Alantoína total por alimentación

Gráfico Nº 6: Concentración total de alantoína en baba de caracoles *Helix aspersa* Müller, según alimentación.

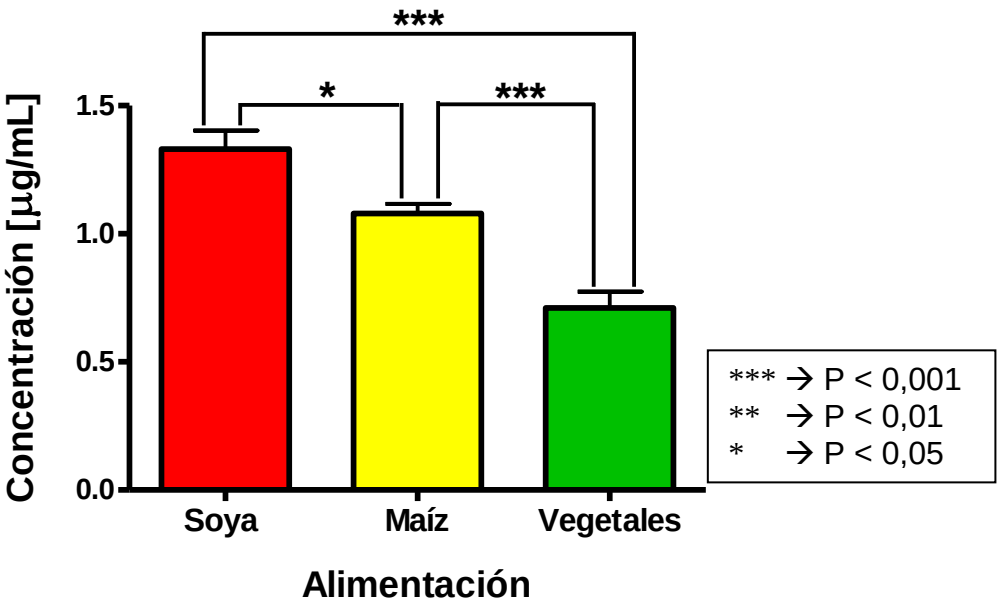
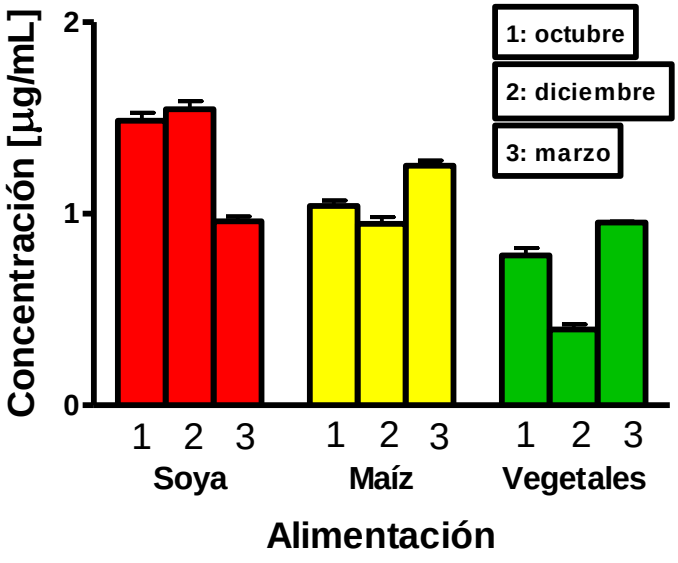


Gráfico Nº 7: Concentraciones de alantoína en baba de caracoles *Helix aspersa* Müller, por alimentación y mes de extracción.



6.2.1.5 Alantoína según mes de extracción.

Gráfico Nº 8: Concentración de alantoína en baba de caracoles *Helix aspersa* Müller en el mes de octubre y diferente alimentación.

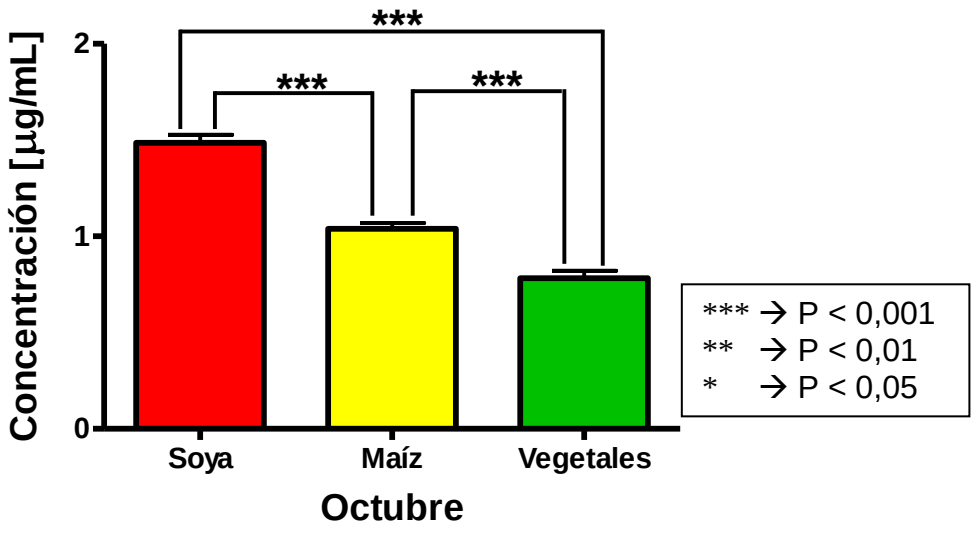


Gráfico Nº 9: Concentración de alantoína en baba de caracoles *Helix aspersa* Müller en el mes de diciembre y diferente alimentación.

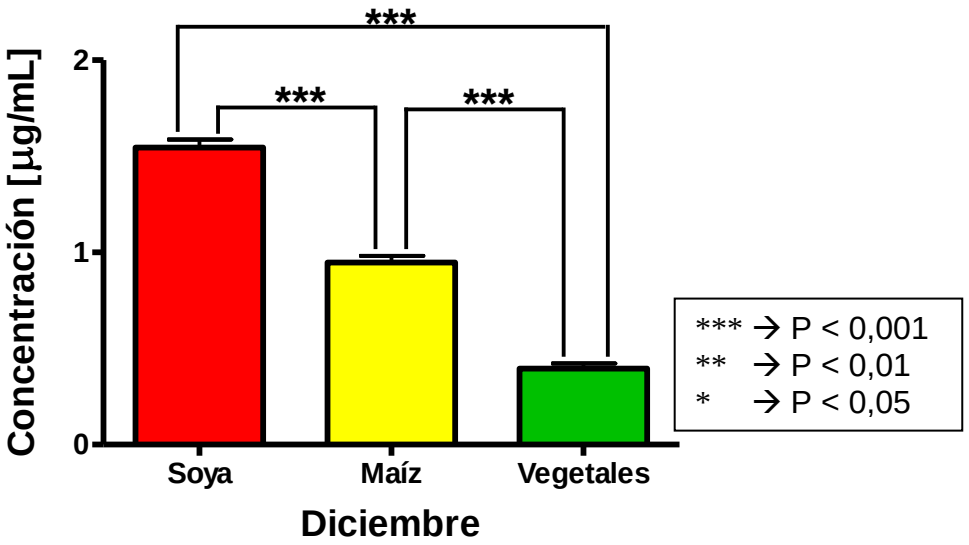
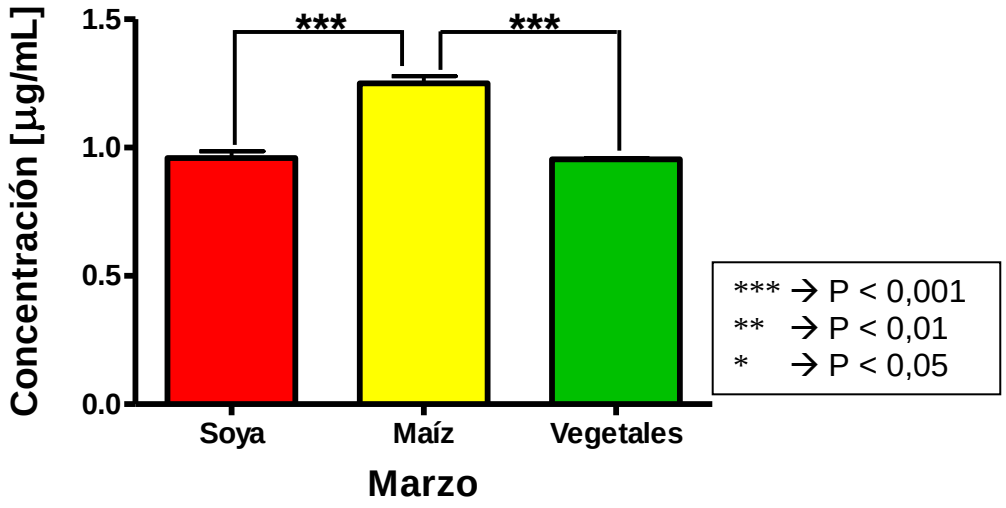


Gráfico Nº 10: Concentración de alantoína en baba de caracoles *Helix aspersa* Müller en el mes de marzo y diferente alimentación.



6.2.1.6 Alantoína total por alimentación

Gráfico Nº 11: Concentración total de alantoína en baba de caracoles *Helix aspersa* Müller, según mes de extracción.

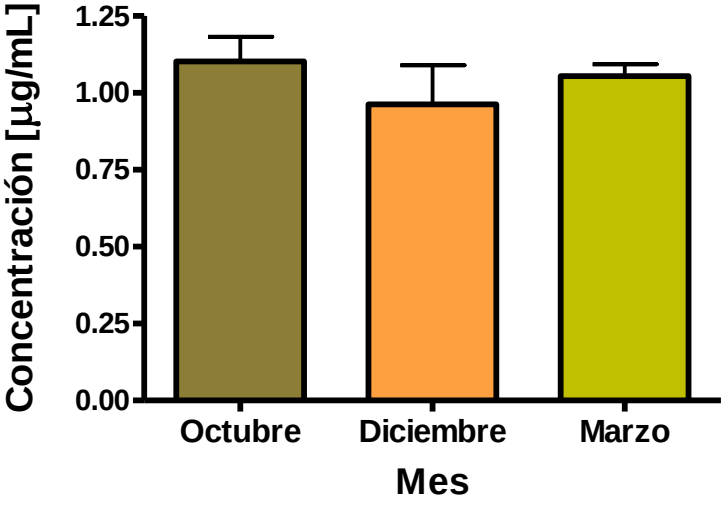


Gráfico Nº 12: Concentración de alantoína en baba de caracoles *Helix aspersa* Müller por mes de extracción y alimentación.

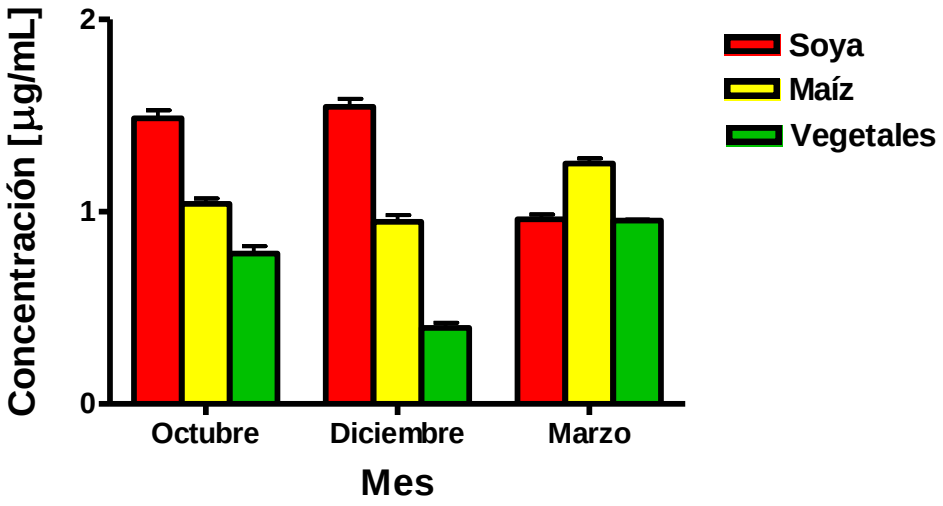


Tabla Nº 13: Concentraciones de alantoína en cada una de las muestras de secreción de caracol *Helix aspersa* Müller.

Alimentación / Mes Extracción	Concentración Alantoína en caracoles alimentados con Harina de Soya [µg/mL]	Concentración Alantoína en caracoles alimentados con Harina de Maíz [µg/mL]	Concentración Alantoína en caracoles alimentados con Vegetales [µg/mL]	Promedio Mes Extracción [µg/mL]
Octubre	1,49	1,04	0,78	1,10
Diciembre	1,54	0,95	0,40	0,96
Marzo	0,96	1,25	0,95	1,04
Promedio Alimentación [µg/mL]	1,33	1,08	0,71	

7 DISCUSIÓN

7.1 Efecto de la alimentación

La síntesis de nucleótidos de purina se puede llevar a cabo por dos caminos, la formación de nuevos nucleótidos o el rescate de estos a partir de los productos del metabolismo de las purinas. En la mayoría de los organismos vivos, la síntesis de nuevos nucleótidos de purina y pirimidina es casi idéntica, compartiendo ambos varios precursores trascendentales para la síntesis de estos. Entre los precursores más importantes se encuentran el fosforribosil pirofosfato, los aminoácidos glicina, ácido glutámico y ácido aspártico (Nelson y Cox, 2005). Dentro de los productos del metabolismo de las purinas, se encuentra la alantoína, componente detectado y cuantificado en la secreción del caracol *Helix aspersa* Müller (Manosalva, 2005). Sin embargo, no se han encontrado estudios que describan el mecanismo por el que se produce y excreta la alantoína en la baba de caracol. Es por ello que la presencia de alantoína, en la secreción, pudiera explicarse por la capacidad del hepatopáncreas del caracol para sintetizar purinas y por la presencia de los aminoácidos precursores de éstas, glicina, ácido glutámico y ácido aspártico en cada una de las alimentaciones que recibieron los caracoles, con la posterior formación de alantoína como uno de los productos intermediarios del catabolismo de las purinas. Otra teoría que podría explicar la presencia de alantoína en la baba de caracol es que ésta se encuentre en el alimento, y que el caracol excrete la porción no utilizada a través de ella.

De los alimentos proporcionados se ha descrito la presencia de alantoína en las hojas y frutos de la soya (Thomas y Schrader, 1981) y en algunos híbridos de maíz (Maksimović *et al*., 2004), sin encontrase descripciones de la presencia de alantoína en

las hojas de lechuga y repollo. Observaciones de Heller y Magaritz (1983) demostraron que las variaciones, en la disponibilidad, de los componentes necesarios para la formación del caparazón, según la estacionalidad, se reflejaban en la cantidad de estos en dicha estructura. Considerando lo anterior, más el hecho que el caparazón sea reparado con los componentes presentes en la secreción, se sustentan los resultados obtenidos en los parámetros evaluados.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la presencia de alantoína en todas las muestras analizadas y la variación de su concentración según la alimentación. En la tabla Nº 13 y gráficos Nº 8, 9 y 10 se pueden observar las diferencias en las concentraciones de alantoína en la baba de caracoles, obtenidas con las diferentes alimentaciones proporcionadas, durante cada período del ciclo activo. La harina de soya y la harina de maíz son las que poseen en mayor cantidad los aminoácidos precursores de purinas antes mencionados (FAO, 1970). Esto se refleja en los resultados obtenidos en cada período, cuyas diferencias son extremadamente significativos ($P < 0,001$) entre todas las alimentaciones estudiadas, y que apoyan la teoría antes mencionada, excepto en el mes de marzo, en el cual no hay diferencias significativas entre las concentraciones de alantoína obtenidas con las alimentaciones a base de harina de soya y vegetales.

En la tabla Nº 13 y gráfico Nº 6 se pueden apreciar las variaciones que presenta la concentración de alantoína en la baba de caracoles, con cada alimentación proporcionada, durante los tres meses en que fue evaluada. Estas diferencias son extremadamente significativas ($P < 0,001$) entre las alimentaciones harina de soya-

vegetales y harina de maíz-vegetales y altamente significativa ($P < 0,05$) entre las alimentaciones harina de soya-harina de maíz.

Se debe considerar la posibilidad de que la alimentación proporcionada aporte la alantoína, los nucleótidos de purina o alguno de los derivados de su metabolismo, de manera directa, sin requerir necesariamente la síntesis de nuevas purinas y posterior metabolismo de éstas para obtenerla.

7.2 Efecto del período de extracción

El desarrollo del caracol involucra una etapa de actividad que comienza luego del período de hibernación que forma parte de su ciclo de vida. Este proceso de volver a la actividad ha demostrado que el organismo del caracol trata de recuperarse y adaptarse metabólicamente, de forma muy rápida, a las nuevas condiciones a que se ve expuesto. Esto último incluye el aumento de algunas especies reactivas del oxígeno (ROS) y de su capacidad antioxidante, debido al estrés oxidativo que produce la inactividad, al despertar en invierno (Ramos-Vasconcelos *et al*., 2003). Sin embargo, en verano no se observó un aumento del estrés oxidativo (Ramos-Vasconcelos *et al*., 2003), lo que sugiere la presencia de cambios metabólicos estacionales adaptativos para la regulación de las enzimas del metabolismo oxidativo en caracoles inactivos y activos.

En la tabla Nº 13 y gráficos Nº 3, 4 y 5 se pueden observar las variaciones en las concentraciones de alantoína, obtenidas durante cada período del ciclo activo, con cada una de las diferentes alimentaciones proporcionadas. Las concentraciones de alantoína muestran un comportamiento similar en las alimentaciones con harina de maíz y

vegetales, disminución en el mes de diciembre y aumento en marzo nuevamente, respecto al mes de octubre, siendo más notorio con la alimentación a base de vegetales, pero en concentraciones menores. Lo contrario ocurre con la alimentación a base de harina de soya, la cual aumenta en el mes de diciembre y disminuye en el mes de marzo. Estos resultados han impedido establecer una explicación razonable para este comportamiento, pero pudiera deberse a las modificaciones metabólicas que el caracol realiza acorde a la estacionalidad, manifestándose esto en la composición de su secreción. Las diferencias entre las concentraciones de alantoína obtenidas son extremadamente significativas ($P < 0,001$) para todos los períodos estudiados con la alimentación a base de vegetales. Del mismo modo, se observaron diferencias extremadamente significativas ($P < 0,001$) con la alimentación a base de harina de maíz, excepto entre los meses de octubre y diciembre, en donde se obtuvieron diferencias altamente significas ($P < 0,01$). Con la alimentación en base de harina de soya, las diferencias también son estadísticamente significativas ($P < 0,001$), con la excepción de la comparación octubre-diciembre, en la que no hay diferencias significativas.

En la tabla Nº 13 y gráfico Nº 11 se pueden apreciar las variaciones que presenta la concentración alantoína, en cada período del estudio, considerando todas las alimentaciones proporcionadas. En este caso no se producen diferencias significativas en la concentración de alantoína presente en la secreción del caracol.

Las diferencias en la concentración de alantoína, durante cada período de extracción, pude ser un indicador de que el metabolismo del caracol va cambiando a medida que avanza su período de actividad. En septiembre u octubre está comenzando el período

activo de los caracoles y el nivel de actividad que posea cada individuo va a depender de su edad, tamaño y/o estado nutricional en que se encuentre luego del período de inactividad que le antecede.

Si bien se esperaba que las concentraciones de alantoína en las muestras obtenidas pudieran haber sido mayores a los 5,48 µg/mL (Manosalva, 2005), encontrados en un estudio anterior y considerando que en aquel estudio se utilizó un método de extracción de baba mediante estimulación con agua, obteniéndose muestras diluidas, y en este estudio la extracción se realizó con estimulación directa del pie del caracol sin provocar dilución de las muestras. Sin embargo, las concentraciones de alantoína obtenidas en cada una de las muestras analizadas fueron inferiores a las determinadas en el estudio antes mencionado, lo que podría indicar que los caracoles no producen alantoína en forma constante y que tanto la alimentación, período de extracción y condiciones de mantenimiento de los caracoles influyen en la calidad y composición de la secreción pedia. De haber proporcionado una alimentación balanceada con los requerimientos nutricionales mínimos para un óptimo desarrollo de los caracoles, se hubiera permitido que los caracoles no extremaran recursos metabólicos para rescatar y obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo. Esto podría explicar la menor concentración de alantoína en la secreción de caracoles alimentados con vegetales debido a la menor cantidad de precursores aminoacídicos presentes en ésta y el subsecuente rescate de los productos del metabolismo de las purinas para poder resintetizarlas a falta de los precursores necesarios, pudiendo explicar de esta manera la menor concentración de alantoína obtenida en este estudio para caracoles del mismo criadero.

Además de las variaciones de alantoína en la secreción, se pudieron observar cambios en la coloración de cada una de las muestras obtenidas (Anexo Nº 1, figura Nº 12), lo que concuerda con uno de los estudios realizados por Campion (1967) quien demostró una correlación entre la cantidad de flavonas eliminadas, a través de la secreción del caracol, y la cantidad de alimento verde que comían. Asimismo, hubo diferencias en la cantidad de producto seco obtenido luego del proceso de liofilización (Tabla Nº 3).

Finalmente, vale la pena destacar que en los criaderos de caracoles no siempre se respeta su ciclo de actividad-hibernación y que el tipo de alimentación de estos puede variar considerablemente de un criadero a otro, por lo que las concentraciones de alantoína son representativas de un productor de baba en particular. Esto hace difícil poder comparar babas de distintos proveedores. Por lo tanto, este estudio es representativo de este productor en particular.

Actualmente, el Instituto de salud Pública de Chile (ISPCh), sólo exige que se investigue presencia de alantoína en las babas utilizadas para elaborar cremas cosméticas. Por lo demás, no existe un método analítico internacionalmente aprobado para la cuantificación de alantoína en baba de caracol.

8 CONCLUSIONES

- Se confirmó la presencia de alantoína en todas las muestras de baba de caracol *Helix aspersa* Müller procedentes del criadero de caracoles ubicado en Caulín, Comuna de Ancud, Isla de Chiloé, Chile.
- La concentración promedio de alantoína obtenida en la secreción de caracol *Helix aspersa* Müller en el inicio, mitad y término de su ciclo activo fue de 1,03; 0,96 y 1,05 µg/mL, respectivamente.
- La concentración promedio de alantoína obtenida en la secreción de caracol *Helix aspersa* Müller con la alimentación a base de harina de maíz, harina de soya y vegetales durante el ciclo activo fue de 1,33; 1,08 y 0,71 µg/mL, respectivamente.
- La alimentación con que se obtuvo la mayor concentración de alantoína en la secreción de caracoles *Helix aspersa* Müller en el inicio, mitad y término de su ciclo activo fue harina de soya (1,48 µg/mL), harina de soya (1,54 µg/mL) y harina de maíz (1,25 µg/mL), respectivamente. Por lo tanto, el período del ciclo activo en que se encuentre el caracol *Helix aspersa* Müller influye en la concentración de alantoína presente en su secreción.
- El período del ciclo en que se obtuvo la mayor concentración de alantoína en la secreción de caracoles *Helix aspersa* Müller alimentados con harina de soya, harina de maíz y vegetales fue en el mes de diciembre (1,54 µg/mL), el que corresponde a la mitad de su ciclo activo; marzo (1,25 µg/mL), el que corresponde al término de su ciclo activo y diciembre (0,95 µg/mL), el que

corresponde al término de su ciclo activo, respectivamente. Por lo tanto la alimentación influye en la concentración de alantoína presente en la secreción de caracoles *Helix aspersa* Müller.

- Los caracoles no producen alantoína en forma constante y factores como el tipo de alimentación y período estacional influyen en la cantidad de alantoína presente en la baba de caracol. Por lo tanto, se acepta la hipótesis planteada.

9 PROYECCIONES

- Este estudio permitiría estimar la cantidad de alantoína presente en la secreción del caracol utilizando diferentes mezclas y proporciones de alimentos.
- Este tipo de estudio puede ser aplicado a otros de los componentes presentes en la baba como proteínas, vitaminas, etc., de manera de determinar si también son influenciados por factores como estacionalidad y alimentación.

10 REFERENCIAS

1. Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). (1990) Guía para la determinación de humedad residual en productos biológicos deshidratados. Centro Para la Evaluación e Investigación Biológica, FDA.

2. Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). (2007) Código de Regulaciones Federales 21CFR347 [en línea]. Centro de Dispositivos y Salud Radiológica. FDA. [Fecha de consulta: 20 Diciembre 2007]

Disponible en:

http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=347%showFR=1&subpartNode=21:5.0.1.1.21.2

Fecha de última actualización: 1 abril 2007.

3. Ansart, A., Vernon, P. y Daguzan, J. (2001) Photoperiod is the main cue triggers supercooling ability in the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda: Helicidae). *Criobiology*. 42: 206-273.

4. Attia, J. (2004). Behavioural Rhythms of Land Snails in the Field. *Biological Rhythm Research*. 35 (1-2): 35–41.

5. Aupinel, P. y Bonnet, J.C. (1996) Influencia del fotoperíodo sobre la actividad estacional del caracol Petit-gris (*Helix aspersa Müller*). Efecto específico sobre el crecimiento y la reproducción. *INRA Production Animales*. 9 (1), 79-83.

6. Bailey, S.E.R. (1981) Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa Müller* and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. *Journal of Comparative Physiology A*. 142: 89-94.

7. Benito, M. (2004) Evaluación técnica económica de una crianza intensiva de caracoles (*Helix aspersa*). Tesis Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. Pp. 3, 6.

8. Berk, Z. (1992) Technology of production of edible flours and protein products from soybeans [en línea]. Roma: FAO. [Fecha de consulta: 20 septiembre 2007] Boletín de Servicios Agrícolas.
Disponible en: http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e02.htm#1.6

9. Biannic, M., Coillot, J.P. y Daguzan, J. (1995) Circadian cardiac rhythm in relation to environmental variables in the snail *Helix aspersa Müller*. *Journal of Molluscan Studies*. 61:289-292.

10. Bustamante, J. (2004) Antecedentes generales de la alimentación de caracoles de tierra *Helix aspersa*. [Fecha de consulta: 10 septiembre de 2007]
Disponible en: http://www.helix.cl/helix.htm#
[Fecha última actualización: 2 marzo 2007]

11. Campion, M (1961) The structure and function of the cutaneous glands in *Helix aspersa*. *Quarterly Jorunal of Microscopical Science*. 102:195-216.

12. Chan, B., Ji, S., Koveal, C. y Hosoi, A.E. (2007) Mechanical Devices for Snail-like Locomotion. *Journal of Intelligent Material Systems and Structures.* 18(2), 111-116.

13. Clark, S. y Rudolph, F. (1979) Purine biosynthesis in *Helix aspersa*: metabolic fate of labeled precursors. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 63(B), 369-371.

14. Cockrum, E. y McCauley, W. (1967) Zoología. Ed. Interamericana. México. Pp 214, 216.

15. Cosméticos Elicina [en línea]

Disponible en:

http://www.elicina.com/esp-crema-de-caracol.php

http://elicina.com/esp-coaniquem-1.php

[Fecha de consulta: 23 septiembre de 2007]

16. Davies, M.S., Jones, H.D., and Hawkins, S.J. (1990) Seasonal variation of pedal mucus from *Patella vulgata L. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 144, 101-112.

17. Denny, M.W. (1984) Mechanical properties of pedal mucus and their consequences for gastropod structure and performance. *Amererican Zoologist.* 24, 23-36.

18. Ferrer, R. y Valenzuela, M.A. (2006) Determinación y cuantificación de alantoína en baba de caracol *Helix aspersa Müller* mediante electroforesis capilar. Resumen. XLIX reunión anual de la Sociedad de biología de Chile. *Biological Research.* 39(4B) (in Press).

19. Fournié, J. y Chétail, M. (1984) Calcium dynamics in land gastropods. *American Zoologist.* 24, 857-870.

20. Heller, J. y Magaritz, M. (1983) From where do land snails obtain the chemicals to build their shells?. *Journal of Molluscan Studies.* 49, 116-121.

21. Herreid, C. (1977) Metabolism of lan snails (*Otala laceta*) during dormancy, arousal, and activity. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 56(A): 211-215.

22. Hickman, C., Roberts, L. y Larson, A. (2002) Principios integrales de Zoología. 11ª. Ed. McGraw- Hill Interamericana, España. Pp 329.

23. Iglesias, J., Santos, M. y Castillejo, J. (1996) Annual activity cycles of the land snail *Helix aspersa Müller* in natural populations in north-western Spain. *Journal of Molluscan Studies*. 62,495-505.

24. Lazaridou-Dimitriadou, M. y Saunders, David S. (1986) The influence of humidity, photoperiod, and temperature on the dormancy and activity of *Helix lucorum L.* (gastropoda, pulmonata). *Journal of Molluscan Studies*. 52, 180-189.

25. Lissmann, H.W. (1945) The mechanism of locomotion in gastropod molluscs II. Kinetics. *Journal of Experimental Biology*. 22: 37-50.

26. Maksimović, Z., Malenović, A., Jančić, B. y Kovačević, N. (2004) Quantification of allantoin in various Zea mays L. hybrids by RP–HPLC with UV detection. *Pharmazie*. 59(7), 524-527.

27. Manosalva, C. (2005) Desarrollo, implementación y validación de una metodología analítica por HPLC para la identificación y cuantificación de alantoína en baba de caracol chileno (*Helix aspersa Müller*). Tesis Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

28. Martin, A. y Deyrup-Olsen, I. (1986) Function of the epithelial channel cells of the body wall of a terrestrial slug, *Ariolimax columbianus*. *Journal of Experimental Biology.* 121, 301-314.

29. Metref, S., Rousseau, D., bentaleb, I. y Vianey-Liaud, M. (2003) Study of the diet effect on $\delta^{13}C$ of shell carbonate of the land snail *Helix aspersa* in experimental conditions. *Earth and Planetary Science Letters*. 211(3-4), 381-393.

30. Moffet, S. (1979) Locomotion in the primitive pulmonate snail *Melampus bidentadus*: foot structure and function. *Biological* Bulletin. 157: 306-319.

31. Nelson, D. y Cox, M. (2005) Lenhinger Principios de Bioquímica. 4ª Ed. Omega, España. Pp 864-875.

32. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Contenido en aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas [en línea] (1970). Roma: FAO. Estudios Nutricionales.

[Fecha de consulta: 20 septiembre de 2007].

Disponible en:

http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T04.htm

http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T14.htm

http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T29.htm

http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T33.htm

33. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). El maíz en la nutrición humana [en línea] (1993). Roma: FAO, Capítulo 2. Alimentación y nutrición. [Fecha de consulta: 20 septiembre 2007].

Disponible en:

http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S03.htm#Contents

ISBN: 9253030135

34. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Fichas técnicas *Lactuca sativa* L. y *Brassica Oleracea* C. [en línea]. FAO. [Fecha de consulta: 21 septiembre 2007]. [Año de última actualización: 2006].

Disponible en:

http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/LECHUGA.htm

http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/REPOLLO.htm

35. Pawlicki, J.M., Pease, L.B., Pierce, C.M., Startz, T.P., Zhang, Y. y Smith, A.M. (2004) The effect of the molluscan glue proteins on gel mechanics. *The Journal of Experimental Biology.* 207, 1127-1135.

36. Perea, J.M., Delgado, M., Mayoral, A., Martín, R. y García. (2004) Efecto de la adición de carbonato cálcico en la dieta de *Helix aspersa Müller*. *Archivos de Zootecnia.* 53, 407-410.

37. Quattrocchi, O.A., Abelaira de Andrizzzi, S.A. y Laba, R.F. (1992) Introducción a HPLC. Aplicación y práctica. Ed Artes Gráficas Farro. Buenos Aires, Argentina**.** Pp: 204, 206, 242, 321-323.

38. Ramos-Vasconcelos, G. y Hermes-Lima, M. (2003) Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land *Helix aspersa*. *Journal of Experimental Biology.* 206, 675-685.

39. Ramos-Vasconcelos, G., Cardoso, L. y Hermes-Lima, M. (2005) Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snail *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology C.* 140, 165-174.

40. RonaCare® Alantoína [en línea]

Disponible en:

http://www.merck.de/servlet/PB/menu/1393640/index.html

[Fecha de consulta: 27 septiembre de 2007]

[Fecha última actualización: 17 enero de 2006]

41. Ruppert, E. y Barnes, R. (1996) Zoología de los invertebrados.61ª.Ed. McGraw-Hill Interamericana, México.Pp 414, 420.

42. Selck, H., Aufderheide, J., Pounds, N., Staples, C., Caspers, N. y Forbes, V. (2006) Effects of food type, feeding frequency, and temperature on juvenile survival and growth of *Marisa cornuarietisk* (Mollusca: Gastropoda). *Invetebrate Biology.* 125(2), 106-116.

43. Skingsley, D.R., White, A.J. y Weston, A. (2000) Analysis of pulmonate mucus by infrared spectroscopy. *Journal of Molluscan Stududies.* 66,363-371.

44. Thomas, R. y Schrader, L. (1981) The assimilation of ureides in shoot tissues of soybeans. *Plant Physiology.* 67, 973-976.

45. Tribó-Boixareu, M. J., Parrado-Romero, C., Rais, B., Rius-Díaz, F., González-Rodríguez, S. y Vitale-Villarejo, M.A. (2004) Resultados preliminares de la eficacia del tratamiento intensivo con la secreción de *Crypthopalus aspersa* (SCA) en la terapéutica del fotoenvejecimiento cutáneo. *Medicina Cutanea Ibero- Latino-Americana.* 32(6), 265-270.

46. Verdugo, P., Deyrup-Olsen, I., Aitken, M., Villalon, M. y Johnson, D. (1987) Molecular mechanism of mucin secretion: I. the role of intragranular charge shielding. *Journal of Dental Research.* 66(2), 506-508.

11 ANEXOS

11.1 Anexo Nº 1: Figuras

Figura Nº 1: Caracol *Helix aspersa* Müller.
(Fuente: http://www.blog.sekano.org)

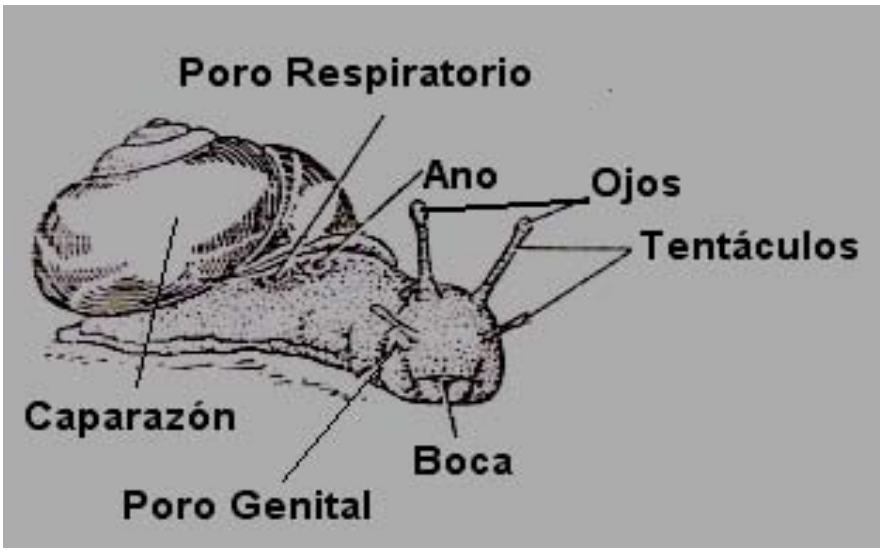


Figura Nº 2: Visión externa del caracol *Helix aspersa* Müller.

Figura Nº 3: Caparazón del caracol *Helix aspersa* Müller.
(Fuente: http:// www.carnegiemnh.org)

Figura Nº 4: Pié del Caracol *Helix aspersa* Müller.
(Fuente: http://www.aukcja.onet.pl)

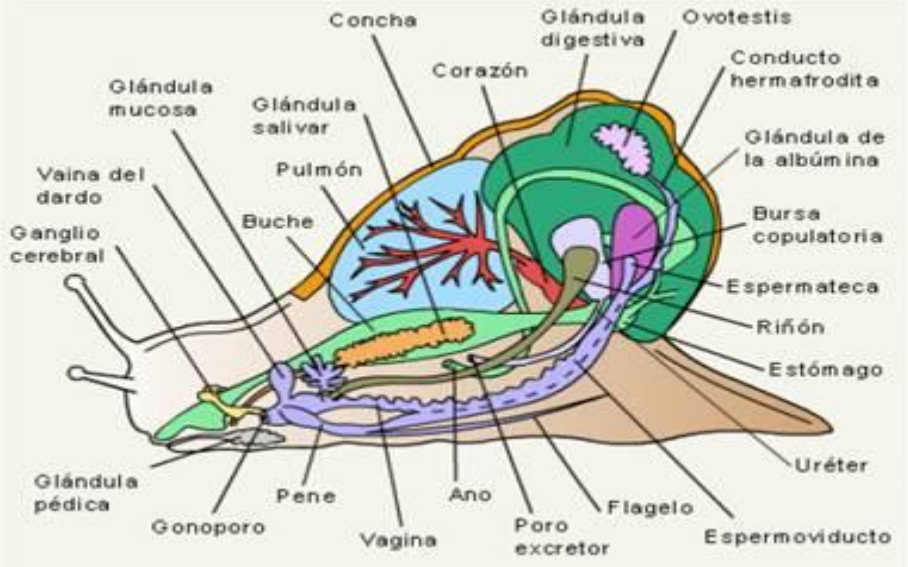


Figura Nº 5: Anatomía interna del caracol *Helix aspersa* Müller.
(Fuente: http://www.cuencarural.com)

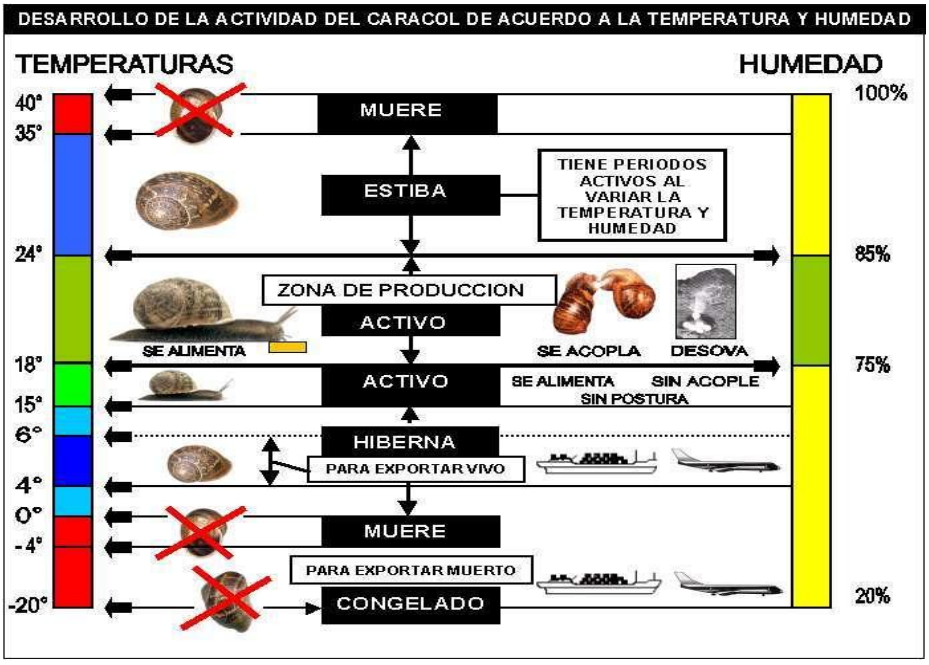


Figura Nº 6: Ciclos de vida del caracol *Helix aspersa* Müller y factores influyentes.
(Fuente: http://www.cedeha.com)

Figura Nº 7: Caracol desovando.
(Fuente: http://www.caulinlodge.cl)

Figura Nº 8: Epifragma formado en la apertura del caparazón.
(Fuente: http://www.arnobrosi.com)

Figura Nº 9: Caracol *Helix aspersa* Müller secretando baba.
(Fuente: http://www.skin-care.cl)

Figura Nº 10: Caracol adherido a un sustrato.
(Fuente: http:// www.botanical-online.com)

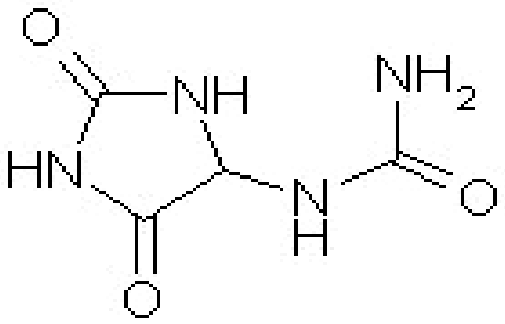


Figura Nº 11: Molécula de alantoína.
(Fuente: http://www.merck.de)

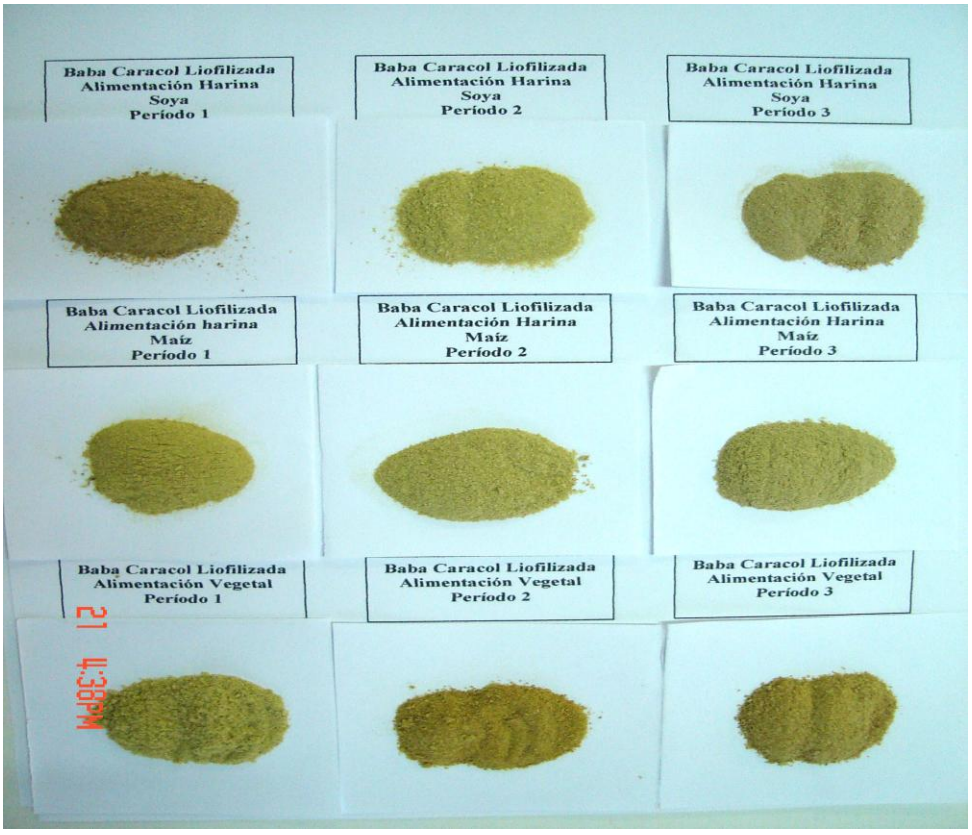


Figura Nº 12: Baba de caracol *Helix aspersa* Müller liofilizada.

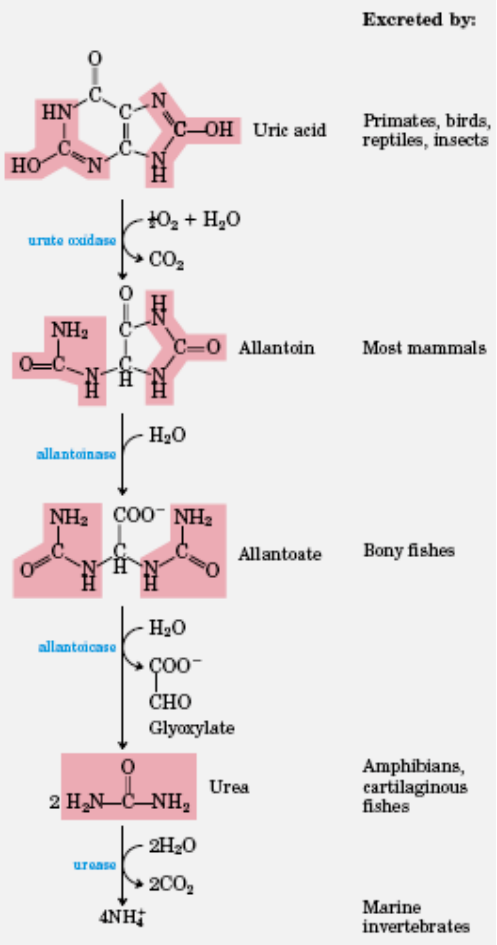


Figura Nº 12: Productos finales del metabolismo de las purinas**.**
(Fuente: Nelson y Cox, 2005. Principios de Bioquímica)

11.2 Anexo Nº 2: Tablas

Tabla Nº 1: Composición aminoacídica del maíz (*Zea maiz*).

Isoleucina	**Leucina**	**Lysina**	**Metionina**	**Cystina**	**Fenilalanina**
230	783	167	120	97	305
Tirosina	**Treonina**	**Triptófano**	**Valina**	**Arginina**	**Histidina**
239	225	44	303	262	170
Alanina	**Ácido Aspártico**	**Ácido Glutámico**	**Glicina**	**Prolina**	**Serina**
471	392	1184	231	559	311

mg/g total de nitrógeno. (FAO, 1970)

Tabla Nº 2: Composición aminoacídica del poroto de soya (*Glycine max*).

Isoleucina	**Leucina**	**Lisina**	**Metionina**	**Cystina**	**Fenilalanina**
284	486	399	79	83	309
Tirosina	**Treonina**	**Triptófano**	**Valina**	**Arginina**	**Histidina**
196	241	80	300	452	158
Alanina	**Ácido Aspártico**	**Ácido Glutámico**	**Glicina**	**Prolina**	**Serina**
266	731	1169	261	343	320

mg/g total de nitrógeno. (FAO, 1970)

Tabla Nº 3: Composición aminoacídica de las hojas de repollo (*Brassica oleracea capitata*).

Isoleucina	**Leucina**	**Lisina**	**Metionina**	**Cystina**	**Fenilalanina**
193	331	194	65	70	189
Tirosina	**Treonina**	**Triptófano**	**Valina**	**Arginina**	**Histidina**
115	235	-	263	519	159
Alanina	**Ácido Aspártico**	**Ácido Glutámico**	**Glicina**	**Prolina**	**Serina**
316	409	544	297	228	258

mg/g total de nitrógeno. (FAO, 1970)

Tabla Nº 4: Composición aminoacídica de las hojas de lechuga (*Lactuca sativa*).

Isoleucina	**Leucina**	**Lisina**	**Metionina**	**Cystina**	**Fenilalanina**
238	394	238	112	-	319
Tirosina	**Treonina**	**Triptófano**	**Valina**	**Arginina**	**Histidina**
169	256	-	338	281	100
Alanina	**Ácido Aspártico**	**Ácido Glutámico**	**Glicina**	**Prolina**	**Serina**
269	719	638	256	325	206

mg/g total de nitrógeno. (FAO, 1970)

11.3 Anexo Nº 3: Glosario de abreviaturas

º C: Grados Celcius.

Nº: Número.

g: Gramos.

$\overline{X}$: Promedio.

µ: Micrón.

µg: Microgramo.

µL: Microlitro.

µm: Micrómetro.

µg/mL: Micrógramos por mililitro.

mg: miligramos.

min: Minuto.

mL: Mililitro.

mV: Milivolt.

pH: Grado de acidez o alcalinidad de una disolución**.**

rpm: revoluciones por minuto.

mg/g: Miligramos por gramo.

mVxmin: Milivolt por minuto.

FD: Factor de dilución.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación**.**

FDA: Food and Drugs Administration.

HPLC: High Performance Liquid Chromatograpy (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia).

ISPCh: Instituto de Salud Pública de Chile.

TCA: Ácido tricloroacético**.**

DS: Desviación estándar.

F.O: Fase orgánica.

UV: Ultra violeta.