



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**“DETERMINACIÓN DE ALANTOÍNA EN BABA DE
CARACOL, MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR Y SU
RELACIÓN CON EL CONSUMO DE PURINAS”**

ROCÍO FERRER SACRISTÁN

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : MARÍA ANTONIETA VALENZUELA
PROFESOR CONSEJERO: LAURA HUAQUIN MORA
PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS CAAMAÑO

SANTIAGO, CHILE

2007

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los maestros que he tenido en el curso de mi carrera que han permitido mi desarrollo integral y profesional, desde un punto de vista científico, ético, valórico y personal.

Gracias a mi familia y una especial gratitud a mi papá que me acercó a los animales, y me dio la vida. A mi hermana Katy, por confiar siempre en mí, y darme su amistad ante todas las cosas.

Dra. Antonieta Valenzuela, muchísimas gracias por su gran apoyo, alegría, simplicidad, por ser tan integradora y paciente; Solidaria y una gran persona, ha permitido que mi sueño se haga realidad.

Agradezco a todos los profesores de Medicina Veterinaria, que me dieron los conocimientos, tiempo y paciencia. Particularmente Dr. Arancibia, por su confianza y amistad.

Muchas gracias a todas mis amigas y amigos, con los cuales estudié y pasé los buenos y malos momentos que esta carrera trae consigo, por ser tan alegres, esforzados, humanos y animales.

A mi marido, Juan Pablo, por estar en todo siempre.

ÍNDICE

ABSTRACT	
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
II.1. Origen de los caracoles en América	3
II.2. Chile y ventajas comerciales sobre <i>Helix aspersa</i>	4
II.3. <i>Helix aspersa</i> y su alto valor nutricional	5
II.4. Origen, anatomía y fisiología	6
II.5. Clasificación taxonómica de <i>Helix aspersa</i>	7
II.6. Órganos y fisiología	8
II.7. El caracol y la medicina	10
II.8. Dietas y Requerimientos de <i>Helix aspersa</i>	13
II.9. Métodos tradicionales de determinación de Alantoína	14
II.10. Técnica de electroforesis capilar, método alternativo para determinación de Alantoína	15
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVO GENERAL	17
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
VI. MATERIALES	18
VII. MÉTODO	19
VII.1. Determinación del número muestral y grupos de experimentación	19
VII.2. Obtención de Baba de caracol <i>Helix aspersa Müller</i>	20
VII.3. Preparación de la muestra	21
VII.4. Determinación y Cuantificación de derivados de purinas en baba	21
VII.5. Cuantificación del contenido de proteínas en la baba de caracol	22
VII.6. Análisis estadísticos	22
VIII. RESULTADOS	23
VIII.1. Dietas otorgadas	23
VIII.2. Determinación de curvas estándares de Alantoína, Xantina y Hipoxantina	23
VIII.3. Análisis en baba de caracol	26
VIII.4. Contenido y análisis estadístico de Alantoína en baba de caracol expresado por el contenido de proteínas	26
VIII.5. Contenido y análisis estadístico de Alantoína expresado por volumen de baba	30
VIII.6. Determinación de otros derivados del metabolismo de las purinas en baba de caracol: Xantina e Hipoxantina	32
VIII.6.1. Xantina	32
VIII.6.2. Contenido y análisis estadístico de Xantina expresado por volumen de baba	35
VIII.6.3. Hipoxantina	36
VIII.6.4. Contenido y análisis estadístico de Hipoxantina expresado por volumen de baba	38
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
IX.1. Ventajas y desventajas de electroforesis capilar	41
IX.2. Efectos de la dieta sobre el contenido de derivados púricos en baba de caracol	42
IX.3. Alantoína, cosmetología y farmacia	43

X. CONCLUSIÓN	46
XI. BIBLIOGRAFÍA	49

INDICE de Figuras, Tablas, Cuadros y Anexo

Fig.1. Esquema de degradación de purinas (Voet y Voet, 1995).	11
Fig.2. Esquema de conversión de Hipoxantina a Alantoína. (Gus'kov <i>et al.</i> , 2001).	11
Fig.3. Degradación de ácido úrico a amoniaco vía Alantoína. Enzimas que catalizan la degradación de cada producto se muestran en negrita. Especies que excretan cada producto se muestran en itálico (Alfazema, 1998 y Voet, 1995).	13
Fig. 4. Electroferograma muestra la separación de siete estándares utilizando CZE y MECC, con tetraborato de sodio 30 mM, pH 10,0 y % SDS, y efectuando la corrida electroforética a 20°C, con un voltaje de 20 KV, y utilizando una detección a 195 nm (Alfazema <i>et al.</i> , 1998).	16
Fig.5 Electroferograma muestra la separación de tres estándares: (a) Alantoína, (b) Hipoxantina y (c) Xantina; Utilizando MECC, con tetraborato de sodio 30 mM, pH 10,0 y % SDS, y efectuando la corrida electroforética a 30°C, con un voltaje de 20 KV, y utilizando una detección a 195 nm.	22
Fig. 6. Electroferograma de estándar de Alantoína.	24
Fig.7. A, B, C. Curvas de calibración de Alantoína, Hipoxantina y Xantina. Área del pick otorgado por el electroferograma/concentración mg/ml de estándar conocido.	25
Fig. 8. Electroferograma de baba de caracol con y sin estándar de Alantoína	26
Fig.9. Electroferograma de baba de caracol en presencia y ausencia de Xantina	33
Fig.10. Electroferograma de baba de caracol en presencia y ausencia de Hipoxantina	36
Fig.11. Curva de determinación de normalidad de Alantoína, en 19 caracoles en ayuno	47
Fig.12. Curva de determinación de normalidad de Alantoína, en 20 caracoles alimentados con soya	48
Fig.13. Curva de determinación de normalidad de Alantoína, en 18 caracoles alimentados sin soya	48
Tabla 1. Nutrientes en 100 g de carne cruda de caracol. Fuente: Borja, 2004	6
Tabla 2. Cualidades alimenticias de la carne de caracol, vaca, cerdo, pollo y pescado. Fuente: Borja, 2004	6
Tabla 3. Valores nutricionales recomendados en distintas fases del caracol. (Borja, 2004)	14
Tabla 4. Contenido proteico y energético de insumos alimenticios. Fuente: Cornejo, S. <i>et al.</i> (2000)	18
Tabla 5. Contenido de purinas en los alimentos (100 g.). Fuente: Vásquez, C. <i>et al.</i> (2006)	18
Tabla 6. Fórmula de dietas otorgadas a dos grupos de caracoles experimentales.	23
Tabla 7. Contenidos de proteína promedio en baba de caracol en diferentes condiciones dietarias.	27
Tabla 8. Valores promedio de Alantoína/Proteína en diferentes condiciones dietarias durante la experimentación de 3 semanas	28

Tabla 9. Valores promedio de Alantoína/Proteína en diferentes condiciones dietarias durante la primera y tercera semana de experimentación	29
Tabla 10. Análisis estadístico de los resultados de Alantoína expresados por proteínas entre los distintos grupos durante la primera y tercera semana de experimentación	29
Tabla 11. Concentración de Alantoína/100 ml de baba en un total de 3 semanas.	30
Tabla 12. Concentración de Alantoína expresadas en 100 ml de baba de caracol durante la primera y tercera semana	31
Tabla 13. Análisis estadístico de Alantoína expresadas en 100 ml de baba de caracol	32
Tabla 14. Valores promedio de Xantina/Proteína en diferentes condiciones dietarias durante la primera y tercera semana de experimentación	34
Tabla 15. Análisis estadístico de los resultados de Xantina expresados por proteínas entre los distintos grupos durante la primera y tercera semana de experimentación	34
Tabla 16. Valores promedio de Xantina/100 ml en diferentes condiciones dietarias durante la primera y tercera semana de experimentación	35
Tabla 17. Análisis estadístico de Xantina expresadas en 100 ml de baba de caracol	36
Tabla 18. Valores promedio de Hipoxantina/Proteína en diferentes condiciones dietarias durante la primera y tercera semana de experimentación	37
Tabla 19. Análisis estadístico de Hipoxantina expresados en 100 ml de baba de caracol	38
Tabla 20. Valores promedio de Hipoxantina por volumen en diferentes condiciones dietarias durante la primera y tercera semana de experimentación	38
Tabla 21. Análisis estadístico de Xantina expresadas en 100 ml de baba de caracol	39
Cuadro 1. Resumen experimental.	20
Cuadro 2. Resumen de resultados estadísticos obtenidos. (A) Alantoína, (B) Xantina y (C) Hipoxantina	40
Anexo I. Test de Shapiro-Wilk	47
Anexo II. Gráficos de normalidad.	47

ABSTRACT

The Allantoin is a substance produced by the metabolism of purines, which is specifically elaborated by the oxidation of uric acid. In the animal world Allantoin is synthesized by gastropods contrasting with humans who they do not produce it. Since decades the cosmetic industry has used this substance, due to its antioxidant properties.

The main objective of this thesis was to determinate Allantoin in terrestrial snails secretion through capillary electrophoresis system; another objective was the quantification of Allantoin in snails secretion after feeding with different diets.

We have determinate the specific condition to identify Allantoin from other nitrogen metabolites like Xanthine, Hypoxanthine, Urea and Allantoic Acid. These substances are also present in snail secretion. The best conditions for the determination of Allantoin and the other metabolites were found to be a capillary 75 μm diameter and 60 cm long, 30 °C temperature and 20 KV of energy. After concentrating the secretion we identified the presence of Allantoin, using Allantoin standard. The analysis done on the first group of snails after fasting, and feeding with and without soybean for three weeks showed significantly higher production of Allantoin in snails with the soybean diet. The other two groups, without soybean and fasting, do not showed difference between them. The Allantoin present in secretion of snails is straight related with the diet which contains more purines: soybean.

The results obtained served us to make a quick technique, accurate and of low cost for determination of Allantoin, thus letting us to manipulate the diet and improve the antioxidant properties of snail secretion used in the cosmetic industry.

RESUMEN

La Alantoína es un producto derivado del metabolismo de las purinas, que se produce específicamente por la oxidación del Ácido Úrico. En el reino animal la excreción de Alantoína es sintetizada por varias clases, una son los gastrópodos; los seres humanos no la producen. Es utilizada hace décadas en productos cosmetológicos, dadas sus propiedades antioxidantes.

Montar un proceso que permita determinar Alantoína en baba de caracol a través de la técnica de electroforesis capilar y cuantificar la producción de este compuesto bajo diferentes condiciones dietarias han sido los grandes objetivos de esta memoria de título.

Se determinaron las condiciones que permitieran distinguir la Alantoína de otros derivados nitrogenados como Xantina, Hipoxantina, Urea y Ácido Alantoico, metabolitos nitrogenados presentes también en la baba de caracol. Las condiciones más adecuadas fueron capilar de 75 μm y 60 cm de largo, a 30 °C y corriente de 20 KV. Se identificó la presencia de Alantoína en muestras de baba de caracol, previamente concentradas utilizando Alantoína como estándar interno. El método montado permitió la detección de Alantoína, Hipoxantina y Xantina en baba de caracol, simultáneamente. Los análisis efectuados en base a ayuno, dieta con soya y sin soya, demuestran que en un período de tres semanas las diferencias son significativas a favor de la dieta con soya, que aumenta la Alantoína, siendo la dieta sin soya y el ayuno bajos en ésta y sus diferencias no son significativas. La Alantoína en la baba de caracol está directamente relacionada al consumo de purinas en la dieta.

Los resultados obtenidos nos han permitido montar una técnica rápida, de bajo costo y sensible para la determinación de Alantoína, permitiendo la investigación para manipular la dieta y mejorar las propiedades antioxidantes de la baba de caracol, utilizada con fines cosméticos.

I. INTRODUCCIÓN

Quizás desde tiempos inmemoriales, el ser humano ha utilizado sin cuestionamiento y sin tantos análisis, productos derivados de los vegetales y animales como métodos curativos, paliativos o simplemente placenteros. Muchos son los productos en base a estos elementos que hoy se venden en el mercado, por su naturaleza, sin químicos, y comprobado su poder sobre la base del conocimiento empírico y muy por encima de todo: las referencias de terceros. Ejemplos de lo anterior, es la miel, pocas son las personas que podrían nombrar algún compuesto activo o bien su método de acción.

La baba de caracol, está siendo el insumo mas novedoso de los últimos años en los laboratorios cosméticos de Santiago de Chile, por nombrar una parte del mundo, ya que decenas de ciudades están integrando la secreción de un molusco como principio regenerativo, desinflamatorio, cicatrizante, borrador de manchas, anti-estrías, entre otros, en cremas, geles, jabones, etc.

Si bien los estudios se han estado iniciando, los productos copan los supermercados, farmacias, calles, TV y revistas. No solo los médicos dermatólogos han incorporado dentro de sus recetarios cremas de caracol, así también lo han implementado médicos veterinarios, que afirman que con perros han tenido buenos resultados. Pero, ¿Qué compuesto logra tantas maravillas y porqué no ha sido proclamado antes este bien común de tan simple acceso?

La Alantoína, pareciera ser el compuesto ya que se nombra mucho para vender la crema. La Alantoína es un producto derivado del metabolismo de las purinas, producido específicamente por la oxidación del Ácido Úrico. En el reino animal la Alantoína es generada por gastrópodos como el caracol *Helix aspersa müller*. Existen varios reportes de trabajadores en cultivos de caracoles que mencionan tener los beneficios en su piel. Hoy existe una crema elaborada en Chile, que se comercializa en todo el mundo en base a baba de caracol *H. aspersa*, la cual contiene Alantoína como uno de sus componentes principales.

Los laboratorios que ofrecen el servicio de elaboración de productos farmacológicos o cosméticos, han instaurado un método de determinación de Alantoína en el insumo

inicial, a través de una técnica de tipo cualitativa, donde solo la presencia de este compuesto, determina que está dentro del rango de las “buenas babas”.

Estudios antiguos, de la década de los '30, han señalado la Alantoína como elemento regenerador, pero afirma que debe estar presente en un 2%, para lograr el efecto deseado. La Alantoína está presente en múltiples accesorios cotidianos tales como crema de: afeitar, para labios y cuerpo.

Montar un método que permita la cuantificación de la Alantoína, podría realmente determinar, si la baba de caracol tiene o no su acción en base a esta molécula. Sumado a esto, planear una dieta para aumentar la concentración de Alantoína podría guiar su producción y definitivamente concluir su efectiva acción médica.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Origen de los caracoles en América.

Los caracoles de tierra han estado presentes en la vida del hombre desde la época de las cavernas donde se han encontrado sus conchas, siendo una excelente fuente de proteína para su sobrevivencia (González, 2005). En diversas partes del mundo, tales como España, Italia y Francia, el consumo del caracol es habitual en su dieta alimentaria (Carmona *et al.*, 1996). Hoy, aquellos que viven del turismo, sobre todo en Europa, logran grandes ingresos producto del comercio de este molusco, lo cual se ve reflejado en las importaciones y consumo que han aumentado durante los últimos 3 años (Prochile, 2006a).

En muchas partes del mundo, el caracol de tierra es considerado plaga (Godan, 1983), por su capacidad de invasión dada sus altas capacidades de sobrevivencia, y es así como en América encontró un nicho. Se encuentran cientos de especies a lo largo del continente americano, en todos los rincones ya sean costeros, del interior o de altura (Vera-Ardilla y Linares, 2005). Se ha permitido por esto su recolección desproporcionada por aquellos interesados en venderlos a Europa (SAG, 2006).

Varias son las fuentes que mencionan la llegada de los caracoles a tierras americanas. “Dada su abundancia en la naturaleza, durante la edad media en Europa el caracol fue el alimento de pobres. Finalizando ésta y con el apogeo de los descubrimientos de nuevos territorios, esta especie se transforma en un elemento muy apreciado para lograr tener alimentos frescos en las largas travesías. De esta forma el caracol llega a América junto con los colonizadores españoles y portugueses. Es en 1814 que, durante una visita del Zar Alejandro I a Francia, se presenta en su honor una receta denominada "a la bourguignonne", instaurándose así el caracol en la dieta de las clases acomodadas. Desde aquí conquista nuevos mercados como Estados Unidos y Japón. Sin embargo, entre los españoles e italianos, sus principales difusores en América, el consumo no es exclusivo de las clases socioeconómicas altas” (INTA, 2003). Sin embargo, otros textos aseguran que los indios ya comían caracoles de tierra cuando arribaron los colonos (Sanfuentes, 2006).

Otra teoría de la llegada de los caracoles a América postula que los caracoles pudieron movilizarse desde áreas endémicas, como islas, gracias a las aves migratorias que en reposo pudieron albergar entre sus patas estos moluscos y luego emprender vuelos, movilizándolo sobre grandes extensiones terrestres huevos de estos moluscos y sino a las crías o adultos (Darwin, 1985). Los caracoles tienen una alta capacidad procreadora, en tan solo un mes son capaces de dar 100 huevos/adulto, lo que explica su reproducción exponencial transformándose consecuentemente en una plaga.

Y por último, Darwin (1985) menciona también en su libro “Origen de las Especies”, sobre la capacidad que tienen los caracoles para navegar en mares y océanos, durante semanas, sin afectar su osmolaridad. Esto es debido a la presencia de un opérculo o membrana que cubre su abertura formada de baba que con acción del sol y el calor se seca y queda hermética, favoreciendo la sobrevivencia y proliferación de los caracoles terrestres en diversas costas continentales.

II.2. Chile y ventajas comerciales sobre *Helix aspersa*.

Helix aspersa müller se encuentra hoy en varios países de Sudamérica, es llamado comercialmente petit-gris. Se consume principalmente en España, que se abastece de este recurso comestible casi en un 70% desde Marruecos. Hoy gracias a las facilidades navieras y tratados comerciales, desde América, siendo Argentina, Brasil, Ecuador, Colombia y Chile, los principales países que abastecen a España e Italia en la época de primavera verano, ya que en esos países por sus bajas temperaturas, el caracol se entierra e hiberna. El 95% del caracol chileno ha sido vendido vivo a España, durante el año 2005. Chile obtuvo un 6% de la cuota europea el 2005 y un 19% de la cuota española. Las exportaciones de caracoles a la UE han presentado un crecimiento (Prochile, 2006a).

Varias son las razones por lo que Prochile, y otros estamentos gubernamentales, están promocionando su desarrollo y producción, y decenas de familias se encuentran trabajando hoy en Chile con este tipo de crianza alternativa (Agromeat, 2006). Entre estas razones están: la cultura europea y el consumo de sus turistas, los tratados comerciales, la misma especie de caracoles, la estabilidad política de Chile, hemisferios opuestos, Chile con fronteras que aíslan enfermedades emergentes en la región y el hecho de que sea

considerado plaga el caracol de tierra, han desarrollado y fomentado la producción y recolección de este molusco en Chile.

Otras razones que han promovido la crianza en Chile incluyen el alto valor de la mano de obra europea y de su tierra, junto con el escaso territorio para la crianza animal y sobre todo silvestre. Igualmente la crianza de caracoles en forma controlada tiene un escaso impacto ambiental, su carne tiene un alto valor nutritivo conteniendo varios aminoácidos esenciales, y desde hace décadas ha estado dirigido a un público de elite lo que permite otorgar un alto valor al producto. Desde hace décadas se utiliza como carne, cosmético y artesanía, por nombrar los principales.

II.3. *Helix aspersa* y su alto valor nutricional.

El alto nivel nutritivo de los caracoles de tierra, con escaso aporte en materia grasa y elevado aporte en energía, se inserta perfectamente en el mercado global actual, donde estos parámetros toman cada vez mayor relevancia a nivel de consumidores y por ende de distribuidores (Prochile, 2006b).

Aportan 9 de los 10 aminoácidos esenciales, careciendo de triptofano (Carmona *et al.*, 1996). Dada la escasez de nutrientes existentes en ciertos continentes este valor nutritivo es una motivación para su comercio y desarrollo en lugares como África, donde la FAO sugiere otorgar recursos para aprovechar este tipo de “ganadería pequeña”, como alternativa nutricional y económica (FAO, 2005). Observando la tabla 1 y 2 se desprenden las ventajas alimenticias en comparación con otras carnes:

Tabla 1. Nutrientes en 100 g de carne cruda de caracol. (Fuente: Borja, 2004)

Componentes	Cantidades
Calorías	76 Kcal
Glúcidos	2%
Proteínas	15%
Vitamina C	15 mg
Yodo	0,006 mg
Azufre	140 mg
Agua	82%
Lípidos	0,8%
Calcio	170 mg
Hierro	3,5 mg
Magnesio	250 mg
Zinc	2,2 mg

Tabla 2. Cualidades alimenticias de la carne de caracol, vaca, cerdo, pollo y pescado. (Fuente: Borja, 2004)

	Caracol	Vaca	Cerdo	Pollo	Pescado
Agua %	82	71	73	71	81
Proteína	16	17	14	18	15
Grasa %	0,8	11,5	12	12	1,5
Minerales	1,93	0,9	0,7	0,8	25
Calorías/100g	70	163	180	120	70

Este molusco se comercializa como alimento en forma de: caracol vivo, caracol congelado, caracol semi-cocido en su concha, conservas, enlatado y platos preparados. Además se comercializa como reproductores y crías para crianza, huevos, conchas, vísceras y heces como abono y la baba con fines cosméticos y medicinales.

II.4. Origen, anatomía y fisiología.

En el período Precámbrico surgen los primeros invertebrados y animales con concha, entre los que se encontraban los moluscos (Griem y Griem-Klee, 1999). Los altos niveles de oxígeno permitieron que organismos pudieran respirar con órganos más

especializados. Los caracoles de tierra han tenido una gran capacidad de adaptación a lo largo de la historia, abarcando zonas frías como el hemisferio norte, países tales como Siberia, y zonas cálidas en el Caribe. Este largo tiempo seguramente ha determinado su capacidad tan voraz y su potencialidad de ayunar durante meses incluyendo el agua.

II.5. Clasificación taxonómica de *Helix aspersa*.

La Malacología es la rama de la Zoología que estudia los moluscos. Los Moluscos forman uno de los grandes filos (Mollusca) del reino animal. Son celomados de cuerpo blando, desnudo o protegido por una concha (Cabrera, 1962). Son animales de cuerpo suave, con tres características únicas en el reino animal por las cuales se identifican:

- Un pie muscular
- Una concha calcárea
- Un órgano de alimentación llamado rádula (formada por hileras de dientes quitinosos curvos).

Clasificación: Según Cabrera (1962) *Helix aspersa* se clasifica dentro del Phylum Mollusca, Clase Gastrópoda, Orden Pulmonata, Suborden Stylommatophora, Familia Helicidae, Especie *Helix aspersa müller*.

Phylum Mollusca: Metazoo sin esqueleto, bilateralmente simétrico (aunque puede estar desfigurado por torsión), y con un pie musculoso y un repliegue tegumentario denominado “manto” que en la mayoría de los casos segrega sales calizas que forman una cáscara o concha. Son seres muy antiguos que han existido desde que se formaron las primeras capas sedimentarias. Las especies actuales de moluscos son de hace más de cuarenta mil años; en su mayor parte marinas. Casi todas son dioicas, pero hay algunas hermafroditas como el *Helix aspersa*; casi todas son ovíparas, pero hay unas pocas vivíparas.

Clase Gastrópoda: Constituyen la clase (de las ocho que hay) más extensa del filo de los Moluscos. *Gaster* = estómago; *poda* = pie. Todos los gastrópodos presentan área cefálica (cabeza), con dos o con cuatro tentáculos, un pie musculoso ventral y una concha dorsal

(que puede reducirse o hasta perderse en los gasterópodos más evolucionados); además, cuando son larvas, sufren el fenómeno de torsión, que es el giro de la masa visceral sobre el pie y la cabeza. Esto les permite esconder antes la cabeza en la concha, dándoles una clara ventaja evolutiva. Existen aproximadamente más de 70.000 especies vivas y 15.000 fósiles descritas. Se pueden encontrar en casi todo tipo de ambientes (inclusive desiertos), pero mayoritariamente en aguas saladas o dulces, aunque unos pocos han logrado colonizar el medio terrestre, siendo el único grupo de moluscos con representantes en tierra firme. En el Globo se extiende desde los 5400 metros de altitud, en las vertientes del Himalaya, hasta los 5100 de profundidad, en los grandes mares.

Orden Pulmonata: Incluye los caracoles y babosas, que han desarrollado pulmones, lo que les permite vivir en tierra firme.

Suborden Stylommatophora: Stylommatophora es un suborden de moluscos que incluye la mayoría de los caracoles de tierra. Stylommatophora es diferente a los otros pulmonados ya que posee ojos en los extremos de sus tentáculos retractables, y todas sus especies son hermafroditas.

Familia Helicidae: El nombre de esta familia deriva del griego “helix” que significa espiral. Es a partir de este significado que se le da el nombre al género *Helix*, que incluye muchas especies.

Especie *Helix aspersa müller*: El género *Helix* es el más conocido y cuenta con más de 3500 especies, repartidas por todo el mundo, otros autores más recientes estiman 4000. Este molusco presenta una concha globosa generalmente más anchas que alta (heliciforme); sólida con estrías longitudinales; color pardo claro-oscuro, con bandas transversales pardo oscuras interrumpidas por flecos amarillos muy delicados, superficie de la concha con estrías finas, espiras 4-vueltas; abertura subcircular (Vera-Ardilla y Linares, 2005).

II.6. Órganos y fisiología.

Los caracoles de tierra presentan órganos bastante complejos, tales como pulmón, corazón, riñón, hígado y ovotestis. No están constituidos por órganos pares, poseen solamente un riñón, un pulmón y una aurícula (Stievenart C. y Hardouin J.,1990).

Los órganos se ubican dentro del caparazón. El seudo pulmón es una cavidad que se comunica al exterior por un pneumostoma a la derecha de la concha. El oxígeno es transportado por pequeños vasos para el intercambio gaseoso, con hemocianina compuesta por cobre (Dallinger *et al.*, 2005), dando un aspecto azul a la sangre, que es transportada al corazón del cual salen dos arterias. El sistema circulatorio está dispuesto en sistemas de lagunas sin grandes ramificaciones.

El oxígeno es aportado por el pulmón aunque algunas fuentes hablan de respiración tegumentaria, lo que realmente se observa en algunos gastrópodos acuáticos. Campion en su trabajo (1961) sobre funciones y tipos de glándulas en el tegumento de *Helix aspersa*, no identifica esta función.

El sistema locomotor de los caracoles terrestres, está dado básicamente por un pie muscular, el cual sólo le permite avanzar hacia delante, imposibilitándolo de retroceder. La succión de este músculo hacia las superficies, le permite realizar ascensiones, lo que se ha dado evolutivamente probablemente para buscar su alimento en hojas sin caer, dado por glándulas mucosas que permiten la cohesión (Campion, 1961). La mucina es el componente de su secreción que le da consistencia gelatinosa y pegajosa, que además de colaborar con lo anteriormente descrito, lubrica su transporte permitiendo que su tejido no se dañe, y como se señalará en “caracoles y medicina”, regenerar su piel, lo cual fue citado y sugerido por Campion en 1961. La glándula principal que secreta la mucina para su desplazamiento, se encuentra bajo su boca, y es llamada “glándula del pie”.

El sistema excretor anatómicamente está integrado por una vejiga que desemboca en las cercanías del ano, uréter, uretra y no existe un riñón como tal, sino que el órgano de Bojanus. *Helix aspersa müller*, no tiene completa la cadena enzimática del Ácido Úrico. Alantoinasa y alantoicasa están ausentes (Charrier y Daguzan, 1980). Como se aprecia en la Fig. 3, sin estas enzimas, el proceso de degradación de purinas en gastrópodos sería vía Ácido Úrico hasta Alantoína. La excreción de sustancias nitrogenadas en animales terrestres pueden tener su origen en dos sustratos: proteínas y purinas. Los metabolitos del catabolismo de las proteínas son eliminados generalmente por la vía de la urea, por la orina, siendo una reacción en cadena que puede llegar por acción enzimática (ureasa) a formar amoniaco. Por su parte las purinas son producto del catabolismo de las bases púricas,

contenidas en el material genético, y a partir de reacciones en la vía del Ácido Úrico, también puede llegar a formar amoniaco (Charrier y Daguzan, 1980).

Los grupos amino, provenientes de aminos ácidos, pueden en ciertos casos ser catabolizados vía ácido úrico, como sería el caso de las aves (Buchanan *et al.*, 1948).

Experimentalmente Charrier y Daguzan (1980), demuestran que la alanatoínasa y alantoicasa no están presentes en la cadena enzimática del Ácido Úrico en *Helix aspersa müller*, y además señalan que el Ácido Úrico tiene variaciones en jóvenes y adultos y en diferentes estaciones del año.

El amoniaco presente en *Helix*, se ha detectado en invierno, durante la etapa de hibernación, en jóvenes y adultos en altas cantidades, por el contrario en estadios de actividad está en valores trazas o ausente. Este producto de degradación de nitrógenos, se evaluó en pos de la enzima ureasa, que degrada urea a amoniaco, y resultó estar en cantidades altísimas, sobre 20 veces lo esperado en relación a otras referencias del autor. Incluye además como información respecto al amoniaco, que no varía en estaciones, ni fotoperíodo ni con la cantidad de agua ambiental su nivel alto de actividad, aunque si es nula en adultos durante la hibernación durante el día.

La ausencia de alantoínasa y alantoicasa, demuestra que la producción de amoniaco es netamente vía ciclo de la urea, lo que estaría demostrando que es producto directo del catabolismo proteico.

II.7. El caracol y la medicina.

De acuerdo a Troncoso (1999), el catabolismo de las purinas representadas por adenina y guanina, origina Alantoína. En las investigaciones realizadas por Gus'kov *et al.* (2001), se demuestra que el Ácido Úrico y la Alantoína son ejemplos de moléculas antioxidantes. Los radicales libres pueden interactuar con Alantoína y con los conocidos atrapadores de radicales libres como Hipoxantina, Xantina y Ácido Úrico por diferentes mecanismos. En el Ácido Úrico los enlaces NH son el único blanco de ataque para radicales libres. En las otras moléculas, y especialmente en la Alantoína, los enlaces CH son un blanco alternativo y pueden competir en este respecto con los enlaces NH del Ácido Úrico. Las conversiones de adenina y guanina a Hipoxantina se muestran en la Fig. 1, y a

su vez la degradación de Hipoxantina a Alantoína produciendo finalmente Ácido Úrico se muestra en la Fig. 2.

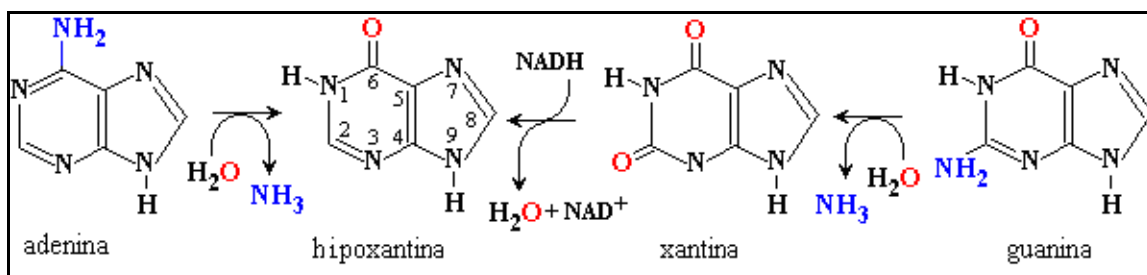
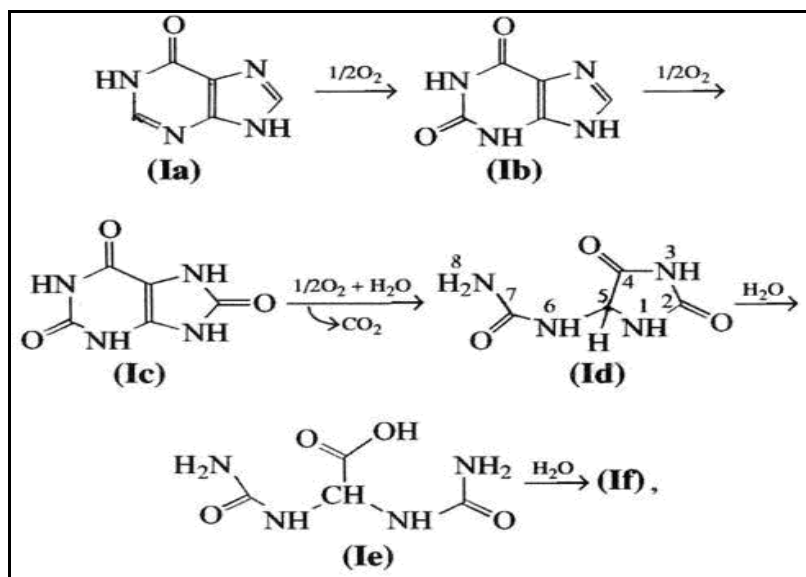


Fig.1. Esquema de degradación de purinas (Voet y Voet, 1995).



(Ia) Hipoxantina; (Ib) Xantina; (Ic) Ácido Úrico; (Id) Alantoína; (Ie) Ácido Alantoico; (If) Urea con Ácido Glioxílico

Fig.2. Esquema de conversión de Hipoxantina a Alantoína. (Gus'kov *et al.*, 2001).

Las propiedades de la Alantoína la ha hecho un compuesto presente en varios productos farmacológicos y cosmetológicos (Kawase *et al.*, 1982), y se ha utilizado por varios años para tratamientos faciales anti-arrugas (Hsu, 2005), en uso tópico y también en cremas labiales. Su poder suavizante, calmante y curativo permite múltiples usos en el área

cosmética y medicinal. Ya en los años 70 se utilizaba con fines terapéuticos en las aftas bucales (Heath y Platt, 1974).

La producción de esta molécula difiere de un organismo vivo a otro. En la vía de excreción de nitrógeno de ciertos mamíferos y gastrópodos, el Ácido Úrico es oxidado a Alantoína debido al efecto de la enzima uricasa. En las plantas, en cambio, la Alantoína se produce debido a la acción de bacterias fijadoras de nitrógeno, donde el amonio formado a partir de nitratos es transportado a otros tejidos de la planta (Voet y Voet, 1995).

En humanos y otros primates, el producto final de la degradación de purinas es el Ácido Úrico, el cual es excretado en la orina; lo mismo ocurre con aves, reptiles terrestres, y varios insectos. Aquellos animales que no excretan urea, pueden catabolizar el exceso de nitrógeno proveniente de aminoácidos hacia la biosíntesis de purinas, vía Ácido Úrico. El Ácido Úrico es escasamente soluble en agua, por lo que su excreción es en parte como cristales. En contraste, la excreción de una cantidad equivalente de urea, secuestra osmóticamente más agua; por ello la excreción de nitrógeno tiene una gran implicancia funcional en la conservación del agua (Voet y Voet, 1995).

Mamíferos diferentes a primates, procesan el Ácido Úrico antes de su excreción, lo oxidan, produciendo Alantoína en una reacción catalizada por una enzima que contiene cobre llamada urato oxidasa (Voet y Voet, 1995). Los caracoles de tierra como otros pulmonados terrestres requieren cobre como mineral traza esencial (Dallinger *et al.*, 2005). Probablemente su función sea también la producción de Alantoína para la excreción de purinas en forma soluble. La excreción de Alantoína por los moluscos terrestres, podría ser uno de los factores determinantes de la consistencia de su baba y la humedad de su piel, dada su alta solubilidad.

La Fig.3 muestra un esquema de degradación de purinas en diferentes especies. En el ser humano la excreción de purinas es hasta Ácido Úrico y en el caso de los gastrópodos hasta Alantoína (Voet y Voet, 1995).

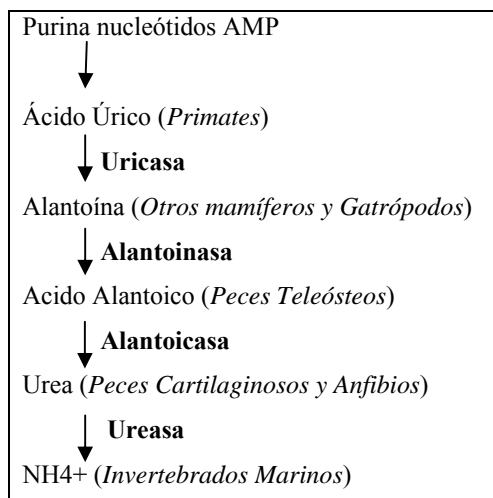


Fig.3. Degradación de Ácido Úrico a Amoniaco vía Alantoína. Enzimas que catalizan la degradación de cada producto se muestran en negrita. Especies que excretan cada producto se muestran en itálico (Alfazema *et al.*, 1998 y Voet y Voet, 1995).

II.8. Dietas y Requerimientos de *Helix aspersa*.

Este tipo de molusco, consume únicamente vegetales (Iglesias y Castillejo, 1999). Este estudio reveló que las preferencias vegetales coinciden con el alto contenido en proteína y calcio. Ha sido catalogado plaga en cultivos de soya y girasol, en Argentina (INTA, 1999). Algunos textos señalan que *Helix aspersa* es capaz de consumir y habitar como plaga en cultivos de frutas, verduras, cultivos forestales y plantas ornamentales (Monje, 1996).

Existen tres tipos de crianzas de caracoles: extensiva, semi intensiva e intensiva, los cuales difieren en la dieta aportada. Aquellos con crianza intensiva, reciben una dieta en base a harinas: trigo, soya, cebada, garbanzo y carbonato de calcio. Aquellos en crianzas extensivas: repollo, lechuga, girasol y alfalfa (Borja, 2004). Se aprecia en Tabla 3, el requerimiento nutricional de caracoles en fase juvenil y reproductiva o adulta.

Tabla 3. Valores nutricionales recomendados en distintas fases del caracol. (Borja, 2004)

	Fase infantil y juvenil	Fase de engorda y reproductores
Proteína	13 a 14%	10 a 11%
Energía metabolizable	2000 a 2100 Kcal/Kg	2600 a 2700 Kcal/Kg

II.9. Métodos tradicionales de determinación de Alantoína.

La determinación de Alantoína no es simple, ya que tiene un espectro en la zona UV cercano a 260 nm, muy similar al de purina y sus productos del metabolismo (Alfazema *et al.*, 1998). Originalmente se ha utilizado una determinación colorimétrica que se basa en la reacción de Rimini-Schryver (Young y Conway, 1942) donde se hidroliza la Alantoína a ácido alantoico en medio alcalino y posteriormente por hidrólisis ácida se forma Ácido glioxílico y Urea. El Ácido glioxílico se deriva con fenilhidrazina, lo que da una Fenilhidrazona que es oxidada y que se puede medir a 520 nm. Las desventajas de esta técnica son que el producto formado tiene poca estabilidad, lo cual la hace muy dependiente del tiempo transcurrido entre la reacción y la lectura, además es poco específica para Alantoína y los niveles de detección en fluidos corporales son del rango de entre 31-126 $\mu\text{moles/L}$ los cuales son bastante altos (Chen *et al.*, 1993). Este método fue modificado derivatizando el Ácido glioxílico con 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), formando un Glioxilato-DNPH, que es un producto más estable y que se mide espectrofotométricamente a 366 nm (Lagendijk *et al.*, 1995; Alfazema *et al.*, 1998).

Otro método ampliamente utilizado es la cromatografía líquida (HPLC, “High Performance Liquid Chromatography”), que utiliza columnas hidrofóbicas de C_{18} en fase reversa para la separación de Alantoína y otros compuestos similares (Alfazema *et al.*, 1998). La detección es entre 195-220 nm, describiéndose como la principal ventaja de esta técnica la detección de cantidades entre 0,6-95 $\mu\text{moles/L}$ en las muestras. Sin embargo, las desventajas de esta técnica son el costo de las columnas y de los solventes necesarios, requiriéndose inclusive dos columnas conectadas en serie, pues la retención de Alantoína es muy pobre, lo que hace que esta técnica sea lenta y cara.

Un método de cromatografía en capa fina (TLC) fue desarrollado inicialmente como una forma semicuantitativa y rápida, para determinar Alantoína en muestras de la industria farmacéutica (Chen, 1996). Posteriormente se utilizó este mismo método para fluidos corporales utilizando como absorbente en la fase estacionaria, sílica gel o celulosa. La Alantoína de la muestra debía ser previamente extraída con un solvente orgánico, luego derivada con para-dimetilaminobenzaldehído (pDMAB) y así formar un producto coloreado (amarillo) que podía ser observado directamente en la placa y ser medido en un densitómetro a una longitud de onda de 445 nm. Las principales desventajas que presenta este método es la poca estabilidad en el tiempo del derivado que se forma, siendo el tiempo un factor crítico además. Su baja sensibilidad le permite sólo detectar cantidades sobre los 95 $\mu\text{moles/L}$.

II.10. Técnica de electroforesis capilar, método alternativo para determinación de Alantoína.

La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica moderna basada en el transporte iónico, bajo la acción de un campo eléctrico y a través de un disolvente que se encuentra en el interior de una columna capilar. Su elevada capacidad analítica no fue demostrada hasta que Jorgenson y Luckacs (1981) describieron en forma sencilla la dispersión de moléculas y demostraron el gran potencial de separación de esta técnica, utilizando voltajes elevados en capilares de 75 μm de diámetro interno.

Entre las distintas modalidades de EC, la Electroforesis Capilar en Zona (CZE) y la Electroforesis Capilar en Fase Micelar (MECC) se han empleado ampliamente para separar metabolitos (Castagnino, 1999). En CZE la separación es debida a las diferentes movilidades de los analitos bajo la acción de un campo eléctrico, mientras que en MECC también interviene la interacción de los analitos pero con las micelas, en una especie de proceso cromatográfico. La técnica de MECC fue desarrollada por Terabe *et al.* (1985) y significó la posibilidad de separar compuestos neutros mediante EC.

MECC es la que se utilizó en esta memoria de título, ya que en base a la experiencia de Alfazema *et al.* (1998), esta técnica separa claramente los componentes que aquí nos

interesan: Alantoína, Xantina, Hipoxantina. Como se puede apreciar a continuación en la Fig. 4.

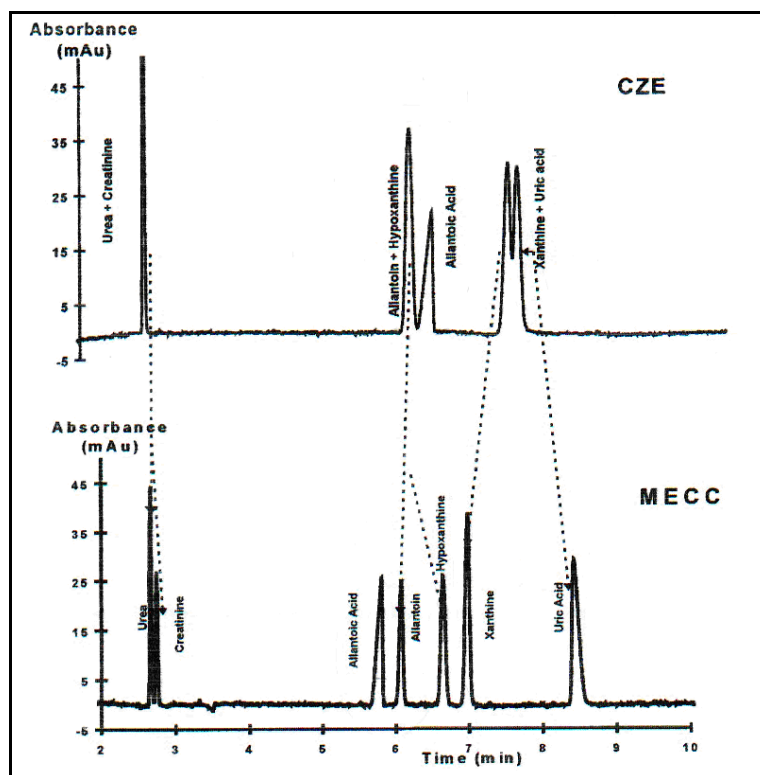


Fig. 4. Electroferograma muestra la separación de siete estándares utilizando CZE y MECC. Electrolito tetraborato de sodio 30 mM, pH 10,0 y % SDS, y efectuando la corrida electroforética a 20°C, con un voltaje de 20 KV, y utilizando una detección a 195 nm (Alfazema *et al.*, 1998).

III. HIPÓTESIS

En bases a los antecedentes de literatura mencionados anteriormente se plantea la siguiente hipótesis:

“Existe una correlación directa entre el consumo de purinas en la dieta y la cantidad de Alantoína y sus precursores Hipoxantina y Xantina en la baba”.

IV. OBJETIVO GENERAL

Relacionar la concentración de Alantoína y sus precursores en baba de caracol con el consumo de purinas.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a-** Establecer las condiciones que permitan detectar y separar los derivados de purinas simultáneamente mediante electroforesis capilar de fase micelar.
- b-** Determinar y cuantificar derivados de purinas en baba de caracol.
- c-** Estimar las variaciones de Alantoína y sus precursores en baba de caracol en diferentes condiciones dietarias de purinas.

VI. MATERIALES

Los materiales utilizados durante el ensayo son:

1-Caracoles *Helix aspersa Müller*, 150 en total obtenidos de un plantel de cultivo ubicado en Huechuraba.

2-Alimento: Se utilizó harinas comerciales, cuyas concentraciones de proteínas y purinas se presentan en las siguientes tablas 4 y 5. Además se suplementó con carbonato de calcio, para evitar debilidades calcáreas.

Tabla 4. Contenido proteico y energético de insumos alimenticios. Fuente: Cornejo, S. *et al.* (2000)

	Proteína (%)	EM Kcal/Kg
Harina de maíz	8	3.420
Afrechillo de trigo	14	2.485
Harina de soya	45	3.220

Tabla 5. Contenido de purinas en los alimentos (100 g). Fuente: Vásquez, C. *et al.* (2006)

	Purinas en 100 g.
Harina de maíz	0-49 mg
Afrechillo de trigo	0-49 mg
Harina de soya	>100 mg

3-Instalaciones: Se utilizaron jaulas de mantención para caracoles.

4-Materiales (y equipos) de laboratorio:

- Estándar de Alantoína, Hipoxantina, Xantina, Estándar de BSA (“bovine serum albumin”) y reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma).

- Reactivos: Acetonitrilo, NaOH, SDS, NaCl, Carbonato de sodio, Tartrato de sodio y potasio, Sulfato cúprico, Tetraborato de sodio (Merck).

- Filtro de 185 nm.

VII. MÉTODOS

VII.1. Determinación del número muestral y grupos de experimentación.




Para calcular el número muestral (n), se analizó la presencia de Alantoína en un grupo control de 20 caracoles de criadero. A partir de los resultados obtenidos, se determinó el número muestral experimental, utilizando el programa Win Episcopo 2.0, con una potencia de un 80% y una confianza 95%. Este programa determina el n a partir de la varianza obtenida y la esperada. Se calculó en base a una varianza esperada del doble. El n total como se verá ha sido de 22 caracoles evaluados en diferentes tiempos: a la semana de iniciada la experiencia y a la tercera semana.

El experimento se realizó con la formación de tres grupos de caracoles. El primer grupo se sometió a ayuno, el segundo a una dieta en base a afrechillo de trigo y harina de maíz, el tercer grupo fue alimentado con la misma dieta que el segundo grupo más harina de soya, que tal como ya se mencionó, contiene una alta cantidad de purinas; los porcentajes de cada insumo en la dieta se presentan a continuación.

La frecuencia de análisis de compuestos nitrogenados, Alantoína, Xantina e Hipoxantina en la baba de los caracoles, se efectuó la primera semana y la tercera semana posterior al inicio del experimento. Todos los caracoles se encontraron bajo las mismas condiciones de temperatura y consumo de agua.

El primer grupo experimental fue sometido a ayuno durante todo el periodo de experimentación, es decir tres semanas, con acceso a agua, de manera de visualizar en el tiempo el efecto directo de la dieta en la producción de Alantoína. El segundo grupo experimental consumió harina de maíz y afrechillo de trigo, 30% del primero y 70% del segundo, nutrientes con bajo contenido de purinas. El último grupo consumió una dieta en base a afrechillo de trigo junto con harinas de maíz y soya, dado que ésta última presenta niveles mayores de purinas y es consumida sin problemas por los caracoles, con un aporte de 20% de soya, ya que 33% de soya como idea inicial, no tuvo buenos índices de consumo; los otros nutrientes en una proporción de 60% para la harina de maíz y 20% para el afrechillo de trigo. Lo anterior ha sido evaluado como base para satisfacer

requerimientos proteicos y energéticos de los caracoles adultos, como se aprecia en la tabla 3. Lo anterior se resume en el siguiente cuadro:

		
Ayuno	Maíz y Trigo	Maíz Trigo Soya
	30% 70%	60% 20% 20%
22 caracoles	22 caracoles	22 caracoles
Se analizaron	Se analizaron	Se analizaron
1ª semana y 3ª semana	1ª semana y 3ª semana	1ª semana y 3ª semana

Cuadro 1. Resumen experimental.

VII.2. Obtención de Baba de caracol *Helix aspersa Müller*.

La toma de muestras, se realizó durante el mes de marzo, dado que es una época de alta actividad del caracol, que nos permite evaluar su metabolismo, se reproduce activamente, las temperaturas no son extremadamente altas o bajas. Durante un mes, se recolectó baba la primera semana y la tercera semana de cada grupo experimental.

La obtención de la muestra de baba fresca se efectuó mediante arrastre con un portaobjetos a partir de caracoles adultos sanos, seleccionados al azar. Se utilizó la baba luego de reposar por un día bajo condiciones refrigerantes para disminuir el efecto mucilaginoso y lograr medir su volumen.

VII.3. Preparación de la muestra.

La baba de caracol luego de un día de reposo en refrigeración fue diluida 1:3 con acetonitrilo, precipitando de esta manera las proteínas, las que se separaron del sobrenadante que contiene Alantoína mediante centrifugación (10.000 x g por 10 min.). Una alícuota de 500 µl del sobrenadante obtenido se concentró en una centrifuga al vacío (Speed vac; Samvant) hasta 50 µl (concentración de 10 veces). Esta es la muestra que fue analizada en electroforesis capilar micelar.

VII.4. Determinación y Cuantificación de derivados de purinas en baba.

Las muestras concentradas son sometidas a electroforesis capilar en las siguientes condiciones: capilar de 75 µm de diámetro interno, 60 cm de largo total con 52,5 cm de largo efectivo hasta el detector. La corriente utilizada es de 20 KV a 30 °C, utilizando como amortiguador de corrida tetraborato de sodio 30 mM y SDS 75 mM a pH 10,0 (Alfazema *et al.*, 1998). Previo a la corrida electroforética se realizó un lavado del equipo entre cada muestra con NaOH 0,5 M, agua y amortiguador, 3 min. sucesivamente. Luego de obtener el registro de la muestra en un electroferograma por un período de 20-30 min., se realizó la detección y cuantificación de los derivados de purinas con estándares de Alantoína, Hipoxantina y Xantina a una longitud de onda de 185 nm. En la Fig. 5 se muestra un electroferograma de señales de estos tres compuestos aplicados en la misma corrida. La asignación de las señales de estos compuestos en las muestras de baba de caracol se realizó adicionando alícuotas de los tres estándares.

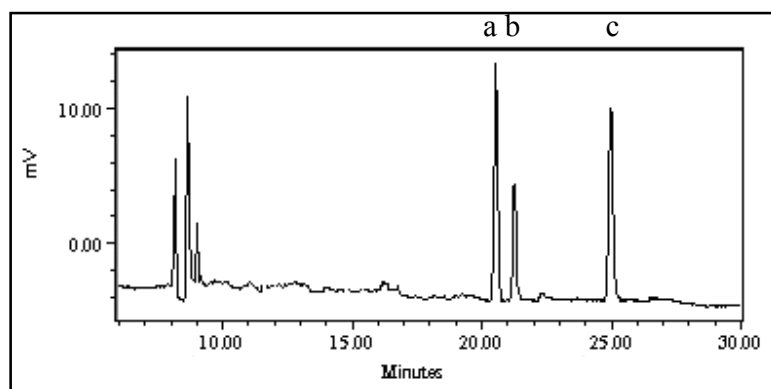


Fig.5 Electroferograma muestra la separación de tres estándares: (a) Alantoína, (b) Hipoxantina y (c) Xantina; Utilizando MECC, con tetraborato de sodio 30 mM, pH 10,0 y % SDS, y efectuando la corrida electroforética a 30°C, con un voltaje de 20 KV, y utilizando una detección a 185 nm.

VII.5. Cuantificación del contenido de proteínas en la baba de caracol.

La concentración de proteínas de la baba se determinó por el método de Lowry y col (1951). Este método consiste en mediciones a 750 nm, de la concentración de proteínas en base a la formación de un complejo con el ión cúprico con los grupos NH del enlace peptídico en condiciones alcalinas, seguido de la reducción del ión cúprico por el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se realiza una curva de calibración con estándar en base a BSA (Bovine serum albumin). La expresión por el contenido de proteína (mg) en la baba de caracol permite estandarizar los resultados obtenidos de diversos individuos.

VII.6. Análisis estadísticos.

Para la evaluación de normalidad se utilizó el test de Shapiro-Wilk, adecuado para evaluar una población menor de 50 individuos. La comparación de los grupos se hizo mediante el test de Kruskal-Wallis que es la alternativa no paramétrica al test ANOVA que permite la comparación de media y varianzas en tres grupos distintos con un n mayor a 5 (Gibbons, 1992).

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Dietas otorgadas.

Cumpliendo con los requerimientos de caracoles adultos, se formularon dos dietas. La primera contenía 30% de soya. Los caracoles no la comieron, por lo que fue necesario reformular las dietas, con este insumo en un 20%. La tabla 6 de formulación de dietas se presenta a continuación, la cual fue utilizada en esta memoria de título. La segunda dieta fue sin soya como se aprecia en la tabla.

Tabla 6. Fórmula de dietas otorgadas a dos grupos de caracoles experimentales.

	Dieta con Soya	Dieta sin Soya
Afrechillo de trigo	60%	30%
Harina de Maíz	20%	70%
Soya	20%	0%
Carbonato de Calcio	Libre disposición	Libre disposición

VIII.2. Determinación de curvas estándares de Alantoína, Xantina y Hipoxantina.

La concentración de Alantoína, Xantina e Hipoxantina se evaluó mediante electroforesis capilar determinando curvas estándares usando concentraciones conocidas de estos compuestos. Se calculó el área bajo la curva obtenida en el equipo de electroforesis capilar utilizando el programa Millenium como se muestra en la Fig. 5 donde la señal indicada con letra b) corresponde a Alantoína.

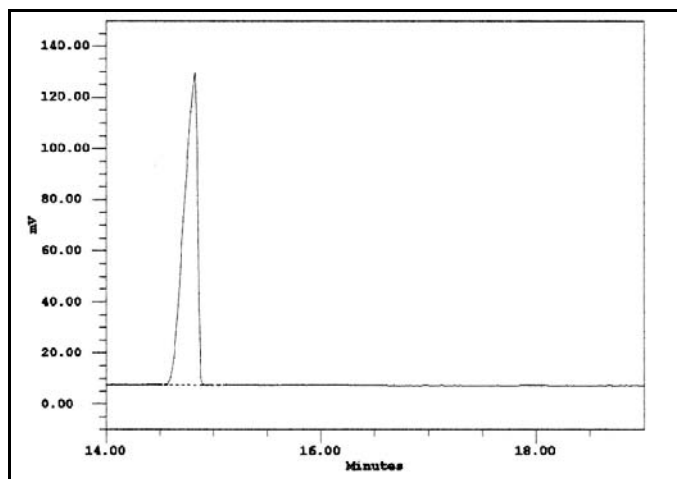


Fig. 6. Electroferograma de estándar de Alantoína.

Las curvas estándares obtenidas, expresadas como mg de Alantoína, Xantina e Hipoxantina se muestran en las Fig. 7 A, B, C donde se aprecia la curva de calibración de los estándares y los respectivos índices de correlación.

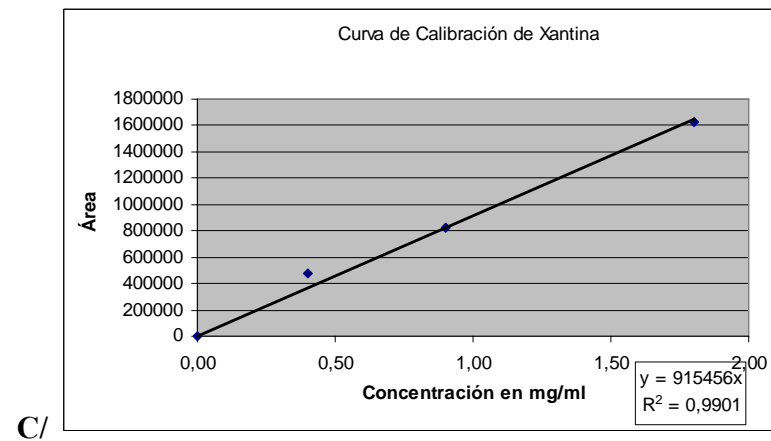
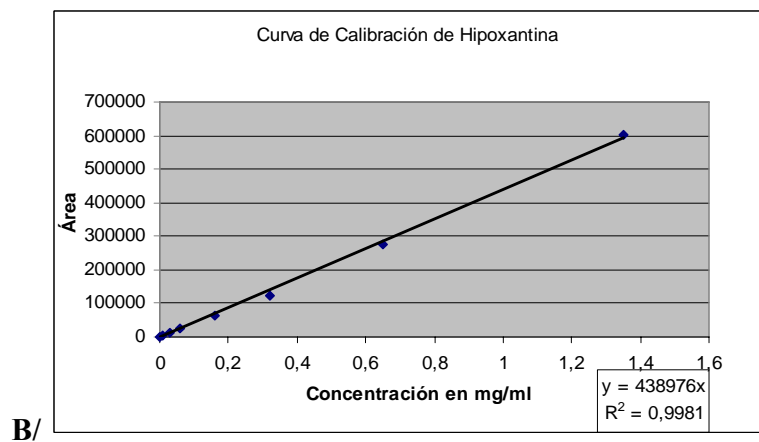
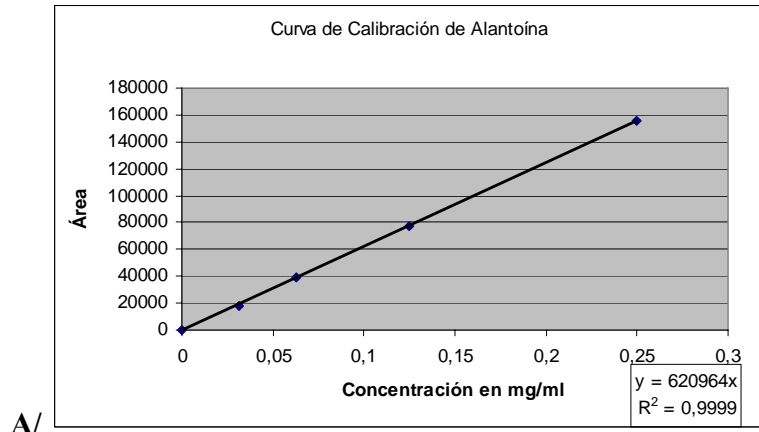


Fig. 7. Curvas de calibración de Alantoína, Hipoxantina y Xantina. A) Alantoína; b) Hipoxantina y C) Xantina. Área de la señal obtenidas del electroferograma en función de la concentración mg/ml de estándar conocido.

VIII.3. Análisis en baba de caracol.

En la Fig. 8 se presenta un electroferograma típico de una muestra de baba de caracol. En la siguiente figura, se muestra la asignación de la señal de Alantoína al adicionar una alícuota de este compuesto. La concentración de Alantoína en la baba de caracol se efectuó interpolando el área bajo la señal en la curva estándar.

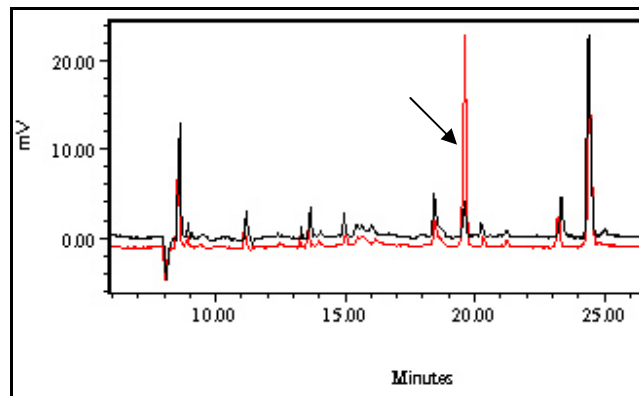


Fig. 8. Electroferograma de baba de caracol con y sin estándar de Alantoína. En negro, se presenta un electroferograma de caracol sin estándar de Alantoína. En rojo se presenta el mismo electroferograma de caracol con estándar de Alantoína señalado con una flecha.

VIII.4. Contenido y análisis estadístico de Alantoína en baba de caracol expresado por el contenido de proteínas

Los valores promedio con su respectiva desviación estándar (DE) de proteínas por grupo de estudio se encuentran en la Tabla 7. No hay diferencias estadísticamente significativas con el test de Kruskal-Wallis en el contenido de proteínas de la baba entre los tres grupos expuestos a distintas condiciones dietarias a la primera semana y a la tercera semana. La única diferencia se presenta entre el grupo ayuno y grupo sin soya ($p= 0,031$), siendo mayor para sin soya.

Tabla 7. Contenido de proteína promedio \pm la desviación estándar en baba de caracol en diferentes condiciones dietarias. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 22 caracoles.

Condición	1 semana mg proteínas/ml de baba	3 semanas mg proteínas/ml de baba
Ayuno	0,20 \pm 0,04	0,22 \pm 0,09
Alimentación sin soya	0,24 \pm 0,08	0,26 \pm 0,1
Alimentación con soya	0,26 \pm 0,1	0,19 \pm 0,09

Los valores de Alantoína promedio expresados por el contenido de proteínas de los tres grupos compuestos de 22 individuos contemplando el tiempo total experimental, es decir tres semanas, se muestran en la Tabla 8. Para el análisis estadístico se determinó en primer lugar si los datos se distribuían normalmente encontrándose que no presentaban una distribución normal de acuerdo con el test de Shapiro Wilks (Anexo I). Igualmente se presenta una graficación de los datos en la sección Anexo II donde se confirma la ausencia de normalidad en los datos. De acuerdo al test de Kruskal-Wallis, la alimentación de los caracoles con una dieta enriquecida en soya existen diferencias significativas en el contenido de Alantoína expresado por la cantidad de proteínas de la baba comparado tanto con el grupo en ayuno como con el alimentado sin soya. Además no se observaron diferencias entre el grupo mantenido en ayuno y el alimentado con la dieta sin soya.

Tabla 8. Valores promedio de Alantoína/proteína en diferentes condiciones dietarias durante la experimentación de 3 semanas. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 22 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	Tiempo total de estudio (3 semanas) μg Alantoína/mg proteínas	Valor p comparado con	
		Ayuno	Dieta sin soya
Ayuno	23,02 \pm 15,45		
Alimentación sin soya	30,95 \pm 16,85	0,264	
Alimentación con soya	47,99 \pm 19,79	0,001	0,048

La evaluación semanal en forma separada de los resultados de Alantoína/mg proteínas obtenidas la primera y la tercera semana se presenta en la Tabla 9. Nuevamente estos datos no se distribuyeron normalmente. La comparación dentro de un mismo grupo a través del tiempo señaló que no hay diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en ninguna de las tres condiciones de estudio.

Los resultados estadísticos al comparar entre los grupos se muestran en la Tabla 10. En la primera semana de estudio los caracoles sometidos a ayuno contienen una cantidad de Alantoína/mg proteína significativamente menor respecto al grupo alimentado con soya. Entre los grupos con y sin soya no se encontró diferencias significativas. Por otra parte, en la tercera semana la condición de ayuno no presentó diferencias con el grupo expuesto a una dieta sin soya principalmente porque se observó una tendencia a la disminución de la Alantoína en este último grupo. En cambio, en el grupo alimentado con soya continuó siendo significativamente mayor que en la condición de ayuno. Es interesante destacar que después de tres semanas la condición sin soya mostró diferencias con la correspondiente a alimentación con soya, por la tendencia a disminuir la Alantoína como se mencionó anteriormente.

Tabla 9. Valores promedio de Alantoína/proteína en diferentes condiciones dietarias durante la primera y tercera semana de experimentación. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	1 semana μg Alantoína/mg proteínas	3 semanas μg Alantoína/mg proteínas	Valor p comparando dentro de un mismo grupo
Ayuno	20,72 \pm 15,27	24,56 \pm 16,29	p = 0,814
Alimentación Sin soya	38,71 \pm 14,94	24,49 \pm 16,67	p = 0,100
Alimentación Con soya	48,36 \pm 22,34	51,2 \pm 16,01	p = 0,380

Tabla 10. Análisis estadístico de los resultados de Alantoína expresados por proteínas entre los distintos grupos durante la primera y tercera semana de experimentación. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	1 semana μg Alantoína/mg proteínas	Valor p comparado con		3 semanas μg Alantoína/mg proteínas	Valor p comparado con	
		Ayuno	Dieta sin soya		Ayuno	Dieta sin soya
Ayuno	20,72 \pm 15,27			24,56 \pm 16,29		
Alimentación Sin soya	38,71 \pm 14,94	0,100		24,49 \pm 16,67	0,906	
Alimentación Con soya	48,36 \pm 22,34	0,034	0,947	51,2 \pm 16,01	0,012	0,032

VIII.5. Contenido y análisis estadístico de Alantoína expresado por volumen de baba.

El contenido de Alantoína expresado por 100 ml de baba en las tres condiciones dietarias en que se han sometido los caracoles en el total del experimento se presenta en la Tabla 11. Como se puede ver las diferencias entre los valores de Alantoína al expresarlos por volumen son coincidentes con aquellos expresados por proteínas. Estos resultados eran los esperados considerando que no se encontraron diferencias entre el contenido de proteínas en las distintas condiciones dietarias, al comparar simultáneamente los tres grupos.

En la Tabla 12 se presentan los datos expresados por volumen de baba de caracol individualizando las semanas. Al igual que los resultados expresados por mg de proteínas antes mencionados no existen diferencias significativas entre semanas para un mismo grupo.

Tabla 11. Concentración de Alantoína/100 ml de baba en un total de 3 semanas. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	3 semanas μg Alantoína/100 ml baba	Valor p comparado con	
		Ayuno	Dieta sin soya
Ayuno	430,17 \pm 198,42		
Alimentación sin soya	617,37 \pm 276,54	0,118	
Alimentación Con soya	1202,31 \pm 456,73	0,000	0,001

Tabla 12. Concentración de Alantoína expresadas en 100 ml de baba de caracol. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	1 semana μg Alantoína/100 ml baba	3 semanas μg Alantoína/100 ml baba	Valor p comparando dentro de un mismo grupo
Ayuno	400,92 \pm 220,86	446,68 \pm 193,24	p = 0,814
Alimentación sin soya	772,66 \pm 236,68	551,41 \pm 255,16	p = 0,522
Alimentación con soya	1344,72 \pm 445,26	1019,21 \pm 433,17	p = 0,101

Los resultados estadísticos al comparar entre los grupos, se muestran en la Tabla 13. Los datos de Alantoína expresados por 100 ml de baba muestran en algunos casos las mismas diferencias la primera semana que aquellos obtenidos al expresar los resultados por proteínas: existe diferencia significativa entre los grupos que recibieron alimento con soya respecto a la condición de ayuno, pero al contrario de los resultados expresados por proteína, los grupos sometidos a dieta con y sin soya, presentan diferencias desde la primera semana. Lo anterior se explica porque aunque las proteínas no muestren diferencias estadísticamente significativas, al dividir el grupo con soya por un valor promedio de 0,26 de proteína, al ser mayor que el valor promedio por el cual se divide el grupo sin soya (0,2 promedio), el primer grupo disminuye su valor y el segundo grupo lo aumenta, y la diferencia se angosta, no siendo significativa. Al quitarle el factor fraccionario, los valores se presentan “reales” con diferencias significativas, como se expresa en la tabla 13. La tercera semana continúa la diferencia significativa que se observaba entre el grupo con soya y ayuno, y al igual que los resultados expresados por proteínas, el grupo sin soya y ayuno no tienen diferencias significativas y entre los grupos con soya y sin soya, se mantiene la diferencia respecto a la primera semana. Nuevamente hubo un aumento de Alantoína la tercera semana en el grupo en ayuno y una tendencia a disminuir en el contenido de Alantoína en el grupo sin soya similar a lo determinado al expresar los resultados por proteínas.

Tabla 13. Análisis estadístico de Alantoína expresadas en 100 ml de baba de caracol. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	1 semana μg Alantoína/100 ml baba	Valor p comparado con		3 semanas μg Alantoína/100 ml baba	Valor p comparado con	
		Ayuno	Dieta sin soya		Ayuno	Dieta sin soya
Ayuno	400,92 \pm 220,86			446,68 \pm 193,24		
Alimentación sin soya	772,66 \pm 236,68	0,150		551,41 \pm 255,16	0,480	
Alimentación con soya	1344,72 \pm 445,26	0,003	0,007	1019,21 \pm 433,17	0,007	0,046

VIII.6. Determinación de otros derivados del metabolismo de las purinas en baba de caracol: Xantina e Hipoxantina.

La electroforesis capilar nos permitió determinar otros compuestos nitrogenados derivados del metabolismo de las purinas en baba de caracol: Xantina e Hipoxantina.

VIII.6.1 Xantina.

En la siguiente figura (Fig. 9), se muestra el electroferograma de baba de caracol con incorporación de estándar de Xantina.

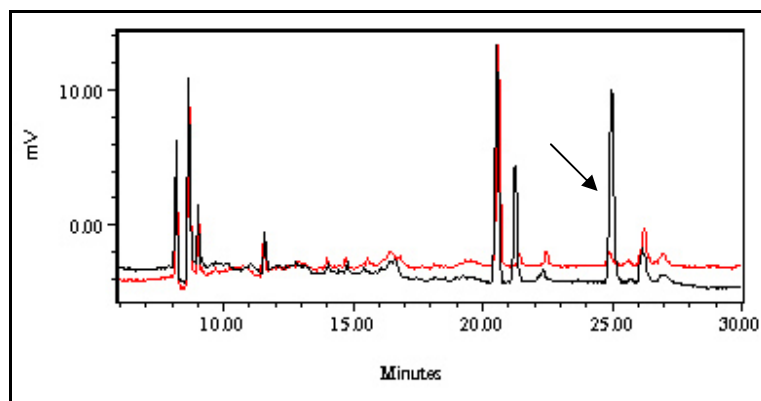


Fig. 9. Electroferograma de baba de caracol en presencia y ausencia de Xantina. En rojo se presenta un electroferograma de caracol sin estándar de Xantina, aunque si de Alantoína. En negro, sobre la misma muestra de caracol, se ha incorporado estándar de Xantina, señalado con una flecha. También presenta estándar de Alantoína e Hipoxantina (20 min. Aprox.).

Los análisis efectuados, se realizaron del mismo modo que con Alantoína, esto es a través de curvas de calibraciones, y los datos se encuentran expresados en relación a la proteína de la baba. La Tabla 14 presenta los resultados expresados por el contenido de proteínas. Cabe señalar que la Xantina es un compuesto que no se encontró en todas las muestras (ver Tabla 14 en la tercera semana de la condición sin soya). Esta memoria de título se guió con un tamaño muestral determinado en relación a varianza de Alantoína y no para estos compuestos.

La comparación entre semanas para un mismo grupo nuevamente no presentó diferencias significativas. Por otra parte, la comparación entre grupos no mostró diferencias significativas en la primera semana y en la tercera solamente se puede comparar el grupo con soya con el mantenido en ayuno presentando una diferencia significativa.

Tabla 14. Valores promedio de Xantina/proteína en diferentes condiciones dietarias durante la primera y tercera semana de experimentación. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	1 semana μg Xantina/mg proteínas	3 semanas μg Xantina/mg proteínas	Valor p comparando dentro de un mismo grupo
Ayuno	29,52 \pm 28,18	21,77 \pm 19,96	0,382
Alimentación sin soya	28,38 \pm 19,64	SIN DATOS	SD
Alimentación Con soya	39,45 \pm 30,65	49,61 \pm 29,44	0,398

Tabla 15. Análisis estadístico de los resultados de Xantina expresados por proteínas entre los distintos grupos durante la primera y tercera semana de experimentación. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	1 semana μg Xantina/mg proteínas	Valor p comparado con		3 semanas μg Xantina/mg proteínas	Valor p comparado con	
		Ayuno	Dieta sin soya		Ayuno	Dieta sin soya
Ayuno	29,52 \pm 28,18			21,77 \pm 19,96		
Alimentación sin soya	28,38 \pm 19,64	0,634		SIN DATOS	SD	
Alimentación Con soya	39,45 \pm 30,65	0,514	0,558	49,61 \pm 29,44	0,009	SD

VIII.6.2. Contenido y análisis estadístico de Xantina expresado por volumen de baba.

Los resultados expresados por 100 ml de baba no presentaron diferencias ya sea comparando entre semanas o entre grupos (Tablas 16 y 17). Los datos entre grupos a la tercera semana presentan una diferencia entre la condición ayuno y la sin soya, respecto a los resultados obtenidos en base a proteína, ya que en esta última si existía diferencia significativa, y no así cuando se presentan los datos en base al volumen como se muestra en la tabla 17.

Tabla 16. Valores promedio de Xantina expresados en 100 ml de baba, en diferentes condiciones dietarias durante la primera y tercera semana de experimentación. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis. SD: Sin datos suficientes para el análisis estadístico

Condición	1 semana μg Xantina/100 ml baba	3 semanas μg Xantina/100 ml baba	Valor p comparando dentro de un mismo grupo
Ayuno	606,65 \pm 565,19	389,18 \pm 276,76	0,470
Alimentación sin soya	594,69 \pm 299,26	SD	SD
Alimentación Con soya	674,46 \pm 426,36	756,09 \pm 466,34	0,818

Tabla 17. Análisis estadístico de Xantina expresadas en 100 ml de baba de caracol. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	1 semana μg Xantina/100 ml baba	Valor p comparado con		3 semanas μg Xantina/100 ml baba	Valor p comparado con	
		Ayuno	Dieta sin soya		Ayuno	Dieta sin soya
Ayuno	606,65 \pm 565,19			389,18 \pm 276,76		
Alimentación sin soya	594,69 \pm 299,26	0,427		SD	SD	
Alimentación Con soya	674,46 \pm 426,36	0,518	0,821	756,09 \pm 466,34	0,053	SD

VIII.6.3. Hipoxantina.

En la siguiente figura (Fig. 10), se muestra electroferograma de baba de caracol con incorporación de estándar de Hipoxantina.

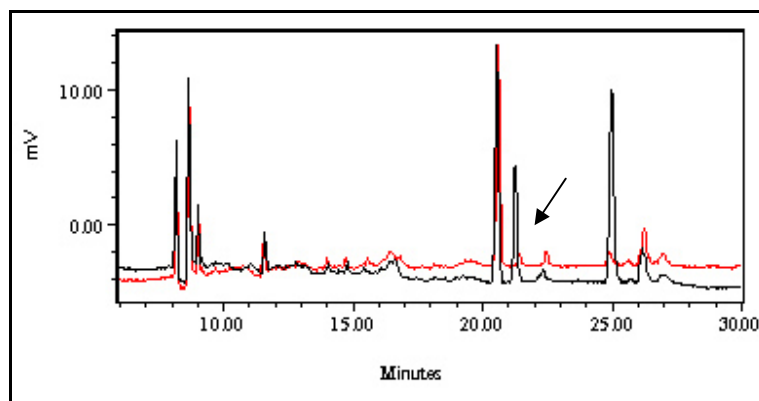


Fig. 10. Electroferograma de baba de caracol en presencia y ausencia de Hipoxantina.

En rojo se presenta un electroferograma de caracol sin estándar de Hipoxantina, aunque si de Alantoína. En negro, sobre la misma muestra de caracol, se ha incorporado estándar de Hipoxantina, señalado con una flecha. También presenta estándar de Alantoína y Xantina (Aprox. 20 min. y 25 min. Respectivamente).

Los análisis efectuados fueron similares a los con Alantoína y Xantina expresados por proteínas y por volumen de baba. Las Tabla 18 y 19 presentan los resultados expresados por el contenido de proteínas. No se pudo cuantificar Hipoxantina en el grupo sin soya la tercera semana. En las comparaciones intragrupos, el grupo ayuno presenta diferencias significativas entre semana uno y tres, debido a un alza de Hipoxantina la tercera semana. Entre grupos las diferencias la primera semana se presentan entre el grupo con soya y las condiciones en ayuno y sin soya.

Tabla 18. Valores promedio de Hipoxantina/proteína en diferentes condiciones dietarias durante la primera y tercera semana de experimentación. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	1 semana μg Hipoxantina/mg proteína	3 semanas μg Hipoxantina/mg proteína	Valor p comparando dentro de un mismo grupo
Ayuno	14,29 \pm 4,38	22,58 \pm 6,17	0,004
Alimentación sin soya	13,05 \pm 7,47	SD	SD
Alimentación Con soya	27,61 \pm 17,44	42,43 \pm 28,98	0,123

Tabla 19. Análisis estadístico de Hipoxantina expresadas en 100 ml de baba de caracol. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	1 semana μg Hipoxantina/ 100 ml baba	Valor p comparado con		3 semanas μg Hipoxantina/ 100 ml baba	Valor p comparado con	
		Ayuno	Dieta sin soya		Ayuno	Dieta sin soya
Ayuno	14,29 \pm 4,38			22,58 \pm 6,17		
Alimentación sin soya	13,05 \pm 7,47	0,722		SD	SD	
Alimentación con soya	27,61 \pm 17,44	0,014	0,032	42,43 \pm 28,98	0,014	SD

VIII.6.4. Contenido y análisis estadístico de Hipoxantina expresado por volumen de baba.

Igualmente a las determinaciones de Alantoína y Xantina no se apreciaron diferencias dentro de los grupos entre la primera y tercera semana de estudio (Tabla 21). Las diferencias significativas estuvieron presentes sólo en la primera semana entre la condición con soya y los otros dos grupos (Tabla 21).

Tabla 20. Valores promedio de Hipoxantina por volumen en diferentes condiciones dietarias durante la primera y tercera semana de experimentación. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	1 semana μg Hipoxantina/100 ml baba	3 semanas μg Hipoxantina/100 ml baba	Valor p comparando dentro de un mismo grupo
Ayuno	283,81 \pm 60,09	467,55 \pm 185,88	0,008
Alimentación sin soya	275,01 \pm 147,05	SD	SD
Alimentación Con soya	612,56 \pm 212,42	675,97 \pm 523,79	0,375

Tabla 21. Análisis estadístico de Xantina expresadas en 100 ml de baba de caracol. Los datos corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. Los resultados se ajustaron a la dilución correspondiente de la baba de caracol inicialmente extraída. Cada grupo estuvo compuesto de 11 caracoles. Análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis.

Condición	1 semana μg Xantina/100 ml baba	Valor p comparado con		3 semanas μg Xantina/100 ml baba	Valor p comparado con	
		Ayuno	Dieta sin soya		Ayuno	Dieta sin soya
Ayuno	283,81 \pm 60,09			467,55 \pm 185,88		
Alimentación n sin soya	275,01 \pm 147,05	0,477		SD	SD	
Alimentación n con soya	612,56 \pm 212,42	0,000	0,002	675,97 \pm 523,79	0,526	SD

Cuadro resumen de los resultados obtenidos

En las siguientes tablas se muestran los resultados significativos (x) encontrados en la experimentación. Cada tabla presenta las distintas condiciones dietarias, los tiempos evaluados, expresados en base a proteína y a volumen (100 ml de baba).

A/

Alantoína				
Proteína Volumen	1 Semana		3 Semanas	
	Ayuno	Sin Soya	Ayuno	Sin Soya
Ayuno				
Sin soya				
Con Soya	x		x	x
		x	x	x

B/

Xantina				
Proteína Volumen	1 Semana		3 Semanas	
	Ayuno	Sin Soya	Ayuno	Sin Soya
Ayuno				
Sin soya			Sin Datos Sin Datos	
Con Soya			x	Sin Datos Sin Datos

C/

Hipoxantina				
Proteína Volumen	1 Semana		3 Semanas	
	Ayuno	Sin Soya	Ayuno	Sin Soya
Ayuno				
Sin soya			Sin Dats Sin Datos	
Con Soya	x x	x	x x	Sin Datos Sin Datos

Cuadro 2. Resumen de resultados estadísticos obtenidos. (A) Alantoína, (B) Xantina y (C) Hipoxantina

IX. DISCUSIÓN

El aumento de derivados purínicos a partir del catabolismo de purinas ya sea vía exógeno (dieta) o endógena (catabolismo celular), ha sido reportado en varias especies tales como rumiantes o monogástricos. La determinación de alantoína, hipoxantina y xantina se ha realizado a través de variadas técnicas las cuales señalan Sandoval-Castro y Herrera-Gómez (1999) donde los más comunes son HPLC, espectrofotómetro y auto-analizador. Escasos son los estudios realizados en baba de caracol. Manosalva (2005) a través de HPLC cuantificó alantoína en baba de *Helix aspersa*, atribuyendo en parte sus resultados a la estación del año en la cual realizó su estudio (marzo), sugiriendo que tal vez en primavera con mayor actividad metabólica, los niveles de este compuesto podrían aumentar.

IX.1. Ventajas y Desventajas de Electroforesis Capilar Utilizado

Este estudio escogió como método la electroforesis capilar de fase micelar, el cual resultó ser eficiente, simple y rápido como señala García *et al.*, (2001). Los analitos se separaron rápidamente por sus tamaños y cargas no siendo una complicación como el HPLC para determinar estos compuestos, ya que fue muy difícil su separación y hubo superposición de señales en que los compuestos coinciden en su longitud de onda de absorbancia al momento de ser evaluados (Manosalva, 2005). Las complicaciones mayores se debieron a la poca solubilidad de la Hipoxantina que tiende a bloquear el capilar, experimentado al momento de correr el estándar, y por supuesto a la poca fluidez de la baba de caracol que presenta características mucilaginosas que impiden la captación de volúmenes precisos, para lo cual se procesó previo el estudio. Si bien se indica que el método es sensible, la baba debió concentrarse 50 veces para su evaluación. Los estudios efectuados en esta memoria de título fueron en base al método señalado por Alfazema *et al.* (1998) realizado en biofluidos de mamíferos y de humanos resultando este método igualmente propicio con una muestra tan diversa como la baba de caracol.

Los resultados obtenidos se hicieron en base a una curva de calibración con un r de 0,9999 para Alantoína, 0,9901 para Xantina y 0,9981 para Hipoxantina. Estas tres curvas se

realizaron entre valores de 0,03 mg/ml y 0,25 mg/ml, lo que nos da un amplio rango de linealidad del método.

IX.2. Efectos de la dieta sobre el contenido de derivados púricos en Baba de Caracol

Los resultados obtenidos en cantidades de Alantoína coinciden con los resultados obtenidos por Manosalva (2005) a través de HPLC que obtuvo valores de 0,548 mg/100 ml de baba. Los valores que fluctúan ese promedio en este estudio, pertenece a aquellos obtenidos en ayuno y como se puede apreciar en la Tabla de Resumen de datos, es significativamente menor, ya sea expresado por proteína o por volumen, a los resultados obtenidos en el grupo con soya (1,344 mg/100 ml y 1,019 mg/100 ml de baba; primera y tercera semana, respectivamente).

Los resultados de este estudio confirman que el aporte de una dieta con soya durante al menos una semana a caracoles de tierra *Helix aspersa*, tiene un efecto determinante en el contenido de alantoína en la baba. Los caracoles que sufrieron ayuno presentaron un nivel significativamente más bajo desde la primera semana comparado con el grupo con soya hasta la tercera semana, y el grupo sin soya lo mismo pero a la tercera semana, lo que refleja probablemente el aporte purínico previo a estas dietas. Lo anterior es ratificado a través de un estudio realizado en seres humanos, durante tres semanas, con diferentes alimentos: hígado de bovino, filetes de pescado y soya, donde se demuestra que los niveles más altos de ácido úrico (derivado purínico), se encontraron en los que consumieron soya y pescado al analizar el plasma (Brule *et al.*, 1992), reflejando a través de este ejemplo los altos niveles purínicos de la soya. Nuestros resultados muestran que una dieta con soya otorga aproximadamente tres veces más alantoína que una condición en ayuno, y dos veces más que cuando en la dieta no se agrega soya.

Las mediciones de estos tres derivados púricos requirieron un proceso de previa concentración por sus bajas cantidades de este compuesto, siendo los de menor concentración la Xantina y la Hipoxantina. Las dificultades de determinar y cuantificar en todas las muestras estos dos últimos, puede deberse por una parte a sus bajas concentraciones y por otra, esta memoria de título se guió con un tamaño muestral determinado en relación a varianza de Alantoína y no para estos compuestos. Aun así, no

hay que subestimarlos como menciona un estudio realizado en rumiantes, que señala que lo más apropiado es cuantificar todos los derivados purínicos para estimar el real aporte de su origen y por ende es mejor cuantificar todos y no solo Alantoína (Sandoval-Castro y Herrera-Gómez, 1999). Lo anterior ratifica los datos obtenidos en la secreción de caracoles, donde los niveles de Hipoxantina no son despreciables con los niveles de Alantoína, ya que están en relación aproximada de 1:2. Cabe destacar que la Hipoxantina en el caso de una dieta con soya mostró similares aumentos que la Alantoína, claramente la primera semana.

El tiempo es un aporte más que entrega esta tesis en relación a la producción de purinas. Es a través de tres semanas que podemos concluir y discutir los resultados, pero el valor del tiempo nos muestra de que manera estos cambios han ido surgiendo. En un inicio el estudio se realizaría determinando y cuantificando los compuestos, la semana 1, 2 y 3. Los datos encontrados la semana dos, se realizaron solo en base a alantoína, otorgando valores muy cercanos a la semana uno, por lo que omitimos estos datos, evaluando periodos de tiempo no tan seguidos.

IX.3. Alantoína, cosmetología y farmacia

La baba de caracol ha sido uno de los tantos compuestos naturales que se ha comercializado por el *vox populis*, y quizás si cumple con las propiedades a las que hacen mención diferentes estudios, relacionadas con su contenido de Alantoína como anti-inflamatorio, reparador de la piel tras irritación cutánea inducida por UV, químicamente o mecánicamente, además de aliviar, limpiar y curar las heridas, cumpliendo además una acción queratolítica (Heath y Platt, 1974). Por estas propiedades la Alantoína es utilizada en soluciones para posterior afeitado, cremas para manos, ungüentos labiales, cremas para guaguas. De acuerdo a las especificaciones de uso cosmetológico y farmacéutico la concentración adecuada que debe incorporarse de 0,1% a 0,5% (The Merck Index, 1996). Tomando en cuenta los niveles de Alantoína en el grupo con soya de alrededor de 1 mg/100 ml en la baba, resulta ser al menos cien veces más bajos que los requeridos para su aplicación. Aun cuando se sumen los otros compuestos púricos estudiados se alcanzan valores promedios de 2,45 mg/100 ml, los cuales no cumplen con los estándares propuestos. Nuestros resultados indican que si se desea utilizar la baba de caracol como

fuelle de Alantoína y otros derivados púricos, deberían usarse muestras concentradas para lograr la dosis adecuada sugerida (The Merck Index, 2006). Los efectos observados con preparados de baba de caracol hasta ahora descritos, posiblemente no se deban a los componentes púricos como lo demuestra este estudio, sino que a otros componentes, lo cual nos lleva a sugerir la realización de estudios que permitan evaluar los poderes reales de la baba de caracol. Una posibilidad de aumentar el contenido de la Alantoína y sus precursores a través de la dieta, no es factible ya que al aumentar el contenido de soya en la dieta más allá de un 20%, los caracoles no la consumen, lo que restringe el uso de este recurso para elevar aun más los niveles de Alantoína.

Los intermediarios del metabolismo de las purinas, cumplen también con un poder antioxidante, ejemplo de lo anterior es el ácido úrico, potente antioxidante que protege el ADN de radicales libres. Xantina e Hipoxantina, son también intermediarios del metabolismo de las purinas y supuestos antioxidantes a lo cual se atribuye su poder regenerativo (Gus’Kov *et al.*, 2001). Narayan *et al.*, (2007) en su estudio explica que existen especies de oxígeno reactivo que juegan un papel fisiopatológico en los problemas cutáneos, tales como rosácea, daños a los ácidos nucleicos, y biomoléculas presentes en la piel, contribuyendo a efectos adversos, señalando que agentes antioxidantes captadores de estos oxígenos reactivos disminuyen y ayudan al tratamiento y prevención de enfermedades dérmicas. Gus’Kov *et al.* (2001), hace referencia al poder antioxidante de la Alantoína como captador de oxígeno reactivo y enfatiza que su poder permite modificar efectos genotóxicos en humanos, y dada su alta solubilidad, explica que la Alantoína es mejor antioxidante que el ácido úrico.

El servicio Agrícola Ganadero (SAG) ha establecido como obligatorio para aquellos que mantengan plantales de caracoles en función de una recolección externa, la realización de una purga de 10 días, esto con el fin de evaluar los caracoles que ingresen a plantales helicícolas y así descartar infestaciones o enfermedades (SAG, 2005). Este procedimiento podría guiar muchas personas para realizar la extracción de la baba con un “caracol limpio”, y de esta manera alterar significativamente los valores de metabolitos como la Alantoína, tal vez no diez días pero si cercano a una semana, lo anterior podría ratificar por esta causa o por la dieta, los resultados de Manosalva (2005), que son muy similares a los de esta memoria de título en ayuno.

Helix aspersa presenta etapas de menor actividad metabólica, ya sea por falta de temperaturas adecuadas, humedad o comida, esto se acompaña por una disminución en su metabolismo. Lo anterior conlleva cambios bioquímicos que contemplan alteraciones en la regulación enzimática. Los estudios de Ramos-Vasconcelos *et al.* (2005) han demostrado que en *Helix aspersa* las enzimas que regulan las reacciones de oxidación-reducción, aumentan en los estadios de bajo metabolismo (hibernación), debido probablemente a una posible estrategia adaptativa, para minimizar los efectos de reanudación posterior a este tiempo, que aumentan significativamente los radicales libres a nivel mitocondrial. Este autor demostró que en épocas invernales las enzimas antioxidantes aumentan en relación al verano. Lo anterior sugiere, que la enzima alantoinasa, podría por su rol de antioxidante aumentar en invierno, para actuar en la época de primavera-verano. El estudio realizado en esta tesis demuestra que algunas enzimas antioxidantes requieren de dieta como sustrato, de la cantidad de purinas concretamente, demostrado al mantener tres semanas en ayuno los caracoles. Por lo que al igual que Manosalva (2005), podría esperarse un aumento de las concentraciones de derivados purínicos en períodos de mayor actividad, por ejemplo posterior a la hibernación, debido a un aumento de la enzima en el periodo de bajo metabolismo. Estudios posteriores podrían cuantificar la producción de Alantoína posterior a una condición de ayuno.

La baba del caracol ha sido también implementada en jarabes. En Chile, uno de estos jarabes es Karacoflu, se vende en farmacias naturistas y está presente en el mercado a partir del año 2006. En Europa, Francia, un jarabe para la tos llamado Helicidina se comercializa desde 1957 como anti-tusivo, y posteriormente en 1999 se comprueba que es bronco relajador producto de la liberación de estrógenos (Bonnemain, 2003). Quevauviller, es presentado por Bonnemain (2003), como el autor que evidencia las propiedades de la baba del caracol: acción mucolítica, inhibidora de ciertos bacilos y actividad espasmolítica sobre las vías respiratorias.

Cabe destacar que actualmente hay una gran simplicidad en la fabricación de cosméticos donde solo se efectúa un análisis cualitativo para determinar Alantoína en la baba de caracol, sin antes evaluar los porcentajes utilizados en cosmética. Los resultados de esta memoria de título señalan la necesidad de efectuar análisis cuantitativos de los componentes químicos que dicen tener los productos cosméticos y naturistas.

X. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones que permitieron detectar, separar y cuantificar los derivados de purinas simultáneamente mediante electroforesis capilar de fase micelar.
- Los resultados encontrados apoyan la hipótesis propuesta de que hay diferencia significativa en la producción de Alantoína, otorgando una dieta con soya (rica en purina) en relación a una sin soya, luego de 3 semanas, debido a la cantidad de purina.
- En cuanto a la cantidad de Alantoína encontrada en la baba de caracol, es alrededor de 1,4 mg por cada 100 ml de baba.
- En el caso de Hipoxantina y Xantina, no fue muy clara la correlación directa propuesta en la hipótesis con la dieta con soya, lo cual se ha atribuido a problemas del tamaño muestral.

ANEXOS

ANEXO I. Test de Shapiro-Wilk

El análisis estadístico se inició determinando la normalidad de los datos encontrándose que no presentaban una distribución normal. La significancia menor a 0,05 indica que no existe normalidad.

Tabla 22. Test de Normalidad Shapiro-Wilk, Programa SPSS.

Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.
Ayuno	0,925	41	0,010
Con Soya	0,736	41	0,000
Sin Soya	0,872	41	0,000

ANEXO II. Gráficos de normalidad.

El siguiente gráfico (Fig.11) representa un histograma de 19 caracoles en ayuno. La carencia de continuidad de los datos, señala que no existe tal normalidad en este grupo.

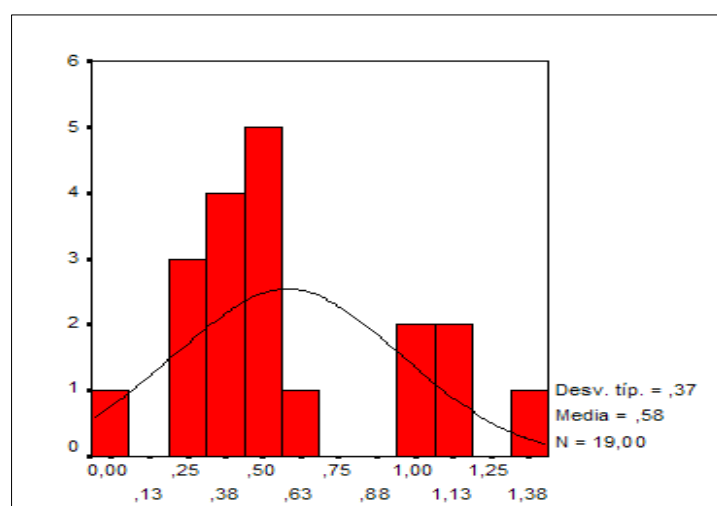


Fig.11 Curva de determinación de normalidad de Alantoína, en 19 caracoles en ayuno.

No existe continuidad de los datos (Fig.12), por lo tanto no hay normalidad dentro del grupo con soya.

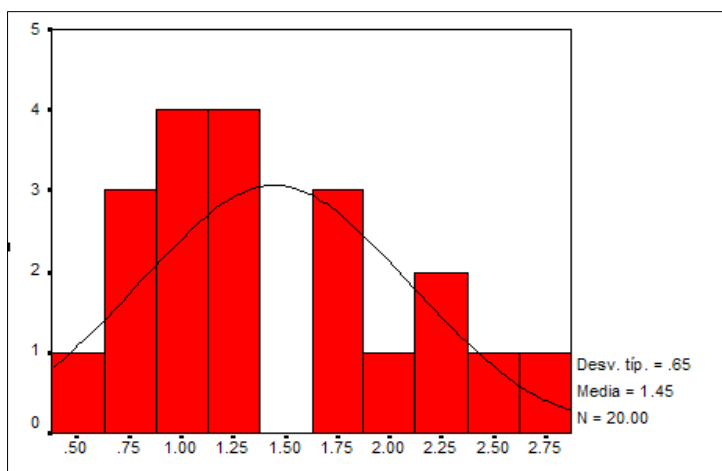


Fig.12 Curva de determinación de normalidad de Alantoina, en 20 caracoles alimentados con soya.

Como se observa en el histograma del grupo sin soya (fig.13), no existe normalidad.

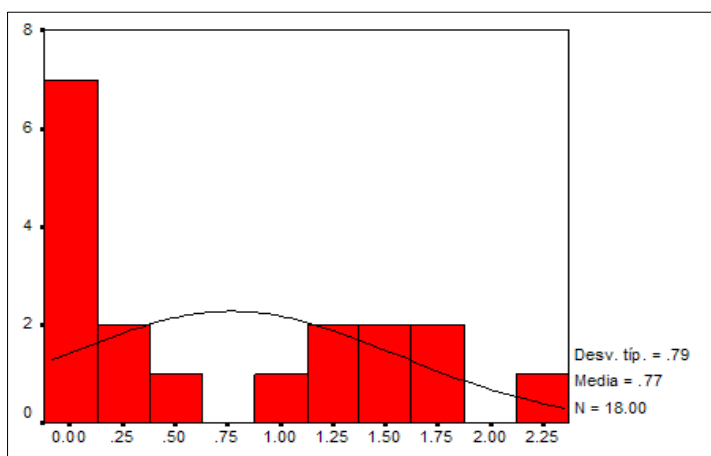


Fig.13 Curva de determinación de normalidad de Alantoina, en 18 caracoles alimentados sin soya.

XI. BIBLIOGRAFÍA

AGROMEAT. Chile- Crean cooperativa para el cultivo y comercio del caracol de jardín. [En línea]. <<http://www.agromeat.com/PAdetalle.asp?id=6714>> <Consulta: 3-10-2006>

ALFAZEMA, L.; HOWELLS, S.; PERRETT, D. 1998. Determination of allantoin in biofluids using micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*. 817: 345-52

BONNEMAIN, B. 2003. Helices et médicaments: l'escargot au service de la sante depuis l' antiquite jusqu'a nos jours. *Revue Histoire de la Pharmacie*. 338: 211-218

BORJA, D. 2004. Estudio de prefactibilidad de la cría de Escargot. [En línea]. <<http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/caracoles/epfcaracol.pdf>> <Consulta: 12-11-2005>

BRULE, D.; SARWAR, G.; SAVOIE, L. 1992. Changes in serum and urinary uric acid levels in normal human subjects fed purine-rich foods containing different amounts of adenine and hypoxanthine. *Journal of the American College of Nutrition*, 11 (3): 353-358

BUCHANAN, J.; SONNE, J.; DELLUVA, A. 1948. Biochemical precursors of uric acid carbon. *Journal Biological Chemistry*. 166: 393-394

CABRERA, A. 1962. *Zoología Pintoresca*. Ed. Ramon Sopena, S.A. Barcelona. P. 165-188

CAMPION, M. 1961. The structure and function of the cutaneous glands in *Helix aspersa*. *Quartely Journal of Microscopical Science*. 102(2): 195-216

CARMONA, A.; ALVARADO, E.; MORFIN L.; AURO A. 1996. Análisis proximal de aminoácidos del caracol (*Helix aspersa*) como alternativa proteínica para el ser humano. México. *Revista Veterinaria México*. 27: 2

CASTAGNINO, J.M. 1999. Electroforesis capilar. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 33 (3): 297-329.

CHARRIER, M.; DAGUZAN, J. 1980. Nitrogen excretion of *Helix aspersa* Muller (Mollusca Gastropoda Pulmonata). Annales de la Nutrition et l'Alimentation. 34(4):709-23

CHEN, X.B.; KYLE, D.J.; ORSKOV, E.R. 1993. Measurement of allantoin in urine and plasma by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization. Journal of Chromatography. 617: 241

CHEN X.B.; MATUSZEWSKI, W.; KOWALCZYK, J. 1996. Determination of allantoin in biological, cosmetic, and pharmaceutical samples. Journal AOAC Int. 79: 628

CORNEJO, S.; POKNIAK, J.; LÓPEZ, A.; EGAÑA, J.I. 2000. Guía de pasos prácticos para la formulación de dietas y raciones. Santiago. Chile. Apunte docente Universidad de Chile, Facultad de Medicina Veterinaria, Departamento de Fomento de la Producción Animal.

DALLINGER, R.; CHABICOVSKY, M.; HODL, E.; PREM, C.; HUNZIKER, P.; MANZL, C. 2005. Copper in *Helix pomatia* (Gastrópoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes. American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 289 (4): R1185-95

DARWIN C. 1985. El Origen de las Especies. Ed. EDAF. Madrid. p.405. Capítulo XIII.

FAO, MANUEL DE FORMATION. 2005. Interactions de genre, de la biodiversité agricole et des savoirs locaux au service de la sécurité alimentaire.

[En línea]. <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/y5956f/y5956f00.pdf>> <Consulta: 03-05-2007>

GARCIA, A.; MUROS, M.; BARBAS, C. 2001. Measurement of nephrolithiasis urinary markers by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 755: 287-295

GIBBONS, J.; CHAKRABORTI, S. 1992. *Nonparametric statistical inference*. New York. Tercera Edición.

GODAN, D. 1983. *Pest Slugs and Snails: Biology and Control*. Springer-Verlag, New York. 445 pp.

GONZÁLEZ, M. 2005. *La Prehistoria de Santoña. Bibliografía/Fuentes documentales*. Dpto. de Ciencias Históricas Universidad de Cantabria. [En línea]. <<http://rehisan.iespana.es/Prehistoria.htm>> <Consulta: 2-04-2007>

GRIEM W.; GRIEM-KLEE S. 1999. Universidad de Atacama, apuntes de geología histórica. Chile. [En línea]. <<http://plata.uda.cl/minas/apuntes/geologia/geologiageneral/ggcap08a.htm>> <Consulta: 10-04-2007>

GUS'KOV, E.; KLETSKII, M.; KORNIENKO, I.; OLEKHNOVICH, L.; CHISTYAKOV, V.; SHKURAT, T.; PROKOF'EV, V.; CORRESPONDING MEMBER OF THE RAS ZHDANOV Y. 2001. Allantoin as a free-radical scavenger. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 383: 105-7

HEATH, S.; PLATT, P. 1974. The determination of Allantoin in dental creams. *Society of cosmetic chemists of great Britain* 6: 1-25

HSU, S. 2005. Green tea and the skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 52 (6): 1049-59

IGLESIAS, J.; CASTILLEJO, J. 1999. Field Observations On Feeding Of The Land Snail *Helix Aspersa* Müller. *The Journal of Molluscan Studies*. 65: 411-423.

INTA. 1999. Informe del Sistema de Alarma de Plaga con Trampa de Luz y Observaciones de Campo. Marcos Juárez. Entomología. Argentina. [en línea]. <www.inta.gov.ar/MJUAREZ/info/documentos/EntomologiaI/sap0705.htm> <Consulta: 11-04-2007>

INTA. 2003. Historia de la Helicicultura. Silvia Martens. Argentina. [en línea]. <www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/alter/caracol.htm> <Consulta: 11-04-2007>

JORGENSON, J.W.; LUCKACS, K.D. 1981. Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries. *Analytical Biochemistry*. 53:1298-1302

KAWASE, J.; UENO, H.; KAZURO, T. 1982. Determination of Allantoin and Chlorohydroxyaluminium allantoinate in cosmetic and pharmaceutical products by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 253 (2): 237-42

LAGENDIJK, J.; UBBINK, J.B.; HAYWARD, W.J. 1995. The determination of allantoin, a possible indicator of oxidant status, in human plasma. *Journal of Chromatography Science*. 33: 186-193

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. AND RANDALL, R. 1951. Protein measurement with the Folinphenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-75

MANOSALVA, C. 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 Químico Farmacéutico. Universidad Austral, Facultad de Ciencias. Chile 2005.

MONJE, J. 1996. Moluscos del suelo como plagas agrícolas y cuarentenarias. *Biología Tropical*. Universidad de Costa Rica. X Congreso Nacional/ Agronómico / II Congreso de Suelos.

NARAYAN, S.; HUNERBEIN, A.; GETIE, M.; JACKEL, A.; NEUBERT, R. 2007. Scavenging properties on free oxygen radicals in a skin lipid model system. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 59(8): 1125-30

PROCHILE. 2006a. Mercado de las carnes exóticas en Europa. Madrid, España. [En línea]. <http://www.prochile.cl/documentos/pdf/encuentro_carnes_exoticas_espana.pdf> <Consulta: 29-09-2006>

PROCHILE. 2006b. Perfil de mercado caracoles – Francia. Paris. [En línea]. <www.prochile.cl/doc2.php?file=paris_caracoles_2006.pdf> <Consulta: 11-06-2006>

RAMOS-VASCONCELOS, G.; CARDOSO, L.; HERMES-LIMA, G. 2005. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140:165–174

SAG. 2005. Helicicultura Cría de Caracoles Terrestres. [En línea]. <[2005http://www.puc.cl/agronomia/2_alumnos/ProyectosTitulos/pdf/EconomiaAgraria/RodrigoWallach.pdf](http://www.puc.cl/agronomia/2_alumnos/ProyectosTitulos/pdf/EconomiaAgraria/RodrigoWallach.pdf)> <Consulta: 20-06-2007>

SAG. 2006. Instructivo tecnico específico *Helix aspersa müller*. [En línea]. <www.prochile.cl/doc2.php?file=paris_caracoles_2006.pdf> <Consulta: 03-04-2007>

SANDOVAL-CASTRO, C.; HERRERA-GOMEZ, F. 1999. Estimación de la síntesis de proteína microbiana en rumiantes a través de la medición de los derivados de purina en orina. México. *Revista Biomédica*. 10:241-251

SANFUENTES, O. 2006. Europa y su percepción del nuevo mundo a través de las especies comestibles y los espacios americanos en el siglo XVI. *Historia*. Santiago. 39(2): 531-556. Issn 0717-7194. [En línea]. <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-71942006000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es> <Consulta: 10-04-2007>

STIEVENART C.; HARDOUIN J. 1990. Manuel d'élevage des escargots africain geant sous les tropiques. Centre Technique de cooperation agricole et rurale (CTA). ISBN 92 9081 0769.

TERABE, S.; OTSUKA, K.; ANDO, T. 1985. Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. *Analytical Chemistry*. 57: 834

THE MERCK INDEX. 1996. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 12^a edition. Susan Budavari (Editor). Published by Merck Research Laboratories Division of MERCK & CO., Inc. Whitehouse Station, NJ. 255 p.

THE MERCK INDEX. 2006. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. London.

TRONCOSO, C. Determinación de Alantoína en plasma de ovinos mediante cromatografía planar instrumental de alta resolución (HPTLC) y su relación con el consumo de materia seca. Tesis Médico Veterinario. Universidad de Concepción, Facultad de Medicina Veterinaria. Chile 1999.

VÁSQUEZ, C.; ALCARÁZ, F.; GARRIGA, M.; MARTIN, E.; MONTAGNA, M.; RUPERTO, M.; SECOS, J. 2006. Contenido en purinas de los alimentos (en 100 gr). [En línea]. <<http://www.fisterra.com/material/Dietetica/purinas.asp>> <consulta: 20-11- 2006>

VERA-ARDILLA, M.J.; LINARES, E. L. 2005. Gastrópodos de la región subxerofítica de la Herrera, Mosquera, Cundinamarca, Colombia. *Revista de la academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales*. 29 (112): 439-456. ISSN 0370-3908

VOET, D.; VOET, J. G. 1995. Nucleotide metabolism. *Biochemistry*. 2nd ed. N. Rose, ed. John Wiley and Sons, Inc. New York. 795-7 p.

YOUNG, E.G.; CONWAY, C.F. 1942. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *Journal of Biological Chemistry*. 142:839-53