

---

## **INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

Proyecto:

**“EXTRACCIÓN QUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÓNICO A PARTIR DE HUMOR VÍTREO  
DE RESIDUOS ACUÍCOLAS.”**

Empresa:

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

Carrera:

**INGENIERIA BIOQUÍMICA**

Presenta:

**JOSÉ HUMBERTO PÉREZ ALFARO**

Asesora:

**DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO**



Carretera Panamericana Km. 1080, C.P. 290 Apartado Postal: 599

Tel. (961)61 5 04 61 Fax: (961)61 5 16 87

contacto@ittg.edu.mx

# ÍNDICE

<b>I.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>II.- JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>III.- OBJETIVOS.....</b>	<b>6</b>
<b>IV.- CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN EL QUE PARTICIPÓ.....</b>	<b>7</b>
<b>V.- PROBLEMAS A RESOLVER.....</b>	<b>9</b>
<b>VI.- FUNDAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>9</b>
<b>VII.- PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES.....</b>	<b>16</b>
<b>VIII.- RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
<b>IX.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>X.- COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y APLICADAS.....</b>	<b>35</b>
<b>XI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES.....</b>	<b>36</b>

## I.- INTRODUCCIÓN

Actualmente las investigaciones científicas han tenido un amplio enfoque en la búsqueda de fuentes biológicas de ácido hialurónico (AH), debido a la alta demanda de este polisacárido, en la industria farmacéutica y cosmética. La aplicación en la industria farmacéutica es principalmente como auxiliar en la fabricación de diferentes medicamentos utilizados para tratamientos contra osteoartritis, artritis reumatoide, entre otras. En la industria cosmética debido a su capacidad de retención de agua es empleado en la hidratación de la epidermis ya que reconstituye las fibras que sostienen los tejidos de la piel, así mismo es empleado en tratamientos de reducción y prevención de arrugas faciales, en tratamientos de relleno y contorneado de los labios y pómulos, así como para alisar la frente, las marcas cutáneas y otros problemas cutáneos que ocasionen pérdida de piel [7].

El AH, es un polisacárido de alto peso molecular, fue descubierto por Meyer y Palmer en 1934 a partir de humor vítreo de ojos de ganado [13]. El ácido hialurónico pertenece al grupo de los glucosaminoglucanos, es un biopolímero donde se alternan el ácido D-glucurónico y el monosacárido N-acetil glucosamina en una cadena helicoidal, esto le confiere sus propiedades estructurales y la capacidad de retener moléculas de agua intercaladas en su estructura. Es casi omnipresente (aunque en cantidades relativamente pequeñas) en el cuerpo humano, y en otros vertebrados. El más alto contenido de AH se encuentra en el cordón umbilical, el cartílago nasal, humor vítreo, ganglios del tórax, plasma, líquido sinovial, y tejido conectivo tal como la membrana sinovial, donde es responsable de la retención de agua normal y la lubricación de la articulación [17]. Al ser un componente habitual de la dermis y tener la ventaja de que su molécula es idéntica en todo ser vivo que lo posee, ha sido fácil su replicación, por lo que a la fecha la producción artificial por bioingeniería del ácido hialurónico ha llevado a la producción de subtipos diferenciados por el tamaño de la partícula, la cantidad

de ácido hialurónico por centímetro cúbico y la cantidad de enlaces cruzados bioquímicos lo que le otorga a cada subtipo diferencias en su densidad, en su facilidad de aplicación y en su duración [16].

El medio marino es un reservorio excepcional de AH partir de productos naturales, además ofrece gran biodiversidad para descubrir compuestos terapéuticos útiles que depende en gran medida de la especificidad de especie. El potencial terapéutico de los compuestos bioactivos naturales tales como polisacáridos, especialmente los glucosaminoglucanos, está ahora bien documentado y combinado con la actividad de la biodiversidad permitirá el desarrollo de una nueva generación de productos terapéuticos [12].

Muchos subproductos y excedentes de la industria agroalimentaria son susceptibles de ser aprovechados y, sin embargo, son destruidos por falta de usos viables. A las conocidas alternativas de producción de energía por incineración, producción de biogás o transformación para alimentación animal, se van sumando poco a poco nuevas ideas para reciclar estos residuos y obtener productos de alto valor añadido [4]. En México la industria pesquera y las actividades acuícolas generan 799,000.02 ton/año aproximadamente de las cuales solo el 3.67 % se aprovechan anualmente [8] para otros fines como generación de biocombustibles y ensilados para consumo animal. Por esta razón el presente trabajo se destina a la investigación de AH obtenido a partir de residuos acuícolas, con la finalidad de proporcionar un valor agregado a dichos subproductos que no cuentan con una disposición final adecuada y que son vertidos directamente al mar o a rellenos sanitarios, ocasionando un problema de contaminación.

## II.- JUSTIFICACIÓN

- Económica

Otorgar un valor agregado a residuos acuícolas generados por la actividad comercial, generando ingresos extras al comercializar el ácido hialurónico obtenido.

- Social

Satisfacer la demanda de ácido hialurónico en tratamientos médico-terapéuticos, en industria farmacéutica y cosmetológica a partir de nuevas fuentes de obtención, tales como los residuos acuícolas.

- Científica

Aportar conocimiento científico para investigaciones posteriores, generando información sobre fuentes alternativas de obtención de moléculas de alto valor comercial a partir de desechos orgánicos acuícolas.

- Ambiental

Dar solución a una problemática ambiental reduciendo porcentajes de desechos acuícolas mediante alternativas para su disposición final.

### **III.- OBJETIVO**

Extraer y cuantificar ácido hialurónico a partir de humor vítreo de residuos acuícolas.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar humedad, grasas, proteínas, y azúcares totales en humor vítreo de residuos acuícolas.
- Evaluar el efecto de la relación sólido: líquido en el rendimiento de extracción de ácido hialurónico por método químico.
- Determinar el peso molecular del ácido hialurónico extraído, mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### IV.- CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN EL QUE PARTICIPÓ

El proyecto “EXTRACCIÓN QUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÓNICO A PARTIR DE HUMOR VÍTREO DE RESIDUOS ACUÍCOLAS.” se realizó en el Polo Tecnológico Nacional Para El Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas En Biocombustibles (Fig. 1) dentro del Tecnológico Nacional de México ubicado en Carretera Panamericana km. 1080. Col. Terán, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.



Figura 1 Polo tecnológico nacional para el desarrollo de investigación y pruebas analíticas en biocombustibles.

**MISIÓN:** Formar parte integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

**VISIÓN:** Ser una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

**VALORES:** El ser humano. El espíritu de servicio. El liderazgo. El trabajo en equipo. La calidad. El alto desempeño. Respeto al medio ambiente.

En el laboratorio No. 5 “Pruebas de combustión” del Polo tecnológico se llevó a cabo la mayor parte de la extracción de ácido hialurónico.



El método de electroforesis en gel de agarosa fue realizado en el laboratorio 1 “Biología molecular”.





## **V.- PROBLEMAS A RESOLVER**

Los residuos acuícolas son considerados como residuos de manejo especial, ya que son subproductos generados por actividades del sector primario. El principal problema radica en el mal manejo de estos residuos, ya que se disponen como residuos urbanos, así como de manera clandestina por la disposición en tierra y mar, incrementando la posibilidad de contaminación por una alta carga orgánica, que provoca malos olores, genera fauna nociva, afecta al suelo, subsuelo y mantos acuíferos, además de contribuir a la transmisión de enfermedades.

En este mismo sentido, no existen datos suficientes para cuantificar el impacto ambiental. Sin embargo, si los residuos se disponen en el mar en grandes cantidades, provocan problemas a la fauna nativa además de sedimentarse en el fondo, ya que a diferencia de lo que la mayoría de pescadores cree, cuando se descartan en grandes cantidades el ecosistema no logra absorberlos completamente.

## **VI.- FUNDAMENTO TEÓRICO**

### **VI.1 Generación de residuos pesqueros y acuícolas**

La Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) define a los residuos de manejo especial como aquellos generados en los procesos productivos, que no reúnen las características para ser considerados como peligrosos o como residuos sólidos urbanos. Por su parte, en su Artículo 19, la Ley General establece ocho categorías definidas de residuos de manejo especial (Tabla 1) y en el proyecto de norma oficial mexicana NOM-161-SEMARNAT- 2011, se establecen las bases para formular los planes de manejo correspondientes. Dichas categorías pueden comprender corrientes y subproductos específicos.

Tabla 1. Categorías de residuos de manejo especial (SEMARNAT 2012)

<b>Categoría (Artículo 19 de la LGPGIR)</b>	<b>Tipo de residuos</b>	<b>Disponibilidad de información</b>
Residuos de las rocas o los productos de su disposición		ND
Residuos de servicios de salud, con excepción de los biológico-infecciosos		ND
Residuos generados por las actividades pesqueras, agrícolas, silvícolas, forestales, avícolas, ganaderas, incluyendo los residuos de los insumos utilizando en esas actividades	Pesqueras: pesca y acuicultura	DGSPYRNR (2010) SAGARPA (2006 A 2010))
	Agrícolas: agroplásticos	SEMARNAT (2007) SEMARNAT (2009)
	Silvícolas	ND
	forestales	ND
	Ganaderas: excretas de porcinos y bovinos lecheros	INEGI (2007) redalyc (2004) SAGARPA (2007)

Los residuos acuícolas forman parte de esta clasificación, ya que son subproductos generados por actividades del sector primario (Tabla 2), en este caso el sector pesquero. De acuerdo a cifras obtenidas, la SEMARNAT indicó que en México durante el periodo del 2006 al 2012, la cantidad promedio generada de residuos pesqueros, alcanzó las 799,000 toneladas por año, de las cuales sólo el 3.67% se aprovecharon para otras actividades (Tabla 3).

Estas cifras son indicadores de que en México son escasas las alternativas para el tratamiento de estos residuos. Esto origina que los desechos sean vertidos directamente al mar o bien a rellenos sanitarios, desperdiciando fuentes potenciales de compuestos de interés y generando un problema serio de contaminación [8].

Tabla 2. Residuos generados por actividad productiva pesquera (SEMARNAT 2012).

<b>Actividad</b>	<b>Residuos generados</b>	
	<b>Orgánicos</b>	<b>Inorgánicos</b>
Pesca	Descartes, vísceras, cartílagos, aletas, piel, huesos, escamas, sangre.	Materiales de pesca.
Cultivo	Cabeza de camarón, valvas, vísceras.	Residuos de actividades administrativas (RSU)
Industria	Vísceras, cartílagos, piel, hueso, escamas, aletas, sangre, cabezas de crustáceo, etc.	Residuos de actividades administrativas (RSU) Residuos de proceso (empaques, herramientas, etc)
Comercio	Vísceras, cartílagos, piel, huesos, escamas, sangre.	Residuos del establecimiento

Tabla 3. Generación y aprovechamiento de residuos de manejo especial (SEMARNAT 2012).

RME	Generación promedio [mil ton/año]	% Aprovechamiento promedio anual	% Disposición anual
Agroplásticos	313.13	ND	ND
Excretas	66,708.27	ND	ND
Pesca	799.02	3.67	ND
Residuos de Aeropuerto de la Cd. De México	8.04	32.20	67.43
Lodos PTAR	232.00	ND	100
Tiendas de autoservicio	407.19	67.97	32.03
Construcción y demolición	6,111.09	ND	ND
Electrodomésticos	21.66	ND	ND
Electrónicos	263.85	ND	ND
Vehículos al final de su vida útil	805,202.50	ND	ND
Llantas	1,011.03	ND	ND
Vidrio	1,142.57	ND	ND
Pilas	33.98	3.13	ND
Papel y cartón	6,819.83	48.59	11
Residuos de hoteles	276.22	1.49	98.51

## IV.2 HUMOR VÍTREO

El cristalino separa la cámara anterior del ojo, que contiene un líquido llamado humor acuoso, de la cámara posterior que contiene humor vítreo (HV). La cámara posterior está delimitada en la parte trasera, desde el interior hacia fuera, por la membrana de la retina, la coroides y la esclerótica, y en la parte delantera por el cuerpo ciliar y el cristalino (Fig. 2).

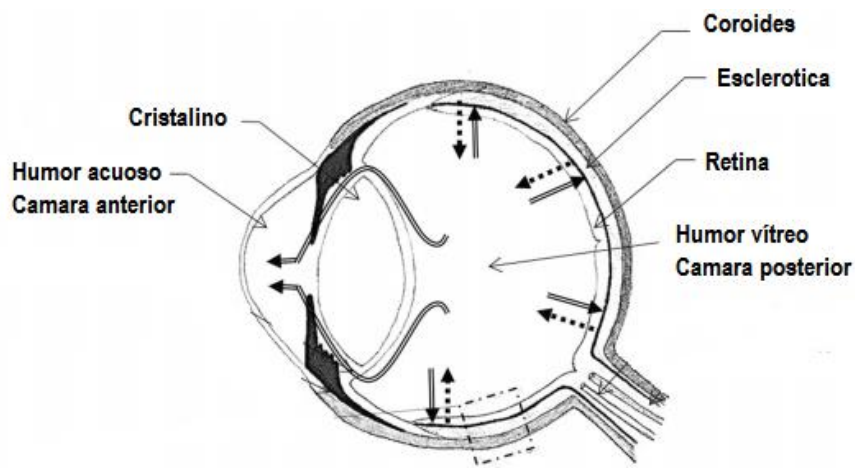


Figura 2 Ubicación del humor vítreo.

El HV es un tejido altamente hidratado, con 98 a 99,7% contenido de agua. Su estructura gelatinosa se debe a proteínas fibrilares: principalmente colágeno, fibras asociados con carbohidratos de glucosaminoglucanos (principalmente ácido hialurónico). Se han identificado aproximadamente 1,205 proteínas en el HV. También contiene electrolitos (tales como sodio, potasio, cloro, lactato y ascorbato), carbohidratos tales como glucosa, y pequeñas cantidades de proteínas distintas de colágeno, incluyendo opticin. Un cambio en composición con la edad conduce a la licuefacción gradual. En niños de 4 años, el HV líquido representa el 20% del volumen total, aumentando a más del 50% en personas con 80-90 años de edad [5].

### **IV.3 ÁCIDO HIALURÓNICO**

El ácido hialurónico (AH), también conocido como hialuronano, clasificado como un glucosaminoglucano y comúnmente conocido como GAG, es un tensoactivo aniónico, lineal, de polisacáridos no sulfatados. AH es una mega molécula con un peso molecular típico entre  $2 \times 10^5$  y  $10 \times 10^7$  Da. Sin embargo, otros GAGs son relativamente más pequeños de tamaño entre  $50 \times 10^4$  Da, comúnmente  $1.5 \times 10^4$  a  $2 \times 10^4$  Da con una longitud de cadena corta.

El más alto contenido de HA se encuentra en el cordón umbilical, el cartílago nasal, humor vítreo, ganglios del tórax, plasma, líquido sinovial, y tejido conectivo tal como la membrana sinovial, donde es responsable de la retención de agua y la lubricación de la articulación. Por lo tanto, el AH tiene diversas aplicaciones en la cosmética, biomédica y las industrias de alimentos. Esta molécula ofrece una gran promesa en diversos campos de la medicina. En consecuencia, los productos terapéuticos derivados del HA enfatizan el impulso para el desarrollo de procesos biotecnológicos y químicos para la optimización de la producción de fármacos basados en AH [17].

En cuanto a la evolución y la biodiversidad, el mar parece ser superior al ecosistema terrestre; las especies marinas comprenden aproximadamente un

medio de la biodiversidad totales, ofreciendo así una gran fuente para descubrir agentes terapéuticos útiles.

Los glucosaminoglucanos abundan en los tejidos de vertebrados, invertebrados marinos. Los polisacáridos sulfatados que incluyen sulfato de condroitina (SC), sulfato de dermatano (SD), sulfato de heparano (SH), heparina, sulfato de Acharan (SA) también se han aislado y caracterizado a partir de diferentes fuentes marinas. (Fig. 3). El AH se produce principalmente en la matriz extracelular (MEC) y la matriz pericelular, aunque recientemente se ha demostrado la presencia intracelular. Del mismo modo, su presencia se ha documentado en los tejidos tan diversos como la piel, el cartílago y el cerebro. Por lo tanto, el HA se ha obtenido de varias fuentes terrestres naturales para aplicaciones clínicas [17].

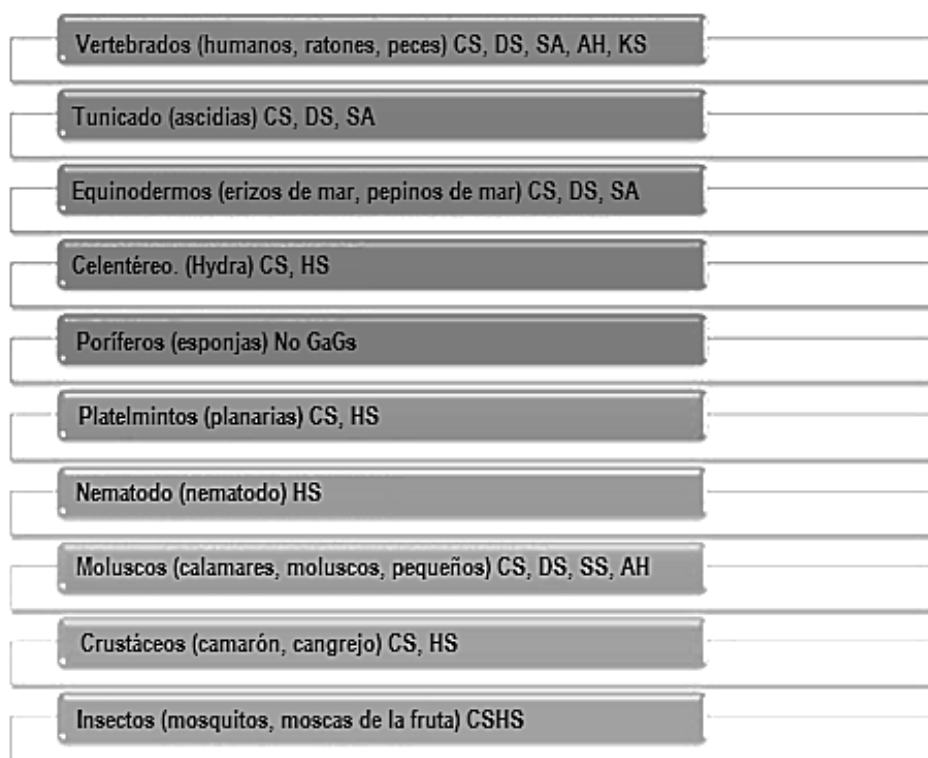


Figura 3 Distribución de GAGs en organismos.

El medio marino es un reservorio excepcional de bioactivo que ofrece una amplia biodiversidad para descubrir compuestos terapéuticos útiles, que dependerá en gran medida de la especificidad de especie [12].

Este biopolímero de alto peso molecular se considera que es energéticamente estable, en parte debido a la estereoquímica de sus componentes disacáridos. Está formado por secuencias alternadas de  $\beta$  (1-4) ácido glucurónico y (1-3) -N-acetilglucosamina y están unidos entre sí a través de enlaces glucosídicos beta-1,4 y beta-1,3 (Fig. 4).

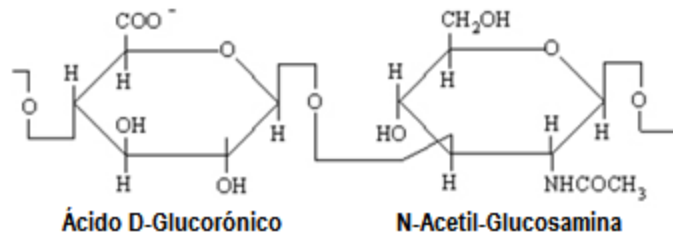


Figura 4 Estructura del Ácido Hialurónico.

Las moléculas de azúcar se encuentran en posiciones estéricamente favorecidas, mientras que los hidrógenos asumen las posiciones axiales menos favorables. La diferencia estructural entre los GAGs sulfatados y no sulfatados se muestra a continuación (Fig. 5) [17].

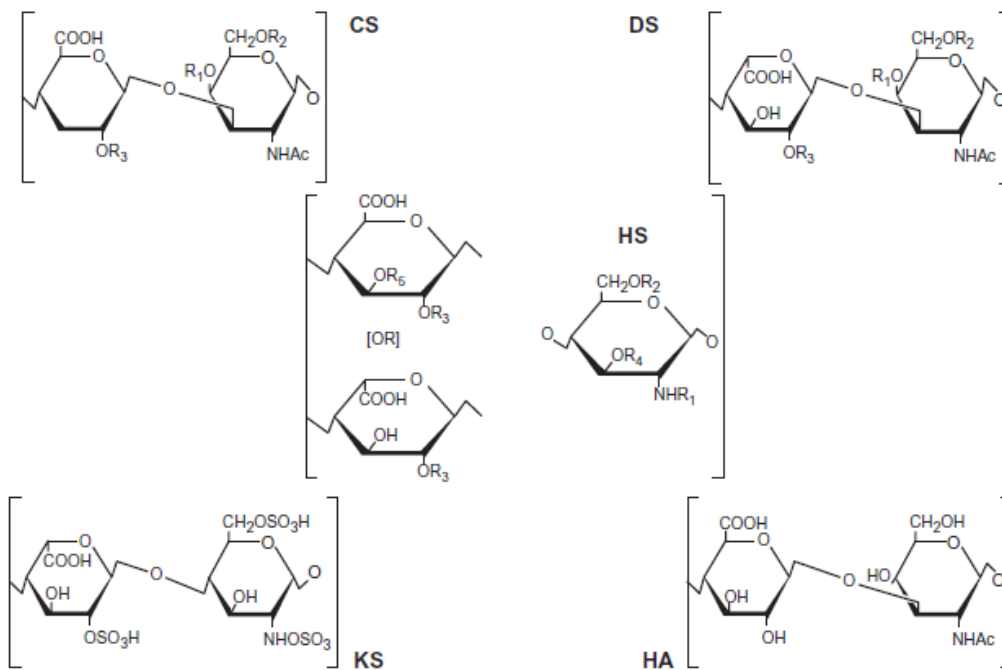


Figura 5 GAGs sulfatados y no sulfatados.

El HA se sintetiza en la cara interior de la membrana plasmática como un polímero lineal libre de cualquier proteína sin núcleo, mientras que otros GAGs son sintetizados por las enzimas de Golgi residentes y unido covalentemente a proteínas del núcleo [17].

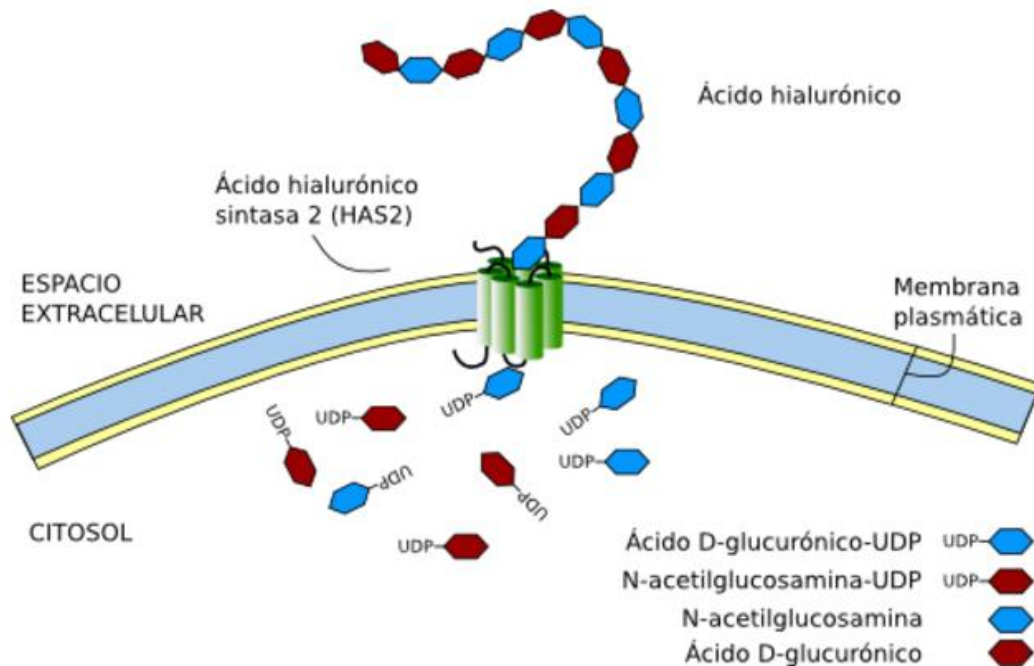


Figura 6 síntesis de ácido hialurónico

La síntesis la llevan a cabo enzimas de membrana denominadas sintasas del ácido hialurónico, de las que hay tres tipos en vertebrados (HSA1, HAS2, HAS3) y se expresan de forma diferencial en diferentes tejidos. La síntesis ocurre en la cara citosólica de la membrana plasmática donde se van ensamblando los monosacáridos, y a medida que se va sintetizando la cadena de ácido hialurónico va siendo transferida al espacio extracelular (Fig. 6). Aunque las tres enzimas sintetizan ácido hialurónico, la HAS2 es la que parece sintetizar las cadenas más largas. Curiosamente un gen homólogo al de la enzima HSA1 se ha encontrado también en algunas bacterias, las cuales lo sintetizan para aumentar su movilidad. Probablemente estas bacterias captaron el gen de los animales [1].

## VII.- PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

### MATERIA PRIMA

El residuo (cabezas de pescado) empleado como materia prima en este trabajo fue recolectado en los expendios de pescado del mercado de los ancianos, ubicado en la 9.<sup>a</sup> avenida sur y 15.<sup>a</sup> calle oriente en el municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; México.



Los residuos fueron colocados en bolsas de plástico de color negro y fueron transportados al laboratorio 8 "Derivatizaciones" del Polo tecnológico nacional para el desarrollo de investigación y pruebas analíticas en biocombustibles en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez ubicado en Carretera Panamericana Km. 1080, C.P. 29050.



- **Acondicionamiento de materia prima**

Las cabezas de pescado (Fig.7) fueron retiradas de las bolsas y fueron lavadas para eliminar cualquier materia extraña, se tomó el peso de las cabezas con una balanza granataria (OHAUS TRIPLE BEAM), posteriormente se retiraron los ojos de manera manual con ayuda de una espátula (Fig. 8 y 9), se colocaron en un recipiente y se tomó el peso final (Fig. 10).



Figura 7 Residuos acuícolas.



Figura 8 Extracción de ojos de pescado



Figura 9 Ojos de pescado.



Figura 10 Pesaje de ojos de pescado.

## CARACTERIZACIÓN DE MATERIA PRIMA

- **Determinación de humedad**

Para la determinación de humedad se tomaron ojos de pescado previamente retirados de las cabezas, los cuales fueron diseccionados por la mitad, se colocaron 3 gramos en una termobalanza marca OHAUS modelo MB25 (Fig. 11) a una temperatura de 60 °C durante 2 h y 30 min aproximadamente. Esto se realizó por triplicado.



Figura 11 Termobalanza OHAUS MB25

- **Determinación de grasas**

La determinación de grasas se realizó con respecto a la AOAC 1990, para esto se pesaron 3 gramos de muestra en una balanza analítica (OHAUS Pioneer TM) debidamente secadas con anterioridad en una termobalanza (OHAUS modelo MB25). Las muestras fueron colocadas en cartuchos de papel filtro previamente pesados. Se instaló el equipo soxhlet al cual se le añadieron 140 mL de hexano como solvente a un matraz de fondo plano de 250 mL, se hizo uso de una parrilla eléctrica (Thermo Scientific modelo: Cimarec) a una temperatura de 265° C. Una vez que el solvente llega a su punto de ebullición este comienza a evaporarse y al pasar por el refrigerante se condensa cayendo en forma de gotas sobre el cartucho que contiene la muestra. Una vez terminado el proceso de evaporación y condensación (reflujo) el solvente vuelve al matraz, a partir de este momento se tomó un tiempo de 5 horas dentro del cual se realizaron varios reflujos, una vez terminado el tiempo estimado, se desinstalo el quipo, se retiró el cartucho y se dejó que el resto del hexano contenido en el cartucho se evaporara para posteriormente tener el peso final del cartucho, la determinación de grasa se obtiene al realizar una diferencia de peso entre el peso inicial y peso final del cartucho. Este procedimiento se realiza por triplicado (Fig.12).



Figura 12 Digestión en equipo Soxhlet.

- **Determinación de proteínas**

Para la determinación de proteínas se cuantificó el nitrógeno total contenido en la muestra, para ello se realizó el método de micro Kjeldahl, el cual tiene como fundamento digerir la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado. Se pesaron 0.15 g de ojo de pescado previamente secados y desgrasados, la muestra se colocó en papel de arroz libre de nitrógeno y se colocó en el matraz Kjeldahl. Se adicionó 0.5 gramos de muestra catalizadora (sulfato cúprico), 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y aproximadamente 0.3 g de sulfato de potasio para elevar el punto de ebullición del ácido sulfúrico. Se colocó el matraz en la parrilla de digestión, dentro de una campana de extracción, girar el matraz ocasionalmente. Se esperó a que la muestra comenzara a ser digerida tomando un color verdoso, terminada la digestión en un tiempo aproximado de 6 h, se dejó enfriando el matraz en la campana de extracción de gases durante 15 min (Fig. 13). Se vació la muestra digerida a un matraz de destilación de 500 mL se lavó el matraz de micro Kjeldahl con pequeños volúmenes de agua destilada para vaciarlo en el matraz de destilación, al matraz se le agregó 200 mL de agua destilada, 15 mL de hidróxido de sodio al 40 %. Se adapta el matraz a un sistema de destilación, a la salida del refrigerante se adapta una manguera con un tubo el cual se coloca dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contiene 10 ml de

solución de ácido bórico al 4 % y unas gotas de indicador de rojo de metilo con azul de metilo. Las primeras gotas de destilación deben virar el color del indicador de violeta a verde de lo contrario se enfría y se agrega más hidróxido de sodio al 40 %. La destilación se detuvo en un tiempo de 4 h para lo que las gotas del destilado dieron alcalinidad negativa con el papel tornasol (Fig. 14).

Se retiró el matraz receptor, se lavó el refrigerante con pequeños volúmenes de agua destilada, que fue depositado en el matraz, El destilado se tituló con una solución de ácido clorhídrico 0.1 N.



Figura 13 Digestión con ácido sulfúrico concentrado.

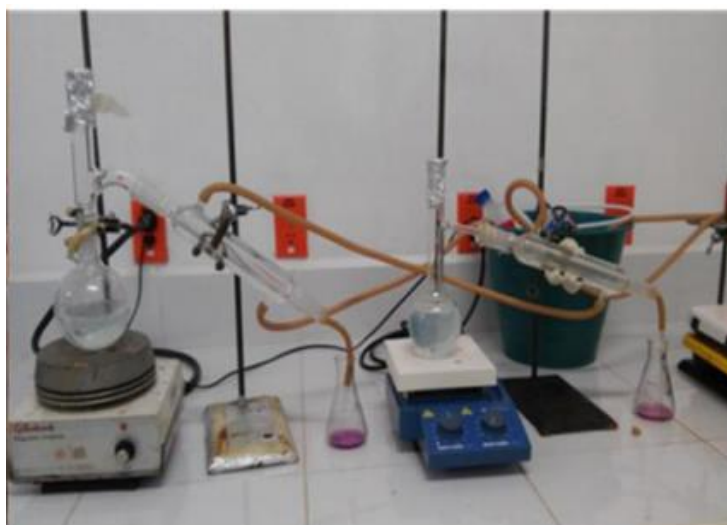


Figura 14 Destilación con hidróxido de sodio



- **Determinación de azúcares totales**

Para la determinación de azúcares totales en la muestra se realizó el método fenol sulfúrico. Se pesaron 2 g de humor vítreo, a lo cual se le adicionaron 10 mL de agua tridestilada hasta homogenizar la muestra. Se adicionó 1 mL de una solución de sulfato de zinc al 10 % y 1 mL de NaOH 0.5 N la mezcla se dejó reposar 15 minutos posteriormente se centrifugó en un centrifugadora marca Eppendorf modelo 5810R a 2000 RPM durante 15 min. Se utilizó el sobrenadante para la determinación de azúcares totales. Se adicionó 1 mL del sobrenadante en tubos de ensayo, a cada tubo se le adicionó 0.5 mL de fenol al 5 % y 3.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, los tubos fueron enfriados en un baño María de agua fría, se tomó lectura de cada tubo en un espectrofotómetro (HACH DR 5000) a 490 nm frente a un blanco, (Fig. 15) debido a que algunos tubos tuvieron una absorbancia superior a se realizó una dilución de 1:10. Se calculó los azúcares totales con una curva de calibración preparada con los carbohidratos de interés tratada de la misma manera que el problema.



Figura 15 Lecturas de absorbancia en espectrofotómetro HACH DR 5000

## **EXTRACCIÓN QUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÓNICO**

Para realizar la extracción química de ácido hialurónico se siguió la metodología emplea por Guillermo Lago en el 2007, para lo cual se realizaron algunas modificaciones debido a la naturaleza de la materia prima empleada en este

proyecto. Los ojos de los pescados fueron retirados de manera manual, se tomó el peso final de los ojos, los cuales fueron diseccionados con ayuda de un bisturí para poder retirar el humor vítreo contenido dentro del ojo, se tomó el peso final del humor vítreo (Fig. 16)



Figura 16 Humor vítreo.

Se realizaron dos tratamientos para la extracción de ácido hialurónico en los que se varió la concentración de CTAB: Se pesaron 20 g de humor vítreo para cada tratamiento, se agregaron 80 mL de NaCl al 0.2 % y se dejó reposar durante 15 minutos, se centrifugó (centrífuga Eppendorf, modelo 5810R) a 4 000 rpm por 20 min a una temperatura de 25 °C. Al sobrenadante se le agregó 6 mL y 12 mL de CTAB al 1% respectivamente dejando reposar por 15 min, y se llevó a centrifugar por 20 min a 4000 RPM a una temperatura de 25°C. (Fig. 17)

- **Lote 1**

Tratamiento 1:

Al precipitado (2 .8 g) se le agregaron 2.1 mL de CaCl (75%) al 0.9 M y 1.225 de etanol acuoso (25%) después se centrifugó a 4000 rpm por 20 min el sobrenadante se lavó con 0.6125 mL de cloroformo durante 4 veces en un embudo de separación. Lo resultante se le agrego 5.053 mL etanol (75%) y 5.053 mL de acetona (75%).

## Tratamiento 2:

Al precipitado (3.1 g) se le agregaron 2.325 mL de CaCl (75%) al 0.9 M y 1.356 de etanol acuoso (25%) después se centrifugó a 4000 rpm por 20 min el sobrenadante se lavó con 0.6781 mL de cloroformo durante 4 veces en un embudo de separación. Lo resultante se le agrego 5.594 mL etanol (75%) y 5.594 mL de acetona (75%).

Las soluciones se dejaron reposando 12 h, después se centrifugaron a 4 000 rpm por 20 min, se recuperó el precipitado de cada tratamiento y se dejaron secar durante una semana en una campana de extracción a temperatura ambiente.

- **Lote 2**

Se realizaron dos tratamientos para la extracción de ácido hialurónico en los que se varió la concentración de CTAB: Se pesaron 23.88 g de humor vítreo para cada tratamiento, se agregaron 95.5 mL de NaCl al 0.2 % y se dejó reposar durante 15 minutos, se centrifugó (centrifuga eppendorf, modelo 5810R) a 4 000 rpm por 20 min a una temperatura de 25°C. Al sobrenadante se le agregó 7.164 mL y 14.328 mL de CTAB al 1% respectivamente dejando reposar por 15 min, y se llevó a centrifugar por 20 min a 4000 RPM a una temperatura de 25°C.

## Tratamiento 1

Al precipitado (2.9 g) se le agregaron 2.175 mL de CaCl (75%) al 0.9 M y 0.725 de etanol acuoso (25%) después se centrifugó a 4000 rpm por 20 min el sobrenadante se lavó con 0.58 mL de cloroformo durante 4 veces en un embudo de separación. Lo resultante se le agrego 5.594 mL etanol (75%) y 5.594 mL de acetona (75%).

## Tratamiento 2

Al precipitado (3.4 g) se le agregaron 2.55 mL de CaCl (75%) al 0.9 M y 1.488 mL de etanol acuoso (25%) después se centrifugó a 4000 rpm por 20 min el sobrenadante se lavó con 0.744 mL de cloroformo durante 4 veces en un embudo



de separación. Lo resultante se le agrego 5.579 mL etanol (75%) y 5.579 mL de acetona (75%).

- **Lote 3**

Se realizaron dos tratamientos para la extracción de ácido hialurónico en los que se varió la concentración de CTAB: Se pesaron 29 g de humor vítreo para cada tratamiento, se agregaron 116 mL de NaCl al 0.2 % y se dejó reposar durante 15 minutos, se centrifugó (centrifuga eppendorf, modelo 5810R) a 4 000 rpm por 20 min a una temperatura de 25 °C. Al sobrenadante se le agregó 8.7 mL y 17.4 mL de CTAB al 1% respectivamente dejando reposar por 15 min, y se llevó a centrifugar por 20 min a 4000 RPM a una temperatura de 25°C.

#### Tratamiento 1

Al precipitado (2 .8 g) se le agregaron 2.1 mL de CaCl (75%) al 0.9 M y 1.225 de etanol acuoso (25%) después se centrifugó a 4000 rpm por 20 min el sobrenadante se lavó con 0.6125 mL de cloroformo durante 4 veces en un embudo de separación. Lo resultante se le agrego 5.053 mL etanol (75%) y 5.053 mL de acetona (75%).

#### Tratamiento 2

Al precipitado (3.1 g) se le agregaron 2.325 mL de CaCl (75%) al 0.9 M y 1.356 de etanol acuoso (25%) después se centrifugó a 4000 rpm por 20 min el sobrenadante se lavó con 0.6781 mL de cloroformo durante 4 veces en un embudo de separación. Lo resultante se le agrego 5.594 mL etanol (75%) y 5.594 mL de acetona (75%).

Las soluciones se dejaron reposando 12 h, después se centrifugaron a 4 000 rpm por 20 min, se recuperó el precipitado de cada tratamiento y se dejaron secar durante una semana en una campana de extracción a temperatura ambiente.

- **Lote 4**

Se realizaron dos tratamientos para la extracción de ácido hialurónico en los que se varió la concentración de CTAB: Se pesaron 65 g de humor vítreo para cada tratamiento, se agregaron 116 mL de NaCl al 0.2 % y se dejó reposar durante 15 minutos, se centrifugó (centrifuga eppendorf, modelo 5810R) a 4 000 rpm por 20 min a una temperatura de 25°C. Al sobrenadante se le agregó 8.7 mL y 17.4 mL de CTAB al 1% respectivamente dejando reposar por 15 min, y se llevó a centrifugar por 20 min a 4000 RPM a una temperatura de 25 °C.

#### Tratamiento 1

Al precipitado (3.9 g) se le agregaron 2.93 mL de CaCl (75%) al 0.9 M y 0.98 de etanol acuoso (25%) después se centrifugó a 4000 rpm por 20 min el sobrenadante se lavó con 0.7805 mL de cloroformo durante 4 veces en un embudo de separación. Lo resultante se le agrego 6.442 mL etanol (75%) y 6.442 mL de acetona (75%).

#### Tratamiento 2

Al precipitado (4.3 g) se le agregaron 3.225 mL de CaCl (75%) al 0.9 M y 1.075 de etanol acuoso (25%) después se centrifugó a 4000 rpm por 20 min el sobrenadante se lavó con 0.86 mL de cloroformo durante 4 veces en un embudo de separación. Lo resultante se le agrego 7.095 mL etanol (75%) y 7.095 mL de acetona (75%). Las soluciones se dejaron reposando 12 h, después se centrifugaron a 4 000 rpm por 20 min, se recuperó el precipitado de cada tratamiento y se dejaron secar durante una semana en una campana de extracción a temperatura ambiente.

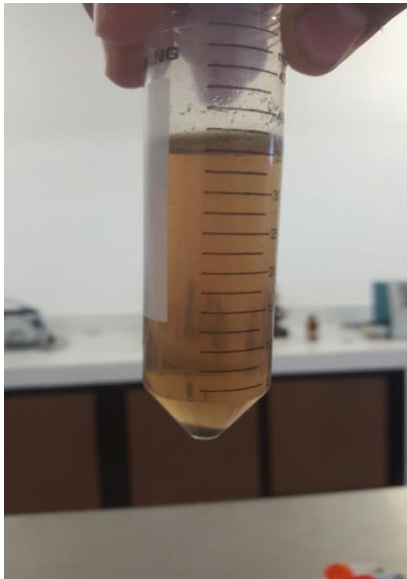
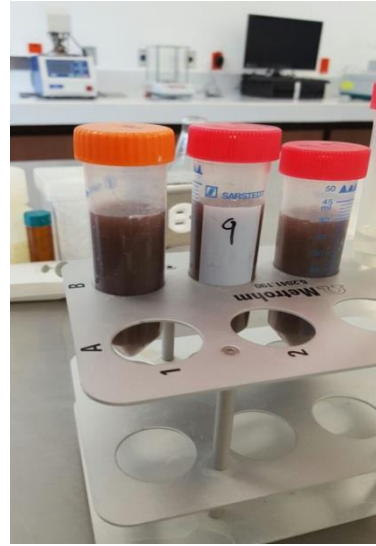


Figura 17 Extracción de ácido hialurónico

## CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO POR ESPECTROSCOPIA DE UV

Para la cuantificación de ácido hialurónico, se usó un método indirecto, a determinación de los ácidos urónicos (Blumenkrantz y Asboe-Hansen 1973), se llevó a cabo basado en la reacción del ácido glucurónico contenido en HA con meta-hidroxibifenilo. El ácido hialurónico se trató en un baño de hielo con ácido sulfúrico en tetraborato de sodio. Después se calentó a 100 °C en baño maria

durante 10 minutos y nuevamente se enfrió en un baño de hielo. Posteriormente, se añadió un 15% de una solución de meta-hidroxibifenilo, dejando reaccionar por 5 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 520 nm y se comparó con la curva patrón de ácido glucorónico como referencia (Fig. 18).

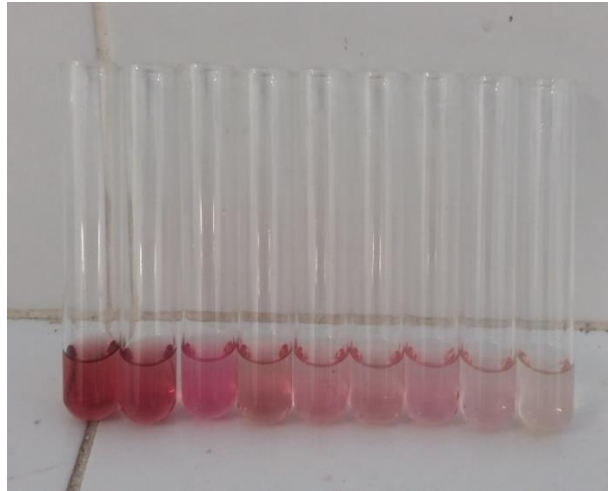


Figura 18 Soluciones de ácido glucorónico a concentraciones conocidas.

## **IDENTIFICACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

Electroforesis en gel de agarosa en acetato de bario/1,2- diaminopropano se realizó como se informó en el marco teórico con modificaciones menores. El gel de agarosa se preparó a una concentración de 0.5% en 0.04 M de tampón de acetato de bario pH 5.8. La corrida fue en 0.05 M de 1,2-diaminopropano (tamponado a pH 9.0 con ácido acético) para 150 min a 50 mA. Después de la migración, la placa se sumerge en solución bromuro de cetil trimetil amonio 0.1% durante al menos 6 h, se secó y se tiñeron con *stains-all* para HA. Cuando el gel es teñido muestra un color azul fuerte (Fig. 19).

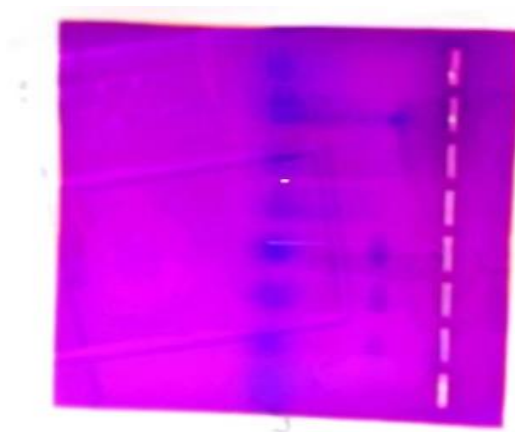


Figura 19 Electroforesis en gel de agarosa.

## VIII.- RESULTADOS

### MATERIA PRIMA

El peso promedio de una cabeza con ojos fue de 120 g, después de pesar 10 unidades elegidas al azar con una desviación estándar de  $\pm 21.67948339$ .

Después de pesar 10 pares de ojos al azar, el peso promedio obtenido fue de 3.56 g con una desviación estándar de  $\pm 0.43$ .

En la tabla 4, se puede observar el peso por lote del total de cabezas y ojos utilizados, que fueron recolectados de acuerdo a la metodología anteriormente descrita.

Tabla 4 Cantidad de cabezas y ojos del lote utilizado para este proyecto.

Lote	Cabezas (Kg)	Ojos (g)
1	20	561
2	15	592
3	16	483
4	40	1 249

## DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se determinó el contenido de humedad en ojos de pescado empleando el método rápido de la termobalanza.

Muestra	Peso inicial	Peso final	Humedad (%)
1	3.240	2.145	66.20
2	3.130	2.115	67.68
3	3.100	2.035	65.87
Promedio			66.58
Desviación estándar			± 0.96

## DETERMINACIÓN DE GRASAS

Se obtiene al realizar una diferencia de peso entre el peso inicial y peso final del cartucho. Este procedimiento se realizó por triplicado.

No de muestra	Peso del cartucho (g)	Peso de los ojos (g)	Peso de la grapa (g)	Peso del cartucho con ojos (g)	Peso seco final (g)	Grasa total (%)
1	1.4159	3.0036	0.0322	4.4517	2.6671	3.5186
2	1.4294	3.0032	0.0322	4.4648	2.3295	2.5969
3	1.4427	3.0038	0.0325	4.4790	2.3510	2.6206
Desviación estandar						± 0.5254

% de grasa promedio: 2.9120 ± 0.5254

## DETERMINACIÓN DE PROTEINA

Ecuación para determinar % de proteína 
$$\% \text{ Proteína} = \frac{14 \times N \times V \times 100 \times \text{factor}}{m \times 1000}$$

Dónde:

N: Normalidad de HCl = 0.1 N

V: Volumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - volumen consumido de HCl = 5 mL

m: Masa de la muestra (g) = 0.15 g

Factor para pescado = 6.25

No. Muestra	Volumen consumido de HCl	Proteína (%)
1	0.9	23.9166
2	0.6	25.6666
3	0.7	25.0833
Promedio		24.8888
Desviación estándar		± 0.7275

## DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES

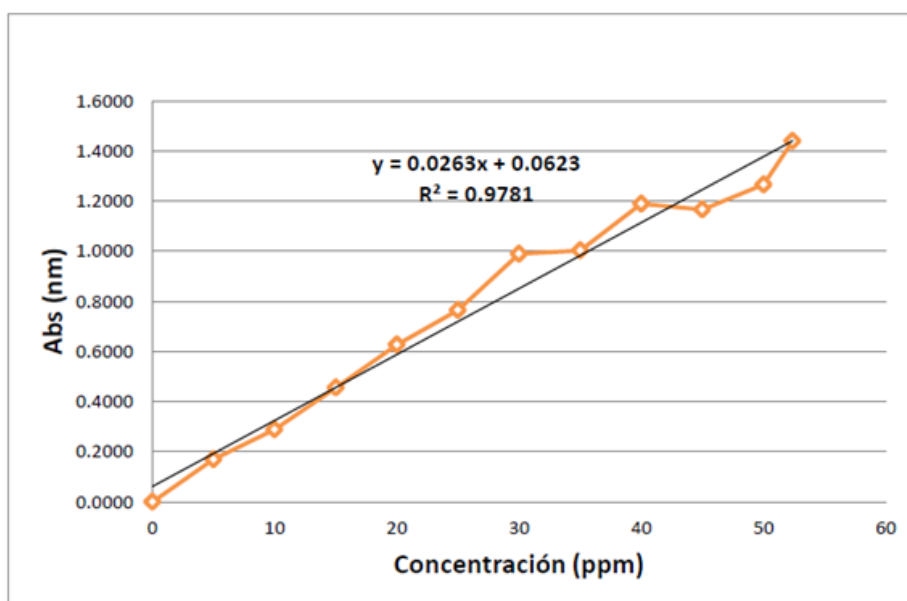


Figura 20 Curva patrón de azúcares totales.

Azúcares totales
0.0052 %

## EXTRACCIÓN QUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÓNICO CRUDO

Lote 1	Tratamiento	Peso (g)
	1	0.0172
	2	0.0184

Lote 2	Tratamiento	Peso (g)
	1	0.0110
	2	0.0220

Lote 3	Tratamiento	Peso (g)
	1	0.0169
	2	0.0188

Lote 4	Tratamiento	Peso (g)
	1	0.0420
	2	0.0624

Método químico	
Rendimiento %	0.0830 %
<b>g de AHC/ g de humor vítreo</b>	0.00083

## ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Peso molecular.

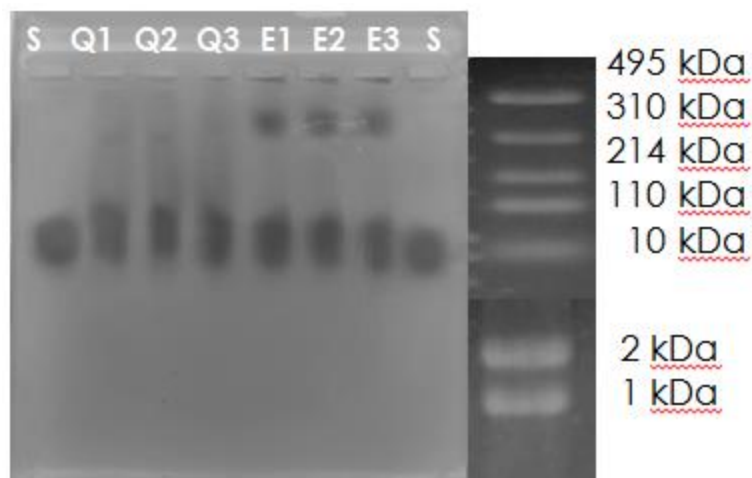
S: Estándar: 8–15 kDa

Método químico.

Q1: 8-15 kDa

Q2: 8-15 kDa

Q3: 8-15 kDa





## CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO POR ESPECTROSCOPIA DE UV

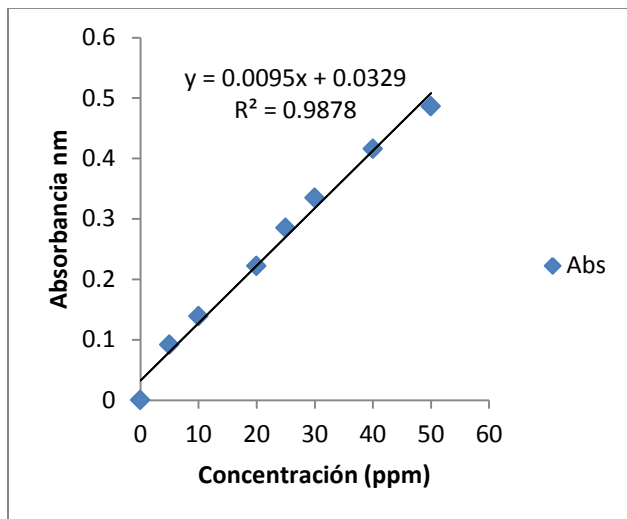


Figura 21 Curva patrón de Ácido Glucurónico

Método químico	
Ácido glucurónico	42.93 ppm
Ácido hialurónico	92 ppm

Rendimiento Ácido Hialurónico puro

Ácido hialurónico	
Método químico	0.0022 %

## IX.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- A partir de los resultados obtenidos, se concluye que la extracción de ácido hialurónico fue satisfactoria, ya que las distintas pruebas realizadas al extracto crudo obtenido, demuestran la presencia de dicho polisacárido.
- La extracción realizada por el método químico mostro un rendimiento de 0.00083g de ácido hialurónico crudo por gramo de humor vítreo (0.0830 % p/p). Dicho rendimiento o puede ser afectado por factores como el tamaño de los pescados, la edad y la procedencia del mismo. Por lo tanto se concluye que el rendimiento de extracto crudo puede variar dependiendo de las características de la materia prima.
- La cuantificación de ácido hialurónico por espectroscopia de UV-Vis, arrojó rendimientos cercanos a los reportados anteriormente en trabajos realizados con humor vítreo bovino, de tiburón y pez espada. Con una concentración de 92 ppm se confirma la presencia de ácido hialurónico en humor vítreo de residuos acuícolas.
- Con la cuantificación de ácido hialurónico por espectroscopia de UV-Vis, se cuantifica un rendimiento de 0.000022 gramos de AH puro por gramos de humor vítreo (0.0022%). Con este método indirecto se cuantifica a la fracción del D-glucurónico.
- Con electroforesis en gel de agarosa se determinó el peso molecular del ácido hialurónico obtenido, el cual oscila entre 8 y 15 kDa. Este resultado se atribuye al método de extracción, ya que se han reportado extractos de ácido hialurónico con peso molecular de 100 kDa a partir de ojos de tilapia.

## **X.- COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y APLICADAS**

- 1.- Capacidad de análisis y síntesis.
- 2.- Capacidad de organizar y planificar
- 3.- Habilidades de gestión de la información (habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas).
- 4.- Análisis y solución de problemas
- 5.- Toma de decisiones
- 6.- Capacidad crítica y autocrítica
- 7.- Trabajo en equipo
- 12.- Compromiso ético
- 13.- Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- 14.- Habilidades de investigación.
- 16.- Capacidad para adaptarse a nuevas situaciones
- 17.- Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- 21.- Diseño y gestión de proyectos.
- 23.- Preocupación por la calidad.

## XI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

1. Atlas de histología vegetal y animal. (28 de diciembre de 2013). Ácido Hialurónico. Recuperado de:  
<http://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/ampliaciones/2-hialuronico.php>
2. Ciencias Ambientales. (2004). *Determinación del contenido graso de leche en polvo: extracción soxhlet*. Recuperado de:  
[https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/TAQ/curso0405/TAQP5\\_0405.pdf](https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/TAQ/curso0405/TAQP5_0405.pdf)
3. E. Solano Oria, E. Pérez Pardo, F. Tomás Alonso. (1991). *Prácticas de laboratorio de química orgánica*. Universidad de Murcia. EDITUM.
4. Eroski, K. (27 de enero de 2004). *Alternativas para los residuos agroalimentarios*. [Intestinos, ojos, pieles o hígados de pescado, por lo general desechados, son fuentes potenciales de compuestos de interés y alto valor añadido].  
Recuperado de: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2004/01/27/10542.php>
5. Fabien, B., Nathalie, C., Charline, B., Laurent, F., Jerome, G. (2010). *Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review*. Forensic Toxicol.
6. German, G, G., Nelsy, L, C. y Clara, M, D. (2010). *Laboratorio de bioquímica: una visión práctica*. ELIZCOM S.A.S.
7. Grigorij, K., Ladislav S., Robert, S. y Peter, G. (2007). *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications*. Biotechnol let.

8. INECC. (2012). *Diagnostico básico para la gestión integral de los residuos*. Recuperado de:  
[http://www.inecc.gob.mx/descargas/dgcenica/diagnostico\\_basico\\_extenso\\_2012.pdf](http://www.inecc.gob.mx/descargas/dgcenica/diagnostico_basico_extenso_2012.pdf)
9. Instituto de salud pública de chile. *Procedimiento para determinar grasa método soxlet*. Recuperado de:  
[http://www.ispch.cl/lab\\_amb/met\\_analitico/doc/ambiente%20pdf/GrasSoxhlet.pdf](http://www.ispch.cl/lab_amb/met_analitico/doc/ambiente%20pdf/GrasSoxhlet.pdf)
10. Instituto de salud pública de chile. *Determinación de proteínas: método Kjeldahl*. Recuperado de:  
[http://www.ispch.cl/lab\\_amb/met\\_analitico/doc/ambiente%20pdf/Proteina.pdf](http://www.ispch.cl/lab_amb/met_analitico/doc/ambiente%20pdf/Proteina.pdf)
11. Indira, J, B. y Aura, G, V. (2012). *Estudio comparativo por cromatografía del producto de hidrolisis acida de los polisacáridos del mucilago de aloe vera (Aloe Barbadensis Miller) de diferentes cultivos del departamento de Risaralda Colombia. Tesis para optar el título de químico industrial*. Universidad tecnológica de Pereira.
12. Kanchana, S., y Arumugam, M. (2014). *Alternative exploration of hyaluronic acid from marine superstore*. Asian J. Pharm. Res.
13. Kazuaki, K., Mitsuhiro, K., Shin-ichi, Y. (2003). *Hyaluronic acid: separation and biological implications*. Journal of Chromatography B.
14. Lago, M. M. (2007). *Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones*. Instituto de Farmacia y Alimentos. Ciudad de la habana.

15. Nuria, B, V., Giselle L, C. y Carlos, H, R. (2003). *Química de alimentos: Manual de laboratorio*. Editorial universidad de costa rica.
  
16. Silvia, E, M., Raymundo, P, B. y Eugenia, H, B. (2010). Rejuvenecimiento facial volumétrico con ácido hialurónico. Cirugía plástica.
  
17. Sadhasivam, G., Muthuvel, A. (2014). *Isolation and Characterization of Hyaluronic Acid from Marine Organisms*. *Advances in Food and Nutrition Research*,