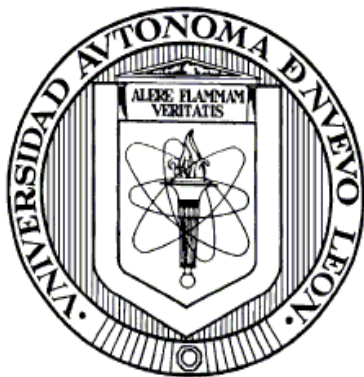


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN POLÍMERO MODIFICADO CON ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE Y ANTIBIÓTICA A BASE DE QUITOSÁN Y COMPUESTOS
FENÓLICOS OBTENIDOS DEL PERICARPIO DEL MAÍZ (*Zea mays*)

Por

Q.F.B. XOCHIQUETZAL MARTÍNEZ GONZÁLEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en
Farmacia

Diciembre, 2007.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN POLÍMERO MODIFICADO CON ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE Y ANTIBIÓTICA A BASE DE QUITOSÁN Y COMPUESTOS
FENÓLICOS OBTENIDOS DEL PERICARPIO DEL MAÍZ (*Zea mays*)

Aprobación de la tesis:

Dra. Mónica Noel Sánchez González
Asesor

Dr. Felipe de Jesús Cerino Córdova
Co-Asesor

Dra. Ma. Teresa Garza González
Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Xochiquetzal Martínez González

Fecha de Graduación: Enero 2008

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN POLÍMERO MODIFICADO CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBIÓTICA A BASE DE QUITOSÁN Y COMPUESTOS FENÓLICOS OBTENIDOS DEL PERICARPIO DEL MAÍZ (*Zea mays*)

Número de páginas: 61

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia.

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Método del Estudio: La industria camaronera procesa más de 20,000 toneladas de camarón al año, generando una gran cantidad de residuos conteniendo mayormente quitina, ya que éste polímero forma parte de la estructura del exoesqueleto de los crustáceos. A partir de la quitina se puede producir quitosán, el cual es un copolímero biodegradable y compatible con la mayoría de los tejidos biológicos. Así mismo, la industria de la tortilla procesa mas de 2.3 millones de toneladas de maíz anualmente a través de la nixtamalización en la cual se obtienen dos subproductos, nejayote y pericarpio de maíz; éstos son fuentes importantes de ácido ferúlico, un compuesto fenólico reconocido por ser un buen antioxidante natural. En este trabajo proponemos utilizar los desechos de estas dos industrias para la creación de un polímero con propiedades antioxidantes y antibióticas. Para este fin se utilizó el quitosán como base para adsorber los compuestos fenólicos presentes en el extracto de harina de pericarpio de maíz.

Contribuciones y Conclusiones: El 50% del extracto del pericarpio de maíz esta compuesto por sustancias de naturaleza fenólica, siendo el AF el de mayor proporción. Al comparar la actividad antioxidante del extracto contra el ácido ascórbico, se encontró que ésta fue aproximadamente 5 veces más alta. En las pruebas antimicrobianas el extracto no presentó actividad y el quitosán de 900 kDa presentó una inhibición completa del crecimiento de *E. coli*. A su vez, el quitosán de alto peso molecular (900 kDa) presentó una mayor capacidad de adsorción de compuestos fenólicos que el de bajo peso molecular (200 kDa). Una vez formado el complejo, el polímero modificado no mostró actividad antimicrobiana diferente a la del quitosán de 900 kDa y en las pruebas antioxidantes mostró mayor actividad el complejo de quitosán de 900 kDa.

FIRMA DEL ASESOR: _____

AGRADECIMIENTOS

A los directivos de la Facultad de Ciencias Químicas por la oportunidad de obtener el grado de Maestría. A la Dra. Martha Alicia Suárez Herrera, los Q.F.B. David Melgoza y Carlos Castillo del laboratorio de Biotecnología, a la Dra. Aurora Hernández Benítez del laboratorio de Biofarmacia y al Dr. Alberto Gómez Treviño y al Q.F.B. Eduardo de la Rosa del laboratorio de Biología Molecular por permitirme realizar el trabajo de laboratorio y por brindarme toda su ayuda. Al Dr. Antonio García de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, a la Ing. Luz Margarita Ramírez Vigíl, Dr. Felipe de Jesús Cerino de la Facultad Ciencias Químicas y a la alumna de la carrera de I.Q Claudia Laguna por el apoyo en el laboratorio. Por último y en especial a la Dra. Mónica Noel Sánchez González, mi asesora de tesis, por darme la oportunidad de trabajar y poder aprender a su lado.

Y el mayor de los agradecimientos a Dios por concederme la gracia de vivir y desarrollarme emocional, física y mentalmente.

DEDICATORIA

A mis padres, José Martínez Molina y Blanca Alicia González Flores, por su amor, comprensión y apoyo. A mis hermanos, José Abisaid, Abner Abdi e Ixchel Aydee, por darme una muestra a seguir de lo mejor de cada uno. Pero en especialmente por darme el placer de formar parte de una gran familia.

A Juan Manuel Martínez Molina por ser un buen tío y estar presente en los mejores momentos de mi vida.

A mis abuelos, Fidencia, Vicente, María y José que están lejos pero siempre presentes.

A mis amigos, Ivonne, Jeanneth, Ernesto, Abraham, Eduardo, Zuleika, Alejandrina, Araceli, Carolina por convertir momentos de tristezas en momentos de alegría y felicidad.

A mis compañeros de laboratorio, Adrián, Héctor, Allan, Pedro, Javier, Sandra, David y Eduardo más que compañeros se convirtieron en grandes amigos. En especial a Carolina, por ir hombro a hombro en los momentos buenos y malos durante todo este tiempo y con mayor énfasis por lavar mi material de laboratorio.

A la Dra. Mónica Sánchez, por todas las llamadas de atención, regaños que al final valieron la pena.

A Eduardo Isaac de la Rosa, por estar a mi lado cada momento y concederme el placer de conocer a una persona muy especial.

Y a Dios por demostrarme su amor, poniendo en mi vida a todas estas personas.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
Introducción.....	1
1. Desechos Agroindustriales.....	2
1.1. Industria de la Tortilla.....	3
1.1.1. Proceso de Nixtamalización.....	3
1.1.2. Ácido Ferúlico	4
1.1.3. Aplicaciones del Ácido Ferúlico	5
1.1.4. Actividad Antioxidante.....	5
1.1.5. Producción de Ácido Ferúlico	7
1.2. Industria Camaronera	9
1.2.1. Quitina y Quitosán	9
1.2.2. Aplicaciones de Quitosán	15
2. Justificación.....	18
Hipótesis y Objetivos.....	20
1. Hipótesis	21
2. Objetivo General	21
1.1. Objetivos Específicos.....	21
Materiales y Metodos	22
1. Preparación de Quitosán a Diferentes Pesos Moleculares	23
1.1. Hidrólisis ácida de Quitosán.....	23
1.2. Determinación de Viscosidad.....	24
2. Determinación de Grado de Desacetilación	25
3. Hidrólisis Alcalina de Harina de Pericarpio	26
4. Determinación de Parámetros Químicos del Extracto Seco de Pericarpio de Maíz	26
4.1. Determinación de Ácido Ferúlico por HPLC.....	26
4.2. Determinación Colorimétrica de Fenoles Totales	28
4.3. Determinación Colorimétrica de Flavonoides.....	28
5. Adsorción de los Compuestos del Hidrolizado de 29 Harina de Maíz ..	29
6. Determinación Colorimétrica de Actividad Antioxidante.....	30
7. Pruebas Antimicrobianas	30
Resultados	32
1. Preparación de Quitosán a Diferentes Pesos Moleculares.....	33
1.1. Determinación de Viscosidades y Pesos Moleculares	33
1.2. Elección de Viscosímetro.....	33
2. Determinación del Grado de Desacetilación	36
3. Determinación de Parámetros Químicos del Extracto Seco de Harina de Pericarpio de Maíz.....	37
1.3. Determinación de Ácido Ferúlico	37
1.4. Determinación de Compuestos Fenólicos Totales	38

1.5. Determinación de Flavonoides.....	39
2. Capacidad de Adsorción de las Muestras Q y Q720	39
3. Determinación de Actividad Antioxidante	41
4. Determinación de la Actividad Antimicrobiana	42
Discusión.....	45
Conclusiones.....	49
Recomendaciones	51
Referencias	53
Apéndice.	62

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1 Clave alfanumérica asignada según el tiempo de hidrólisis de las muestras	23
Tabla 2 Gradientes de las fases utilizadas para el análisis de AF	27
Tabla 3 Resultados de viscosidades intrínsecas y pesos moleculares.....	35
Tabla 4 Resultados del porcentaje de grado de acetilación y desacetilación ..	37
Tabla 5 Resultados de los parámetros químicos del extracto seco de la harina de pericarpio de maíz	39
Tabla 6 Resultados de la actividad antioxidante (estabilización de radicales libres [DPPH])	41

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1 Estructura química del Ácido Ferúlico.....	4
Figura 2 Estructura química de 1,1–difeníl–2–picrilhidrazil (DPPH).....	7
Figura 3 Estructura química de la quitina.....	10
Figura 4 Estructura química del quitosán.....	10
Figura 5 Viscosímetro tipo Ostwald modificado por Canon-Fenske.....	25
Figura 6 Gráfica de viscosidad reducida (η_{red}) y viscosidad inherente (η_{inh}) de la muestra Q para la obtención de la viscosidad intrínseca ($[\eta]$).....	34
Figura 7 Grafica de pesos moleculares dados en kDa de las muestras de quitosán tomadas a diferentes tiempos de hidrólisis.	36
Figura 8. Cromatograma del extracto seco de la harina de pericarpio de maíz.	38
Figura 9. Gráfica de la capacidad de adsorción de las muestras Q y Q720.	40
Figura 10 Gráfica de la curva de crecimiento de <i>E.coli</i> en caldo de soya tripticaseína con Quitosán (Q).	43
Figura 11 Gráfica de la curva de crecimiento de <i>E.coli</i> en caldo de soya tripticaseína con extracto de harina de pericarpio de maíz (E).	43
Figura 12 Gráfica de la curva de crecimiento de <i>E.coli</i> en caldo de soya tripticaseína con Quitosán (Q).	44

LISTA DE SÍMBOLOS

c	Concentración
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
g/kg	Gramo por kilogramo
g	Gramos
g AF/kg	Gramos de ácido ferúlico por kilogramo
h	Horas
kDa	Kilodaltons
MHz	Megahertz
μL	Microlitro
mg	Miligramo
mg/mL	Miligramos por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
nm	Nanometros
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
ton/día	Tonelada por día
UI	Unidad Internacional

NOMENCLATURA

DPPH	1,1–difenil–2–picrilhidrazil
ABTS	2,2'–azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato
AF	Ácido ferúlico
HOD	Alta densidad óptica
q	Capacidad de adsorción
Q720-E	Complejo quitosán de 200 kDa-extracto de harina de pericarpio de maíz
Q-E	Complejo quitosán de 900 kDa-extracto de harina de pericarpio de maíz
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50%
K y α	Constantes del sistema de disolventes de polímeros
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
DO	Densidad óptica
E	Extracto de harina de pericarpio de maíz
GDA	Grado de desacetilación
PM	Peso molecular
Q720	Quitosán de 200 kDa
Q	Quitosán de 900 kDa
QBPM	Quitosán de bajo peso molecular
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrogeno
UV	Ultravioleta
η_{esp}	Viscosidad específica
[η]	Viscosidad intrínseca
η_{red}	Viscosidad reducida
η_{rel}	Viscosidad relativa

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Desechos Agroindustriales

Los procesos industriales son generadores de desechos, por lo cual, las industrias tienen la responsabilidad de disponer de manera adecuada de los residuos producidos pues de otra manera pueden originar problemas ambientales, tanto en México como a nivel global.

Los desechos líquidos, residuos sólidos y emisiones gaseosas industriales están considerados entre los principales factores causantes de la degradación ambiental. Éstos presentan concentraciones considerables de compuestos contaminantes que, sin lugar a duda, provocan un deterioro gradual del medio ambiente, los recursos naturales y en particular de la salud humana. Un elemento que mucho tiene que ver es la carencia de tecnologías amigables con el medio ambiente que a su vez sea de bajo costo y/o presenten una relación costo-beneficio favorable para la disposición de los desechos lo suficientemente atractivo para el sector industrial. La agroindustria impacta de manera negativa particularmente la atmósfera y los mantos acuíferos debido a la eliminación de desperdicios sólidos y a los cambios en el uso de la tierra.¹

Los residuos industriales deben ser tratados para su eliminación; sin embargo, esto representa un gasto importante para la mayoría de las empresas. Debido a lo antes mencionado, una opción rentable es el aprovechamiento de los desechos para su comercialización directa o como materia prima para la elaboración de productos de valor agregado.

Entre las agroindustrias con gran producción de desechos en México, se ubican la industria de la tortilla y la camaronera.

1.1. Industria de la Tortilla

1.1.1. Proceso de Nixtamalización

La nixtamalización es un proceso en el que los granos de maíz se someten a cocimiento a pH alcalino utilizando cal de grado alimenticio. Luego de este proceso se obtienen los granos cocidos, denominados nixtamal, y se separan los residuos líquidos, conocido como nejayote y los residuos sólidos compuestos principalmente por pericarpio.²

La industria de la tortilla en México, procesa mas de 12.5 millones de toneladas de maíz anualmente a través de la nixtamalización. Por lo que se estima que la generación de nejayote asciende a 150 ton/día y 4 ton/día de pericarpio.^{3,4} Debido a la alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO), el nejayote es tratado microbiológicamente antes de ser desechado al drenaje, mientras que el pericarpio se utiliza para la alimentación de ganado o se arroja directamente al entorno.⁵ Sin embargo, en años recientes, se ha demostrado que tanto el nejayote como el pericarpio son fuentes importantes de derivados

del ácido cinámico como el ácido p-cumárico, ácido sinápico y ácido ferúlico, este último, un compuesto de importancia comercial⁶⁻⁸

1.1.2. Ácido Ferúlico

En la Figura 1 se muestra la estructura química del ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico o ácido ferúlico (AF), que junto con sus derivados es reconocido como uno de los antioxidantes naturales de mayor importancia.⁹

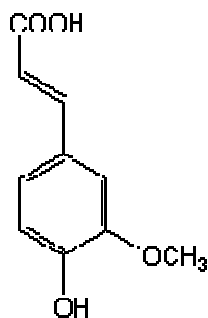


Figura 1 Estructura química del Ácido Ferúlico

El AF es uno de los ácidos fenólicos más abundante en el reino vegetal, ya sea en forma libre o conjugado con azúcares, formando ésteres y amidas, generalmente se presenta esterificado con polisacáridos de la pared celular (arabinoxilanos, pectinas, celulosa, hemicelulosa, xiloglucanos) y con proteínas para proporcionar rigidez estructural y fuerza a los granos.¹⁰ La fuente más importante de AF es el grano de maíz, presentando concentraciones que van desde 1 a 2 g/kg.¹¹

1.1.3. Aplicaciones del Ácido Ferúlico

Entre las principales aplicaciones del AF se pueden mencionar las siguientes: agente antienvjecimiento,¹² tratamiento de algunos de los efectos secundarios de la diabetes (ciertos autores refieren actividad hipoglucemiante e hipolipidémica),^{13,14} en el tratamiento de arterosclerosis evitando la oxidación lipídica,¹⁵ anticancerígeno,^{16,17} neuroprotector,¹⁸ antidegenerativo de estructuras óseas,¹⁹ tratamiento para el alivio de algunas molestias ocasionadas por la menopausia²⁰ e inmunomodulador.²¹ Todas estas aplicaciones son atribuidas a la actividad antioxidante del AF.

Se ha comprobado que el AF presenta sinergismo con otros antioxidantes naturales o sintéticos que se consumen a través de la dieta o por prescripción médica. Además, presenta mayor actividad antioxidante que otros compuestos cuando se expone a la radiación UV por lo que se ha propuesto su uso como coadyuvante para la protección de la piel contra el daño solar.²²

1.1.4. Actividad Antioxidante

Los radicales libres son especies moleculares reactivas dotadas de un electrón desapareado en un nivel energético superior, que a su vez les confiere propiedades paramagnéticas. Dada su alta energía interactúan de forma indiscriminada con cualquier molécula produciendo reacciones en cadena que afectan las células al comprometer la integridad de la membrana o bien al dañar

moléculas de gran importancia como los ácidos nucleicos.²³ Se conocen diversos mecanismos por los que pueden producirse radicales libres, ocupando un lugar primordial las reacciones de oxidación. Los antioxidantes son un tipo de compuestos capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas terminando estas reacciones mediante la eliminación de intermediarios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación disminuyendo o neutralizando la energía excedente oxidándose ellos mismos.²⁴

Existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante; los cuales, precisan distintos mecanismos de determinación, por ejemplo: métodos químicos basados en el secuestro de las especies oxigénicas y nitrogenadas reactivas como peroxinitrito, superóxido, ion hidroxilo, entre otros. Otros métodos miden la desaparición de los radicales libres mediante espectrofotometría, por ejemplo, el 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato (ABTS), un radical catiónico o el 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Figura 2).²⁵ Este último, es un radical de nitrógeno orgánico estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a 517 nm.²⁶

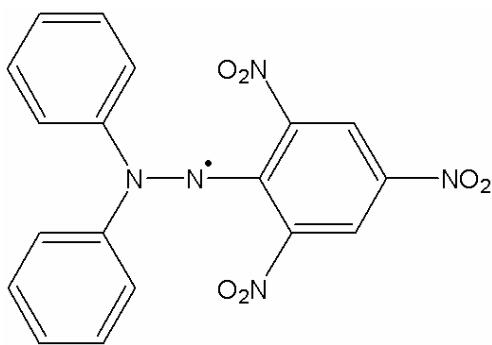


Figura 2 Estructura química de 1,1–difeníl–2–picrilhidrazil (DPPH)

En este ensayo se evalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar radicales libres. En dicho ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de manera que una disminución en la absorbancia se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la captación de electrones por la especie antioxidante. La actividad antioxidante se expresa en términos de IC_{50} , es decir, la concentración de antioxidante requerida para neutralizar o inhibir el 50% del contenido de radical libre.^{27,28}

1.1.5. Producción de Ácido Ferúlico

El AF es producido por síntesis química a través de la condensación de vainillina con ácido malónico. Dicha reacción presenta un alto rendimiento pero requiere de alrededor de tres semanas.² Por otro lado, su obtención por vías químicas genera un producto sintético y la tendencia actual es el empleo de sustancias de origen natural. Debido a esto, se está buscando materia prima de origen natural para la obtención de AF.

En países asiáticos, la producción comercial de AF esta basada en el aprovechamiento del salvado de arroz proveniente de desechos de la industria del aceite. El proceso comprende hidrólisis alcalina de oryzanol, un éster del ácido ferúlico, durante 8 horas entre 90° y 100° C seguida por la precipitación del AF liberado que se lleva acabo por el enfriamiento de la mezcla reaccionante. Por ultimo, se recupera del AF crudo y la purificación por recristalización².

Otros métodos para la obtención industrial de AF, incluyen la hidrólisis enzimática de la material vegetal.² Antrim desarrollo un método para la obtención de AF a partir del pericarpio de maíz, utilizando α -amilasas para la degradación de almidones residuales seguida de una hidrólisis alcalina para la liberación de hemicelulosa y compuestos no carbohidratados²⁹.

A pesar de que en México se generan grandes cantidades de pericarpio de maíz, éste es utilizado para alimentar el ganado siendo una fuente importante de AF. Se ha determinado en los subproductos de la nixtamalización el contenido de AF entre 7 y 11 g AF/kg de pericarpio de maíz crudo y en el nejayote, nuestro grupo de investigación ha encontrado de 1.5 a 14 g AF/kg de sólidos.³⁰ Además, en el pericarpio de maíz se puede encontrar flavonoides, carotenoides y antocianinas en menor proporción. Estos componentes adicionales del pericarpio, también poseen características antioxidantes de suma importancia.³¹

1.2. Industria camaronera

La industria camaronera genera más de 120 mil toneladas de desechos al año, cifra que aumenta cada año con el crecimiento de la población.³² Los desechos generados se constituyen principalmente por el exoesqueleto de los camarones y otros crustáceos. Estos desechos son perjudiciales para la salud, debido a que se convierte en un medio de cultivo para diferentes microorganismos tanto fúngicos (*Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Rhizopus*) como bacterianos (*Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*), los cuales pueden ser patógenos para el hombre y algunos animales domésticos.³³

A pesar de lo antes mencionado, estos residuos son de gran interés para el hombre pues a partir de ellos se puede obtener una proteína fibrosa llamada queratina, diferentes tipos de carbonatos y un polisacárido llamado quitina; estas tres estructuras, le dan la dureza necesaria al caparazón de los crustáceos para desempeñar su función protectora.³³

1.2.1. Quitina y Quitosán

La quitina es un homopolisacárido de unidades de N-acetil glucosamina, un derivado de la glucosa que contiene un grupo amino acetilado unido al C-2.

El enlace $\beta(1-4)$ que forman sus unidades no es hidrolizado por enzimas presentes en los vertebrados (Figura 3).³³

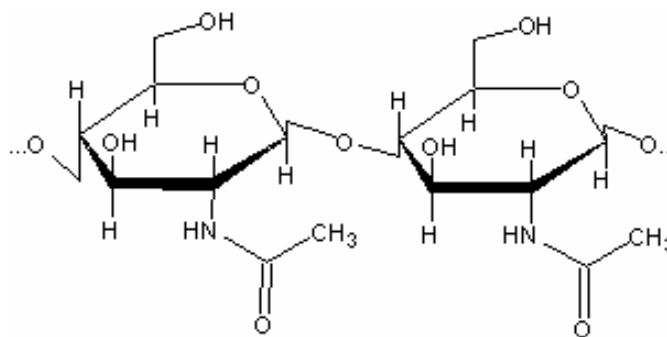


Figura 3 Estructura química de la quitina

Uno de los principales derivados de la quitina es el quitosán, que se obtiene a partir de su desacetilación y se considera un componente de mucha utilidad y alta rentabilidad. En términos generales el quitosán es un copolímero lineal, integrado por una unidad desacetilada (D-glucosamina) y una unidad acetilada en el C-2 (N-acetil-D-glucosamina) unidas entre si por enlaces $\beta(1-4)$ (Figura 4).

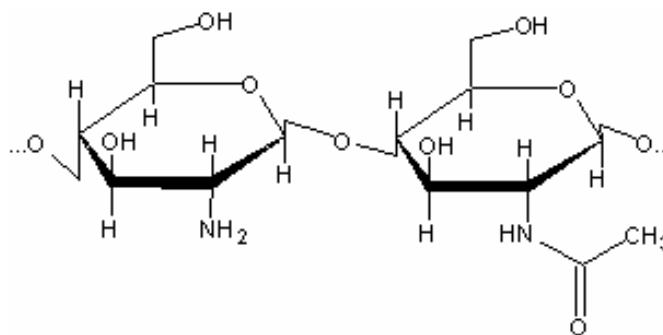


Figura 4 Estructura química del quitosán

Una de las características más importantes de este compuesto, es la posibilidad de ser sustituido o de acomplejarse con grupos químicos afines al grupo amino de la unidad desacetilada. El quitosán es utilizado como un bioadhesivo, ya que se une eficazmente a las superficies con carga negativa, gracias a la carga positiva que presenta el grupo amino a pH fisiológico.³⁴

Su composición le permite ser compatible con la mayoría de los tejidos biológicos, por tanto, carece de efectos secundarios conocidos además de ser biodegradable y no tóxico.^{35,36} Estas características le convierten en un producto con numerosas aplicaciones en el campo de la medicina, farmacia, bioquímica, cosmética y nutrición.^{35,37}

El peso molecular (PM) y el grado de desacetilación (GDA) del quitosán son los factores más importantes que influyen en su valor funcional y su actividad biológica.

El proceso de desacetilación para obtener quitosán a partir de quitina involucra la remoción de grupos acetilo de las unidades N-acetil-D-glucosamina de la cadena de quitina, dejando un grupo amino ($-NH_2$) con un alto grado de reactividad. Esto hace que el GDA sea una propiedad importante a controlar durante la producción de quitosán ya que afecta sus características físicas y químicas, lo que determina su aplicación al igual que la biodegradabilidad y la actividad inmunológica.^{38,39} El quitosán presenta dos ventajas sobre la quitina debido al alto GDA. En primer lugar, permite la solubilización del quitosán en

soluciones moderadamente ácidas, mientras que la quitina solo es soluble en solventes como el cloruro de litio o dimetilacetamida reconocidos como sustancias tóxicas. Por otra parte los grupos amino libres representan un sitio activo en muchas reacciones químicas.⁴⁰

Existen métodos para determinar el GDA de quitosán. Estos métodos incluyen la prueba con ninhidrina, titulación potenciométrica linear, volumetría con bromuro de hidrógeno y distintas técnicas espectroscópicas (IR, UV-Vis, RMN ¹H).⁴¹ Empleando RMN ¹H se obtiene el grado de acetilación, determinado por la relación entre los protones del radical metilo del grupo acetamida y los protones del anillo glicosídico.

A partir de los espectros es posible calcular el grado de acetilación mediante la Ecuación 1.

$$\% GA = \frac{(I_{met})}{(3 I_{H2})} \times 100 \quad Ec. 1$$

Donde, I_{met} es la intensidad del integral de la señal de dos protones metilo de grupos acetamida e I_{H2} es la intensidad del integral de la señal de un hidrógeno ligado al C-2 del anillo glicosídico.⁴² Estas áreas son seleccionadas por estar libres de la influencia del pico de alta densidad óptica (HOD).

Tanto el PM como el GDA pueden variar según el origen de la materia prima y del método de producción del quitosán. Al parecer, el quitosán con un

PM promedio de entre 5-20 kDa tiene mayor funcionalidad bioquímica comparada con el quitosán de alto peso molecular. Liu y colaboradores, realizaron estudios para evaluar la influencia del PM en el crecimiento de *E. coli*, y encontraron mayor actividad cuando éste disminuye.⁴³ A un PM entre 5-10 kDa muestra un mayor efecto en la inhibición del crecimiento de varios microorganismos patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis fukushi*, *Alternaria alternata*.⁴⁴ También se propone el uso de quitosán de bajo peso molecular (QBPM) en la preservación de leche y en productos de higiene bucal por su actividad antimicrobiana.⁴⁵

Otros estudios concluyen que el quitosán con PM de 20 kDa previene la progresión de *diabetes mellitus* y presenta mayor afinidad por lipopolisacáridos en comparación con PM de 140 kDa.⁴⁶ Se ha demostrado que QBPM, con un promedio mayor a 5 kDa, previene el aumento de colesterol sérico en ratas con una dieta alta en colesterol por 14 días.⁴⁷ El QBPM también reduce la incidencia de marcadores pre-neoplásicos de la carcinogénesis del colon.⁴⁸

El PM del quitosán puede ser establecido mediante la viscosidad, basándose en la ecuación de Mark-Houwink (Ecuación 2):

$$[\eta] = KM^{\alpha} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde, M es el peso molecular de polímeros lineales y $[\eta]$ la viscosidad intrínseca al igual que dos constantes (K y α) específicas para cada sistema de disolventes.⁴⁹

Para obtener la $[\eta]$ se necesita calcular la viscosidad relativa (η_{rel}) utilizando el tiempo de flujo requerido para que un volumen determinado de una solución de concentración conocida pase a través de un tubo capilar contra el tiempo de flujo de un volumen igual de disolvente.⁵⁰ Los tiempos de flujo se sustituyen en la Ecuación 3 para obtener la η_{rel} .

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde, t es el tiempo de flujo de la solución de quitosán y t_0 es el tiempo de flujo del solvente.

Con la η_{rel} podemos calcular la viscosidad específica (η_{esp}) según la Ecuación 4:

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 \quad \text{Ec. 4}$$

La viscosidad reducida (η_{red}) relaciona la η_{esp} con la concentración (c).

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{c} \quad \text{Ec. 5}$$

La viscosidad inherente relaciona el logaritmo natural de la η_{rel} y la c :

$$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_{rel}}{c} \quad Ec. 6$$

Tomando en cuenta la viscosidad reducida y la inherente, se construye una grafica con los valores de concentración en el eje de las abscisas y los valores de viscosidad reducida e inherente en el eje de las ordenadas. La recta obtenida se extrapola para determinar la viscosidad reducida e inherente a concentración cero, a este parámetro se le llama viscosidad intrínseca ($[\eta]$) y es utilizada para calcular el peso molecular a través de la Ecuación 2.

1.2.2. Aplicaciones de Quitosán

En los últimos años, el quitosán ha despertado gran interés pues su naturaleza química le otorga propiedades de interés industrial. Entre las aplicaciones que se le dan al quitosán se encuentran las siguientes:

1. Ambiental. Se emplea como agente floculante/coagulante para clarificar efluentes industriales y urbanos. En el tratamiento para potabilización del agua. También es usado como quelante de contaminantes como el mercurio, plomo, cadmio y elementos radioactivos como el uranio y el cobalto, así como en la remoción de plaguicidas.^{33,51} En muchos países se está elaborando actualmente cartón, papel, películas y plástico a partir de quitosán por su biodegradabilidad.^{33,52}

2. Biotecnología. El quitosán se emplea en cromatografías, para la inmovilización de enzimas, separación de proteínas y remoción de células.⁵¹

3. Farmacéutica. Es utilizado para la elaboración de fármacos con liberación controlada, espesante, estabilizador de medicamentos y en la fabricación de lentes de contacto.⁵² Un ejemplo de esto, es su uso como vehículo para el transporte de insulina a través de la mucosa nasal.^{54,55}

4. Cosmética. El quitosán se usa en la fabricación de champús, acondicionadores, lociones para el cabello y se utiliza para la formación de películas con proteínas, ya que son más estables.⁵¹

5. Clínica. El quitosán se utiliza como antiácido, secuestrador de anticoagulantes, reductor de la placa dental y estimulador de la producción de vitamina K e hipocolesterolémico reduciendo la absorción de lípidos ya sea por interacción iónica, captación de ácidos grasos y sales biliares, atrapamiento de triglicéridos e inhibición de la lipasa pancreática. También muestra propiedades antibacterianas, antifúngicas y antitumorales.^{43,56,57} En Cuba es usado en forma de ungüento o polvo, para restituir los tejidos dañados en la terapia de úlceras crónicas, quemaduras, pústulas, heridas en las manos y miembros superiores.³³

6. Medicina veterinaria. Otra aplicación interesante es en nutrición animal, como fibra dietética y para favorecer el desarrollo de bifidobacterias en los animales.³³

7. Alimenticia. Ofrece consistencia a alimentos procesados, también se emplea en la recuperación de proteínas residuales de las industrias alimenticias; en la reducción de sólidos totales, en la purificación de bebidas (aguas, jugos, cerveza, vinos, etc.). El quitosán también se emplea como agente clarificante en los zumos de frutas reduciendo la turbidez de los mismos y retardando el pardeamiento enzimático en los jugos de manzana y pera. Se usa como ingrediente funcional para controlar la textura, estabilidad, mejorar el flujo de otros ingredientes, proporcionar volumen, controlar la viscosidad y para incrementar el contenido de la fibra dietética.^{33,51} Debido a que el quitosán no es absorbido por el organismo, ha sido empleado como acarreador de pigmentos, sabores y nutrientes; por ejemplo es utilizado para la pigmentación de especies acuícolas como truchas arcoiris y salmones, aumentando así su valor comercial.³³

8. Agrícola. El quitosán se usa como protector contra la invasión de microorganismos a ciertas plantas, esto permite cosechar frutos maduros que, al ser fumigados con una solución de quitosán, pueden permanecer más tiempo sin malograrse, evitando de esta forma la cosecha del fruto verde y esperar la maduración durante el transporte, lo cual rinde un producto de menor calidad.^{33,51} Otro uso del quitosán es como medio de atrapamiento que permite

la liberación controlada de ingredientes concentrados, agentes antimicrobianos y sustancias agroquímicas.³³

2. Justificación

Diferentes estudios han comprobado que el quitosán puede ser modificado con compuestos fenólicos que le confieren actividades biológicas adicionales. Kenawy en 2005, realizó una modificación del quitosán con diferentes reactivos (vainillina, p-hidroxibenzaldehído, p-clorobenzaldehído, anisaldehído, metil 4-hidroxibenzoato, metil 2,4.dihidroxibenzoato, propil 3,4,5,-trihidroxibenzoato, 2-hidroximetilbenzoato), obteniendo resultados favorables en la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias.⁵² Sin embargo, en este trabajo no manejan controles adecuados para determinar en qué porcentaje aumenta o disminuye la actividad antimicrobiana respecto al quitosán sin modificar. Tampoco fue reportada la actividad antioxidante. Kosaraju en 2006, encapsuló un extracto de hojas de olivo en microesféras de quitosán, y caracterizó fisicoquímicamente la preparación de microesféras, pero no se realizó ningún estudio de actividad biológica.³⁶ Por otra parte una gran desventaja presentada en estos dos estudios es que los sustratos utilizados para modificar el quitosán son de alto costo en comparación con los compuestos fenólicos presentes en el pericarpio del maíz.

Muchas de las investigaciones actuales buscan utilizar los desechos de los procesos industriales para la obtención de compuestos de interés comercial. Con base en lo anteriormente expuesto, nuestra propuesta es adsorber los compuestos fenólicos procedentes de la hidrólisis de pericarpio de maíz en quitosán para obtener un polímero modificado con propiedades antioxidantes y antibióticas.

CAPÍTULO 2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

Es posible modificar el quitosán con compuestos fenólicos presentes en los hidrolizados de pericarpio de maíz, para conferirle propiedades antioxidantes e incrementar sus propiedades antibióticas.

2. Objetivo General

Producir un polímero modificado con propiedades farmacológicas a partir de quitosán y compuestos fenólicos presentes en hidrolizados de pericarpio de maíz.

1.1. Objetivos Específicos

- Caracterizar el contenido químico del hidrolizado del pericarpio de maíz.
- Modificar el peso molecular del quitosán.
- Caracterizar el quitosán en términos de peso molecular y grado de desacetilación.
- Determinar la influencia del peso molecular del quitosán sobre la actividad antimicrobiana.
- Determinar la actividad antioxidante y/o antibiótica de los polímeros modificados con diferentes contenidos de compuestos fenólicos.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y METODOS

1. Preparación de Quitosán a Diferentes Pesos Moleculares

1.1. Hidrólisis ácida de Quitosán

El quitosán fue sometido a hidrólisis utilizando ácido acético a través de un proceso reportado en la literatura.⁴³ Fueron disueltos 2 g de quitosán en 38 mL de ácido acético al 5% (v/v) e incubados a 50° C por 14, 25 y 72 h. Al término del tiempo de incubación se ajustó el pH entre 7–9 con una solución de NaOH 4 N. El precipitado formado fue filtrado a vacío y lavado con agua y etanol hasta obtener un pH cercano a 7 y secado a 50° C por 24 h. En la Tabla 1 se muestra la clave alfanumérica asignada a las muestras, correspondiente al tiempo de hidrólisis.

Tabla 1
Clave alfanumérica asignada según el tiempo de
hidrólisis de las muestras

Muestra	Tiempo de hidrólisis (h)
Q	0
Q016	0.16
Q050	0.5
Q100	1
Q140	14
Q250	25
Q720	72

1.2. Determinación de Viscosidad

Se utilizó la viscosidad para determinar el PM del quitosán empleando un viscosímetro tipo Ostwald modificado por Canon-Fenske con número de capilar 25. Los valores para K y α correspondientes al sistema de disolventes utilizado en este trabajo (HCH_2COOH 0.1 M/ NaCl 0.2 M) fueron 1.81×10^{-3} a 25°C y 0.98, respectivamente.⁵⁸

Se preparó una solución de quitosán a 2.0 mg/mL y se dejó reposar en refrigeración por una noche. A partir de la solución antes descrita se procedió a preparar soluciones a 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 mg/mL.

En la Figura 5 se presenta una imagen del viscosímetro tipo Ostwald modificado por Canon-Fenske donde se muestran las partes que lo componen. Se añadieron 10 mL de la solución de quitosán en el viscosímetro por el tubo G y se introdujo en un baño de agua a 25°C por aproximadamente 20 min para estabilizar la temperatura de la solución de quitosán. Posteriormente, se aplicó succión por el tubo A hasta llenar los bulbos D y B. Una vez llenos, la solución se dejó fluir por el capilar midiendo el tiempo que tardó el menisco en pasar desde la marca C a la marca E. Las determinaciones se realizaron por triplicado.⁴⁹

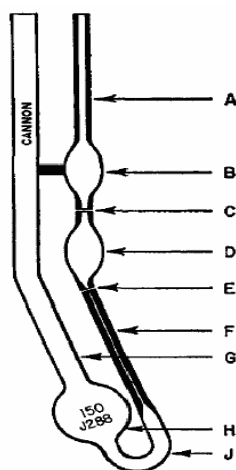


Figura 5 Viscosímetro tipo Ostwald modificado por Canon-Fenske (G) Tubo de ventilación. (H) Reservorio de la solución. (J) Tubo de Extensión. (F) Tubo capilar. (E) Marca inferior de medida. (D) Bulbo de medición. (C) Marca superior de medida. (B) Bulbo Superior.

2. Determinación de Grado de Desacetilación

El grado de desacetilación fue determinado por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de hidrogeno (RMN ^1H) utilizando un espectroscópio de resonancia magnética nuclear Broker de 500 MHz.

Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera. Se agregó 1 mL de $\text{HCl}/\text{D}_2\text{O}$ al 1% a 10 mg de quitosán y se incubó con agitación a temperatura ambiente por 24 h formando una solución viscosa. Se tomó una alícuota de esa solución que fue colocada en un tubo de 5 mm de diámetro para su posterior análisis a 70°C .^{42,59}

3. Hidrólisis Alcalina de Harina de Pericarpio

Los extractos de pericarpio fueron obtenidos utilizando un método químico-enzimático.¹¹ A 5 g de pericarpio (donado por CIASA, sucursal Ruíz Cortínez) se le agregaron 2 UI de α -amilasa llevando a un volumen final de 15 mL de H₂O destilada. La solución fue incubada a 65°C por 30 min, terminado el tiempo de incubación, se inició la hidrólisis alcalina utilizando 85 mL de NaOH 2.4 M. La mezcla de reacción se incubó a 25°C y 300 rpm por 1 h. Terminado el tiempo de incubación se procedió a filtrar a vacío y a ajustar el pH entre 1 y 2 con HCl 6 N. Posteriormente se añadieron 3 volúmenes de acetato de etilo (EtAOC) recuperando la fase orgánica, misma que fue deshidrata sobre Na₂SO₃, filtrada a través de algodón y llevada a sequedad utilizando una evaporador rotatorio (Buchii). Los extractos fueron almacenados a -20°C hasta su análisis.³⁰

4. Determinación de Parámetros Químicos del Extracto Seco de Pericarpio de Maíz

4.1. Determinación de Ácido Ferúlico por HPLC

La determinación de la concentración de AF en el extracto seco de pericarpio de maíz se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un Cromatógrafo Waters 2695, con sistema de bombeo cuaternario equipado con un detector de arreglo de diodos modelo 2996. Se

utilizó una columna HyperClone 5U ODS C18 (Phenomenex) con 5 µm de tamaño de partícula y 250 x 4.5 mm de longitud por diámetro interno.

Se utilizó como fase móvil un gradiente binario con fases A y B a 0.8 mL/min. La fase móvil A, estaba compuesta por agua:acetonitrilo:ácido fórmico en proporción 95:5:1 (v/v/v); la fase B, por acetonitrilo:agua:ácido fórmico en proporción 90:10:1 (v/v/v). Las proporciones de las fases utilizadas durante el gradiente para la cuantificación del AF se presentan en la Tabla 2.^{8,9} Las absorbancias de las sustancias eluídas fueron registradas a 305 nm. Para la conversión de áreas bajo la curva a términos de concentración, se utilizaron curvas estándar en un intervalo de concentración de 0.01 a 0.4 mg/mL de AF.

Tabla 2
Gradientes de las fases utilizadas
para el análisis de AF

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
Inicial	100	0
15.00	90	10
20.00	80	20
30.00	70	30

El extracto seco de la harina de pericarpio de maíz fue resuspendido en metanol grado HPLC y filtrado a través de una membrana de nylon de 0.45 µm, para después ser analizado por HPLC. El AF fue identificado comparando los

tiempos de retención y el espectro de UV de los datos de las muestras con estándares comerciales.

4.2. Determinación Colorimétrica de Fenoles Totales

La concentración de fenoles totales en el extracto seco de pericarpio de maíz fue determinada de acuerdo al método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, que consiste en agregar 5 µL de extracto seco resuspendido en H₂O caliente (aprox. 50° C) en una cubeta de plástico con 400 µL de agua destilada. La reacción fue iniciada al agregar 30 µL del reactivo Folin-Ciocalteu, se agitó y se incubó por 5 minutos a una temperatura aproximada a 25° C. Después de ese tiempo se agregaron 80 µL de una solución de Na₂CO₃ al 25 % (p/v), se agitó y se incubó a una temperatura aproximada a 25° C por 15 min. Transcurrido este tiempo, se realizaron las lecturas de absorbancia a 765 nm de λ un espectrofotómetro Genesys 5. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El contenido de fenoles totales se estandarizó utilizando una curva de calibración de AF para expresar el resultado como mg equivalentes de AF/g de extracto seco.³⁰

4.3. Determinación Colorimétrica de Flavonoides

La concentración de flavonoides en el extracto seco de harina de pericarpio de maíz fue determinada por el método colorimétrico de Liu (2002). Se tomaron 50 µL de extracto seco resuspendido en H₂O caliente (aprox. 50° C) al que se agregaron 300 µL de agua destilada y 20 µL de NaNO₂ al 5 %

(p/v). Se dejó reposar por 6 min a una temperatura aproximada a 25° C, posteriormente se añadieron 30 µL de AlCl₃ al 10 % (p/v), dejando reposar por 5 minutos a la misma temperatura. Al término de este tiempo se añadieron 100 µL de NaOH 1 M. La solución se agitó y enseguida se realizaron las lecturas de absorbancia a 510 nm utilizando un espectrofotómetro Genesys 5. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El contenido de flavonoides se estandarizó utilizando una curva de calibración de quercetina para expresar el resultado como mg equivalentes de quercetina/g de extracto seco.⁶⁰

5. Adsorción de los Compuestos del Hidrolizado de

Harina de Maíz

El extracto de pericarpio se resuspendió en 10 mL de agua destilada (~50° C), obteniendo una concentración de AF de 0.8 g/L. Esta solución fue acidificada con HCl 6N hasta alcanzar un pH de 4. Posteriormente, se agregaron diferentes cantidades Q y Q720 para obtener concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50 y 75 g/L. El proceso de adsorción se realizó a 40°C por 2 h a 125 rpm. Transcurrido este tiempo, las muestras de quitosán se separaron por centrifugación, al sobrenadante se le ajustó el pH entre 1 y 2 con HCl 6N para ser extraído con 3 volúmenes de EtAOC, recuperando la fase orgánica, misma que fue deshidrata sobre Na₂SO₃, filtrada a través de algodón y llevándose a sequedad utilizando un evaporador rotatorio (Buchii). Las muestras fueron posteriormente analizadas por HPLC.³⁰

6. Determinación Colorimétrica de Actividad Antioxidante

Se utilizó un método basado en la reducción del radical libre estable DPPH. Se tomaron alícuotas de 480 μ L de una solución de DPPH 65 μ M en metanol 80% y se agregaron 20 μ L del extracto. La mezcla fue agitada vigorosamente e incubada por 30 min a 25° C en ausencia de luz. La absorbancia fue medida a 517 nm en un espectrofotómetro Genesys 5. Todas las muestras fueron corridas por triplicado. Utilizando como control ácido ascórbico. La actividad antioxidante es expresada en términos de IC₅₀.^{26,27}

7. Pruebas Antimicrobianas

Las pruebas antimicrobianas se realizaron empleando seis concentraciones diferentes de Q, Q-Extracto de harina de pericarpio de maíz (Q-E) y extracto de harina de pericarpio de maíz (E). La actividad antimicrobiana del quitosán fue probada contra *E.coli* (ATCC 25922).

El crecimiento del microorganismo se realizó en dos etapas; durante la primera se preparó una suspensión *E. coli* en solución salina 0.85% con la cual se inocularon tres matraces Erlen Meyer de 250 mL con 50 mL de medio soya tripticaseína BD Bioxon (Becton Dickson de México S.A. de C.V.) con 0.5 mL de la suspensión, incubándolos a 37°C por 72 h a 150 rpm.

En la etapa dos, 5 matraces con medio soya tripticaseína fueron adicionados con diferentes concentraciones Q, Q-E y E (20, 50, 100, 200, 500 y

1000 ppm) y posteriormente incubados con un inóculo del 10 % (v/v) derivado de la etapa uno de cultivo. Los cultivos fueron incubados en agitación a 150 rpm y a 37°C.

Se tomaron muestras de 1 mL a las 0, 3, 6, 8 y 10 hrs, para medir la densidad óptica (DO) a 610 nm en un espectrofotómetro Genesys 5. Las determinaciones se realizaron por triplicado.⁴³

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

1. Preparación de Quitosán con diferentes Pesos

Moleculares

1.1. Determinación de Viscosidades y Pesos Moleculares

Se utilizó quitosán (Biokrissma) de peso molecular y grado de desacetilación desconocido. El peso molecular de este quitosán comercial fue modificado mediante hidrólisis con ácido acético. Este método fue seleccionado ya que puede ser fácilmente controlado y monitoreado y los productos pueden ser obtenidos sin modificaciones en el grado de desacetilación, en comparación con los métodos enzimáticos no específicos.

1.2. Elección de viscosímetro

Para determinar el peso molecular de los hidrolizados de quitosán se determinó mediante viscosidad. Para lo cual fue necesaria la selección de un viscosímetro de Ostwald ya que existen viscosímetros que presentan capilares con distinto diámetro interno, específicos para un intervalo de viscosidades. Inicialmente se utilizó un viscosímetro con capilar número 50; sin embargo, los resultados presentaban muchas variaciones debido a que era un capilar con un diámetro mayor al necesario y los tiempos de hidrólisis eran insuficientes para la obtención de PM más bajos. Para la selección del capilar, se recurrió al valor K reportado para quitosán en el sistema de disolvente de HCH_2COOH 0.1 M/NaCl 0.2 M, de esta manera se determinó que el capilar número 25 era el adecuado para nuestras determinaciones.

En la Figura 6 se presentan los resultados de las viscosidades obtenidas a partir de los tiempos de flujo de las soluciones de la muestra Q.

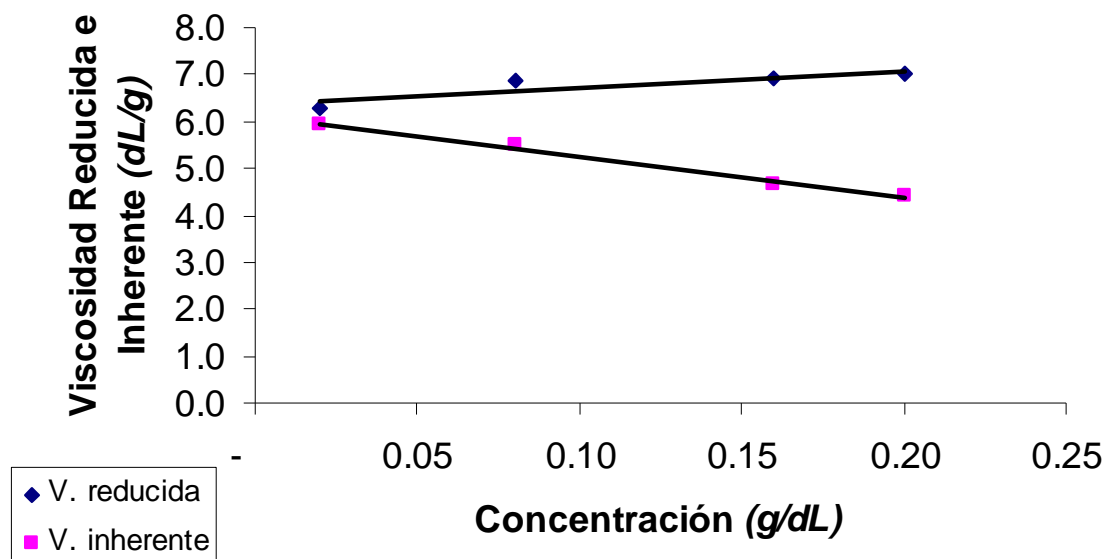


Figura 6 Gráfica de viscosidad reducida (η_{red}) y viscosidad inherente (η_{inh}) de la muestra Q para la obtención de la viscosidad intrínseca ($[\eta]$).

Con el PM de Q determinado, se fijaron los tiempos de hidrólisis en 14, 25 y 72 hrs. Obteniendo Q140, Q250 y Q720, respectivamente. Las graficas de viscosidad reducida e inherente para de las muestras Q140, Q250 y Q720 se presentan en el apéndice.

Una vez obtenidos los valores de viscosidad intrínseca ($[\eta]$), se procedió a calcular el peso molecular utilizando la Ecuación 2. Los resultados de la viscosidad intrínseca ($[\eta]$) y el peso molecular de las muestras de quitosán y sus hidrolizados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3
Resultados de viscosidades intrínsecas y
pesos moleculares

Muestra	$[\eta]$ (mL/mg)	PM (Da)
Q	623.595	899,519
Q140	353.02	487,867
Q250	261.085	352,714
Q720	155.255	201,695

En la Figura 7 se presenta de modo grafico la relación de los resultados de los pesos moleculares con respecto al tiempo. Se obtuvieron pesos moleculares dentro del rango de 200 a 900 kDa en 72 h de hidrólisis. Durante las primeras 12 h se presenta una alta velocidad de hidrólisis que disminuye después de este tiempo, mostrando una disminución del 50% del valor inicial del PM. A pesar de que se deseaba disminuir aun más el peso molecular, es poco factible utilizando esta técnica, pues en la curva se presenta un comportamiento asintótico. Por lo anterior para el desarrollo de este proyecto se decidió utilizar el quitosán de 900 y 200 kDa.

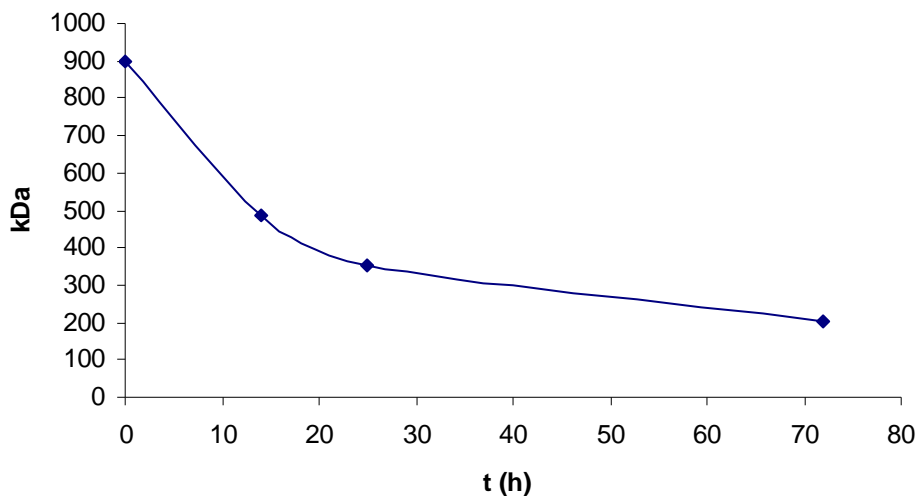


Figura 7 Grafica de pesos moleculares dados en kDa de las muestras de quitosán tomadas a diferentes tiempos de hidrólisis.

2. Determinación del Grado de Desacetilación

Comparando el método de hidrólisis ácida con los enzimáticos, se llegó a concluir que se pueden obtener productos sin modificación en el GDA, pues los valores porcentuales que presentaron tanto la muestra original como sus derivados se encuentran cerca del 85%. En la Tabla 4 se muestran los resultados del cálculo del grado de desacetilación obtenidos a partir del grado de acetilación que se determinó a partir de los espectros de RMN H^1 .

Tabla 4

Resultados del porcentaje de grado de acetilación y desacetilación

Muestra	% GA	%GDA
Q	15	85
Q140	15	85
Q250	15	85
Q720	15	85

3. Determinaciones de Parámetros Químicos del Extracto Seco de Harina de Pericarpio de Maíz

Después de la obtención del extracto de pericarpio de maíz por hidrólisis químico-enzimática, se procedió a la cuantificación de AF por HPLC, compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu y flavonoides por un método colorimétrico.

1.3. Determinación de Ácido Ferúlico

La Figura 8 muestra un cromatograma del extracto seco de harina de pericarpio de maíz donde se aprecia la señal del AF a 26.056 min. En la Tabla 5 se presenta la concentración de AF en la muestra.

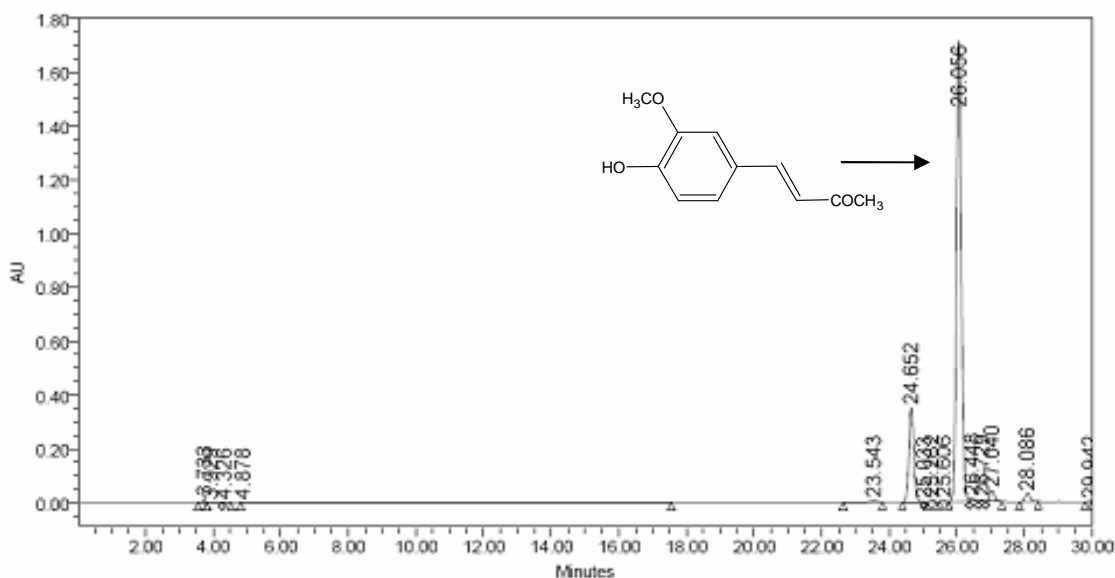


Figura 8. Cromatograma del extracto seco de la harina de pericarpio de maíz.

En el cromatograma del extracto seco de la harina de pericarpio de maíz se aprecia como compuesto principal al AF y también observan algunas señales con menor intensidad pertenecientes a compuestos no identificados. Los cuales probablemente pertenecen a la familia del ácido cinámico pues poseen espectros de UV parecidos al AF. Se obtuvo una concentración de AF de 7 g/Kg de harina de pericarpio de maíz, constituyendo el 0.7% del peso de la muestra.

1.4. Determinación de Compuestos Fenólicos Totales

Los resultados de la determinación de los compuestos fenólicos totales presentes en el extracto seco de la harina de pericarpio de maíz se presentan en la Tabla 5. Obteniendo casi el 50% de compuestos fenólicos en la harina de pericarpio de maíz.

1.5. Determinación de Flavonoides

Otro de los parámetros determinados en el extracto seco de la harina de pericarpio de maíz es la presencia de flavonoides. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron confiables ya que la metodología utilizada presentó interferencias con algún componente del extracto de pericarpio de maíz arrojando falsos positivos.

Tabla 5

Resultados de los parámetros químicos del extracto seco de la harina de pericarpio de maíz

Determinación	Concentración
Ácido Ferúlico	7 g de AF por kg de harina de pericarpio
Compuesto fenólicos totales	406 g de AF por kg de harina de pericarpio
Flavonoides	ND*
* ND = No determinado	

2. Capacidad de Adsorción de las Muestras Q y Q720

Una vez obtenidos y caracterizados los hidrolizados de E y Q a distintos PM, fue determinada la capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos presentes en el extracto de pericarpio en Q y Q720. Los resultados se muestran en la Figura 9.

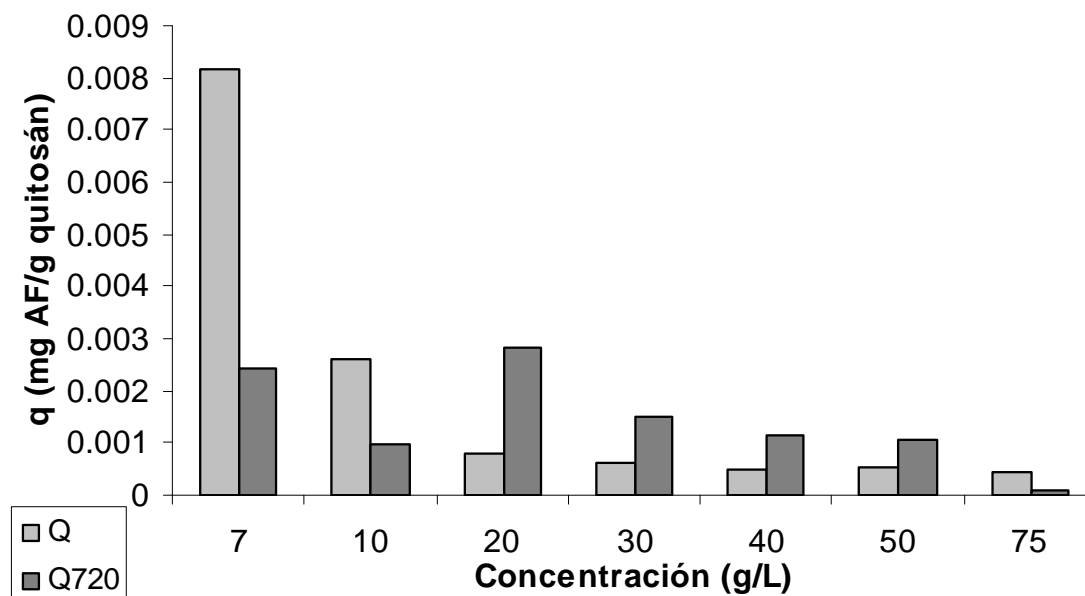


Figura 9. Gráfica de la capacidad de adsorción de las muestras Q y Q720.

Es necesario tomar en cuenta que la formación de complejos se da entre los grupos amino libres expuestos y los compuestos fenólicos, siendo un factor trascendente para una eficiente captación de los mismos. Es por esto que el tamaño de partícula influye en gran manera sobre el fenómeno de adsorción. Siendo importante tomar en cuenta esta variable a la hora de poner en contacto estos compuestos. A concentraciones menores o iguales a 10 g/L Q presenta mayor capacidad de absorción que Q720. Al parecer, este resultado fue afectado debido a que el tamaño de partícula de Q720 no fue uniforme comparado con Q. Por otro lado, a concentraciones mayores a 20 g/L Q720 presentó mayor capacidad de adsorción que Q. Este fenómeno se explica por la característica del quitosán de formar aglomerados o acumulados, por lo que, en altas concentraciones este fenómeno evita que las partículas que se encuentran en el centro del aglomerado expongan sus grupos aminos libres e interaccionen

con los compuestos fenólicos, disminuyendo la capacidad de adsorción a altas concentraciones.

Finalmente se decidió utilizar una concentración de 10 g/L para los análisis subsiguientes para asegurar que, tanto la actividad antioxidante como la antimicrobiana se presenten con menor variabilidad al ser comparadas con las muestras individuales.

3. Determinación de Actividad Antioxidante

Además de determinar la actividad antioxidante del E y del ácido ascórbico como control. Se determinó la actividad antioxidante de las muestras Q-E y Q720-E resultantes de la adsorción del AF en 10 g/L de quitosán. Los resultados de la actividad antioxidante expresados como IC₅₀ de las muestras analizadas se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6
Resultados de la actividad antioxidante (estabilización de
radicales libres [DPPH])

Muestras	IC ₅₀ (mg/mL)
Ácido ascórbico	0.22
E	0.96
Q - E	3.05
Q720 - E	6.22

Una vez adsorbidos los compuestos fenólicos en quitosán fue necesario determinar la actividad antioxidante del polímero modificado y compararla con el E y el ácido ascórbico como referencia. Como se observa, el E presentó un IC_{50} 4.3 veces más alto que el IC_{50} del ácido ascórbico. Q-E y Q720-E presentaron IC_{50} más altos que E. Como era de esperarse, debido a las capacidades de adsorción, Q-E presentó un IC_{50} mas bajo que Q720-E. Por tanto, corrigiendo el tamaño de partícula utilizada en las muestras de quitosán, se espera aumentar la capacidad de adsorción y con esto aumentar la actividad antioxidante de Q720-E. Por lo anterior, para realizar el resto de las pruebas se decidió utilizar solamente las muestras de Q.

4. Determinación de la Actividad Antimicrobiana

En las Figuras 10, 11 y 12 se muestran las curvas de crecimiento de *E. coli* en presencia de E, Q y Q-E a distintas concentraciones. En las pruebas microbiológicas realizadas con Q, se logró la inhibición del crecimiento de *E. coli*; sin embargo, los resultados obtenidos con E no fueron los mismos, ya que en éste no se presento modificación alguna en el crecimiento. Finalmente para Q-E no se observaron diferencias significativas en la actividad de quitosán. Con esto se puede determinar que la actividad antimicrobiana esta determinada por el Q y que E no afecta la actividad antimicrobiana de éste.

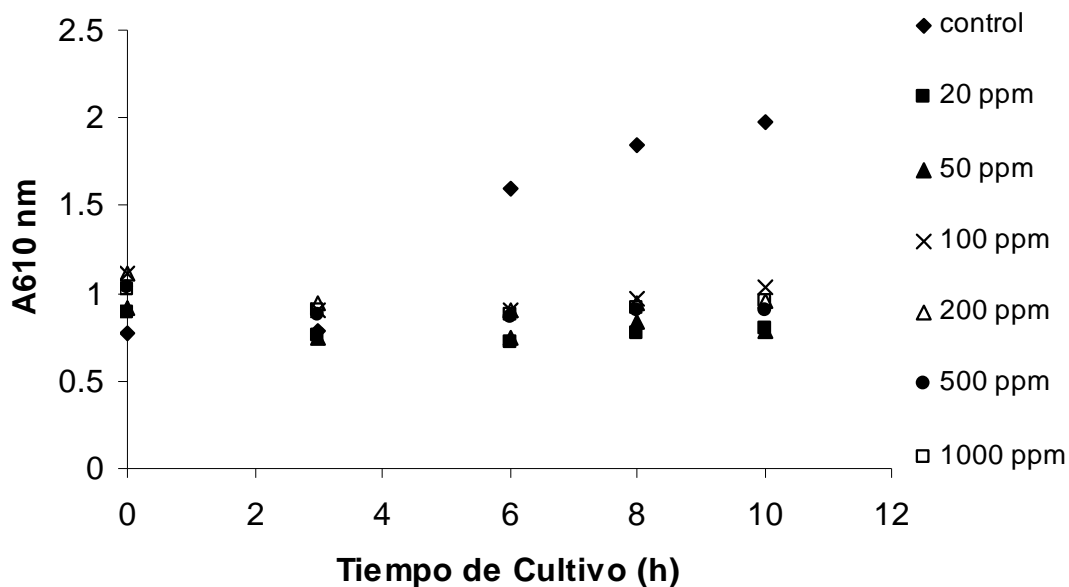


Figura 10 Gráfica de la curva de crecimiento de *E.coli* en caldo de soya tripticaseína con Quitosán (Q).

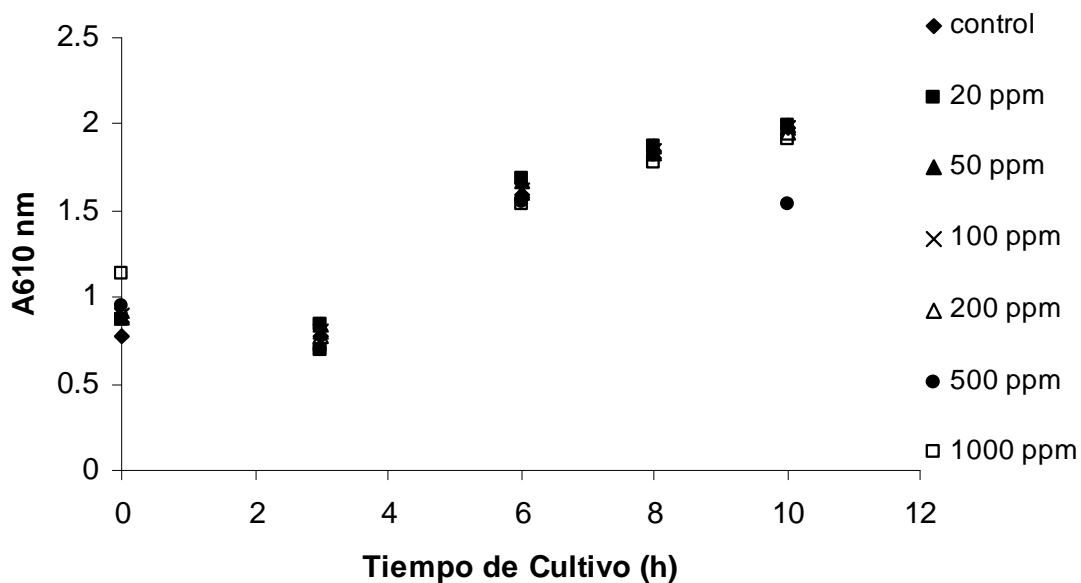


Figura 11 Gráfica de la curva de crecimiento de *E.coli* en caldo de soya tripticaseína con extracto de harina de pericarpio de maíz (E).

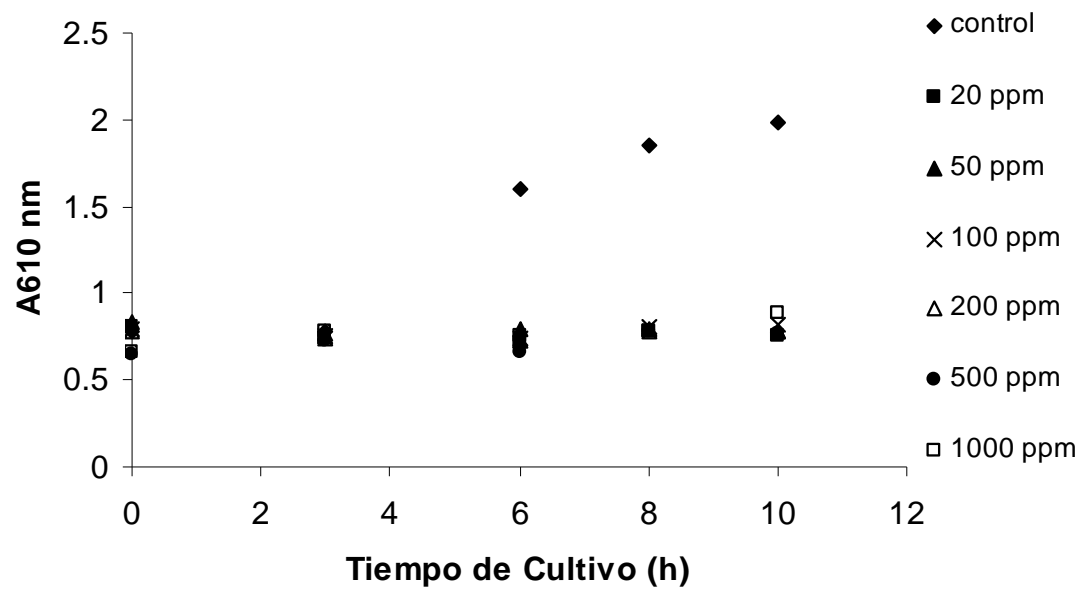


Figura 12 Gráfica de la curva de crecimiento de *E.coli* en caldo de soya tripticaseína con Quitosán (Q).

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

En años recientes se ha reconocido al quitosán como un compuesto de gran interés por sus diversas aplicaciones en distintas áreas del cuidado de la salud y el medio ambiente. Aunado al interés actual de consumir productos con menor procesamiento y reutilización de desechos; en éste trabajo se proponen nuevas aplicaciones para los desechos de la industria camaronera y de la tortilla.

Fue necesario caracterizar tanto el quitosán como el extracto de pericarpio de maíz a fin de optimizar sus propiedades; ya que, en el quitosán el peso molecular es un factor de suma importancia que influye de manera determinante sobre las propiedades antimicrobianas de éste. Por lo que fue necesario la puesta en marcha de metodologías que nos permitieran determinar y modificar su peso molecular. Para alcanzar esta meta se eligió la medición de la viscosidad e hidrólisis ácida respectivamente. Sin embargo, a diferencia de lo reportado en la literatura, se observó una disminución de la velocidad de hidrólisis del quitosán después de 12 horas, provocando que los cambios en el peso molecular del quitosán fueran mínimos a tiempos mayores y no se obtuviera un valor cercano a 10 kDa peso molecular reportado como óptimo para la inhibición del crecimiento de microorganismos según la literatura. Este comportamiento pudo ser ocasionado por la formación de agregados que dificultan la difusión del ácido acético, pues es conocido que polímeros como el quitosán bajo determinadas condiciones formen agregados que cambien sus propiedades reológicas. A pesar de este último inconveniente las muestras de quitosán fueron capaces de inhibir completamente el crecimiento de *E. coli*.

Por otro lado, se caracterizó parcialmente el extracto de pericarpio de maíz obtenido por hidrólisis químico-enzimática, determinando que el 40% del extracto esta formado por compuestos fenólicos, entre los cuales, el ácido ferúlico se presenta en mayor proporción en los análisis por cromatografía de alta resolución. En otra determinación se trató de medir el contenido de flavonoides, sin embargo, interferencias presentes en el extracto impidieron una determinación confiable, posiblemente debida a la presencia de compuestos fenólicos polimerizados. Así mismo, se comparó la capacidad antioxidante del extracto de pericarpio de maíz contra ácido ascórbico resultando aproximadamente 5 veces mayor. No obstante, sigue siendo un producto de gran interés al ser un producto de valor agregado.

Diferentes concentraciones de quitosán fueron utilizadas para su modificación a una concentración conocida de extracto, a fin de determinar la capacidad de adsorción del quitosán. Se observó que a concentraciones bajas de quitosán se obtuvo mayor capacidad de adsorción. Esto nos confirma que, al aumentar la concentración de quitosán se promueve la formación de aglomerados, disminuyendo el área superficial de las partículas. Por otro lado, el quitosán de bajo peso molecular presento un comportamiento un tanto errático, probablemente por diferencias en el tamaño de partícula. A pesar que a 7 g/L presentó mejor capacidad de adsorción se propone utilizar 10g/L para preservar la actividad antimicrobiana del quitosán. Una vez formado el complejo Q-E se determinó la actividad antimicrobiana concluyendo que la presencia de los compuestos fenólicos no la afectan. En cambio, el IC_{50} sufrió un incremento,

ya que la mayor parte estaba constituido por quitosán y una pequeña parte por los compuestos fenólicos que proporcionan la actividad antioxidante.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

- ✓ Se disminuyó el peso molecular del quitosán a través de la hidrólisis ácida de ácido acético, sin modificación en el grado de desacetilación.
- ✓ Dentro de las primeras 24 horas de hidrólisis ácida del quitosán se logra la disminución de peso molecular mas significativa.
- ✓ El quitosán de alto peso molecular (~900 kDa) logró inhibir el crecimiento de *E. coli*
- ✓ En el extracto de pericarpio de maíz obtenido por hidrólisis químico-enzimática, el compuesto con una mayor concentración es el ácido ferúlico.
- ✓ La actividad antimicrobiana del quitosán no se vio afectada por la adsorción de los compuestos fenólicos del extracto de pericarpio de maíz.
- ✓ El extracto de pericarpio de maíz no presento actividad antimicrobiana.
- ✓ Se le confirió actividad antioxidante al quitosán con la adsorción de los compuestos fenólicos presentes en el extracto de pericarpio de maíz.

CAPITULO 7

RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo la determinación de la capacidad de adsorción del quitosán, manejando tamaño de partícula uniforme y observar el aumento de la concentración de compuestos fenólicos por gramo de quitosán.
- Realizar la determinación de actividad antioxidante al ácido ferúlico puro, para saber si existe aumento o disminución de la actividad, y así saber si conviene o no la purificación de este compuesto.
- Efectuar la determinación de la actividad antioxidante por otras metodologías para corroborar los resultados obtenidos y si es o no factible el desarrollo del quitosán modificado como principio activo.
- Identificar la interferencia presente en el extracto de pericarpio de maíz responsable de la interacción que impide el uso de la técnica utilizada para la determinación de flavonoides, así como determinarlos por métodos mas precisos

REFERENCIAS

1. **Agroindustria**; <http://es.wikipedia.org/wiki/Agroindustria> (10/07/2007).
2. Assaf Torres, Ali, Macias Ochoa, Roberto, De la Torre Martinez, Mayra; **Proceso para la recuperación de ácido ferúlico**; WO 2004/110975 A1; C07C 59/52 59/68; PCT/MX2003/000050; BIOKAB, S.A. de C.V.
3. **Efluentes de la Industria Alimentaría Materia Prima para una Industria Sustentable**;
<http://www.cienciaytecnologia.yucatan.gob.mx/noticias/verarticulo.php?IdArticulo=166&Categoria> (11/07/2007).
4. Dr. Alfredo Morales Díaz (2007) **Comunicación personal**; Gruma.
5. **Efecto de los sólidos insolubles de nejayote sobre parámetros de eficiencia alimenticia en cerdos de crecimiento**;
http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=423 (13/07/2007).
6. Carrillo Domínguez Lubiano, Zuleika (2006) **Análisis del contenido de ácido ferúlico extraído del maíz blanco, negro y de los subproductos de nixtamalización**. Tesis como requisito para la obtención del grado de Químico Farmacéutico Biólogo, en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
7. Guadián Delgado Alejandrina (2006) **Análisis del contenido de ácido ferúlico presente en el maíz blanco, morado y en los subproductos de su procesamiento**. Tesis como requisito para la obtención del grado de Químico Farmacéutico Biólogo; Facultad de Ciencias Químicas; Universidad Autónoma de Nuevo León.
8. Salinas-Moreno, Yolanda; López-Reynoso, José de J.; González-Flores, Guadalupe B.; Vázquez-Carrillo, Griselda (2007) **Compuestos fenólicos del grano de maíz y su relación con el oscurecimiento de masa y tortilla**. *Agrociencia*;41:295-305.

9. Sohn, Young Teak; Oh Hee Jin (2003) **Characterization of physicochemical properties of ferulic acid.** *Archive of Pharmacal Research*;26(12):1002-1008
10. Rosazza J. P. N., Huang Z., Dostal L. (1995) **Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product.** *Journal of Industrial Microbiology*;15:457-471.
11. Gamez De León Nancy Elizabeth (2006) **Extracción químico-enzimática del Ácido Ferúlico presente en diferentes variedades de maíz,** Tesis como requisito para la obtención del grado de Químico Farmacéutico Biólogo; Facultad de Ciencias Químicas; Universidad Autónoma de Nuevo León.
12. Graf E. (1992) **Antioxidant potential of ferúlico acid.** *Free Radical Biology & Medicine*;13:435-448.
13. Balasubashini M. S., Rukkumani R., Menon V.P. (2003) **Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats.** *Acta Diabetologica*;40(3):118-22.
14. Balasubashini M.S., Rukkumani R. (2004) **Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats.** *Phytotherapy Research*;18(4):310-4.
15. Kim H.K., Jeong T.S., (2003) **Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats.** *Clinica Chimica Acta*;327(1-2):129-37.
16. Chávez-Joa, J. A., Suárez-Lugo, G. A. (2001) **Determinación de malondialdehído y óxido nítrico en individuos fumadores.** *Medicina Interna (Caracas)*;17(2)
17. Hudson E.A., Dinh P.A., Kokubun T., Simmonds M.S., Gescher A. (2000) **Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells.** *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*;9(11):1163-70

18. Kanski J., Aksenova M., Stoyanova A., Butterfield D.A. (2002) **Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies.** *Journal of Nutritional Biochemistry*;13(5):273-281.
19. Sassa S., Kikuchi T. (2003) **Preventive effect of ferulic acid on bone loss in ovariectomized rats.** *In Vivo*;17(3):277-80.
20. Philp H.A. (2003) **Hot flashes-a review of the literature on alternative and complementary treatment approaches.** *Alternative Medicine Review*;8(3):284-302. Review.
21. Chiang L.C., Ng L.T. (2003) **Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of Plantago species.** *Planta Medica*;69(7):600-4.
22. Ou S, Kwok KC. (2004) **Review Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in food.** *Journal of the Science of Food & Agriculture*;84:1261-1269.
23. González San José, M.L.; Muñoz Rodríguez, P.; Valls Bellés, V. (2001) **Actividad antioxidante de la cerveza: estudios *in vivo* e *in vitro*.** Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos; Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Valencia.
24. **Antioxidante** <http://es.wikipedia.org/wiki/Antioxidante> (17/12/2007)
25. Muselík, Jan; García-Alonso, María; Martín-López, María P.; Žemlička, Milan; Rivas-Gonzalo, Julián C. (2007) **Measurement of Antioxidant Activity of Wine Catechins, Procyanidins, Anthocyanins and Pyranoanthocyanins.** *International Journal of Molecular Sciences*;8,797-809.

26. Matsukawa, R.; Dubinsky, Z.; Kishimoto, E.; Masaki, K.; Masuda, Y.; Takeuchi, T.; Chihara, M.; Yamamoto, Y.; Niké, E.; Karube, I. (1997) **A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds.** *Journal Applied Phycology*; 9:29-35.
27. Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. (2002) **Methods for testing antioxidant activity.** *Analyst*;127: 183-198.
28. Du, Qizhen; Xu, Yuanjin; Li, Lei; Zhag, Yang; Jerz, Gerold; Winterhalter, Peter (2006) **Antioxidante constituents in the fruits of *Luffa cylindrical* (L.) Roem.** *Journal of Agricultural & Food Chemistry*;54:4186-4190.
29. Antrim Richard Lee; Harris Donald Wayne (1977) **Method for treatment of corn hulls.** U.S. Patent 4038481; Standard Brands Incorporated.
30. Valladares Juárez, Ana Gabriela (2006) **Recuperación de ácido ferúlico de subproductos y desechos de la industria de la tortilla.** Tesis como requisito para obtener el Grado de Maestría en Ciencias con orientación en Procesos Sustentables; Facultad de Ciencias Químicas; Universidad Autónoma de Nuevo León.
31. Adom K. K., Liu R. H. (2002). **Antioxidant activity of grains.** *Journal of Agricultural & Food Chemistry*;50:6182-6187.
32. **Estadísticas Internacionales;**
http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_estadisticas (11/07/2007)
33. Blgo. Iván Paz Aliaga, Blgo. Marianela Chávez de Rebisso, e Ing. Q. Jorge Velásquez Salinas (2002–2003) **Efectos medio ambientales y sanitarios de los deshechos del crustaceo *Emerita analoga* en la región arequipa;** Centro de Investigación de la Universidad Catolica Santa Maria CICA.
34. Sandford, P.A. (1992) **High purity chitosan and alginate: Preparation, analysis, and applications.** *Frontiers in Carbohydrate Research*;2:250-269.

35. Li, Q.; Dunn, E.T.; Grandmaison, E.W.; Goosen, M.F.A. (1992) **Applications and properties of chitosan.** *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*;7(4): 370-397.
36. Kosaraju, S. L., D'ath, L., Lawrence, A. (2006) **Preparation and characterization of chitosan microspheres for antioxidant delivery.** *Carbohydrate Polymers*;64:163–167.
37. Vishu Kumar, B. Acharya; Varadaraj, Mandyam C.; Tharanathan, Rudrapatnam N. (2007) **Low molecular weight chitosan – preparation with the aid of pepsin, characterization and its bactericidal activity.** *Biomacromolecules*;8:566-572
38. Rout, S. K. (2001) **Physicochemical, Functional, and Spectroscopic analysis of crawfish chitin and chitosan as affected by process modification.** *Dissertation*.
39. Tolaimate, A., Desbrieres, J. Rhazi, M. Alagui, A., Vincendon, M., Vottero, P. (2000) **On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin.** *Polymer*;41:2463-2469.
40. Knaul, J., Z., Hudson, S.M., Creber, K.A.M. (1999) **Crosslinking of Chitosan Fibers with Dialdehydes: Proposal of a New Reaction Mechanism.** *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*;72:1079-1094.
41. Ahmad Khan, Tanveer; Khiang Peh, Kok; Seng Ch'ng, Hung. (2002) **Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods.** *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*;5(3):205-212.
42. Barros, Francisco C. F., Cavalcante, Rivelino M., Carvalho, Tecia V. (2006) **Produção e caracterização de esfera de quitosana modificada quimicamente,** *Revista Iberoamericana de Polímeros*;7(4):232-246.

43. Liu, N., Chen, X. (2006) **Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*.** *Carbohydrate Polymers*; Available online 19 January 2006.
44. Felt, O.; Carel, A.; Bachni, P.; Gummy, R. (2000) **Chitosan as tear substitute: a wetting agent endowed with antimicrobial efficacy.** *Journal of Ocular Pharmacological Therapy*; 16:261-270.
45. Tsai, G. J.; Wu, Z. Y.; Su W. H. (2000) **Antibacterial activity of a chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application in milk preservation.** *Journal of Food Protection*; 63(6):747-752.
46. Kondo, Y.; Nakatani, A.; Hayashi, K.; Ito, M. (2000) **Low molecular weight chitosan prevents the progression of low dose streptozotocin induced slowly progressive diabetes mellitus in mice.** *Biological Pharmacological Bulletin*; 23:1458-1464.
47. Vishu Kumar, A.B., Tharanathan, R.N. (2004) **A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes.** *Carbohydrate Polymers*; 58:275-283.
48. Torszas, T. L.; Kendall, C. W. C.; Sugano, M.; Iwamoto, Y.; Rao, A. V. (1996) **The influence of high and low molecular weight chitosan on colonic cell proliferation and aberrant crypt foci development in CF1 mice.** *Food and Chemical Toxicology*; 34:73-77.
49. Russo, Paul; Hester, Roger. **Determination of Mark-Houwink constants for poly(styrene) by dilute solutions viscosity.** Wet Lab 3.
50. Lopez Medina, Francisco; Pupo Lorenzo, Noemi; Oropeza Ricardo, Alejandro. (2001) **Determinación de la masa molar del ester mixto acetato butirato de**

celulosa por viscosimetría. Revista electrónica "Ciencias Holguín";3(6):

<http://www.ciencias.holguin.cu/2001/Diciembre/articulos/ARTI11.HTM>

51. Fernandez-Kim Sun-Ok (2004) **Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols** Thesis for the degree of Master of Science in The Department of Food Science, LSU and Agricultural and Mechanical College.
52. Kenawy E.R., Abdel-Hay F.I. (2005) **Biologically active Polymers: Modification and antimicrobial activity of chitosan derivates.** *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*;20:95-111.
53. Ravi Kumar, M. N. V.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J. (2004) **Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives.** *Chemical Reviews*;104:6017-6084.
54. Shaoyun Yu; Ying Zhao; Fenglan Wu; Xuan Zhang; Wanliang Lü; Hua Zhang; Qiang Zhang. (2004) **Nasal insulin delivery in the chitosan solution: in vitro and in vivo studies International.** *Journal of Pharmaceutics*;281:11–23
55. Zeng Shuan Ma; Hock Hin Yeoh; Lee-Yong Lim. (2002) **Formulation pH Modulates the Interaction of Insulin with Chitosan Nanoparticles.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*;91(6): 1396–1404.
56. Barańska-Rybak, W., Sonesson, A. (2006) **Glycosaminoglycans inhibit the antibacterial activity of LL-37 in biological fluids.** *Journal of. Antimicrobial. Chemotherapy*;57:260-265.
57. Chung, Y. C.; Su, Y. P.; Chen, C. C. (2004) **Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall.** *Acta Pharmacologica Sinica*;25(7):932-6.

58. Roberts, George A. F.; Domszy, Julian G. (1982) **Detrmination of the viscometric constants for chitosan.** *International Journal of Biological Macromolecules*;4:374-377.
59. Santos, José E. Dos, Campana Filho, Sérgio P. (2003) **Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*;13(4):242-249.
60. Liu, Ming; Qi Li, Xin; Weber, Courtney; Yong Lee, Chang; Brown, Janice; Hai Liu, Rui (2002) **Antioxidant and antiproliferative of raspberries.** *Journal of Agricultural & Food Chemistry*;50(10):2926-2930.

APÉNDICE.

GRÁFICAS DE VISCOSIDADES Y PESOS MOLECULARES

Grafica de Viscosidad reducida y viscosidad inherente de la muestra Q

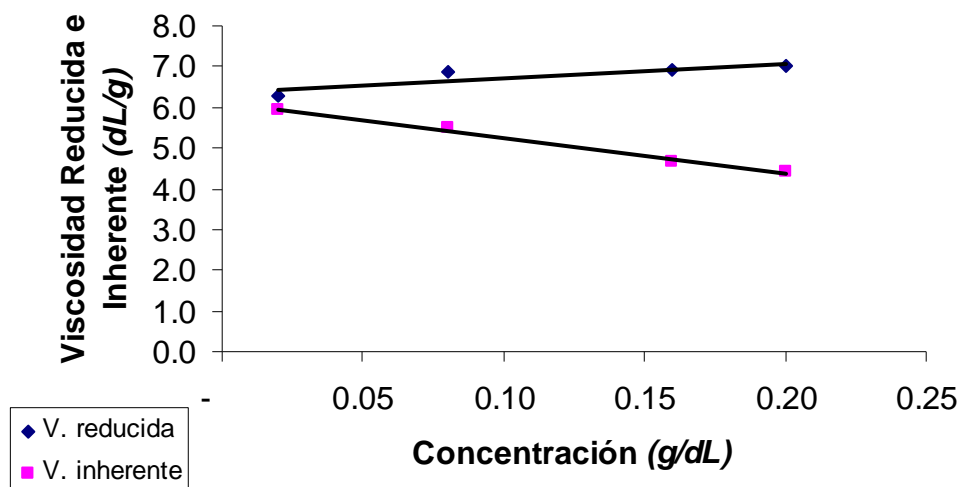


Tabla de viscosidad intrínseca y pesos moleculares de Q	
Viscosidad intrínseca promedio (ml/g)	Peso molecular en kDa
623.59	899.519

Grafica de Viscosidad reducida y viscosidad inherente de la muestra Q114

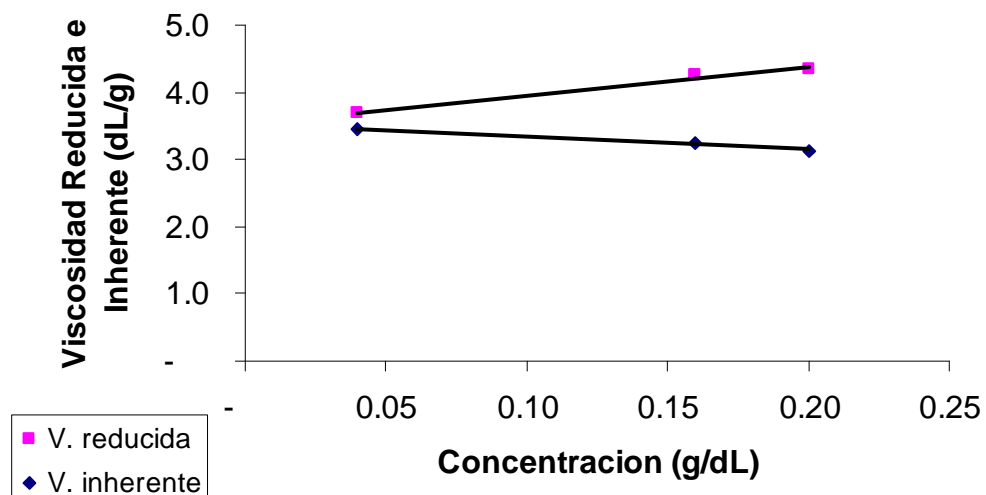


Tabla de viscosidad intrínseca y pesos moleculares de Q114	
Viscosidad intrínseca promedio (ml/g)	Peso molecular en kDa
353.02	487.876

Grafica de Viscosidad reducida y viscosidad inherente de la muestra Q125

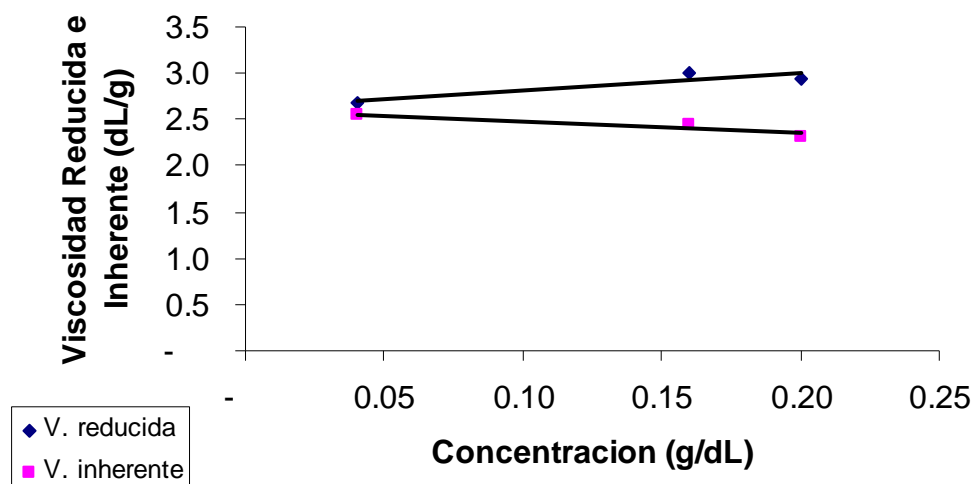


Tabla de viscosidad intrínseca y pesos moleculares de Q125	
Viscosidad intrínseca promedio (ml/g)	Peso molecular en kDa
261.08	352.714

Grafica de Viscosidad reducida y viscosidad inherente de la muestra Q720

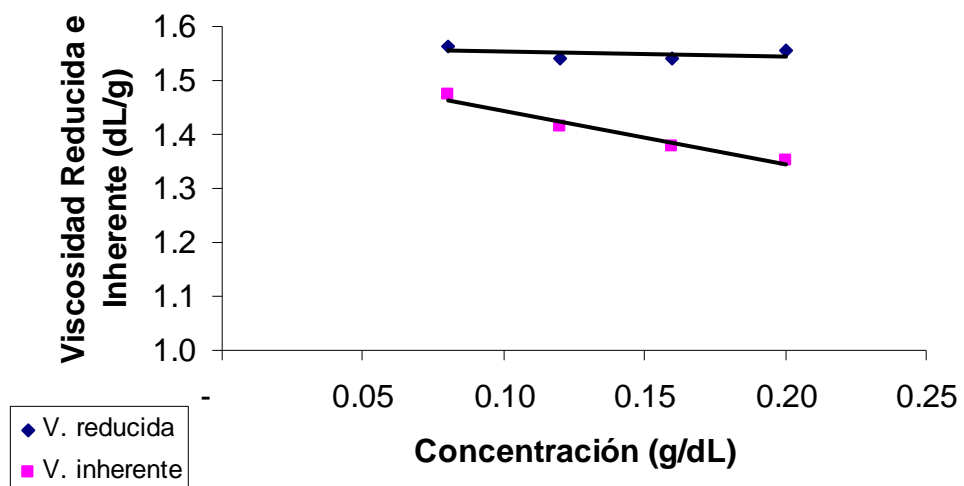


Tabla de viscosidad intrínseca y pesos moleculares de Q720	
Viscosidad intrínseca promedio (ml/g)	Peso molecular en kDa
155.25	201.695

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Xochiquetzal Martínez González

Nacida el 8 de Octubre 1983 en Monterrey, Nuevo León, México, hija de padres mexicanos, José Martínez Molina y Blanca Alicia González Flores. A la edad de 21 años recibió el grado de Químico Farmacéutico Biólogo en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Actualmente es candidata al grado de Maestra en Ciencias con orientación en Farmacia.