



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**TESIS DOCTORAL**

**“Extracción y caracterización de ácido hialurónico a partir de crestas de *Gallus gallus domesticus* mediante el método de ultrasonido de alta intensidad”**

Para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Agropecuarias

**PRESENTA**

**Mtra. Graciela Callejas Quijada**

Director

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Codirector

Dr. José Juan Escobar Chávez

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., 13 agosto de 2025.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**TESIS DOCTORAL**

**“Extracción y caracterización de ácido hialurónico a partir de crestas de *Gallus gallus domesticus* mediante el método de ultrasonido de alta intensidad”**

Para obtener el grado de  
Doctor (a) en Ciencias Agropecuarias

**PRESENTA**

**Mtra. Graciela Callejas Quijada**

**Director**

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

**Codirector**

Dr. José Juan Escobar Chávez

**Asesores**

Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Dr. Juan Ocampo López

Dr. Antonio de Jesús Cenobio Galindo

Tulancingo de Bravo, Hgo., 13 de agosto de 2025.

Asunto: Autorización de impresión.

**Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado**  
**Directora de Administración Escolar**  
**Presente.**

El Comité Tutorial de la **TESIS** del programa educativo de posgrado titulado "**Extracción y caracterización de ácido hialurónico a partir de crestas de *Gallus gallus domesticus* mediante el método de ultrasonido de alta intensidad**", realizado por la sustentante **Graciela Callejas Quijada** con número de cuenta **290659**, perteneciente al programa de **Doctorado en Ciencias Agropecuarias**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

### **AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN**

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

**Atentamente**  
**"Amor, Orden y Progreso"**  
**Lugar, Hidalgo a 05 de Agosto de 2025.**

El Comité Tutorial



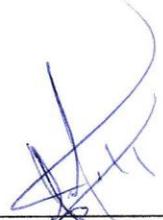
---

Dr. Gabriel Aguirre  
Alvarez



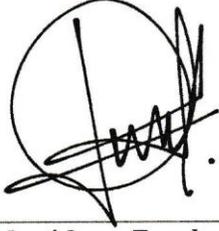
---

Dr. Rubén Jiménez  
Alvarado



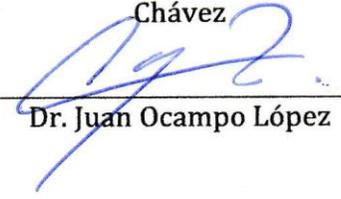
---

Dr. Antonio de Jesus  
Cenobio Galindo



---

Dr. José Juan Escobar  
Chávez



---

Dr. Juan Ocampo López

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer primero a Dios, por haberme permitido vivir y aprender en cada etapa del Doctorado en Ciencias Agropecuarias. No sólo por el hecho de poder obtener un grado más de estudios en mi carrera profesional, sino todas las experiencias de vida, las personas, amistades que conocí y me acompañarán siempre el resto de mi vida.

Agradezco enormemente a mi asesor, Dr. Gabriel Aguirre Álvarez, por haber tenido la confianza de admitirme en este programa de estudios, y quien con su sabiduría y experiencia como investigador me involucró y me dio a conocer el panorama del camino de la investigación. Gracias doctor, porque además de lo académico, de los momentos difíciles que me tocó vivir y enfrentar... usted siempre tuvo una sonrisa y un consejo de vida, una motivación para continuar en este camino... ¡Gracias Doctor!

Quiero agradecer a mi familia (Mis padres Celia y Francisco, Mely, Mary y Regina) que, aunque por distancia no podemos vernos siempre están presentes en mi pensamiento y son complemento de mi motivación cada día. Gracias por conocer a mi mejor amiguito y ahora parte de mi familia también... mi gato "*Garfield*", a quien conocí y adopté hace 1 año en mi transitar de los laboratorios de ICAP.

Quiero agradecer a mis compañeras y amigas de laboratorio: Araceli, Jenny, Gieraldin, Alejandra y compañeros de otros laboratorios con quienes conviví y compartí muchas experiencias de vida.

Quiero agradecer a CITNOVA al Dr. Francisco Patiño Cardona, director general del CITNOVA, Marai Shairene Acuña Pérez que en coordinación con Merck México Dr. Cristian von Schulz-Hausmann, me otorgaron la beca de la convocatoria “MEXICANAS CON CIENCIA”, lo cual me permitió completar los estudios complementarios para este proyecto de investigación. Gracias por haber confiado en mí y haber podido complementar esta investigación con una estancia en la Universidad Federal de Ceará (UFC), Brasil.

Mi agradecimiento infinito a los diferentes laboratorios que además de permitirme trabajar, tuvieron un gran impacto en mi vida personal y en el desarrollo de este proyecto;

Dr. Bartolomeu de Souza, Dra. Karol y su equipo de trabajo (Laboratorio de Pesca, Universidad Federal de Ceará, Brasil), Dr. José Juan Escobar Chávez y su equipo de trabajo (Unidad de Sistemas Transdérmicos: Laboratorio 12, FESC-Cuautitlán UNAM, Cuautitlán Izcalli Edo. México), Dr. Juan Ocampo López (Laboratorio de Histología, Instituto de Ciencias Agropecuarias UAEH) y su equipo de trabajo, Dra. Alma (Laboratorio de Frutas y Hortalizas, Instituto de Ciencias Agropecuarias UAEH), Química Maribel (Laboratorio Central Multidisciplinario, Instituto de Ciencias Agropecuarias UAEH), Dr. Del Razo (Laboratorio de Nutrición Animal), Dra. Nidia (Laboratorio de Genética y Genómica).

Gracias, Gracias, Gracias.

## DEDICATORIA

*En memoria de mis abuelas y bisabuelas finadas Pascuala Crisóstomo, María Godínez, Francisca Cenobia “Paulita” Godínez Crisóstomo y Regina Ángeles Chávez.*

*Esta Tesis, la dedico a todas las mujeres de mi familia... a mi madre Celia Quijada Crisóstomo, quien desde que me sostuvo por primera vez en sus brazos, cuidó y dedicó su vida, me dio amor desde el primer momento ...ella dice que cuando vio mis sonrisas por primera vez, me llamó Graciela que significa “aquella que tiene gracia”.*

*A mis hermanas: Melissa, Mariana y Regina de quienes aprendo cada día y agradezco por estar conmigo en momentos buenos y en momentos de aprendizaje. A mi Tía Jaqueline, gracias por ampliar muestra mente a nuevos horizontes sin rendirse. La admiro por todo su esfuerzo, a mis tías, primas, sobrinas, futuras hijas, futuras sobrinas y futuras nietas.*

*A todas las mujeres del pueblo que me vio crecer “Santuario Mapethé”, estas mujeres que alguna vez tuvieron sueños y ambiciones pero que, por circunstancias de la vida, no pudieron tener la oportunidad de estudiar. También quiero dedicar este trabajo a las mujeres que han y siguen enfrentado batallas de vida... todas seguimos avanzando creciendo, madurando en el camino... con amor, sabiduría y respeto para cada una...gracias por haberme ofrecido y enseñado todo lo que tuvieron a su alcance... las atesoro y llevo siempre en mi corazón pues siguen vivas en mí.*

*Esta tesis, también se la dedico al hombre que me dio la vida: Francisco Callejas, gracias por haberme permitido formar una partecita de tu vida y haberte hecho responsable de mí, así como con las herramientas que tuviste al alcance. Agradezco a los hombres que han formado parte de mi familia en el trabajo de campo; a mi reciente finado abuelo Juan Quijada Crisóstomo, a mis tíos Lázaro y Ángel, a quien honraré siempre por haber formado gran parte de mi infancia.*

*Esta tesis la dedico a un hombre especial; Joel López Hernández (“Chu”) quien me acompañó en el transcurso de mi vida para descubrir este nuevo camino, que, sin duda, me retó a experimentar y enfrentar mis más grandes miedos a nivel personal, pero sobre todo demostrarme a mí misma...haberlos superado.*

*Finalmente, y no menos importante quiero agradecer a Germán G., gracias por haber coincidido en esta vida y también por escucharme en momentos difíciles... gracias por haber estado ahí. Gracias también a ti Paco C., por haberme escuchado y dejarme aprender lecciones de la vida. Gracias Herón, Kevin, Erasto y Alejandro por haberme sacado una sonrisa en momentos de bienestar e incertidumbre... gracias por su amistad.*

*Por siempre a todos ustedes, los admiro y respeto... algunos son padres, hombres inteligentes, trabajadores, protectores y amorosos... que Dios bendiga siempre su camino de vida.*

## RESUMEN

La extracción de HA de diversas fuentes se ha convertido en un polímero de interés de alto valor cosmético, farmacéutico y biotecnológico, sin embargo, los métodos de extracción convencionales implican largos tiempos de extracción. El objetivo de este proyecto, fue desarrollar un proceso de extracción y caracterización de HA a partir de crestas de *Gallus gallus domesticus* mediante la aplicación de UAI para contribuir en la implementación de tecnologías emergentes como alternativa de mejora al MT.

En la primera etapa, se caracterizó la materia prima (crestas de *Gallus gallus domesticus*) en sus propiedades fisicoquímicas e histológicas.

La segunda etapa, consistió en el desarrollo y optimización de métodos para la extracción de HA a partir de las crestas de *Gallus gallus domesticus* mediante UAI para comparar el rendimiento de HA y contenido de proteína con el MT. En la tercera etapa se evaluó el rendimiento de HA y la caracterización del HA obtenido de los métodos (MT, UAI) en sus propiedades fisicoquímicas, antioxidantes, citotóxicas y microscopía SEM-FEG para evaluar la calidad de los extractos.

Finalmente, en la cuarta etapa se desarrolló un sistema transdérmico de microagujas de aplicación tópica con los extractos obtenidos de ácido hialurónico.

**Palabras clave:** ácido hialurónico (HA), método de ultrasonido de alta intensidad (UAI), método tradicional (MT), acetato de sodio (A), ácido acético (AA), extracción, antioxidantes, citotoxicidad, SEM-FEG, sistema transdérmico, microagujas.

## ABSTRACT

The extraction of HA from various sources has emerged as a polymer of interest with high cosmetic, pharmaceutical, and biotechnological value; however, conventional extraction methods entail long extraction times. The objective of this project was to develop a process for the extraction and characterization of HA from *Gallus gallus domesticus* combs using UAI to contribute to the implementation of emerging technologies as an alternative to MT improvement.

In the first stage, the physicochemical and histological properties of the raw material (*Gallus gallus domesticus* combs) were characterized.

The second stage consisted of the development and optimization of methods for extracting HA from *Gallus gallus domesticus* combs using UAI to compare HA yield and protein content with those of MT. In the third stage, HA yield was evaluated and the HA obtained using the methods (MT, UAI) was characterized based on its physicochemical, antioxidant, and cytotoxic properties, and SEM-FEG microscopy was used to assess the quality of the extracts.

Finally, in the fourth stage, a topically applied transdermal microneedle system was developed with the obtained hyaluronic acid extracts.

**Keywords:** hyaluronic acid (HA), high-intensity ultrasound (UAI) method, traditional method (MT), sodium acetate (A), acetic acid (AA), extraction, antioxidants, cytotoxicity, SEM-FEG, transdermal system, microneedles.

**ÍNDICE**

AGRADECIMIENTOS .....	ii
DEDICATORIA.....	iv
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	vii
ÍNDICE .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS .....	xxi
GLOSARIO .....	xxv
1 INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	2
1.2 Justificación .....	3
1.3 Planteamiento del problema.....	4
2 MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 Generalidades del ácido hialurónico .....	6
2.1.1 Historia.....	6
2.2 Composición de la membrana extracelular .....	7
2.2.1 Distribución del ácido hialurónico en tejidos y fluidos .....	8
2.2.2 Funciones del ácido hialurónico según su peso molecular .....	9

2.2.3	Estructura química y conformación .....	10
2.2.4	Subproductos del ácido hialurónico .....	12
2.2.5	Propiedades reológicas.....	13
2.3	Materiales para la extracción de ácido hialurónico.....	14
2.4	Métodos comerciales para la producción de ácido hialurónico .....	15
2.4.1	Método de producción mediante el uso de tejidos animales .....	15
2.4.2	Método de producción a base de microorganismos.....	17
2.4.3	Métodos de producción libres de células .....	18
2.4.4	Métodos de extracción y caracterización de ácido hialurónico .....	18
2.5	Técnicas empleadas para caracterización del ácido hialurónico.....	24
2.5.1	Análisis mediante métodos de electroforesis .....	24
2.5.2	Análisis mediante técnicas cromatográficas .....	24
2.6	Aplicaciones en industria alimentaria, medicina, farmacéutica y cosmética.	26
2.6.1	Biomateriales, productos farmacéuticos y sistemas transdérmicos .....	28
2.7	Usos y aplicaciones de HA en sistemas transdérmicos .....	31
2.7.1	Anatomía de la piel: estructura y función .....	31
2.7.2	Administración transdérmica de fármacos .....	32
2.8	Sistema de administración de fármacos con microagujas.....	35
2.9	Tecnologías emergentes en la extracción de compuestos bioactivos.....	39
2.9.1	Técnica de extracción asistida por ultrasonido .....	40

---

2.9.2	Ultrasonido de alta intensidad (UAI).....	41
3	OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	43
3.1	Objetivo general .....	43
3.1.1	Objetivos específicos .....	43
3.2	Hipótesis	44
4	MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
4.1	Etapa I: Caracterización y acondicionamiento de la materia prima.....	45
4.1.1	Composición física e histológica de las crestas de <i>Gallus gallus domesticus</i> .....	46
4.1.2	Tinción de Hematoxilina-Eosina.....	49
4.1.3	Tinción de Tricrómica de Masson .....	51
4.1.4	Tinción con Azul de Alcian pH 2.5.....	52
4.1.5	Análisis proximal de las crestas de <i>Gallus gallus domesticus</i> .....	53
4.1.6	Determinación de humedad .....	53
4.1.7	Determinación de cenizas.....	54
4.1.8	Determinación de nitrógeno total por método Kjeldahl.....	56
4.1.9	Determinación de extracto etéreo .....	58
4.2	Etapa II: Proceso de extracción y purificación.....	59
4.2.1	Acondicionamiento.....	59
4.2.2	Extracción por método tradicional (MT) .....	60

4.2.3	Extracción asistida por ultrasonido de alta intensidad (UAI) .....	61
4.3	Etapa III: Caracterización del ácido hialurónico .....	61
4.3.1	Colorimetría .....	61
4.3.2	Medición de pH .....	64
4.3.3	Cuantificación de ácido hialurónico: método de carbazol .....	65
4.3.4	Concentración de proteína .....	66
4.3.5	Análisis espectral UV-VIS .....	67
4.3.6	Espectroscopía FT-IR .....	68
4.3.7	Prueba de citotoxicidad .....	69
4.3.8	Actividad antioxidante .....	71
4.3.9	Microscopía SEM-FEG .....	76
4.4	Etapa IV: Elaboración de un sistema transdérmico basado en un arreglo de microagujas poliméricas.....	77
4.4.1	Preparación del molde de microagujas en impresión 3D .....	79
4.4.2	Formulaciones para elaboración de los parches transdérmicos .....	80
4.4.3	Caracterización de los sistemas transdérmicos con base en microagujas de HA cargadas con antihipertensivos.....	84
5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	88
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	90
6.1	Descripción histológica de las crestas de <i>Gallus gallus domesticus</i> .....	90

6.2	Análisis proximal de las crestas de <i>Gallus gallus domesticus</i> .....	100
6.3	Cuantificación del HA por reacción carbazol: curva de calibración .....	101
6.4	Desarrollo y ejecución de los procesos de purificación del HA mediante reacción de carbazol .....	105
6.4.1	Análisis de FT-IR de los extractos del proceso de purificación .....	110
6.4.2	Análisis de UV-VIS de los extractos del proceso de purificación .....	115
6.5	Selección del proceso de purificación .....	118
6.6	Parámetros colorimétricos de los métodos UAI y MT.....	120
6.6.1	Método tradicional (MT) .....	121
6.6.2	Método ultrasonido de alta intensidad (UAI) .....	125
6.7	Medición de pH de los tratamientos extraídos de los métodos MT y UAI ..	129
6.8	Cuantificación del HA del método ultrasonido de alta intensidad (UAI) y método tradicional (MT) .....	133
6.9	Cuantificación de proteína del método de ultrasonido de alta intensidad (UAI) y método tradicional (MT) .....	147
6.10	Selección de tratamientos de los métodos de extracción.....	151
6.11	Actividad antioxidante de HA obtenidos de los métodos MT y UAI.....	153
6.11.1	Capacidad de eliminación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	154
6.11.2	Poder reductor de los iones férricos (FRAP).....	167
6.11.3	Poder de quelación de iones ferrosos (FIC).....	173

6.11.4	Actividad inhibidora del blanqueamiento del $\beta$ -caroteno (BCB) .....	178
6.12	Evaluación de la citotoxicidad de HA .....	186
6.13	Microscopía SEM-FEG de HA.....	200
6.14	Optimización y análisis estadístico de las formulaciones de sistemas transdérmicos con base en microagujas poliméricas de HA cargadas con antihipertensivos	207
6.15	Incorporación de los tratamientos obtenidos de HA para la elaboración de microagujas y análisis de variables de respuesta en cada antihipertensivo .....	220
6.15.1	Evaluación de parámetros evaluados de los sistemas transdérmicos (arreglos de microagujas poliméricas) con las formulaciones optimizadas .....	223
7	CONCLUSIONES.....	240
8	BIBLIOGRAFÍA .....	243
9	ANEXOS .....	263

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Descubrimiento del ácido hialurónico. Tomado y modificado de: Cortes-Sánchez et al. (2017).	7
<b>Figura 2.</b> Estructura química del disacárido de ácido hialurónico. Tomado de: Scott and Heatley (1999).	11
<b>Figura 3.</b> Estructuras básicas de glicosaminoglicanos. Tomada de: Kakehi, Kinoshita, and Yasueda (2003).	13
<b>Figura 4.</b> Esquema de un corte transversal de la piel. Donde los componentes de importancia son: epidermis, dermis e hipodermis. Tomado y modificado de: Callejas-Quijada et al. (2023).	32
<b>Figura 5.</b> Esquema de generaciones de administración transdérmica de fármacos. Tomado y modificado de: Ahmed Saeed Al-Japairai, Mahmood, and Hamed Almurisi (2020).	33
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de administración de fármacos de los 5 tipos de microagujas sólidas, recubiertas, huecas, disolventes y formadoras de hidrogel. Tomado de: Ahmed Saeed Al-Japairai et al. (2020).	36
<b>Figura 7.</b> a) Histocassettes empleados para la deshidratación de los tejidos y b) Procesador de tejidos tipo carrusel MICROM/STP-120-1.	47
<b>Figura 8.</b> a) Bloques de parafina solidificados y b) Moldes “L” de metal para solidificar parafina.	47
<b>Figura 9.</b> Micrótopo Marca Leica.	48
<b>Figura 10.</b> a) Baño de flotación de tejidos Premiere, Mod. XH-1001 y b) Fijación de muestra a 60 °C.	49

<b>Figura 11.</b> Secuencia de tinción. Tomado y modificado de: Prophet et al. (1995)....	50
<b>Figura 12.</b> Microscopio (Olympus™, Mod. BX-41, Waltham, MA). Cámara (Evolution VF™, Media Cybernetics, Rockville, MD). Software Image Pro® Express v.6.0 (Media Cybernetics). .....	53
<b>Figura 13.</b> Plano Tridimensional del Modelo de Color CIE L *A *B. Tomado de: Delgado, Herrera-Guillén, Medina Barragan, and Corredor–Gómez (2017). .....	62
<b>Figura 14.</b> Colorímetro MINOLTA CM-2002 SPECTROPHOTOMETER.....	63
<b>Figura 15.</b> Monitoreo de pH para los extractos de los tratamientos, se realizó utilizando un potenciómetro Oakton 550 con sonda.....	64
<b>Figura 16.</b> NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies) Spectrophotometer V3.8. ....	66
<b>Figura 17.</b> Espectrofotómetro, Mod Cary 8454. UV-VIS Diode Array System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). .....	67
<b>Figura 18.</b> Espectrómetro FT-IR Frontier SP8000 (Perkin Elmer). Controlado por el software Spectrum 10.4.2 (Perkin Elmer Ltd, Bucks, Reino Unido). .....	68
<b>Figura 19.</b> Equipo empleado para hacer microscopía QUANTA FEG 450. ....	77
<b>Figura 20.</b> Plan de trabajo para el desarrollo del sistema transdérmico basado en un arreglo de microagujas poliméricas de HA. ....	78
<b>Figura 21.</b> Soluciones preparadas de Polyvinilalcohol (PVA), polivinilpirrolidona (PVP) y ácido hialurónico (HA). .....	79
<b>Figura 22.</b> Soluciones preparadas de PVA, PVP y HA.....	82
<b>Figura 23.</b> Elaboración de sistemas transdérmicos: a) Equipo de vacío y b) Secado de los arreglos de microagujas en condiciones ambientales. ....	82
<b>Figura 24.</b> Equipo (Brookfield modelo CT3 Texture analyzer, USA con TexturePro CT Software) para pruebas mecánicas.....	84

<b>Figura 25.</b> Equipo (Brookfield modelo CT3 Texture analyzer, USA con TexturePro CT Software) empleado para pruebas tensión a la fractura. ....	85
<b>Figura 26.</b> Sistema adaptador multisonda (C+K Electronic MPA 2, TM 300, Courage + Khazaka electronic GmbH, Köln, Alemania).....	87
<b>Figura 27.</b> Gallo doméstico de 28 semanas. Cresta. Corte transversal.....	92
<b>Figura 28.</b> Gallo doméstico de 6 sem. Cresta. Corte transversal. Tinción: HE.....	92
<b>Figura 29.</b> Gallo doméstico de 28 sem. Cresta. Corte transversal. Tinción: Tricrómica de Masson.....	93
<b>Figura 30.</b> Gallo doméstico de 6 sem (c-d) y Gallo doméstico de 28 sem (e). Cresta. Corte transversal. Tinción: Tricrómica de Masson. ....	94
<b>Figura 31.</b> Gallo doméstico, 28 sem (a-c). Tejido conectivo mucoide. Gallo doméstico, 6 sem (d y e). ....	95
<b>Figura 32.</b> Mapa estructural de la cresta. de Gallus gallus domesticus. Tinción con Azul Alcian pH 2.5, 40X.....	96
<b>Figura 33.</b> Diferencias en las morfológicas entre: (a1-a3) cresta de Gallus gallus domesticus de 6 sem y (b1-b3) cresta de Gallus gallus domesticus de 28 sem. ....	99
<b>Figura 34.</b> Reacción de carbazol de la solución madre con ácido hialurónico con ácido acético 0.5 M (AA).....	103
<b>Figura 35.</b> Curva de calibración de la solución madre de ácido hialurónico con solvente ácido acético 0.5 M (AA). ....	103
<b>Figura 36.</b> Curva de calibración de solución de ácido hialurónico con acetato de sodio 5% (A). ....	104
<b>Figura 37.</b> Reacción de carbazol de la solución madre ácido hialurónico con acetato de sodio 5% (A).....	104

**Figura 38.** Reacción de carbazol de los procesos de purificación empleados con A y AA. .... 108

**Figura 39.** Rendimiento de HA extraído con: a) acetato de sodio 5% (A) y b) ácido acético 0.5 M (AA). Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. .... 109

**Figura 40.** FT-IR de los procesos empleados en purificación disueltos en: a) A y b) AA. .... 111

**Figura 41.** Espectro de UV-VIS de los procesos empleados en purificación disueltos en: a) A y b) AA. .... 116

**Figura 42.** Descripción del proceso de purificación seleccionado para los extractos obtenidos con A y AA. .... 119

**Figura 43.** a) Tratamientos de CF con A y AA, b) Tratamientos de CS con A y AA, c) Tratamientos post-purificación. .... 128

**Figura 44.** Comparación del contenido de % HA entre los métodos MT y UAI presente en los tratamientos extraídos con acetato de sodio 5% (A) y ácido acético 0.5 M (AA) respectivamente. Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. .... 144

**Figura 45.** Contenido de % HA presente en MT extraídos con acetato de sodio 5% (A) y ácido acético 0.5 M (AA). Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras diferentes ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. .... 146

**Figura 46.** Contenido de % HA presente en los residuos del UAI extraídos con acetato de sodio 5% (A) y ácido acético 0.5 M (AA), respectivamente. Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. .... 146

**Figura 47.** Comparación del contenido de proteína presente en los tratamientos del método MT de los extractos empleando acetato de sodio 5% (A) y ácido acético 0.5 M (AA) respectivamente. Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. .... 150

**Figura 48.** Tratamientos seleccionados de los métodos de extracción MT y UAI con de ambos solventes (A, AA) con mayor rendimiento provenientes de crestas frescas (CF). ..... 152

**Figura 49.** Capacidad de eliminación de radicales DPPH del control positivo A. asc y estándar de HA (S. equi). ..... 155

**Figura 50.** Poder de reducción del ión férrico (FRAP), expresado en valores de absorbancia monitoreados a 700 nm, del control positivo BHA y estándar S. equi. 168

**Figura 51.** Poder de quelación de iones ferrosos (FIC) del control positivo (EDTA) y S. equi en concentraciones de 25 a 4000  $\mu\text{g/mL}$ . ..... 174

**Figura 52.** Actividad inhibidora del blanqueamiento con  $\beta$ -caroteno (BCB) del control positivo A. asc (ácido ascórbico) y S. equi. en concentraciones de 25 a 4000  $\mu\text{g/mL}$ , incubados durante 7 y 24 h. .... 179

**Figura 53.** Viabilidad celular en un rango de concentración de 0.125-1.0 (g/mL): C1: S. equi y C2: RC evaluados en fibroblastos y queratinocitos. Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. .... 187

**Figura 54.** Viabilidad celular de los tratamientos del método tradicional (MT) extraídos con ácido acético al 0.5 M (AA). Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. .... 190

**Figura 55.** Viabilidad celular de los tratamientos del método de ultrasonido de alta Intensidad (UAI) extraídos con ácido acético al 0.5 M (AA). Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey..... 193

**Figura 56.** Viabilidad celular de los tratamientos del método tradicional (MT) extraídos con acetato de sodio 5% (A). Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. .... 195

**Figura 57.** Viabilidad celular de los tratamientos del método de ultrasonido de alta intensidad (UAI) extraídos con ácido acético al 0.5 M (AA). Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey..... 197

**Figura 58.** Microscopía electrónica de barrido SEM-FEG: a) C1: S. equi, b) C2: RC, c-d) HA comercial: S. equi. Tomado y modificado de: L. O. Alcántara et al. (2023) y e-f) Extracto de Oreochromis niloticus. Tomado y modificado de: L. O. Alcántara et al. (2023)..... 201

**Figura 59.** Microscopía SEM-FEG de controles: **a) C1:** S. equi y **b) C2:** RC. Micrografías de los tratamientos extraídos por método **MT:** **(c)TCF-A4D:** Extracción 4 días, crestas frescas disueltas en **A**, **(d) TCF-A8D:** Extracción 8 días, crestas frescas disueltas en **A**. **(e) TCF-AA4D:** Extracción 4 días, crestas frescas disueltas en **AA**, **(f) TCF-AA8D:** Extracción 8 días, crestas frescas disueltas en **AA**..... 203

**Figura 60.** Micrografías de los tratamientos extraídos con método **UAI:** **a) UCF-AA30:** Extracción 30 min, crestas frescas disueltas en **AA**, **b) UCF-AA60:** Extracción 60 min, crestas frescas disueltas en **AA**, **c) UCF-AA120:** Extracción 120 min, crestas frescas

disueltas en **AA**, **d) UCF-A30**: Extracción 30 min, crestas frescas disueltas en **A**, **e) UCF-A60**: Extracción 60 min, crestas frescas disueltas en **A**, **f) UCF-A120**: Extracción 120 min, crestas frescas disueltas en **A**..... 206

**Figura 61.** Diagrama de Pareto. Losartán. Regresión de superficie de respuesta de: **a)** pH, **b)** Bioadhesión y **c)** Bioadhesión poshumectación. .... 211

**Figura 62.** Diagrama de Pareto. Captopril. Regresión de superficie de respuesta de: **a)** pH, **b)** Mexámetro, **c)** Bioadhesión poshumectación y **d)** Ruptura..... 214

**Figura 63.** Diagrama de Pareto. Telmisartán. **a)** Tewámetro, **b)** Mexámetro y **c)** Ruptura. .... 216

**Figura 64.** Diagrama de Pareto. Amlodipino. Regresión de superficie de respuesta de: **a)** pH y **b)** Ruptura..... 219

**Figura 65.** a) Parches de microagujas elaborados con las fórmulas optimizadas de los controles de HA, C1: S. equi (superior) y C2: rooster comb comercial con antihipertensivos (CAPTO, AMLO, TELMI y LOSAR). b) Acercamiento de la estructura de parche microagujas. .... 239

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Antecedentes sobre la extracción de HA por método tradicional y tecnologías emergentes. ....	1
<b>Tabla 2.</b> Concentración de ácido hialurónico y peso molecular de tejidos y fluidos corporales. Tomado y modificado de: Xu et al. (2021). ....	9
<b>Tabla 3.</b> Fuentes y métodos de extracción de ácido hialurónico (HA). Tomado y modificado: Callejas-Quijada et al. (2023). ....	21
<b>Tabla 4.</b> Productos y aplicaciones del HA en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Tomado y modificado de: Callejas-Quijada, Escobar-Chavez, Campos-Lozada, Pérez-Marroquín, and Aguirre-Álvarez (2023). ....	27
<b>Tabla 5.</b> Productos y aplicaciones del HA en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Tomado y modificado de: Callejas-Quijada et al. (2023). ....	29
<b>Tabla 6.</b> Coloración de la tinción HE. Tomado de: Prophet et al. (1995). ....	50
<b>Tabla 7.</b> Interpretación de Tricrómica de Masson. Tomado de: Prophet et al. (1995). ....	51
<b>Tabla 8.</b> Interpretación de Azul de Alcian pH 2.5. Tomado de: Prophet et al. (1995). ....	52
<b>Tabla 9.</b> Actividad antioxidante evaluada en tratamientos seleccionados de MT y UAI. ....	72
<b>Tabla 10.</b> Diseño experimental de las formulaciones según cada antihipertensivo (LOSAR, CAPTO, TELMI, AMLO). ....	80
<b>Tabla 11.</b> Análisis proximal de las crestas de Gallus gallus domesticus. ....	101
<b>Tabla 12.</b> Procesos de mejora para el proceso de purificación. ....	107

<b>Tabla 13.</b> Diferencia de color entre tratamientos crudos y purificados del método MT en AA. ....	122
<b>Tabla 14.</b> Diferencia de color entre tratamientos crudos y purificados del método MT en A.....	123
<b>Tabla 15.</b> Método UAI: Diferencia de color entre los tratamientos crudos y purificados extraídos con AA. ....	126
<b>Tabla 16.</b> Método UAI: Diferencia de color entre los tratamientos crudos y purificados extraídos con A. ....	128
<b>Tabla 17.</b> Determinación de pH de extractos crudos y purificados disueltos A y AA. ....	130
<b>Tabla 18.</b> Determinación de pH de los extractos crudos y los obtenidos después del proceso de purificación disueltos en A y AA.....	131
<b>Tabla 19.</b> Tratamientos seleccionados de los métodos de extracción MT y UAI de crestas frescas (CF). ....	151
<b>Tabla 20.</b> Capacidad de eliminación de radicales DPPH del control positivo A. asc. y estándar S. equi. en concentraciones de 25-4000 µg/mL y la concentración efectiva (CE <sub>50</sub> ). ....	155
<b>Tabla 21.</b> Capacidad de eliminación de radicales DPPH de los métodos (MT, UAI) disueltos en AA de HA en concentraciones de 25 a 4000 µg/mL y la concentración efectiva (CE <sub>50</sub> ). ....	160
<b>Tabla 22.</b> Capacidad de eliminación de radicales DPPH de los métodos (MT, UAI) disueltos en A de HA en concentraciones de 25 a 4000 µg/mL y la concentración efectiva (CE <sub>50</sub> ). ....	162

**Tabla 23.** Poder reductor del ión férrico (FRAP) del control positivo BHA y S. equi en las concentraciones de 25 a 4000 µg/mL..... 168

**Tabla 24.** Poder reductor del ión férrico (FRAP) de los métodos (MT y UAI) en concentraciones de 25 a 4000 µg/mL. .... 169

**Tabla 25.** Poder reductor del ión férrico (FRAP) de los métodos (MT y UAI) de las muestras de HA de 25 a 4000 µg/mL, expresado en valores de absorbancia monitoreados a 700 nm..... 171

**Tabla 26.** Poder de quelación de iones ferrosos (FIC) del control positivo (EDTA) y S. equi en concentraciones de 25 a 4000 µg/mL..... 173

**Tabla 27.** Poder de quelación de iones ferrosos (FIC) de los métodos (MT y UAI) de HA de 25 a 4000 µg/mL y la concentración efectiva (CE<sub>50</sub>). .... 175

**Tabla 28.** Poder de quelación de iones ferrosos (FIC) de los métodos (MT y UAI) de HA de 25 a 4000 µg/mL y la concentración efectiva (CE<sub>50</sub>). .... 177

**Tabla 29.** Actividad inhibidora del blanqueamiento con BCB del control positivo A. asc. y S. equi a concentraciones de 25 a 4000 µg/mL, incubados durante 7 y 24 h. .... 179

**Tabla 30.** Actividad inhibidora del blanqueamiento con BCB de los métodos (MT y UAI) de las muestras de HA de 25 a 4000 µg/mL durante un período de 7 h y la concentración efectiva (CE<sub>50</sub>)..... 181

**Tabla 31.** Actividad inhibidora del blanqueamiento de BCB de los métodos (MT y UAI) de las muestras de HA de 25 a 4000 µg/mL de 24 h y la concentración efectiva (CE<sub>50</sub>). .... 181

**Tabla 32.** Actividad inhibidora del blanqueamiento (BCB) de los métodos (MT y UAI) de 25 a 4000 µg/mL de 7 h. .... 183

<b>Tabla 33.</b> Actividad inhibidora del blanqueamiento (BCB) de los métodos (MT y UAI) de 25 a 4000 µg/mL de 24 h. ....	183
<b>Tabla 34.</b> Diseño experimental de las formulaciones según cada antihipertensivo.	208
<b>Tabla 35.</b> Tratamientos seleccionados de HA de los métodos MT y UAI. ....	221
<b>Tabla 36.</b> Fórmulas óptimas para la elaboración de parches de cada antihipertensivo. ....	221
<b>Tabla 37.</b> Captopril: microagujas de la fórmula optimizada en tratamientos de HA.	234
<b>Tabla 38.</b> Amlodipino: microagujas de la fórmula optimizada en tratamientos de HA. ....	235
<b>Tabla 39.</b> Losartán: microagujas de la fórmula optimizada en tratamientos de HA.	236
<b>Tabla 40.</b> Telmisartán: microagujas de la fórmula optimizada en tratamientos de HA. ....	237

GLOSARIO

ABREVIATURA	SIGNIFICADO	ABREVIATURA	SIGNIFICADO
<b>A</b>	Solución de acetato de sodio 5%	<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>AA</b>	Solución de ácido acético 0.5 M	<b>E</b>	Epidermis
<b>Abs</b>	Absorbancia	<b>FIC</b>	Actividad quelante de los iones ferrosos
<b>A</b>	Amlodipino	<b>CE<sub>50</sub></b>	concentración efectiva
<b>B</b>	Bioadhesión	<b>ECA</b>	enzima convertidora de la angiotensina
<b>BP</b>	Bioadhesión Post-Humectación	<b>FRAP</b>	Poder Antioxidante Reductor Férrico
<b>CF</b>	Crestas frescas	<b>BCB</b>	Inhibición del blanqueamiento del betacaroteno
<b>CS</b>	Crestas secas	<b>FT-IR</b>	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
<b>MT</b>	Extracción por Método tradicional	<b>UV-VIS</b>	Espectrofotometría ultravioleta-visible
<b>UAI</b>	Extracción asistida por método ultrasonido de alta intensidad	<b>MTT</b>	Ensayo colorimétrico que mide la viabilidad, la proliferación y la citotoxicidad celular
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina	<b>H</b>	Hipodermis
<b>HA</b>	Ácido Hialurónico	<b>TA</b>	Tejido Adiposo
<b>HAS</b>	Hialuronidasas	<b>vs</b>	Vaso sanguíneo
<b>NaOAc</b>	Acetato de sodio	<b>TCF-A4D</b>	Tradicional, 4 días, crestas frescas, acetato de sodio 5%
<b>CPC</b>	Cloruro de cetilpiridinio	<b>TCF-A8D</b>	Tradicional, 8 días, crestas frescas, acetato de sodio 5%
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio	<b>TCS-A4D</b>	Tradicional, 4 días, crestas secas, acetato de sodio 5%
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio	<b>TCS-A8D</b>	Tradicional, 8 días, crestas secas, acetato de sodio 5%
<b>EDTA</b>	Tetraacetato de etilendiamina	<b>GAG</b>	glicosaminoglicanos
<b>mA</b>	milliampere	<b>Á. asc</b>	ácido ascórbico

ABREVIATURA	SIGNIFICADO	ABREVIATURA	SIGNIFICADO
<b>Q</b>	Queratina		
<b>D</b>	Dermis		
<b>Da</b>	Dalton	<b>TCF-AA4D</b>	Tradicional, 4 días, crestas frescas, ácido acético 0.5 M
<b>kDa</b>	kilodalton	<b>TCF-AA8D</b>	Tradicional, 8 días, crestas frescas, ácido acético 0.5 M
<b>TCCDI</b>	Tejido conectivo colágeno denso irregular	<b>TCS-AA4D</b>	Tradicional, 4 días, crestas secas, ácido acético 0.5 M
<b>TCM</b>	Tejido conectivo mucoide	<b>TCS-AA8D</b>	Tradicional, 8 días, crestas secas, ácido acético 0.5 M
<b>TCCL</b>	Tejido conectivo colágeno laxo	<b>LMw</b>	Bajo peso molecular
<b>TM</b>	Tejido mesenquimatoso	<b>HMw</b>	Alto peso molecular
<b>nm</b>	nanómetros	<b>UCF-A30</b>	Ultrasonido, 30 min, crestas frescas, acetato de sodio 5%
<b>UCS-A120</b>	Ultrasonido, 120 min, crestas secas, acetato de sodio 5%.	<b>UCF-A60</b>	Ultrasonido, 60 min, crestas frescas, acetato de sodio 5%
<b>UCF-AA30</b>	Ultrasonido, 30 min, crestas frescas, ácido acético 0.5 M.	<b>UCF-A120</b>	Ultrasonido, 120 min, crestas frescas, acetato de sodio 5%
<b>UCF-AA60</b>	Ultrasonido, 60 min, crestas frescas, ácido acético 0.5 M.	<b>UCS-A30</b>	Ultrasonido, 30 min, crestas secas, acetato de sodio 5%
<b>UCF-AA120</b>	Ultrasonido, 120 min, crestas frescas, ácido acético 0.5 M	<b>UCS-A60</b>	Ultrasonido, 60 min, crestas secas, acetato de sodio 5%
<b>UCF-AA30</b>	Ultrasonido, 30 min, crestas secas, ácido acético 0.5 M	<b>L929</b>	fibroblastos de ratón
<b>UCF-AA60</b>	Ultrasonido, 60 min, crestas secas, ácido acético 0.5 M	<b>HaCat</b>	Queratinocitos humanos
<b>UCF-AA120</b>	Ultrasonido, 120 min, crestas secas, ácido acético 0.5 M	<b>gf</b>	Gramo-fuerza
		<b>DE</b>	Desviación estándar

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>	<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
<b>PVA</b>	Acetato de polivinilo	<b>S. equi</b>	<i>Streptococcus equi</i>
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona	<b>SEM-FEG</b>	Microscopio electrónico de barrido con cañón de emisión de campo
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno	<b>LMw</b>	Bajo peso molecular
<b>P1</b>	Proceso 1	<b>HMw</b>	Alto peso molecular
<b>P1S</b>	Proceso 1, Sobrenadante	$\Delta E$	Diferencia de color
<b>P2</b>	Proceso 2	<b>TELMi</b>	Telmisartán
<b>P2S</b>	Proceso 2, Sobrenadante	<b>LOSAR</b>	Losartán
<b>P3</b>	Proceso 3	<b>CAPTO</b>	Captopril
<b>P3S</b>	Proceso 3, Sobrenadante	<b>AMLO</b>	Amlodipino
<b>P4</b>	Proceso 4	<b>TEWL</b>	Pérdida de agua transepidermica
<b>P4S</b>	Proceso 4, sobrenadante	<b>M</b>	Mexámetro
<b>P5</b>	Proceso 5	<b>BP</b>	Bioadhesión post-humectación
<b>P5S</b>	Proceso 5, Sobrenadante	<b>B</b>	Bioadhesión
		<b>R</b>	Ruptura

## 1 INTRODUCCIÓN

El ácido hialurónico es un polímero lineal de la clasificación de los no sulfatados y éste se encuentra conformado a partir de unidades de disacáridos que unen a N-acetilglucosamina y ácido glucurónico (Kang, Kim, Heo, Park, & Lee, 2010). Al ser un polisacárido de cadena larga, se encuentra en todos los mamíferos, por tanto, está presente en tejido conectivo laxo, piel, ojos y líquido sinovial (secretado continuamente por la membrana sinovial hacia el espacio articular), por tanto, actúa básicamente como lubricante y amortiguador (Da Rosa, Tovar, & Mourão, 2012; Kulkarni, Patil, & Chavan, 2018).

De acuerdo con cifras preliminares del SIAP-SADER, la producción de carne de ave durante 2020, alcanzó 3.58 millones de toneladas, representado un 48.2% del volumen total de la producción de carne. Sólo el 70% de la canal es aprovechada después del sacrificio pues existen subproductos (cabeza, crestas, patas) de piezas que no son consumidas (Rodríguez-Saldaña, 2011). La mayoría de los residuos de la industria avícola son procesados y destinados para la elaboración de harinas para elaboración de alimentos para animales, mientras que a nivel local las menudencias (patas y cabezas) son destinadas solo para la alimentación animal.

Hoy día, el ácido hialurónico se ha obtenido de fuentes convencionales como: producción *in vitro*, bacteriano y tejidos animales. En este caso, la producción bacteriana representa altos costos para su producción, mientras que la ventaja de obtener ácido hialurónico de tejidos animales (bovinos, vacunos y aves) implica una alta disponibilidad de materia prima. Por este motivo, es importante identificar otro tipo de fuentes alternativas que permitan satisfacer la demanda de este polisacárido. Las

crestas de pollo son ricas en ácido hialurónico y al ser parte de los restos, se descarta junto con la cabeza (Da Rosa et al., 2012).

De manera tradicional en los métodos convencionales para obtener ácido hialurónico, se realizan con un exceso de solventes que involucran largos períodos de extracción. Hoy la demanda de este polímero es alta porque es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica, industria cosmética, alimentaria y recientemente en desarrollos biotecnológicos (nanoportadores, andamios, etc.).

El objetivo de este proyecto de investigación fue desarrollar un proceso de extracción y caracterización de ácido hialurónico a partir de crestas de *Gallus gallus domesticus* mediante la aplicación de ultrasonido de alta intensidad para contribuir en la implementación de tecnologías emergentes como alternativa de mejora al método tradicional.

### **1.1 Antecedentes**

La extracción de ácido hialurónico de crestas específicas de gallos adultos de estirpes puras de machos con parámetros de crecimiento ya ha sido estudiada previamente.

Algunos estudios previos de sobre extracciones de crestas de gallos se describen brevemente en la Tabla 1. Por ejemplo, Da Rosa, Rotta, and Barreto (2007), trabajaron en la purificación y caracterización del ácido hialurónico de crestas de pollo con crestas mediante extracción químico-enzimática. Kulkarni et al. (2018), llevaron a cabo la extracción, purificación y caracterización del ácido hialurónico de crestas de gallo (machos) y después de un desengrasado previo de 10 días con cambios cada 24 h y la extracción la realizaron con acetato de sodio. Srisantisaeng, Garnjanagoonchorn, and Thanachasai (2013), trabajaron en la actividad proteolítica de intestino y páncreas

de pollo para la extraer también ácido hialurónico de crestas de gallo (machos) y sus vísceras (intestino, páncreas) de la raza Arbor Acres.

Los procesos de extracción observados en la Tabla 1, implican períodos largos de extracción (tiempo), consumo de energía, poco prácticos, así como el uso excesivo de los solventes específicos y altamente contaminantes que podrían implicar costos elevados a escala. Algunos trabajos han empleado UAI para procesos degradación, pero no para la extracción directa (S. Chen, Chen, & Gao, 2015; Hafsa et al., 2017) y otros estudios han comenzado a incursionar en la extracción de colágeno II del cartílago esternal de pollo y colágeno II de ovinos (A., 2016; Akram & Zhang, 2020). Por este motivo, el uso de tecnologías emergentes como ultrasonido de alta intensidad (UAI) se planteó como propuesta para la extracción de ácido hialurónico en las crestas de *Gallus gallus domesticus*.

**Tabla 1.** Antecedentes sobre la extracción de HA por método tradicional y tecnologías emergentes.

Autor	Trabajos	Materia Prima	Resultados
Da Rosa et al. (2007)	Purificación y caracterización del ácido hialurónico de crestas de pollo	Crestas 50:50 Edad: 48 días	~ 16% peso seco Concentración: 14.9 µg ácido hexurónico/mg Viscosidad: 1190.6mL/g
Kulkarni et al. (2018)	Extracción, purificación y caracterización del ácido hialurónico de la cresta de gallo	Crestas de gallo (machos)	Rendimiento (8.35 g) Prueba cualitativa: Azul Toluidina Viscosidad: 2.55 poise Espectroscopia absorción UV: 191.4 nm
Srisantisaeng et al. (2013)	Actividad proteolítica de intestino y páncreas de pollo: extracción, caracterización parcial y aplicación para la separación del ácido hialurónico de la cresta de pollo	Crestas de gallo (machos) Vísceras (intestino, páncreas) • Raza: Arbor Acres • Edad: 5-6 sem • Peso: 2.4-2.6 kg	Extracción enzimática: Comercial: 4.65-4.93 µg ácido urónico mg <sup>-1</sup> Proteolítica: 4.65-4.93 µg ácido urónico mg <sup>-1</sup>
Pérez-Gumeta et al. (2018)	Optimización del método de extracción de ácido hialurónico del humor vítreo de <i>Oreochromis niloticus</i>	Humor vítreo de <i>Oreochromis niloticus</i>	Extracción: • Enzimática 8x10 <sup>-3</sup> % • Química 2.2 x10 <sup>-3</sup> % Espectroscopia UV-VIS (190-1100 nm): 213 nm, 237 nm y 257 nm, 205 nm
Hafsa et al. (2017)	Efecto de la degradación ultrasónica del ácido hialurónico	Crestas de gallo	

	extraído de crestas de gallo sobre las actividades antioxidantes y antiglicantes		Nativo y Bajo peso molecular Peso Molecular: 1090–181 kDa
Chen et al. (2015)	Degradación del ácido hialurónico derivado de los globos oculares de tilapia mediante un método de microondas, peróxido de hidrógeno y ácido ascórbico	Globos oculares de tilapia	Irradiación con microondas Contenido de ácido glucurónico 34.96% Rendimiento 77.43%
Akram & Zhang (2020)	Extracción de colágeno II con pepsina y tratamiento con ultrasonido del cartílago esternal de pollo; propiedades fisicoquímicas y funcionales	Cartílago de pollo	Extracción con ultrasonido y convencional

---

### 1.2 Justificación

Esta investigación involucra el uso de las tecnologías emergentes como la extracción asistida por ultrasonido, se basa en el principio de cavitación ultrasónica y se logra mediante el acoplamiento de las ondas de ultrasonido de alta frecuencia y baja frecuencia de material por ejemplo, tejidos de animales como crestas de pollos de engorde (*Gallus gallus domesticus*) (Kaewbangkerd, Hamzeh, & Yongsawatdigul, 2023). El acoplamiento, se logra mediante un procesador ultrasónico que genera ondas de alta energía viajando a través del líquido creando ciclos alternos de altas y bajas presiones. La ventaja principal es mejorar la eficiencia en el proceso de extracción, reducir los tiempos de extracción, alto nivel de automatización y menor consumo disolventes por lo que se tiene como principal ventaja amigables con el medio ambiente en comparación con los métodos tradicionales. Según la literatura, el peso promedio una canal es de 2 kg aproximadamente (Quintana-López, 2011), la cabeza representa el 2.5% (equivalente a 50 gr) (Cervantes-López, 2007), de esta manera, por cada gramo de crestas en tejido se obtienen hasta 7.5 mg (Selyanin, Boykov, Khabarov, & Polyak, 2015), se estima que para obtener 7.5 g se requieren 1 kg de crestas. Actualmente, como referencia el costo del ácido hialurónico el mercado varía según la fuente tan solo 1 g tiene un costo por encima de los \$10,000.

En este proyecto de investigación, se trabajó en una solución para el aprovechamiento de las crestas de *Gallus gallus domesticus*, mediante el desarrollo de un protocolo de extracción y caracterización de ácido hialurónico utilizando ultrasonido de alta intensidad (UAI) para encontrar las condiciones óptimas de rendimiento.

### 1.3 Planteamiento del problema

En la industria avícola se generan producciones a nivel nacional de pollos ascendiendo a 1800 millones de cabezas en México (FIRA, 2021) y nivel estatal de 36,845,007 (SIAP, 2020). Básicamente su procesamiento inicia cuando *Gallus gallus domesticus* mejor conocidos como pollos de engorda (provenientes de estirpes o líneas genéticas generadas mediante un mestizaje) han alcanzado el crecimiento idóneo para el sacrificio. Se obtienen dos productos importantes: la canal que es comercializada en fresco (negocios locales, centrales de abasto) y las mermas (incluyendo las cabezas) en el cual su procesamiento consiste en aplicar un tratamiento térmico para la elaboración de piensos destinados para alimentación animal. En las zonas rurales, el pollo se comercializa vivo donde los mayoristas realizan el proceso de matanza, dejando las cabezas (y otros residuos) para la alimentación porcina o canina.

Pocos estudios, han utilizado las crestas de estos pollos de engorda (*Gallus gallus domesticus*) como materia prima para la extracción de polímeros de interés, los pollos no superan las 6 semanas de crecimiento y las crestas al ser pequeñas son desechadas directamente. La disponibilidad de esta materia prima es alta, ya que, al existir un consumo de carne de pollo exacerbado, éste será proporcional a las mermas (las crestas) generadas después del proceso de matanza.

Dicho lo anterior, otro problema existente es que los métodos de extracción tradicionales existentes para la obtención de ácido hialurónico implican largos procesos de extracción y el uso excesivo de disolventes, por lo que existe la necesidad

## **Planteamiento del problema**

---

de desarrollar un proceso de extracción eficiente mediante la aplicación de tecnologías emergentes y amigables con el medio ambiente. Tecnologías emergentes como el ultrasonido de alta intensidad, representa una propuesta de mejora en la extracción de ácido hialurónico para el aprovechamiento de las crestas de *Gallus gallus domesticus* como mermas de la industria avícola.

En este proyecto de investigación, se pretende aprovechar las crestas de *Gallus gallus domesticus* para la extracción de ácido hialurónico mediante el método de ultrasonido de alta intensidad.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades del ácido hialurónico

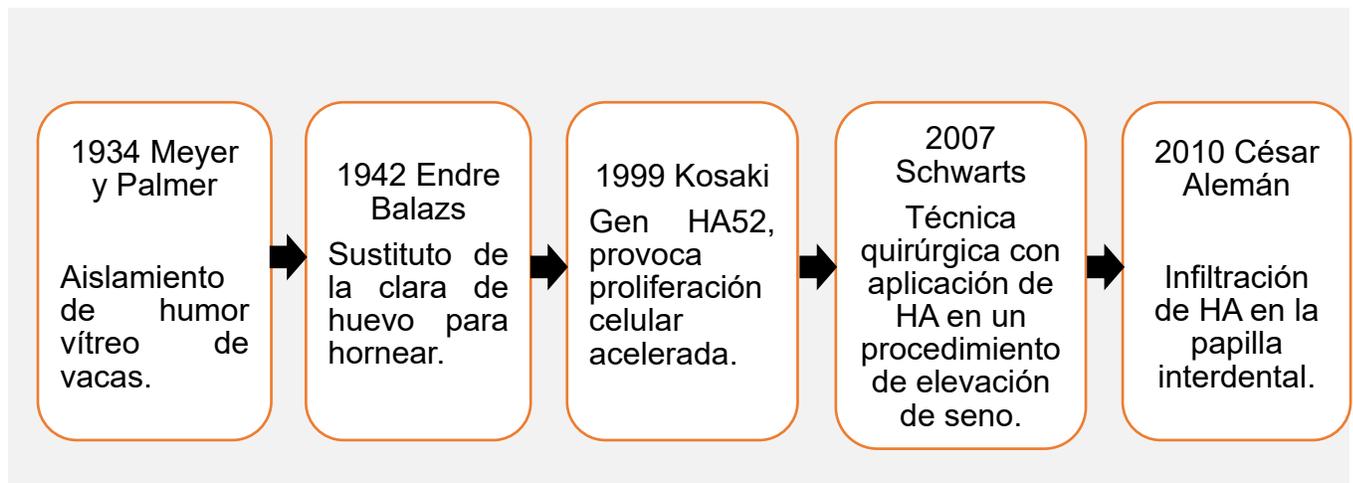
#### 2.1.1 Historia

Dentro del contexto de antecedentes sobre el ácido hialurónico es que fue descubierto en 1934 y el término "ácido hialurónico" fue creado por Karl Meyer y su asistente John Palmer donde lo aislaron el ácido hialurónico (HA) del humor vítreo de ojos de vaca, una sustancia química desconocida hasta ese entonces por ellos.

Posteriormente, ellos lo llamaron hialoide (que significa *vítreo*) declarando que esta sustancia contenía dos residuos de azúcar y un ácido urónico (Xu, Torres, & Hakim, 2021).

En hallazgos históricos, los investigadores afirmaron que era un componente universal del espacio extracelular y que sus múltiples propiedades permitían la constitución de una matriz que apoyaría el funcionamiento normal de células y tejidos (Xu et al., 2021). Endre Alexander Balazs, lo empleó para sustituir la clara de huevo en procesos de horneado para realizar la mayor parte de los descubrimientos sobre el polisacárido en los últimos 50 años (Corte-Sánchez, Yáñez-Ocampo, & Esquivel-Chirino, 2017).

La Fig. 1, indica el proceso sobre la línea de tiempo del descubrimiento de HA y las primeras aplicaciones en los años posteriores. En un inicio, se utilizó ácido hialurónico como sustituto de la clara de huevo, después se utilizó como promotor de la migración celular en diferentes campos de la medicina (Corte-Sánchez et al., 2017).



**Figura 1.** Descubrimiento del ácido hialurónico. Tomado y modificado de: Corte-Sánchez et al. (2017).

## 2.2 Composición de la membrana extracelular

Se ha demostrado que la membrana extracelular se compone principalmente de proteínas, glicosaminoglicanos (GAG), que son polisacáridos que se unen a una estructura proteica para formar proteoglicanos. La membrana extracelular es insoluble, lo que se debe principalmente a proteínas extracelulares de membranas altamente reticuladas como el colágeno, y por tanto es una fuente estable de moléculas de señalización celular. A pesar de la variación en la composición entre las membranas extracelulares de diferentes tejidos, todas están compuestas por proteínas, glucoproteínas y proteoglicanos. La proteína fibrosa más abundante, es el colágeno y comprende <30% de la masa proteica corporal total (Xu et al., 2021).

### **2.2.1 Distribución del ácido hialurónico en tejidos y fluidos**

El ácido hialurónico se encuentra distribuido en la membrana extracelular de varios tipos de tejido y es importante para procesos biológicos y funciones de los tejidos. Por ejemplo, el peso molecular en el cuerpo humano oscila de entre 10 y 8000 kDa, mientras que otros GAG suelen ser entre 15 y 20 kDa. Los diferentes pesos moleculares le confieren diversas funciones biológicas y biomecánicas. El término “hialuronano” se introdujo para ajustarse a la nomenclatura internacional de polisacáridos.

El polianión sin su catión correspondiente se denomina “hialuronato” y en condiciones fisiológicas, el ácido hialurónico se presenta en forma de sal. El recambio de ácido hialurónico en los tejidos de los vertebrados en promedio es de 5 g por día, es proporcionado por biosíntesis y degradación enzimática. Mientras tanto, el recambio de ácido hialurónico en el flujo sanguíneo alcanza los 30-100 mg por día. Se encuentran altas concentraciones en el cordón umbilical, el líquido sinovial entre articulaciones, piel y cuerpo vítreo del ojo (Xu et al., 2021). Está presente en todos los tejidos humanos con la mayor concentración de HA que se encuentra en los tejidos conectivos.

En la Tabla 2, se muestra un resumen de las distribuciones de concentración y el peso molecular promedio de en varios tejidos humanos sanos. Estudios han revelado que el cuerpo de una persona de 70 kg y alrededor de 15 g de hialuronano en diferentes tejidos donde una tercera parte se revuelve todos los días. La piel humana contiene más del 50% de hialuronano en el cuerpo (Kogan, Soltes, Stern, & Gemeiner, 2007; Xu, Jha, & Harrington, 2012).

**Tabla 2.** Concentración de ácido hialurónico y peso molecular de tejidos y fluidos corporales. Tomado y modificado de: Xu et al. (2021).

Tejido	Concentración	Peso Molecular
Piel (total)	440-520 $\mu\text{g/g}$ peso húmedo en la dermis	2000-5000 kDa
Líquido sinovial	40-3800 $\mu\text{g/mL}$	Mayoría 6000-7000 kDa
Cuerpo vítreo del ojo	8-400 $\mu\text{g/mL}$	2000-4000 kDa
Cordón umbilical	20,000 $\mu\text{g/g}$	1100 kDa, 700 kDa durante funisitis aguda (inflamación del cordón umbilical) y 520 kDa en funisitis necrosante
Líquido amniótico	20 $\mu\text{g/mL}$ (16-20 semanas de embarazo), 1 $\mu\text{g/mL}$ en la 30 <sup>va</sup> semana hasta el final del embarazo	330 kDa (16 <sup>va</sup> semana de embarazo), mezcla de >1000 kDa y <100 kDa (en la semana 40)
Humor acuoso	1.1 $\mu\text{g/mL}$	1000-5300 kDa
Fluido linfático	0.1-18 $\mu\text{g/mL}$	1400 kDa
Leche humana	0.8 $\mu\text{g/mL}$ (inmediatamente postparto), 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (60 días después del nacimiento)	440 kDa
Plasma sanguíneo	0.06-0.7 $\mu\text{g/mL}$	140-270 kDa

Las concentraciones de tejido se informan en unidades de  $\mu\text{g HA/g}$  de peso húmedo del tejido, y las concentraciones de líquido se informan en unidades de  $\mu\text{g HA/mL}$  del líquido de interés.

### 2.2.2 Funciones del ácido hialurónico según su peso molecular

Las aplicaciones de HA y bioactividad dependen bastante del peso molecular pues es complicado obtener HA de alto peso molecular por la degradación del ácido hialurónico durante la extracción, purificación, almacenamiento o esterilización (Xu et al., 2021).

Este depende de la fuente de obtención por ejemplo si es de materiales animales tiene un muy alto (hasta 20.000 kDa), el bacteriano tiene un peso molecular entre 1000 y 4000 kDa, la técnica enzimática permite obtener polisacáridos con un rango de peso

molecular entre 550 kDa y 2500 kDa. El líquido sinovial normal humano de 6000-7000 kDa mientras que el líquido reumatoide de 3000-5000 kDa (Fraser, Laurent, & Laurent, 1997).

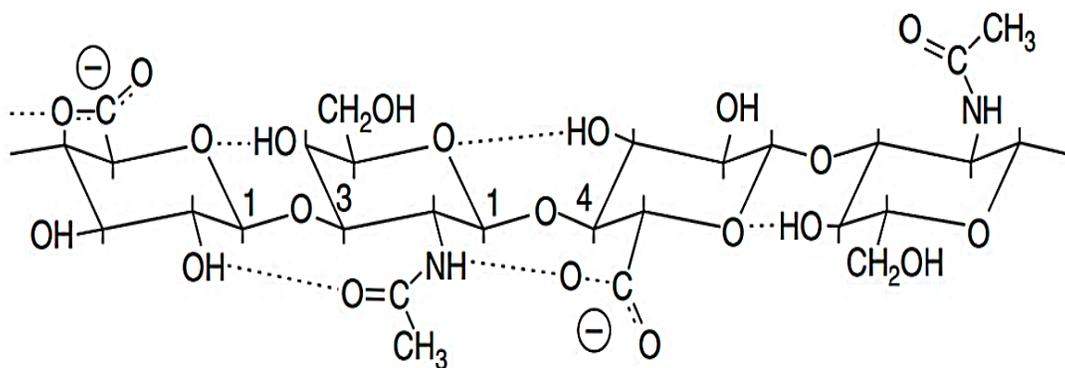
Por ejemplo, los efectos biológicos con pesos moleculares de 0.4-4.0 kDa, actúan como inductor de proteínas de choque térmico y tiene propiedades no apoptóticas. Los polisacáridos con un peso molecular igual a 6-20 kDa poseen actividades inmunoestimuladoras, angiogénicas y flogóticas. Asimismo, con un peso molecular de 20-200 kDa participa en procesos biológicos como: desarrollo embrionario, cicatrización de heridas y ovulación. Por el contrario, el ácido hialurónico de alto peso molecular (>500 kDa), tiene actividad anti-angiogénica y puede funcionar como un relleno del espacio y depresor inmunológico natural (Stern, Asari, & Sugahara, 2006). La preferencia es obtener ácido hialurónico de baja polidispersidad o monodisperso, con ciclos sucesivos de degradación y posterior ensamblaje de cadenas de HA (Snetkov, Zakharova, & Morozkina, 2020).

### **2.2.3 Estructura química y conformación**

El ácido hialurónico (glucosaminoglicano, mucopolisacárido) de alto peso molecular está confirmado por N-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico, éste último está asociado con el amino-azúcar por enlaces  $\beta$ -(1-3) glucosídicos y el amino-azúcar está conectado con el ácido D-glucurónico por un  $\beta$ -(1-4) unión de glucósidos (Selyanin et al., 2015). Esta estructura de la unidad monomérica no depende del peso molecular del ácido hialurónico y sus diferentes grupos funcionales contienen grupos carboxilo, hidroxilo y acetilo permiten modificaciones químicas que pueden alterar las propiedades del material resultante.

Como es sabido, la matriz extracelular (MEC), se compone principalmente de proteínas, GAG los cuales son polisacáridos que se unen a la estructura proteica para formar proteoglicanos. Entonces los proteoglicanos son biomacromoléculas en las que las proteínas se unen covalentemente a los GAG y por este motivo, ofrecen propiedades únicas de amortiguación, hidratación y resistencia a la fuerza a la MEC. HA como GAG, no contiene sulfato ni proteínas centrales unidas covalentemente y particularmente, y se une a los agreganos (proteína grande se encuentra en la matriz del cartílago y se une al ácido hialurónico para formar agregados que ayudan a mantener la hidratación y la estructura del cartílago) de forma no covalente a través de una proteína de enlace. Entonces, la alta viscosidad del HA le confiere resistencia a las fuerzas de compresión y lo hace especialmente importante en los tejidos que soportan cargas (Xu et al., 2021).

La Fig. 2, muestra los enlaces de hidrógeno potenciales que podrían formarse tanto dentro de una macromolécula como entre las moléculas unidas, una molécula acuosa podría ser un puente entre los dos grupos funcionales conectados. Eventualmente, esta estructura primaria y los enlaces de hidrógeno ayudan a formar estructuras secundarias y terciarias (Selyanin et al., 2015).



**Figura 2.** Estructura química del disacárido de ácido hialurónico. Tomado de: Scott and Heatley (1999).

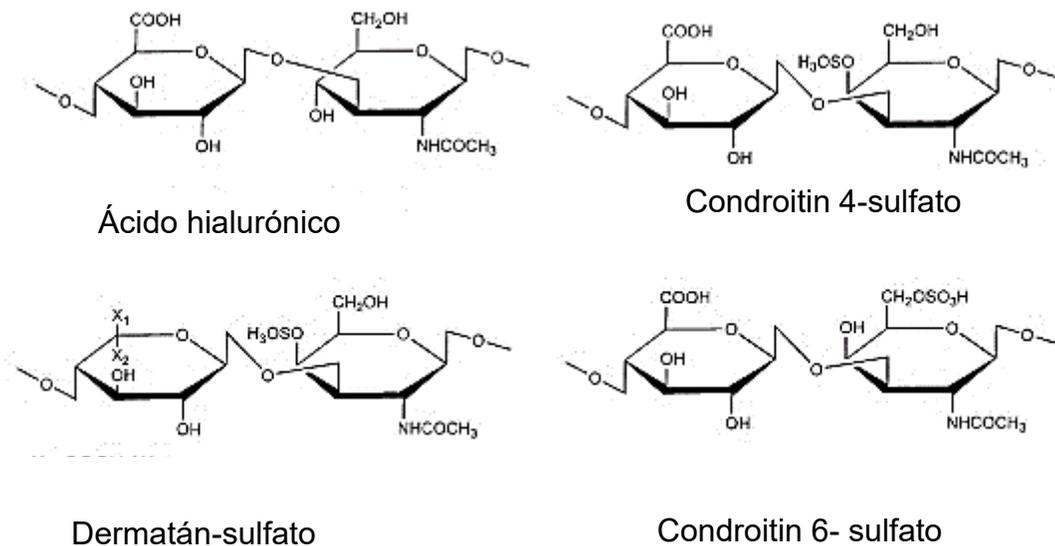
El ácido hialurónico con iones de amonio, magnesio, metales alcalinos los cuales presentan buena solubilidad en agua y poseen un alto nivel de viscosidad incluso a bajas concentraciones de polímero. En solución podría organizar una estructura celular tridimensional de enormes dimensiones a concentraciones inferiores a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por el contrario, los biopolímeros pueden organizar pseudo-geles cuando las concentraciones son iguales o superiores al 1% en peso (Selyanin et al., 2015). Las sales de ácido hialurónico con cationes que poseen dos o más números de valencia tienen una insolubilidad sustancial en agua. Si dichos iones se introducen en soluciones de ácido hialurónico, se forman enlaces cruzados intermoleculares que da como resultado el desarrollo de un gel con gran contenido de agua (Snetkov et al., 2020). A pesar de la simplicidad de la estructura, la evaluación de la conformación de la molécula y su conformación molecular son un desafío. La rigidez natural de la cadena de polisacárido se deriva de las restricciones en la rotación de los enlaces glucosídicos debido a los voluminosos grupos N-acetilo adyacentes a los enlaces glucosídicos. La conformación de la molécula depende del tipo de contracción, pH, temperatura, grado de hidratación y concentración (Xu et al., 2021).

#### **2.2.4 Subproductos del ácido hialurónico**

El ácido hialurónico es de alto peso molecular, pero también puede existir con pequeños fragmentos u oligosacáridos. Los disacáridos que están enlazados a través de 1-3 enlaces, son para formar la cadena del ácido hialurónico y aunque es polímero homogéneo las distribuciones del tamaño molecular son de amplio rango ( $10^5$ - $10^7$ ).

La Fig. 3, muestra la lista de estructuras básicas de algunos glicosaminoglicanos típicos donde la mayoría se sintetizan en el aparato de Golgi dentro de la célula y se

unen a proteínas. Por el contrario, el HA si se sintetiza en la membrana plasmática y no se ha asociado con cualquier proteína central. Los estudios han revelado que se sintetiza en la cara interna de la membrana celular; fuera de la célula, puede formar un complejo con proteínas de unión a hialuronano, como el agregcano o el versicano (Kakehi, Kinoshita, & Yasueda, 2013).



**Figura 3.** Estructuras básicas de glicosaminoglicanos. Tomada de: Kakehi, Kinoshita, and Yasueda (2003).

### 2.2.5 Propiedades reológicas

Las soluciones de ácido hialurónico podrían caracterizarse como líquidos no newtonianos con comportamiento elastoviscoso y de adelgazamiento por cizallamiento (Fallacara, Baldini, & Manfredini, 2018; J. Kim, Chang, & Kim, 2018). El perfil de adelgazamiento por cizallamiento de las soluciones de ácido hialurónico se puede atribuir a varias razones: a la destrucción de los enlaces de hidrógeno intramoleculares y al efecto hidrófobo con el aumento de la velocidad de cizallamiento.

Las soluciones de ácido hialurónico no demuestran propiedades tixotrópicas; si la velocidad de cizallamiento se reduce y finalmente es casi nula, las cadenas moleculares de ácido hialurónico asumen la estructura inicial (Lapčik & Lapčik, 1998). La viscosidad de las soluciones es única y conserva su relevancia e importancia en procesos fisiológicos y bioquímicos, así como durante el desarrollo de la aplicación terapéutica, médica, celular, bioingeniería, cosmética y alimentaria del ácido hialurónico (Rwei, Chen, & Mao, 2008). En ocasiones, la viscosidad de cizallamiento cero del ácido hialurónico no describe completamente las propiedades, por lo que el análisis de oscilación es suma importancia pues permite obtener la dependencia de la viscosidad compleja  $\eta$  (como la suma del módulo de almacenamiento  $G'$  y el módulo de pérdida  $G''$ ) y la frecuencia. La viscosidad compleja de las soluciones disminuye con el aumento del peso molecular del ácido hialurónico. Además, la frecuencia y los valores de módulo del punto de cruce de  $G'$  y  $G''$  aumentan con la disminución del peso molecular. El ácido hialurónico de alto peso molecular posee un mayor tiempo de relajación (paso de un comportamiento principalmente viscoso a un comportamiento elástico). Con la disminución de su peso molecular, se necesita menos tiempo para la red polimérica tridimensional para desenredar y demostrar un comportamiento principalmente viscoso (Falcone, Palmeri, & Berg, 2006).

### **2.3 Materiales para la extracción de ácido hialurónico**

Algunos materiales que son empleados para la extracción de este polímero, son las crestas y las barbillas que son las excrecencias que tienen los machos y hembras (de menor tamaño) compuestos por 2 tejidos que comprenden cada uno 3 capas que incluyen epidermis, dermis y tejido conectivo central. La epidermis contiene 2 capas,

estrato córneo y estrato germinativo. La dermis; se puede dividir en capas superficiales e intermedias, este último contiene tejido fibromucoide que ocupa gran parte de las estructuras de cresta y zarzo de los gallos. Este se localiza principalmente en las fibras mucosas de la capa subcutánea. Los estudios de la composición química de cresta y del zarzo han demostrado que el colágeno y el ácido hialurónico como glucosaminoglicano no sulfatado (GAG), son los componentes principales de estos tejidos (Selyanin et al., 2015). Recientemente, se ha detectado inmunoquímicamente un epítipo de disacárido de queratán sulfato en tejidos de cresta y zarzo (T. Nakano & Sim, 1994). Se sabe que el ácido hialurónico se concentra en el tejido fibromucoide (E. A. Balazs, 1959) pero se dispone de información limitada sobre la distribución de otros componentes, incluidos el colágeno y glicosaminoglicanos sulfatados donde éstos últimos se unen covalentemente a las proteínas centrales para formar proteoglicanos pero se desconoce el tipo de proteoglicano en crestas y barbillas de los gallos. La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales específicos, es una técnica útil para localizar una molécula constituyente en los tejidos (T. Nakano, Imai, & Koga, 1996).

## **2.4 Métodos comerciales para la producción de ácido hialurónico**

### **2.4.1 Método de producción mediante el uso de tejidos animales**

La extracción de tejidos animales, se empleó para investigaciones de laboratorio con el objetivo de identificarlo y caracterizarlo para poder dilucidar su potencial biológico o aplicación biomédica. Se ha aislado de casi todos los tejidos de los vertebrados, incluido el cuerpo vítreo del ojo, cordón umbilical, líquido sinovial, piel de cerdo, líquido pericárdico del conejo y cartílago de los tiburones entre otros (Ignatova & Gurov, 1990).

Las fuentes más accesibles para la producción a gran escala de alto peso molecular son las crestas de gallo ( $1.2 \times 10^6$  Da), cordones umbilicales humanos ( $3.4 \times 10^6$  Da), humor vítreo del ganado ( $7.7 \times 10^4$ - $1.7 \times 10^6$  Da) y líquido sinovial bovino ( $14 \times 10^6$  Da). En 1979, estuvo disponible un método para la producción de hialuronano de grado farmacéutico mediante extracción de tejidos animales. Balazs (1979), desarrolló un procedimiento para aislar y purificar HA con de crestas de gallo y cordones umbilicales humanos y abrió la brecha en la investigación con su porte para la producción industrial de hialuronano a partir de crestas de gallo para aplicaciones médicas. La extracción de este polisacárido puro y de alto peso molecular a partir de tejidos animales es difícil, suele presentar un complejo con otros biopolímeros, incluidos los proteoglicanos y para liberarlo de estos complejos se necesita el uso de enzimas proteolíticas (es decir, papaína, pepsina, pronasa y tripsina) así como la precipitación con disolventes orgánicos, precipitación no disolvente, detergentes, etc. (O'Regan, Martini, & Crescenzi, 1994).

La ultrafiltración y cromatografía, se utilizan para eliminar los productos de degradación y otros contaminantes. La filtración estéril, se utiliza para eliminar todas las células microbianas antes de la precipitación con alcohol, secado y acondicionamiento del producto final. Es importante que los procesos de extracción y purificación se mejoren continuamente para cumplir con los altos estándares de calidad para poder ser empleado en aplicaciones médicas. Actualmente, los desechos animales siguen siendo la fuente más importante para la fabricación industrial para aplicaciones médicas y proporciona varias preparaciones de grado médico por año (Boeriu, Springer, Kooy, van den Broek, & Eggink, 2013).

#### 2.4.2 Método de producción a base de microorganismos

El ácido hialurónico se ha producido comercialmente a partir de varios microorganismos después de que se identificaran operones HAS (hialuronidasas) en la bacteria *Streptococcus* en la década de 1990. Las enzimas HAS de las especies de *Streptococcus*, se extienden en la cadena de hialuronano desde el extremo reductor y están unidas a la membrana, lo que es similar a las enzimas humanas. Existen varias limitaciones que inhiben el progreso de la producción por microorganismos, ya que la fermentación a gran escala es difícil, debido al aumento de la viscosidad a medida que aumenta su concentración. La alta viscosidad, impide una mezcla adecuada y da como resultado una baja tasa de transferencia de oxígeno, lo que reduce el rendimiento (Liu, Liu, & Li, 2011). La polidispersidad es muy importante en el peso molecular del producto final, pues sigue siendo un problema porque la distribución está fuertemente controlada por la estequiometría de reacción entre otras condiciones de cultivo.

Finalmente, existe la posibilidad de endotoxinas de microorganismos patógenos o contaminación bacteriana de proteínas de unión y ácidos nucleicos que pueden provocar una respuesta inmune humana. En comparación con la extracción de animales, la producción por bacterias suele dar como resultado una longitud de cadena de hialuronano más corta (Xu et al., 2021). El valor comercial supera con creces el de otros polisacáridos extracelulares microbianos. Con un valor estimado en el mercado mundial de 500 millones de dólares americanos, se vende por hasta 100.000 dólares americanos el kilogramo (Boeriu et al., 2013).

### **2.4.3 Métodos de producción libres de células**

Para reducir inconvenientes de la fermentación de microorganismos, se produce a escala en sistemas *in vitro* sin células que utilizan enzimas HAS (hialuronidasas) purificadas. La mayoría de las especies producen enzimas HAS que necesitan estar unidas a la membrana celular, en el caso de *Pasteurella multocida*, produce enzimas que no requieren asociación de membrana y pueden sintetizar HA en un sistema libre de células. Sin embargo, aunque los huéspedes no patógenos y los sistemas libres de células ofrecen alternativas a la producción comercial actual, no tienen la capacidad de producir a escala comercial. Todos los métodos comerciales actuales están limitados en su capacidad para producir eficientemente ácido hialurónico de alto peso molecular con una distribución de peso molecular estrecha a gran escala. El aumento del uso en la industria biomédica seguirá impulsando la innovación futura para optimizar la producción (Xu et al., 2021).

### **2.4.4 Métodos de extracción y caracterización de ácido hialurónico**

Como se ha mencionado, la cresta de *Gallus gallus domesticus*, es uno de los tejidos más ricos en contener este polisacárido. Algunos estudios han revelado que se ha extraído el ácido hialurónico de las crestas de gallo mediante extracciones químicas o químico enzimáticas. En cuanto a las crestas, los estudios hacen hincapié para la distinción de machos y hembras, así como control exacto de la edad de los animales para poder aplicar las extracciones.

En la Tabla 3, se observan las investigaciones y hallazgos en la extracción de HA proveniente de crestas o barbillas de gallo. Asimismo, se pueden identificar las condiciones y reactivos de cada proceso de extracción. Se identifican los trabajos que

se han realizado de la extracción de ácido hialurónico de tejidos animales con diversos métodos. Mediante digestión proteolítica con papaína durante 24 h a 60 °C, seguida de precipitación con cloruro de cetilpiridinio. Para caracterización, se ha determinado el contenido de ácido hexurónico mediante el método del carbazol, la viscosidad intrínseca se midió utilizando el viscosímetro de bola y la masa molar se calculó extrapolando la línea de calibración a cero. Además, se llevó a cabo una espectroscopia de infrarrojos cualitativa en la muestra utilizando el espectrofotómetro Bomem (Da Rosa et al., 2007). Kulkarni et al. (2018), trabajaron en la extracción de ácido hialurónico puro de crestas de gallo que donde posteriormente se realizaron: pruebas cualitativas, viscosidad, absorción UV, ensayo de detección de endotoxinas. También, se realizó SDS-PAGE para verificar los contaminantes proteicos para verificar que el ácido hialurónico no estuviera contaminado con la proteína.

La viscosidad del ácido hialurónico extraído fue de 2.55 poise, es económico y puede usarse para la producción industrial. Kang et al. (2010), han realizado experimentos donde a partir de 500 g donde el peso de las crestas de gallo secas y desgrasadas fue de aproximadamente 80 g. También se ha realizado la evaluación también sobre la extracción química y enzimática para aprovechar otras fuentes de ácido hialurónico. Pérez-Gumeta, Meza-Gordillo, and Ventura-Canseco (2018), evaluaron ambos procesos de extracción del humor vítreo de tilapia, pues además de la mejora al tratamiento se realizaron pruebas complementarias para su caracterización (espectroscopia de UV-VIS, IR y electroforesis en gel de agarosa).

Srisantisaeng et al. (2013), desarrollaron la extracción del polímero de la utilización de vísceras y crestas, donde se aplicaron proteasas extraídas de vísceras de pollos de engorde para digerir crestas y separar HA. Donde normalmente las condiciones

óptimas para la digestión de crestas de pollos de engorde por la proteasa cruda en este estudio se eligieron de pH 7.5 y 50 °C y los resultados revelaron que el rendimiento de HA crudo extraído con enzima fue menor ( $P < 0.05$ ) que el obtenido por digestión comercial con papaína. Se verificó una identidad similar del HA extraído y del estándar HA mediante electroforesis de acetato de celulosa y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. El extracto de enzima crudo de intestino y páncreas de pollo tenía una alta actividad proteolítica y podría usarse con éxito para separar HA de crestas de pollos de engorda. Hafsa et al. (2017), se extrajo ácido hialurónico de cresta de gallo y ácido hialurónico de bajo peso molecular. Este último, se obtuvo mediante degradación ultrasónica donde mostró que el rendimiento extraído y el contenido de proteína de tanto del ácido hialurónico nativo como el de bajo peso molecular fueron 0.1, 61.5, 0.6 y 0.4% respectivamente. Previamente, el peso molecular y el contenido de ácido glucurónico se han utilizado como índice para comparar los efectos de la irradiación de microondas. Existen pocos estudios sobre el uso de tecnologías emergentes sobre la extracción de ácido hialurónico de las crestas de pollo de engorda, por lo que el estudio relacionado con este tipo de extracción lo reportan S. Chen et al. (2015), quienes a través de un estudio determinaron el peso molecular y el contenido de ácido glucurónico como índice y comparar los efectos de irradiación por microondas, irradiación de microondas combinada con peróxido de hidrógeno y ácido ascórbico sobre la degradación del ácido hialurónico en diferentes condiciones.

**Tabla 3.** Fuentes y métodos de extracción de ácido hialurónico (HA). Tomado y modificado: Callejas-Quijada et al. (2023).

<b>Autor</b>	<b>Fuente</b>	<b>Método</b>	<b>Condiciones usadas</b>	<b>Concentración</b>
N. Volpi and Maccari (2003)	Zarzo	Extracción Enzimática	-Papaína -Diálisis y celulosa electroforesis de acetato	17.9 µg/mg
T. Nakano and Sim (1994)	Cresta de gallo	Extracción química enzimática	-Desgrasado: Acetona y secado a 80 °C. -Digestión: papaína dos veces cristalizada en 1 mL de 0.1 M tampón de fosfato de sodio que contiene EDTA 0.005 M, 0.005 M clorhidrato de cisteína, azida sódico al 0.02% que tiene un pH de 6.5. 65 °C durante 4 h. -Diálisis: tubo de diálisis (corte de masa molecular, 6000–8000 Da) durante 24 h.	39.8 µg/mg
Da Rosa et al. (2012)	Cresta de pollo 50:50 macho y hembra	Extracción químico enzimática	Deshidratación: acetona Extracción/delipidación: solución de cloroformo y metanol (2:1 v/v) durante 24 h a 25 °C). Extracción: Buffer de digestión de papaína (20 mg/mL), etanol para purificación y centrifugación.	Material seco 15 g hexurónico ácido/mg tejido seco
Kulkarni et al. (2018)	Cresta de gallo	Extracción químico enzimática	-Acetona desgrasada (3 intervalos) cada 24 h, 8 °C. -Extracción: NaOAc 5% -Precipitación: citrato salino de sodio.	*
Kang et al. (2010)	Cresta de gallo	Extracción química	-Desgrasado: acetona -Extracción: NaOAc 5% -Precipitación: cloroformo-alcohol amílico. -Diálisis	1 mg/g de gallo congelado peine
Selyanin et al. (2015)	Cresta de gallo	Extracción enzimática	-Agua 100 °C. -Papaína; Ultrafiltración en mezcla de agua y etanol al 40%	* Polvo liofilizado
Selyanin et al. (2015)	Cresta de gallo	Extracción química	Calentamiento del extracto de agua a 90–100 °C; eliminación de lípidos; filtración; Tratamiento con carbón activado.	* Polvo liofilizado

Selyanin et al. (2015)	Cresta de gallo	Extracción química	-Solución fisiológica, 80–90 °C, 2 extracciones. -Filtración: precipitación de ácido acético con NaOH a pH 7–7.3, calentando a 80–90 °C; filtración repetible.	*	Polvo liofilizado
Selyanin et al. (2015)	Cresta de gallo	Extracción química	3 extracciones: agua -Precipitación: ácido tricloroacético del volumen de extracto a 20–22 °C durante 1–2 h; Eliminación de lípidos y agua con acetona y éter 3 veces.	*	Polvo liofilizado
Selyanin et al. (2015)	Cresta de gallo	Extracción química	Solución de NaCl al 1–15% a 60 °C, 18 h. Rendimiento 1.92% del material de partida, centrifugación; liofilización.		Sustancia blanca parecida a una fibra; contenido de proteína 9–24%
Selyanin et al. (2015)	Cresta de gallo	Ultrasonido Extracción química	Tratado: etanol y ultrasonido (16–20 kHz 20–25 min). Condiciones de extracción: agua a 45–50 °C, 20–25 min 55% de HA. Filtración al vacío: HA 95% precipitación con etanol a la proporción 1:3, secado.	*	Polvo seco de ácido hialurónico
Selyanin et al. (2015)	Crestas de gallo cordón umbilical	Extracción química	Materia prima molida congelada a (–20–70 °C), 2 partes de agua. Se añadió peso y se calentó la mezcla durante 15–25 min a 95–100 °C.	*	Polvo seco de ácido hialurónico
	Crestas de gallo	Extracción química	Colagenasa tratada 0.03–0.04% del peso del tejido 45–50 min, 45–50 °C, pH 6.8–7. Precipitación: etanol en la relación 1:3; filtración al vacío, secado al vacío o sublimación.	*	Ácido hialurónico seco polvo de solución
Selyanin et al. (2015)	Crestas de gallo	Extracción enzimática	Tejido congelado tratado con agua a 55 °C. Proteólisis: 3.5 h a 37 °C. Filtración (5.6 g/1 kg de tejido). Precipitación: etanol disuelto al 30% con NaCl, reprecipitado (etanol).	*	Ácido hialurónico polvo seco

Selyanin et al. (2015)	Crestas de gallo	Extracción enzimática	Crestas hervidas: 4 h-50 °C y pH 7.5 con Pronase. Producir: 6.7 g/1 kg de tejido. Filtración: CPC. Precipitante: etanol al 30% y NaCl.	*
Selyanin et al. (2015)	Crestas de gallo y gallina	Extracción química	Agua: pH 3–4, 90–100 °C, 50 min. Tratamiento con activado carbono luego celuloso; filtración.	*
	Crestas de gallo y gallina	Extracción química	Extracciones: agua. Tratamiento con cloroformo. Precipitación: etanol.	*
	Crestas de gallo/pollo	Extracción química	Lavado: (etanol, cloroformo). Extracción: 3.5 volúmenes de agua acidificada (pH 3-4 a 90–100 °C, 40–60 min), rendimiento 0.09%. Extractos (filtrados), proteínas (60–80 °C). Filtración: 40 °C a través de membranas de policloruro de vinilo.	Polvo seco
Selyanin et al. (2015)	Crestas de pollo	Extracción química	Solución de alcohol tercbutílico dos veces (5–25%). NaCl para creación de sistema de precipitación bifásica (etanol).	*
Gherezghiher, Koss, Nordquist, and Wilkinson (1987)	Cresta de pollo (ojos)	Extracción química	Sal de sodio, diálisis.	469.9 µg/mL humor vítreo
Balazs (1979)	Crestas de gallo	Extracción química	Extracción: agua. Tratamientos con mezcla de cloroformo y NaCl 5 °C, 3–5 h. Tratamiento: Pronase. Precipitación: etanol.	*

HA (Ácido hialurónico), NaOAc (Acetato de sodio), CPC (Cloruro de cetilpiridinio), NaCl (Cloruro de sodio), Hidróxido de sodio (NaOH), EDTA (Tetraacetato de etilendiamina), Rendimiento no especificado por los autores (\*), milliampere (mA).

## **2.5 Técnicas empleadas para caracterización del ácido hialurónico**

### **2.5.1 Análisis mediante métodos de electroforesis**

También se ha empleado electroforesis para identificar el peso molecular de los extractos de HA sin importar el tipo de extracción, pues es indispensable conocerlo pues a partir de esta prueba se puede decidir las posibles aplicaciones de los extractos. Por ejemplo, en la membrana de acetato de celulosa ha sido un método común para el análisis cualitativo y semicuantitativo de mezclas de GAGS, la ventaja principal de este método radica en su sencillez y la capacidad de procesar varias muestras al mismo tiempo. Debido a la simplicidad y el bajo costo del análisis, este método sigue siendo la primera opción para el análisis de muestras clínicas (Kodama, Kodama, & Yosizawa, 1988; Wegrowski, Bellon, & Quéreux, 1999). Este se aplicó, por ejemplo, para analizar ácido hialurónico en líquido sinovial de articulación de rodilla humana normal y HA vítreo de mono búho. Los resultados indican que ambas muestras mostraron distribuciones estrechas de masa molecular de  $6-7 \times 10^6$  y  $5-6 \times 10^6$ , respectivamente. Se desarrolló adicionalmente para la visualización de GAGS no radiomarcados resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa usando tinción con azul de toluidina seguido del procedimiento Stains-All (Takehi et al., 2013).

### **2.5.2 Análisis mediante técnicas cromatográficas**

Los GAGS, incluidos ácido hialurónico y condroitín-dermatán sulfatos, se convierten en disacáridos insaturados mediante la acción de condroitín sulfato liasas. Estos disacáridos insaturados, se han analizado mediante HPLC con derivatización antes y después de la columna. Todos los disacáridos insaturados no sulfatados, mono y disulfatados, derivados de condroitín sulfato, dermatán sulfato y HA, se resolvieron con

éxito y se detectaron mediante HPLC mediante detección fluorométrica después de derivatización con dansilhidrazina (N. Volpi, 2000).

Se han descrito una variedad de métodos para evaluar la distribución de la masa molecular del ácido hialurónico tanto en el líquido sinovial como otros fluidos utilizando los métodos de viscosimetría, cromatografía de permeación en gel de alto rendimiento (GPC), electroforesis capilar, electroforesis en gel y dispersión de luz láser de ángulo bajo.

Un método para la estimación del tamaño molecular es mediante cromatografía de exclusión por tamaño requiere una variedad de estándares de masa molecular conocida para generar una relación entre el volumen de retención y el logaritmo de la masa molecular promedio en peso ( $\log(M_w)$ ) (Anadere, Chmiel, & Laschner, 1979).

La caracterización de los parámetros moleculares de muestras de ácido hialurónico de diferentes orígenes se ha logrado utilizando un detector de dispersión de luz láser de múltiples ángulos (MALLS) acoplado a un sistema de cromatografía de permeación en gel (GPC) (Adam & Ghosh, 2001).

El tamaño molecular de estos productos de HA químicamente modificados, se examinó mediante cromatografía de exclusión de tamaño de alto rendimiento con detección de conductividad (Chaidedgumjorn, Suzuki, & Toyoda, 2002). El análisis se realizó en una columna TSK gel G3000SWXLHPSEC con tampón borato como eluyente. La detección de conductividad permitió una detección altamente sensible en el rango de picogramos. Es importante utilizar oligosacáridos bien caracterizados y altamente purificados en estudios biológicos y estructurales celulares para evitar resultados erróneos. Se han purificado mediante una combinación de tamaño de exclusión y

cromatografía de intercambio de iones después de la digestión con hialuronidasa testicular (Kakehi et al., 2013).

## **2.6 Aplicaciones en industria alimentaria, medicina, farmacéutica y cosmética**

El ácido hialurónico se ha utilizado en diversas formas, como hidrogel, relleno dérmico, inyección intradérmica, andamios, cremas, películas, espumas y geles para el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades. Asimismo, ha mostrado una amplia gama de actividades farmacológicas que incluyen antiinflamatorias, cicatrización de heridas y regeneración de tejidos, inmunomoduladores, anticancerígenos y antidiabéticos reparadoras de la piel y propiedades cosméticas (Pavicic, Gauglitz, & Lersch, 2011). Este polímero desempeña una actividad importante en la regulación de diversos procesos biológicos, por ejemplo, en periferia e interfaces de las fibras de colágeno. En la piel envejecida, estas conexiones con el ácido hialurónico cuando se encuentran ausentes, ocasiona la desorganización del colágeno y las fibras de elastina pueden conducir a la presencia de líneas finas en la piel, arrugas y pliegues nasolabiales (Bukhari, Roswandi, & Waqas, 2018).

En la Tabla 4, se observan los productos elaborados a partir de ácido hialurónico comercial o extraído de fuentes convencionales. Cada producto tiene funcionalidad y han sido empleados para elaborar alimentos, suplementos, medicamentos y productos para el cuidado personal.

**Tabla 4.** Productos y aplicaciones del HA en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Tomado y modificado de: Callejas-Quijada, Escobar-Chavez, Campos-Lozada, Pérez-Marroquín, and Aguirre-Álvarez (2023).

<b>Producto</b>	<b>Fuente</b>	<b>Funcionalidad</b>
Embutidos ahumados homogeneizados con HA	HA de calidad alimentaria (94,27%)	Efectos del HA como aditivo y propiedades de efecto de productos cárnicos procesados.
Yogur suplementado con HA	Cresta de gallo HA (65%) (Mobile TM, Beriberi S.A., Palafolls, España)	Eficacia de la administración oral en individuos sanos con leves molestias en las articulaciones.
Leche	HA comercial	Efecto del polímero en diversas concentraciones sobre diversas propiedades fisicoquímicas de la leche.
Cápsulas	HA (Habest®) 95% de pureza	Ingesta de HA (120 mg) de prueba durante 12 semanas en 40 personas sanas. Individuos asiáticos que consumen por vía oral.
Cápsulas	HA (Habest®) 95% de pureza	Efecto de la ingesta oral de HA durante 12 semanas en individuos japoneses.
Preparación oral	HA, CS, curcumina y quercetina	Terapia contra la cistitis en pacientes que reciben quimioterapia intravesical para el cáncer de vejiga.
Administración oral	CS, GIHCl, HA, colágeno nativo tipo II	Efectos beneficiosos para la salud de las articulaciones de la fórmula básica (CS + GIHCl + HA) y la fórmula básica más colágeno nativo tipo II que da como resultado una eficacia aún mayor.
Polvo seco	HA de 2 Mw (Kewpie Corporation, Tokio, Japón)	Degradación y absorción de HA en la excreción en las heces, el tracto intestinal, el intestino grueso y se examinó la translocación a la sangre y a la piel.
Nanopartículas	HA Comercial	Se entrega de manera más efectiva mediante nanopartículas que mediante difusión pasiva y podría contribuir a la recuperación de la barrera después de la irradiación UV.
Microagujas	HA Comercial	Verificar el efecto de mejora de la piel del rostro y la seguridad de un nuevo parche cosmético de microagujas.
Microagujas	HA Comercial	Más eficaz que la esencia de HA para mejorar las arrugas y es seguro.

Microagujas	HA Comercial	Rejuvenecimiento de la piel debido a su capacidad de retención de agua y naturaleza viscoelástica.
Microagujas	Adenosina encapsulada de alta y HA de bajo peso molecular	Se analizó la mejoría de la piel y el parche, el parche HMw mostró un mejor efecto que el parche LMw HA con dosis de adenosina similares.
Matriz de microagujas disolventes	HA Commercial/Hidroxipropil- $\beta$ ciclodextrina/Acetónido de triamcinolona	Se evaluó en un modelo en conejos el tratamiento alternativo a la cicatriz hipertrófica mediante la estrategia de administración.

---

\*Sulfato de condroitina (CS), HA (ácido hialurónico), clorhidrato de glucosamina (GIHCl), ácido hialurónico (HA), peso molecular (Mw), bajo peso molecular (LMw), alto peso molecular (HMw).

### **2.6.1 Biomateriales, productos farmacéuticos y sistemas transdérmicos**

El ácido hialurónico se ha convertido en uno de los ingredientes más importantes de los productos cosméticos y nutricosméticos, pues ha sido usado como hidrogel, relleno dérmico, inyección intradérmica, andamios, cremas, películas, espumas y geles para el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades. La eficacia cosmética y nutricosmética de formulaciones a base del polisacárido incluyen efectos humectantes, hidratación de la piel, suavidad y rejuvenecimiento de la piel y eficacia de regeneración de la piel. Un análisis exhaustivo reveló que las formulaciones basadas en ácido hialurónico (es decir, geles, cremas, inyecciones de relleno intradérmico, rellenos dérmicos, geles grasos autólogos, lociones, sueros, etc.) han demostrado una eficacia notable para tratar una amplia gama de defectos de la piel como arrugas, pliegues nasolabiales y envejecimiento de la piel. Se ha logrado una mejora del nivel de hidratación de la piel, estimulación del colágeno y rejuvenecimiento facial. También posee actividades farmacológicas: antiinflamatorias, cicatrización de heridas y

regeneración de tejidos, inmunomoduladores, anticancerígenos y antiproliferativos, antidiabéticos, antienvjecimiento, reparadoras de la piel y propiedades cosméticas (Bukhari et al., 2018).

En la Tabla 5, se pueden observar productos y aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética los cuales van enfocados a diferentes funcionalidades y han demostrado tener un efecto positivo.

**Tabla 5.** Productos y aplicaciones del HA en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Tomado y modificado de: Callejas-Quijada et al. (2023).

Producto	Fuente	Funcionalidad
<b>Recubrimiento compuesto</b>	HA Comercial	Excelente citocompatibilidad
<b>Nanopartículas</b>	HA Comercial	Como posible agente terapéutico para el tratamiento de la artrosis
<b>Nanopartículas</b>	HA de <i>Streptococcus equi</i>	Efectos de la irradiación gamma sobre nanopartículas de HA (HA-NP) que podrían disminuir los efectos perjudiciales. Procesos inducidos por radiación en el tejido pulmonar.
<b>Hidrogel</b>	HA Comercial	Mezcla de LMw y HMw que tuvo mayor efecto <i>in vitro</i> capacidad antidegradación como sugerencia de potencial en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos.
<b>Apósito con hidrogeles a base de HA de doble reticulación</b>	HA Mw = $3 \times 10^5$ Da	Se estudiará más a fondo este nuevo hidrogel doblemente reticulado para su aplicación en el tratamiento de las úlceras del pie diabético.
<b>Bioimpresión 3D (Andamio híbrido)</b>	Cs, Gel y HA	Los bioandamios se prepararon utilizando tecnología de impresión 3D. Para apoyar la proliferación y diferenciación de células madre mesenquimales.
<b>Liposomas activados por luz</b>	HA 8–15 kDa	Liposomas recubiertos para la liberación de fármacos, estabilidad, formación de corona proteica y movilidad en el humor vítreo como alternativa para la administración de fármacos por vía intravenosa y ocular.

<b>Actividad HA con <i>Lactobacillus crispatus</i> Liofilizado</b>	HA comercial Mw 1800–2300 kDa	Sobrenadantes de cultivos libres de células y HA de <i>L. crispatus</i> BC5 para diseñar una nueva estrategia terapéutica para contrarrestar candidiasis vulvovaginal
<b>Hidrogel (Hymovis®) en el tratamiento de artrosis de rodilla sintomática</b>	HA (Hymovis®, Fidia Farmacéuticos S.p.A, Abano Terme, Italia)	Nuevo hidrogel a base de HA (Hymovis®) en personas que padecen artrosis de rodilla para reducir el dolor y mejorar la función articular.
<b>Parches a base de nanocelulosa</b>	Peso molecular de HA 403.31 kDa > 95 %	Con Diclofenaco en el tratamiento de la estomatitis aftosa apuntando a un mecanismo de liberación del fármaco controlado por difusión e hinchazón.
<b>Micelas poliméricas iónicas</b>	Peso molecular bajo de 50 kDa	Micelas cargadas con un fármaco antifúngico hidrófobo poco soluble, clotrimazol, previendo aplicación cutánea o vaginal.
<b>Microagujas</b>	HA Comercial	Administración transdérmica de insulina, disponibilidad farmacológica relativa y biodisponibilidad relativa de la insulina a partir de microagujas en ratones.
<b>Sistema de explantos organotípicos de piel humana Hidrogel</b>	HA Comercial	También se estudió el efecto sobre los tejidos de una mezcla de interfaz piel-alfiler. Estudio in vitro para analizar la apoptosis y proliferación celular.
	HA Comercial	Mezcla física de Poloxamer 407, quitosano y HA para el tratamiento de heridas de piel y mucosas con efectos antimicrobianos y biológicos propuesto como un vehículo adecuado contra infecciones en piel y mucosas.
<b>Recubrimiento</b>	HA Comercial	El parche recubierto fue antitrombótico y disminuyó el espesor de la neointima tanto en la venoplastia con parche como en la angioplastia en un modelo de rata.
<b>Andamio</b>	HA Comercial	Potente plataforma de materiales para imitar mejor los microambientes biofísicos y bioquímicos en la matriz extracelular (ECM) y dilucidar los roles de las señales mecánicas en la biología celular en cultivos celulares en 3D y dirigir la función y el destino de las células madre.
<b>Parche de microagujas</b>	HA Comercial	Microagujas de HA con hemaglutininas de influenza para vacunación, induciendo una respuesta inmune.

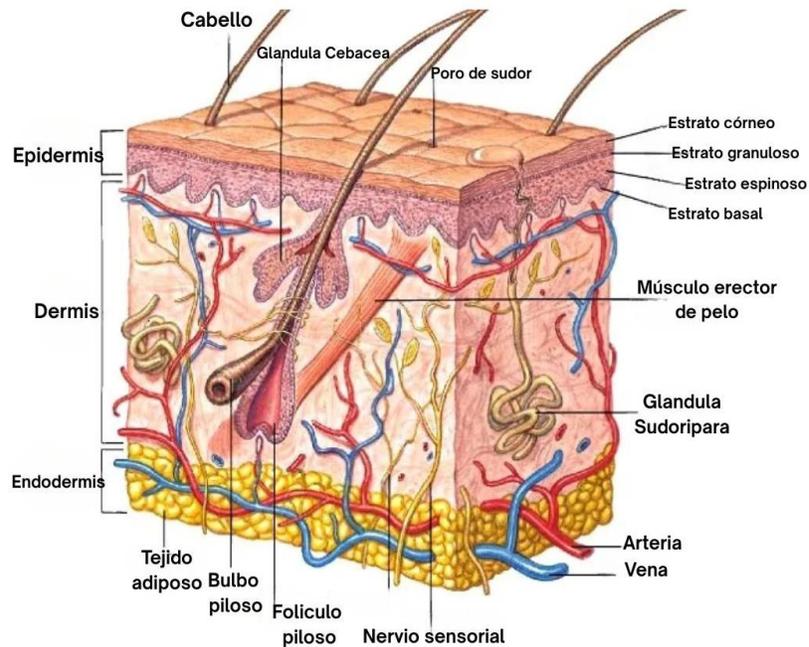
Sulfato de condroitina (CS), HA (ácido hialurónico), clorhidrato de glucosamina (GIHCl), ácido hialurónico (HA), peso molecular (Mw), bajo peso molecular (LMw), alto peso molecular (HMw).

## **2.7 Usos y aplicaciones de HA en sistemas transdérmicos**

### **2.7.1 Anatomía de la piel: estructura y función**

La función principal de la piel es proteger al cuerpo de la pérdida de agua y la entrada de compuestos tóxicos potenciales, alérgenos, irritantes y microbios. En la Fig. 4, se observan las estructuras principales que se abordarán a continuación.

La piel humana comprende la epidermis (capa no vascular de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de grosor), la dermis (una capa altamente vascularizada de aproximadamente 500 a 3000  $\mu\text{m}$  de grosor) y el tejido subcutáneo subyacente, con glándulas sebáceas y sudoríparas corriendo por toda la superficie. La dermis está directamente adyacente a la epidermis y proporciona el soporte mecánico a la piel. La epidermis viable es un epitelio estratificado que consta de capas de células basales, espinosas y granulares y es responsable de la generación del estrato córneo. La epidermis es un tejido dinámico, que se renueva constantemente a sí mismo, en el que todas las células de la superficie del estrato córneo (descamación) se equilibran con el crecimiento celular en la epidermis inferior. La capa epidérmica más externa es la capa córnea (1040  $\mu\text{m}$  de grosor) y representa la principal impregnación cutánea de las barreras mediante formulaciones farmacéuticas aplicadas dérmicamente. Está compuesto por células epidérmicas muertas, parcialmente desecadas y queratinizadas (Bartosova & Bajgar, 2012).



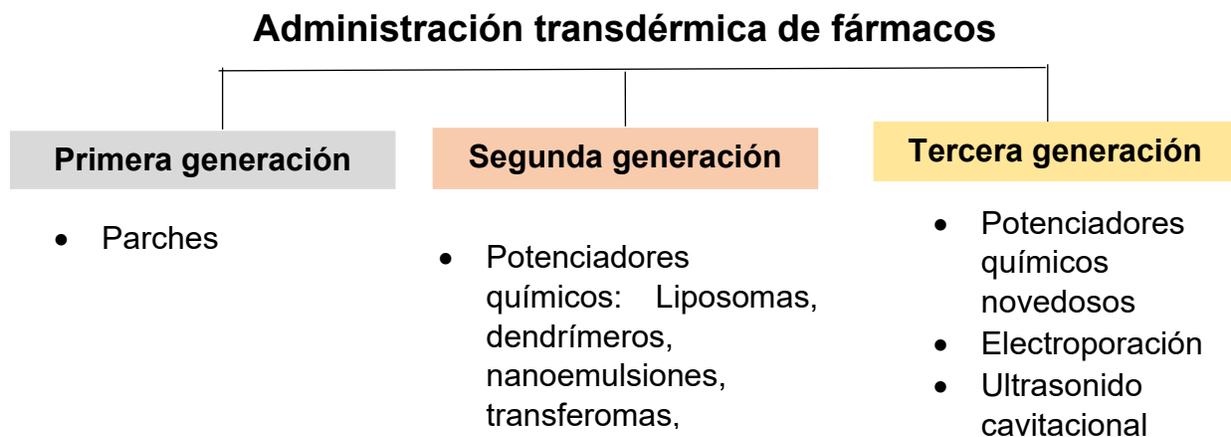
**Figura 4.** Esquema de un corte transversal de la piel. Donde los componentes de importancia son: epidermis, dermis e hipodermis. Tomado y modificado de: Callejas-Quijada et al. (2023).

### 2.7.2 Administración transdérmica de fármacos

La administración transdérmica está ganando interés como una opción para la administración de fármacos. El fármaco alcanza la circulación sistémica a través de la piel sin perderlo mientras alcanza su objetivo, mejora la biodisponibilidad, mejora la liberación sostenida, minimiza los efectos secundarios indeseables mejorando la respuesta fisiológica y farmacológica (Mahmood et al., 2014; Rai et al., 2018). Por ejemplo, en los estudios de sustitución de testosterona, la administración transdérmica supera los problemas asociados con la administración oral e intramuscular, evita el primer paso hepático después de la administración oral reduciendo la dosis requerida.

Además, elimina la necesidad de inyecciones recurrentes y una mayor concentración de testosterona en la sangre (Hathout et al., 2010; Tajbakhsh et al., 2020). Sin embargo, la administración de fármacos por vía transdérmica se ve muy afectada por las propiedades químicas de los fármacos, lo que afecta la absorción a través del estrato córneo. Por lo tanto, pocos fármacos pueden administrarse en cantidades significativamente terapéuticas por esta vía (Mittapally et al., 2018).

Los fármacos aplicados a través de sistemas transdérmicos deben tomar una ruta tortuosa para pasar por alto capas de piel consecutivas que contienen dominios tanto acuoso como lipídico y alcanzar la circulación sistémica (Mahmood et al., 2018; Haque & Talukder, 201). Hay tres generaciones de administración transdérmica de fármacos, como se ilustra en la Fig. 5.



**Figura 5.** Esquema de generaciones de administración transdérmica de fármacos. Tomado y modificado de: Ahmed Saeed Al-Japairai, Mahmood, and Hamed Almurisi (2020).

**Primera generación de administración transdérmica:** son sistemas empleados para administración transdérmica de fármacos (parches), el candidato a fármaco que es apropiado para la formulación del parche, está extremadamente limitado debe caer en rangos óptimos de peso molecular, hidrofiliidad y efectividad a dosis bajas (Economidou et al., 2018).

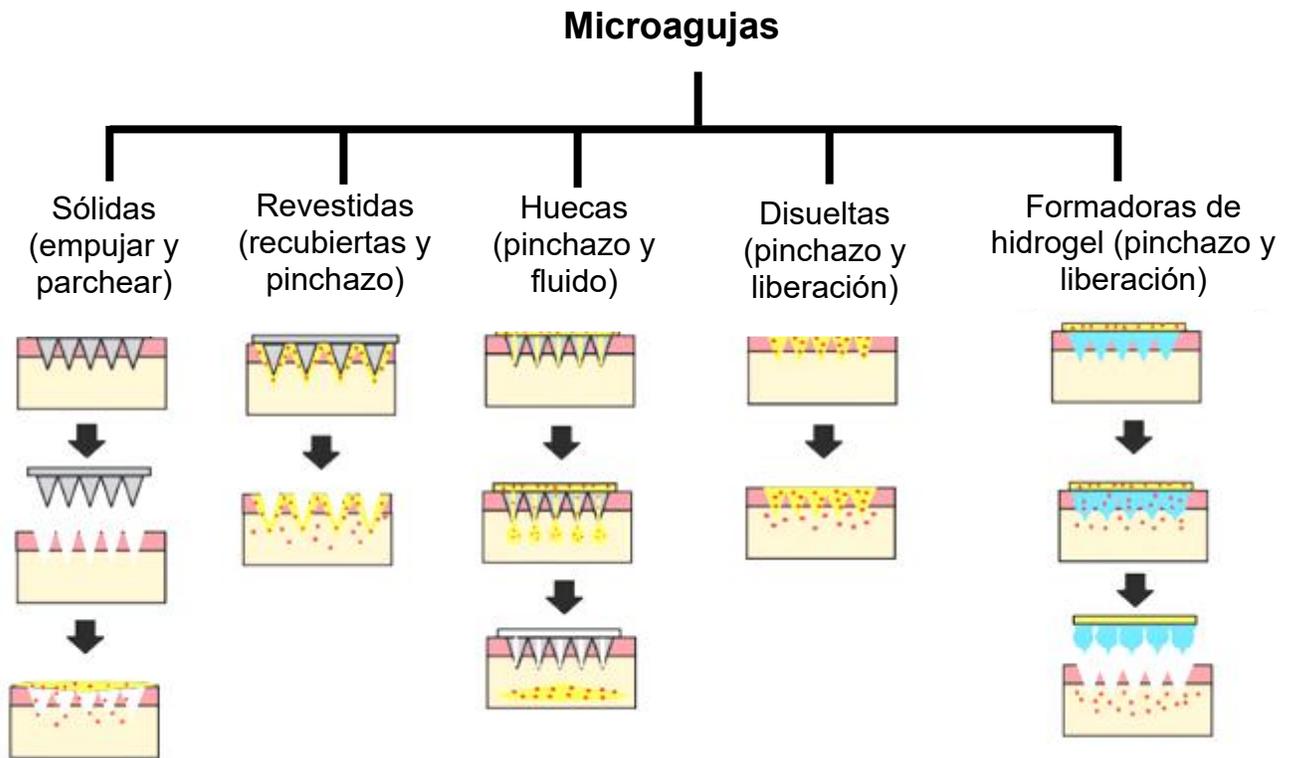
**Segunda generación de administración transdérmica:** se implementó con una técnica de mejora de la permeabilidad de la piel para extender su aplicación en la administración transdérmica de fármacos. Estos métodos luchan por proteger los tejidos más profundos de cualquier daño fisiológico y aumentar la distribución de moléculas de fármaco a través del estrato córneo (Lee et al., 2018).

**Tercera generación de administración transdérmica:** introducción de nuevos potenciadores químicos, electroporación, ultrasonido cavitacional, microagujas, ablación térmica y microdermoabrasión; las técnicas permitieron que los bioterapéuticos y moléculas grandes penetraran mejor en la capa externa de la córnea, lo que resultó en una mayor eficacia de la administración transdérmica en ensayos clínicos humanos (Nandagopal et al., 2014). Las técnicas empleadas en métodos de abrasión, láser y calor, exposición a radiofrecuencia, dañaban la piel, causaban malestar en los pacientes y resultaban en la aplicación del fármaco y el tratamiento de efectos secundarios. Estas limitaciones pueden resolverse mediante el uso de agujas de tamaño micrométrico llamadas microagujas (Ahmed Saeed Al-Japairai et al., 2020).

## 2.8 Sistema de administración de fármacos con microagujas

La tecnología de las microagujas, emplean el uso de agujas microscópicas para administrar medicamentos a través de la capa del estrato córneo hacia las capas subyacentes con mínima invasividad. Las microagujas utilizadas en estos sistemas de administración difieren en longitud; algunas tienen unos pocos micrómetros de largo, pero pueden llegar hasta 2000  $\mu\text{m}$  (Tuan-Mahmood et al., 2013). La corta longitud de estos sistemas permite la penetración del estrato córneo, sin tocar los nervios en las capas subyacentes de la piel (Quinn, Kearney, Courtenay, McCrudden, & Donnelly, 2014). Se prefiere su uso en métodos convencionales de administración de medicamentos debido a su mecanismo de administración simple, dispositivos indoloros y mínimamente invasivos que ofrecen la simplicidad de usar transdérmicos mientras brindan la efectividad de agujas y jeringas invasivas (Nayak, Babla, Han, & Das, 2016). A diferencia de los métodos convencionales, no requieren habilidades o personal especializado, pues son para un solo uso, por lo que esto minimiza el potencial de contaminación cruzada de los medicamentos (Mahato, 2017).

En la Fig. 6, se encuentra la clasificación en cinco grupos diferentes de arreglos de microagujas según el diseño: microagujas sólidas, huecas, recubiertas, que se disuelven y que forman hidrogel.



**Figura 6.** Mecanismo de administración de fármacos de los 5 tipos de microagujas sólidas, recubiertas, huecas, disolventes y formadoras de hidrogel. Tomado de: Ahmed Saeed Al-Japairai et al. (2020).

**Microagujas sólidas:** El mecanismo consta de dos pasos (se conoce como el enfoque de "pinchar y parchear"); en primer lugar, se introducen orificios en la piel utilizando matrices de microagujas; y posteriormente se administra una formulación de fármaco convencional mediante un parche de fármaco transdérmico (Al-Japairai et al., 2020).

**Microagujas revestidas:** siguen el enfoque de "recubiertas y pinchazo"; donde una formulación de fármaco se recubre sobre las microagujas antes de su aplicación en la piel. La penetración en la piel, permite que el revestimiento se disuelva y a partir de entonces el fármaco se deposita en la piel (Al-Japairai et al., 2020).

**Microagujas huecas:** consiste cuando el fármaco se introduce en el espacio hueco de la punta de la microaguja, que se deposita directamente en la epidermis o la capa de la dermis superior de la piel tras la inserción. En términos simples, esto se puede describir como "pinchazo y liberación" (Pamornpathomkul et al., 2017).

**Microagujas de disolución (disueltas):** elaboradas de polímeros en disolución o biodegradables permiten el proceso de aplicación simple en un solo paso (Al-Japairai et al., 2020).

**Microagujas formadoras de hidrogel:** absorben agua en grandes cantidades en su red polimérica, lo que resulta en hinchazón. El mecanismo de disolución y liberación del fármaco de las microagujas formadoras de hidrogel se denomina "pinchazo y liberación"; ambas eliminan la necesidad de utilizar medidas especiales para el descarte de la aguja y el riesgo de reutilización inadvertida (Waghule et al., 2019).

El material de las microagujas puede ser de metal, polímero, vidrio y silicio, por lo que el metal, vidrio, silicio y cerámica que se utilizan en la fabricación de estas que son rígidas, lo que permite la penetración de la piel, pero quebradizas, con riesgo de rotura dentro de las capas cutáneas, provocando dolor, hinchazón y posiblemente granulomas. Como los accidentes y los problemas en la administración de microagujas, los mejores materiales para su fabricación deben ser biodegradables y biocompatibles, para evitar complicaciones que ocurren por accidentes como cuando la punta de estas se rompe dentro de las primeras capas de la piel (Dardano et al., 2019).

### Microagujas poliméricas

Se prefieren los polímeros debido a su bajo costo, biocompatibilidad, biodegradabilidad, uso higiénico, capacidad de hinchamiento y disolución. Su degradación *in vivo* en presencia o ausencia de enzimas degradantes produce subproductos no tóxicos. Esta propiedad reduce la posibilidad de infección en el cuerpo. Los polímeros se utilizan predominantemente en la fabricación de matrices de microagujas que se disuelven y forman hidrogel. Sin embargo, hay pocos estudios que utilicen polímeros para la producción de microagujas recubiertas, sólidas y huecas que se atribuyan a la debilidad de la resistencia mecánica del polímero que es probable que falle durante la inserción (Ali et al., 2020; Arya et al., 2017). Las microagujas poliméricas se pueden clasificar según los materiales, las formulaciones, la construcción de las agujas y el rendimiento *in vivo*. Por ejemplo, en las microagujas de polímero sólido, el fármaco no está encapsulado en microagujas sólidas y son eficaces para generar agujeros a través del estrato córneo. Asimismo, las microagujas huecas actúan como reservorio de fármaco externo aplicado después de crear microcanales en la piel. Además, la formulación del fármaco y los polímeros se pueden recubrir sobre microagujas utilizando varios métodos de recubrimiento tales como recubrimiento por inmersión, técnicas de deposición por fundición, secado por pulverización e impresión por chorro de tinta (Q. Y. Li, Zhang, Chen, Wang, & Guo, 2017; Ye, Yu, Wen, Kahkoska, & Gu, 2018).

## 2.9 Tecnologías emergentes en la extracción de compuestos bioactivos

Teniendo en cuenta la importancia de estos extractos y compuestos bioactivos, el desarrollo y uso de métodos de extracción respetuosos con el medio ambiente se ha vuelto popular para mejorar los métodos de extracción convencionales (Casas, Conde, & Domínguez, 2018; Gullian-Klanian & Terrats-Preciat, 2017).

La demanda es alta en investigación y desarrollo para optimizar tecnologías existentes y desarrollar técnicas alternativas creativas y eficientes. Algunos de los métodos novedosos e innovadores utilizados en el procesamiento de alimentos son la extracción de fluidos supercríticos, procesamiento a alta presión, campo eléctrico pulsado, plasma frío, ultrasonido e irradiación ultravioleta.

La utilización de nuevas técnicas "tecnológicas e innovadoras" normalmente implica menos tiempo, agua y energía en el procesamiento, pasteurización y extracción. Estas técnicas son: procesamiento asistido ultrasonido, procesamiento por microondas, extrusión, extracción y procesamiento de fluidos supercríticos, proceso de caída de presión controlada, campo electromagnético de pulso, extracción de agua subcrítica y alta presión. La tecnología de los alimentos, es actualmente un campo de la investigación aplicada y la industria en rápida evolución, bajo condiciones extremas no clásicas. La eficiencia de producción, puede aumentar mediante el uso de mejores alternativas a las técnicas convencionales de extracción, procesamiento y conservación; además, puede conducir a la conservación del medio ambiente mediante la reducción del uso de agua/solventes, minimizando las aguas residuales y la eliminación de contaminantes dañinos del procesamiento (Singla & Sit, 2021).

### **2.9.1 Técnica de extracción asistida por ultrasonido**

La técnica de ultrasonido puede demostrarse como una técnica para lograr el objetivo de extracción y química "verde" sostenible. Esta técnica en el campo de la industria química y alimentaria es conocida por influir significativamente en la velocidad de procesamiento de los diferentes procesos utilizados (Bezerra, De Oliveira, & Bezerra, 2020).

La extracción asistida por ultrasonido, es una alternativa de bajo costo y mejorar la extracción de sustancias bioactivas, parece muy prometedora para obtener altos rendimientos como se ha concluido a partir de los estudios sobre extracción de compuestos proteicos y vegetales. Este tipo de extracción funciona según el principio de cavitación acústica que daña las paredes celulares de la matriz de la planta y, por lo tanto, ayuda en la liberación de compuestos bioactivos (Tiwari, 2015).

El ácido hialurónico se degrada bajo la influencia de los ultrasonidos y esto ocurre como resultado de una ruptura de los enlaces glicosídicos por los radicales libres OH y H, que pueden ser generados por la acción de ondas ultrasónicas en el agua y el colapso de las burbujas de cavitación, dicho fenómeno causado por el colapso violento de las burbujas en el líquido, inducido por ciclos alternos de alta y baja presión, los efectos mecánicos asociados a los ultrasonidos pueden acelerar el remolino, difusión interna y aumentar la transferencia de masa de solutos al disolvente, hinchazón e hidratación, provocando así la rotura de las paredes celulares y facilitando la liberación del contenido celular en el medio. Las malas condiciones de funcionamiento normalmente empleadas en extracción asistida por ultrasonido no provocan cambios significativos en la estructura y funcionalidad de la mayoría de los bioactivos, aunque

la sonicación del agua puede producir radicales libres dentro de las burbujas de cavitación (Casas et al., 2018; Gullian-Klanian & Terrats-Preciat, 2017).

La sonicación conduce a la degradación de una manera no aleatoria, pues el de alto peso molecular se degrada más lentamente que el de bajo peso molecular debido a la forma bimodal de los cromatogramas obtenidos después de 45 y 60 min de sonicación (Vercruyssen, Lauwers, & Demeester, 1995).

### **2.9.2 Ultrasonido de alta intensidad (UAI)**

El ultrasonido no solo representa una alternativa rápida, eficiente y confiable para mejorar la calidad de los alimentos, sino que también tiene el potencial de desarrollar nuevos productos con una funcionalidad única. Tiene un rango de frecuencia que oscila entre 16-100 kHz, y 10-1000 W/cm<sup>2</sup> de potencia, puede tener una amplia variedad de aplicaciones en la industria alimentaria. Por tanto, es utilizado cada vez más en la industria química, farmacéutica y las industrias de tratamiento de residuos y es también se utiliza en diferentes aplicaciones de la ciencia de los alimentos como emulsificación, dispersión de sólidos, cristalización, desgasificación y extracción (Arzeni, Pérez, & Pilosof, 2012).

Kubo, Nakamura, and Takagaki (1993), concluyeron que la acción de ultrasonido no condujo a la degradación del ácido hialurónico a monómeros u oligosacáridos. Inicialmente, el peso molecular de las muestras de ácido hialurónico obtenidas de diferentes fuentes fue de 400 kDa, 1000 kDa y 1200 kDa; después de 10 h de exposición a los ultrasonidos, el peso molecular disminuyó a 11 kDa, 3 kDa y 60 kDa, la sonicación se llevó a cabo a 20 kHz, 7.5 W a 0 °C.

Usando ultrasonido, las extracciones completas ahora se pueden completar en minutos con alta reproducibilidad, reduciendo el consumo de solvente, simplificando la manipulación y el tratamiento, dando una mayor pureza del producto final. Varias clases de componentes alimentarios como aromas, pigmentos, antioxidantes y otros compuestos orgánicos y minerales se han extraído y analizado de manera eficiente a partir de una variedad de matrices (tejidos animales, alimentos y materiales vegetales) (Chemat, Rombaut, & Sicaire, 2017; Mason, 1996).

### 3 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 3.1 Objetivo general

Desarrollar un proceso de extracción y caracterización de ácido hialurónico a partir de crestas de *Gallus gallus domesticus* mediante la aplicación de ultrasonido de alta intensidad para contribuir en la implementación de tecnologías emergentes.

#### 3.1.1 Objetivos específicos

- Caracterizar la materia prima (crestas de *Gallus gallus domesticus*) en sus propiedades fisicoquímicas e histológicas.
- Desarrollar y optimizar un método para la extracción de ácido hialurónico a partir de las crestas de *Gallus gallus domesticus*, mediante ultrasonido de alta intensidad (UAI) para comparar los rendimientos con el método tradicional (MT).
- Caracterizar el ácido hialurónico obtenido de los métodos empleados en sus propiedades fisicoquímicas, antioxidantes, citotóxicas, morfológicas, y medición de rendimiento para evaluar la calidad de los extractos.
- Aplicar los extractos obtenidos de ácido hialurónico para la formulación de un producto final (sistema terapéutico transdérmico) de aplicación tópica.

### 3.2 Hipótesis

El proceso de extracción y caracterización de ácido hialurónico a partir de crestas de *Gallus gallus domesticus* utilizando el método asistido por ultrasonido de alta intensidad (UAI) presenta un mayor rendimiento que el método tradicional (MT).

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto de investigación se desarrollará en 4 etapas principales, las cuales se describen a continuación:

- **Etapa I: Caracterización y acondicionamiento de la materia prima**
- **Etapa II: Proceso de extracción y purificación**
- **Etapa III: Caracterización del ácido hialurónico**
- **Etapa IV: Aplicación en un producto final**

### **Materia Prima**

Se realizará la recolección de cabezas de *Gallus gallus domesticus* indistintamente (machos y hembras) del mercado local de las pollerías en Tulancingo, Hgo.

#### **4.1 Etapa I: Caracterización y acondicionamiento de la materia prima**

En primera instancia, se procederá a separar las crestas de las cabezas con la ayuda de un bisturí, posteriormente se realizará un lavado de estas, para eliminar la suciedad (restos de plumas, sangre). Se les dará un tratamiento térmico y almacenamiento a 18 °C hasta su uso en la extracción.

### 4.1.1 Composición física e histológica de las crestas de *Gallus gallus domesticus*

Se realizó un análisis mediante tinciones básicas y observando los tejidos en microscopio, esto permite identificar las estructuras de las crestas *Gallus gallus domesticus* para ello se siguió la metodología de T. Nakano et al. (1996) y Ramalingam and Ravindranath (1970), con algunas modificaciones por triplicado.

En esta etapa, se realiza una descripción morfológica e histológica de las crestas de *Gallus gallus domesticus* con la finalidad de identificar su composición y según la morfología, evidenciar la presencia de ácido hialurónico para su posterior extracción. La recolección, preparación de tejidos y tinción de las muestras, se llevaron a cabo según lo establecido por Prophet, Mills, Arrington, and Sobin (1995) con algunas modificaciones.

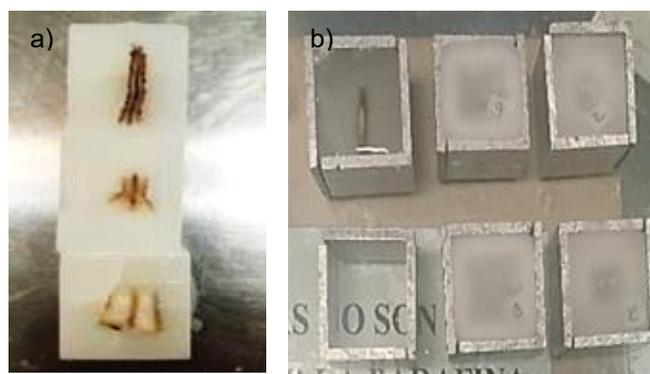
**Preparación de las muestras:** se recolectaron las crestas a unas pocas horas después de la matanza y se recolectaron crestas de pollos de 6 semanas y crestas de gallos de 28 semanas para ser enjuagadas ligeramente con agua corriente y eliminar residuos como sangre y plumas. Se fijaron las muestras en formalina bufferada al 10%.

**Deshidratación:** el procesador de tejidos es un equipo utilizado para la deshidratación automática, pre-impregnación e infiltración de las muestras. Por lo que dichas muestras, fueron introducidas en histocassettes (ver Fig. 7), para iniciar su tratamiento en el procesador de tejidos tipo carrusel MICROM/STP-120-1 durante 16 h.



**Figura 7.** a) Histocassettes empleados para la deshidratación de los tejidos y b) Procesador de tejidos tipo carrusel MICROM/STP-120-1.

**Inclusión:** las muestras se incluyeron en parafina en moldes “L” humectados con glicerina. Una vez solidificados los bloques son congelados a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante al menos 24 h (ver Fig. 8).



**Figura 8.** a) Bloques de parafina solidificados y b) Moldes “L” de metal para solidificar parafina.

**Corte histológico (Microtomía):** se usan 2 clases de micrótomos para cortar secciones delgadas para que la microscopía de luz: (1) el micrótomos rotatorio, en el cual lo que se mueve es el bloque, es el más usado; (2) el micrótomos deslizante, en el cual la cuchilla se mueve, es particularmente útil cuando se están cortando bloques grandes, incluyendo el montaje de preparaciones enteras. Grosor de las secciones: Durante el corte rutinario de tejidos, lo usual es escoger un grosor de 6 micrones.

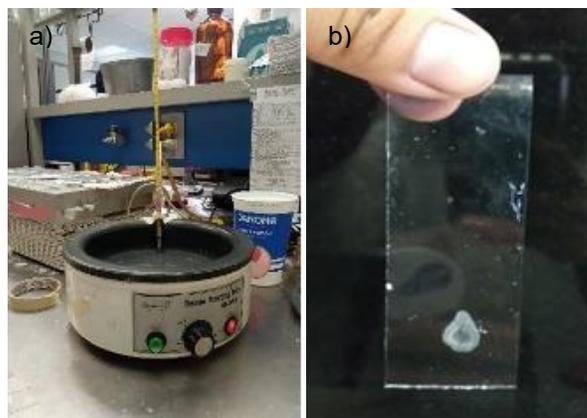
En la Fig. 9, se muestra el microtomo empleado para realizar el corte. En este caso, los bloques fríos se colocaron en el micrótomos (Micrótomos, Leica, Mod. RM2125RT) para ser rebajados y se realizaron los cortes de 7  $\mu\text{m}$  de espesor una vez que se llegó al tejido de las muestras.



**Figura 9.** Micrótomos Marca Leica.

**Fijación:** después del corte del tejido, se coloca y fija en el portaobjetos con la ayuda de alcohol al 50% y enseguida será llevado al baño de flotación (ver Fig. 10). El baño de flotación debe estar a una temperatura a 30 °C, unos cuantos grados por debajo del punto de fusión de la parafina. En este caso, la fijación se realizó en un rango de 55-60 °C según el tipo de muestra. El uso de agua destilada en el baño de agua ayuda a eliminar las burbujas de aire. Cada muestra, se llevó a la flotación para evitar la

formación de pliegues en el corte y una mayor uniformidad. Una vez que se extiendan se volverán a recuperar con el portaobjetos y se colocarán en una placa a  $37\pm 3$  °C y se dejarán secar por 24 h y podrán colocarse en xileno para iniciar el tren de tinción. El corte se coloca en portaobjetos y se fija con una solución de alcohol al 50% para después ser colocadas en un termobañero con agua destilada y los portaobjetos se secan durante 1 h en el horno a 60 °C.



**Figura 10.** a) Baño de flotación de tejidos Premiere, Mod. XH-1001 y b) Fijación de muestra a 60 °C.

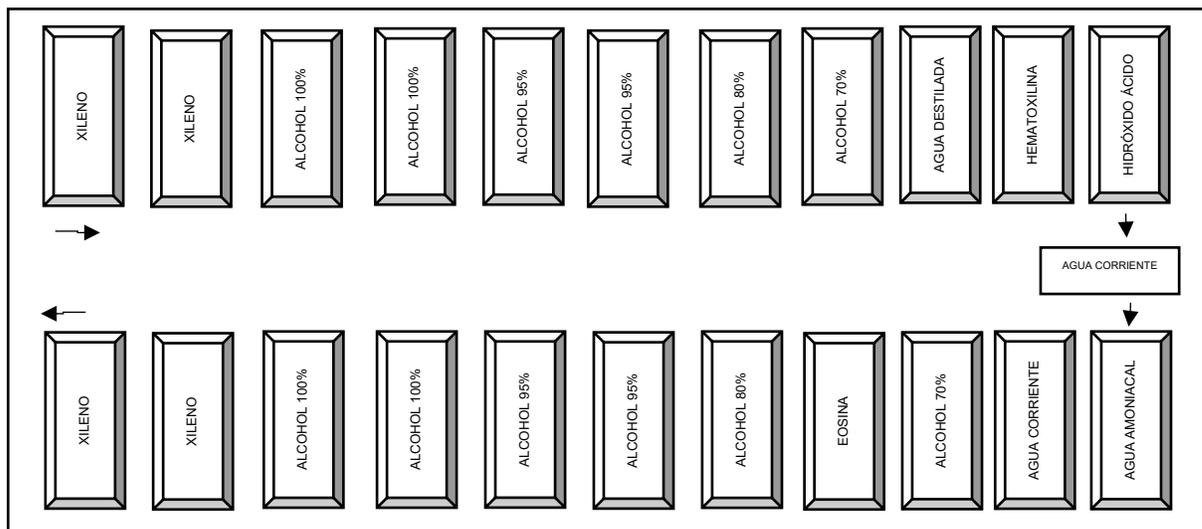
### 4.1.2 Tinción de Hematoxilina-Eosina

La hematoxilina, un colorante natural, fue usada por primera vez en 1863. El agente colorante activo, la hemateína se forma por la oxidación de la hematoxilina. Los contrastes de color para cada estructura se describen en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Coloración de la tinción HE. Tomado de: Prophet et al. (1995).

Tipo de Tejido	Coloración
Tejido conectivo (fibras)	rosa claro
Tejido muscular	rosa intenso
Tejido nervioso	rosa pálido
Eritrocitos	naranja o rojo

**Tren de tinción:** para la tinción se seguirá la metodología establecida por Prophet et al. (1995), una vez fijadas las muestras en el portaobjetos se colocarán en el tren de tinción según la metodología establecida por. Una vez que se hace el corte histológico, se fijan en parafina con agua destilada y posteriormente se llevan al tren de tinción de acuerdo con la Fig. 11, que se muestra a continuación:



**Figura 11.** Secuencia de tinción. Tomado y modificado de: Prophet et al. (1995).

#### **4.1.3 Tinción de Tricrómica de Masson**

Preparación de la muestra: se obtuvieron cortes de 6 micrones los cuales se desparafinan e hidratan en agua destilada. Primero se fijan en líquido de Bouin durante 1 h a 56-60°C, se enfrían y lavan en agua destilada para quitar el color amarillo. El teñido con hematoxilina férrica se realizó durante 10 min y se lavó en agua destilada durante 10 min. Luego, se realizó un teñido con la solución de escarlata fucsina ácida durante 2-5 min y se lavó con agua destilada. A continuación, se trató con la solución de ácido fiosfomolíbdico-fosfotúngstico durante 10-15 min y luego se realizó teñido con azul de anilina 15 min. Se lavó en agua destilada, deshidrató en el tren de tinción y se dejaron en xileno para posteriormente montar las muestras en un portaobjetos (Prophet et al., 1995). La interpretación de los resultados se basa en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Interpretación de Tricrómica de Masson. Tomado de: Prophet et al. (1995).

<b>Tipo de Tejido</b>	<b>Coloración</b>
Tejido conectivo (fibras colágenas)	azul intenso o verde de acuerdo con el contraste utilizado
Tejido muscular	rojo intenso
Tejido nervioso	grisáceo
Eritrocitos	rojos
Núcleos	de verde a violeta

#### 4.1.4 Tinción con Azul de Alcian pH 2.5

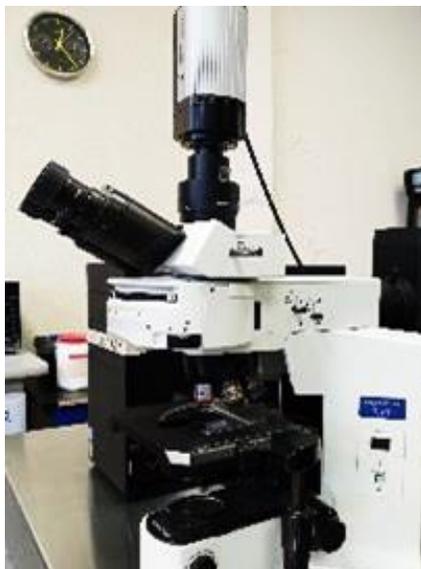
La Tinción con Azul Alcian pH 2.5, el cual se realiza con rojo núcleo-resistente (Nuclear Fast Red solution N3020 Sigma Aldrich). (Lev & Spicer, 1964).

Las soluciones que se emplean para dicha tinción son: Azul Alcian 8GX, Solución de ácido acético al 3% y una solución de rojo núcleo-resistente (Kernechtrot). El azul de alciano al pH referido, colorea las mucinas, partes sulfatadas y ácido hialurónico (HA) de color azul (Prophet et al., 1995). La interpretación de los resultados se realizó según la Tabla 8.

**Tabla 8.** Interpretación de Azul de Alcian pH 2.5. Tomado de: Prophet et al. (1995).

<b>Tipo de Tejido</b>	<b>Coloración</b>
Mucinas sulfatadas ácidas débiles, ácido hialurónico y mucina salivar	Azul oscuro
Núcleos	De rojo a rosado
Citoplasma	Rosado pálido

Una vez que las muestras fueron procesadas y teñidas con los métodos de HE, Azul Alcian pH 2.5, Tricrómica de Masson o Verhoeff, las preparaciones histológicas se observaron en un microscopio compuesto de campo claro con los objetivos de 4,10, 40 y 100X (ver Fig. 12). Se obtuvieron imágenes con una cámara digital y se procesaron con el Software Image Pro® Express v.6.0 (Media Cybernetics).



**Figura 12.** Microscopio (Olympus™, Mod. BX-41, Waltham, MA). Cámara (Evolution VF™, Media Cybernetics, Rockville, MD). Software Image Pro® Express v.6.0 (Media Cybernetics).

### **4.1.5 Análisis proximal de las crestas de *Gallus gallus domesticus***

Las técnicas con las que se trabajó para el análisis químico proximal, en este estudio son métodos oficiales de la AOAC (Asociation of Official Analytical Chemists). Se reporta el número de metodología de cada técnica. Los análisis proximales para las crestas de pollos de engorda se analizaron con una muestra representativa de manera indistinta para determinar: humedad (925.10), cenizas (923.03), proteína (960. 52) y grasa (920. 39) (AOAC, 1990).

### **4.1.6 Determinación de humedad**

La determinación se realizará por el método de sólidos totales y humedad 925.10 AOAC (AOAC, 1990), empleando un horno de secado y se basa en una determinación gravimétrica en la que se obtiene la diferencia de pesos de una muestra antes y después de secarla en un horno a una temperatura constante de 130 °C durante 1 h.

### *Preparación de la muestra*

En un vidrio de reloj a peso constante, se pesan 2 g de muestra homogénea y se colocan en el horno evitando el contacto directo con las manos dejando secar 1 h manteniendo la temperatura a  $130 \pm 1$  °C (el período de secado de 1 h comienza cuando la temperatura del horno se estabilice a 130 °C). Al finalizar se transfiere al desecador, dejando enfriar durante 30 min y se pesó en una balanza analítica (sensibilidad  $\pm 0.1$  mg) y se calculó el porcentaje de humedad por diferencia de pesos, utilizando la siguiente fórmula para hacer los cálculos.

Fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{B - A}{C} * 100$$

Donde:

B= Peso de la charola con muestra (g).

A= Peso de charola con muestra seca (g).

C= Peso muestra (g).

### **4.1.7 Determinación de cenizas**

Se realizará por método de incineración, método oficial de la AOAC 923.03 (AOAC, 1990) empleado una mufla (Mufla, Felisa®, MOD-FE,70886). Su principio se basa en una determinación gravimétrica en la que se saca la diferencia del peso inicial de la muestra menos el peso que se obtiene al final después de realizar una carbonización e incinerado. Para su determinación se siguieron los siguientes pasos:

### *Preparación de la muestra*

Se colocan los crisoles de porcelana en un horno (Horno de convección, CRAFT®) y se llevaron a peso constante a 130 °C durante una hora. Se dejaron enfriar durante media hora en el desecador y se tomaron el peso en una balanza analítica. En un vidrio de reloj se colocan 6 g de muestra a peso constante durante una hora a 130 °C, se deja enfriar durante media hora en el desecador y se toma el peso en una balanza analítica. Una vez secos los crisoles y la muestra, se manipularon con pinzas para evitar la contaminación.

**Procedimiento:** en un crisol de porcelana a peso constante se pesaron 5 g de muestra y se realizó una carbonización con mechero bunsen y pinzas para crisol en el interior de una campana de extracción de humos, para después llevar a incineración en la mufla a 525 °C durante 5 h. Al término de este tiempo se disminuyó la temperatura a 200 °C y se pasaron las muestras a un desecador para dejar enfriar durante 1 h. Finalmente, se tomó el registro de peso de cada una, en una balanza analítica obteniendo el porcentaje de cenizas por diferencia de pesos.

Fórmula:

$$Cenizas = \frac{A - B}{C} * 100$$

Donde:

**A:** Peso de crisol con muestra seca (g).

**B:** Peso de crisol con ceniza (g).

**C:** Peso de la muestra seca (g).

### 4.1.8 Determinación de nitrógeno total por método Kjeldahl

Método oficial de la AOAC 991.20 (AOAC, 1990), con algunas modificaciones adaptadas a los equipos de digestión y destilación. Su principio es en general el procedimiento de referencia de Kjeldahl que determina la materia nitrogenada total, y basándose en la digestión de la muestra en ácido sulfúrico para reducir el nitrógeno orgánico hasta amoniaco, el cual queda en forma de sulfato de amonio.

Concluida la digestión, se alcaliniza y se destila de manera directa o bien por un arrastre con vapor para desprender el amoniaco y es atrapado en una solución ácida y titulado automáticamente por el equipo.

#### *Preparación de la muestra*

Se pesa aproximadamente 1 g de muestra y se lleva a peso constante colocándola 1 h a 130°C en un horno de secado (Horno de convección, CRAFT®). Una vez transcurrida la hora, se retirará del horno y se deja enfriar durante media hora en un desecador, se toma el peso en una balanza analítica y se colocará en el tubo de digestión junto con una tableta catalizadora (compuesta de 5 g de sulfato de potasio, 0.5 g de sulfato de cobre), la cual se manipula con pinzas evitando contaminarla con las manos. Se adicionan 5 mL de agua destilada y 15 mL de ácido sulfúrico (98%, libre de nitrógeno). Se colocan en los tubos 5 perlas de ebullición, se precalienta el digestor a 230 °C. Un blanco es trabajado junto con todo el proceso.

#### *Procedimiento*

*Digestión:* para este proceso se utilizó la unidad de digestión, Büchi, Speed Digester Mod. K-436. Sistema de neutralización, Büchi. Mod. Scrubber K-415, Alemania.

Una vez que el digestor alcanza la temperatura de 230 °C, se colocan los tubos de digestión y se conectan al sistema de neutralización, verificando que los gases

formados sean neutralizados con la solución de NaOH al 10% para lo cual se encenderá el equipo de neutralización. Se mantiene a la misma temperatura durante 30 min. Una vez que transcurrió el tiempo, se eleva a 260 °C la temperatura y se deja por 5 min, verificando que no haya formación excesiva de espuma para incrementar hasta 300 °C durante 5 min y después llevar a 400 °C por 20 min. Al observar un tono verde esmeralda en el fondo de los tubos, se aumentará la temperatura a 405 °C durante 30 min. Una vez terminada la digestión, se retiran los tubos de digestión y se dejarán enfriar a temperatura ambiente sin desconectar del sistema de neutralización debido a que la liberación de gases aún es elevada.

*Destilación:* una vez enfriados los tubos, se colocan en el destilador automático (el equipo Büchi, Unidad de destilación, Mod. K-350, Alemania), el cual es programado para realizar la destilación de amoniaco adicionado automáticamente H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> al 3% (pH= 4.6-4.7) y la titulación con HCl 0.1 N. Posteriormente, se registrará el porcentaje de nitrógeno obtenido por el propio equipo.

Fórmula:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{(\text{mL de HCL}) \times (\text{Normalidad de HCl}) \times 0.014}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

$$\% \text{ de proteína} = \% \text{ de Nitrógeno} \times 6.25$$

Esta determinación no incluye el nitrógeno inorgánico y existen factores establecidos por la FAO/OMS para la conversión de nitrógeno a proteína cruda, que para el caso de las crestas de *Gallus gallus domesticus* es de 6.25 (Ref.).

### 4.1.9 Determinación de extracto etéreo

La determinación se realizó por la técnica de extracción de Soxhlet. Método oficial de la AOAC 920.25 (AOAC, 1990) con algunas modificaciones al equipo empleado: Unidad de Extracción, BÜCHI. Mod. E-816, Alemania de sistema de extracción BÜCHI. Su principio, se basa en la extracción directa con un solvente, donde el mejor agente es el éter de petróleo, finalmente se somete a secado en horno durante 30 min para determinar la grasa total extraída.

#### *Preparación de la muestra*

De las muestras de humedad se tomaron 3 g aproximadamente de muestra a peso constante durante 1 h a 130 °C, en un horno para secado. Se dejará enfriar en el desecador durante 30 min y se tomará el peso en una balanza analítica. Para esta técnica se utilizan dedales de extracción para Soxhlet Whatman (dimensiones 80 x 22 mm) los cuales se llevaron a un horno para secado durante 1 h a 130 °C, se dejarán enfriar por 30 min en el desecador y se registró su peso en la balanza analítica.

**Procedimiento:** se pesan 5 g de muestra a peso constante y se colocaron en los dedales de extracción a peso constante. Se colocaron 120 mL de éter de petróleo en los reservorios de solvente y se sometió a 2 h de arrastre por solvente. Se programa en el equipo una sesión de lavado y otra de secado con duración de 10 min cada una, según especificaciones del fabricante. Se secaron los cartuchos a 130 °C a peso constante durante 1 h en un horno (Horno de convección, CRAFT®), dejando enfriar en el desecador por un lapso de 30 min a temperatura ambiente. Al final se registró el peso en una balanza analítica.

Fórmula:

$$\% \text{ de Extracto etéreo} = \frac{B - A}{C} * 100$$

Donde:

**A:** Peso constante del vaso BÜCHI (g).

**B:** Peso final del vaso BÜCHI desgrasado (g).

**C:** Peso de la muestra seca (g).

## **4.2 Etapa II: Proceso de extracción y purificación**

Reactivos: acetato de sodio anhidro, Química Meyer® y ácido acético glacial, Química Meyer®, acetona, Química Meyer®, Hexano, Química Meyer®. Cuantificación de ácido hialurónico: Reagent Carbazol, Sigma Aldrich®, Alcohol absoluto, Química Meyer®, Sal sódica de ácido hialurónico de cresta de gallo, polisacárido de glicosaminoglicano aviar (Hyaluronic acid sodium salt from rooster comb H5388-100 mg), Tetraborato de Sodio Decahidratado, Química Meyer®, Ácido sulfúrico concentrado 98%, Química Meyer®. Materiales de extracción: se emplearon 2 soluciones; acetato de sodio 5% y ácido acético 0.5 M. Para la extracción, se usaron parrillas de agitación marca Joanlab®, vasos de precipitado (100 mL), manta cielo, colador chico de plástico, probeta (100 mL), tazas de medición (250 mL), envases de plástico con tapa.

### **4.2.1 Acondicionamiento**

El proceso inicia con la recolección de las cabezas del mercado local las cuales se pesaron en una báscula Torrey PCR. Posteriormente, se separaron las crestas de las cabezas para realizar el lavado quitando impurezas (plumas y sangre). Seguido esto, las crestas fueron almacenadas a -18 °C en un refrigerador marca Mabe.

Este método se extraerá utilizando un método similar al informado por Boas (1949), Hafsa et al. (2017) y Kang et al. (2010) con algunas modificaciones.

**Preacondicionamiento crestas frescas (CF):** el descongelamiento de las muestras a 25 °C. Posteriormente, estas se picaron y pesaron 10 g por triplicado. Dichas muestras se desengrasaron en acetona proporción 1:2 en 3 tiempos con cambios cada 24 h a 4 °C. Finalmente, se evaporaron los solventes a una temperatura de 30 °C durante 6 h.

**Preacondicionamiento crestas secas (CS):** el descongelamiento del lote las muestras fueron a 25 °C. Posteriormente, estas se picaron con un molino de mano Marca, Modelo. Dicho lote se inició colocando las crestas a 50 °C en un horno de secado y después se desengrasó en acetona proporción 1:2 en 2 tiempos con cambios cada 24 h a 4 °C. Posteriormente, se colocó en la misma proporción hexano durante 6 h más en las mismas condiciones de refrigeración. Se evaporaron el solvente a una temperatura de 50 °C durante 2 h. Finalmente, las muestras se pesaron con 10 g aproximadamente para cada tratamiento.

### 4.2.2 Extracción por método tradicional (MT)

Una vez que se evaporaron los solventes de las crestas, éstas se colocaron en vasos de 100 mL con una proporción 1:2 según el tipo de solvente: acetato de sodio 5% y ácido acético 0.5 M.

Se realizaron cambios cada 24 h para cada solvente y las colectas se fueron vaciando en cada recipiente (500 mL) que se almacenaron en condiciones de refrigeración.

### 4.2.3 Extracción asistida por ultrasonido de alta intensidad (UAI)

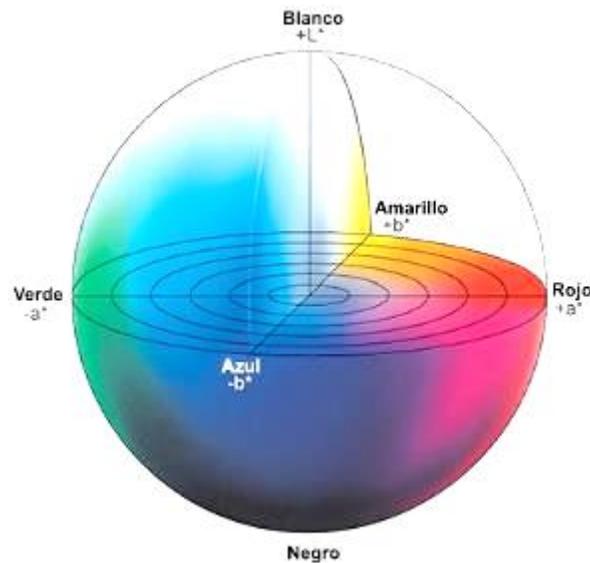
Se siguió la metodología de Lanfranco and Davide (2000) y Akram and Zhang (2020) con algunas modificaciones. El proceso inicio con el pesado de 10 g de crestas frescas picadas las cuales se desengrasaron con acetona en una proporción 1:2 y fueron sometidas en un baño ultrasónico durante 30 min en tubos de centrifuga de 50 mL. Se retiró el solvente y las muestras se colocaron en un horno para evaporar los residuos de acetona durante 6 h a 30 °C.

Cada muestra se colocó en tubos de centrifuga de 50 mL se colocó cada solvente (1:2 solución acetato de sodio 5% ácido acético 0.5 M). Dichos tratamientos, se sometieron a 3 tiempos diferentes (30, 60 y 120 min) en un baño ultrasónico a 40 Hz con 120 Volts de potencia. Una vez terminado este proceso, las crestas fueron filtradas y prensadas de cada tubo para extraer la mayor parte líquida. Finalmente, los extractos fueron colocados nuevamente en tubo centrifuga y se almacenaron a 4 °C en un refrigerador Mabe.

### 4.3 Etapa III: Caracterización del ácido hialurónico

#### 4.3.1 Colorimetría

El sistema  $L^* a^* b^*$  fue desarrollado en 1948 por Hunter. Hunter Lab tiene una superficie uniforme de color definida por tres coordenadas rectangulares:  $L^*$ (luminosidad) donde indica que 0 es el negro y 100 es el blanco. Para el parámetro  $a^*$  (rojo-verde), los valores positivos son para el color rojo y los negativos para el color verde y 0 el neutro, finalmente el parámetro  $b^*$  (eje amarillo-azul) indica valores positivos para amarillo, valores negativos para azul y 0 el neutro (ver Fig. 13) (Delgado et al., 2017; Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014).



**Figura 13.** Plano Tridimensional del Modelo de Color CIE L \*A \*B. Tomado de: Delgado, Herrera-Guillén, Medina Barragan, and Corredor–Gómez (2017).

Debido a las necesidades de emplear sistemas prácticos para medir este parámetro, aparecieron los colorímetros Hunter Lab frente a los espectrofotómetros convencionales para medir los parámetros  $L^*$   $a^*$   $b^*$  (Delgado et al., 2017; Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014). Los colorímetros están basados en la visión del ojo humano y los colorímetros son dispositivos con 3 filtros para cada longitud de onda: filtros rojo, verde y azul. De esta manera, así se simula la percepción del ojo humano al color y la luz resultando ser herramientas de menor costo (Fig. 14).

Para la determinación de color, se tomaron muestras con un colorímetro (ver Figura 14) (MINOLTA CM-2002 SPECTROPHOTOMETER). Los parámetros del espacio de color CIEL  $L^*$   $a^*$   $b^*$ , se obtuvieron mediante un colorímetro (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014).



**Figura 14.** Colorímetro MINOLTA CM-2002 SPECTROPHOTOMETER.

Estos parámetros se calculan mediante las siguientes fórmulas:

$$(Ec. 1) \Delta L^* = L_m^* - L_{ref}^*$$

$$(Ec. 2) \Delta a^* = a_m^* - a_{ref}^*$$

$$(Ec. 3) \Delta b^* = b_m^* - b_{ref}^*$$

Asimismo, con los mismos parámetros se calculó  $\Delta E$ , la que se indica la diferencia de color ( $\Delta E$ ) entre dos muestras es la distancia que existe en el espacio (X, Y, Z) de los puntos que indican el color de las muestras mediante el teorema de Pitágoras (Ec. 4) (Delgado et al., 2017; Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014). Calculándose así en la ecuación:

$$(Ec. 4) \Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Donde:

$\Delta$  representa la diferencia y E (Empfindung que significa “sensación” definiendo la cuantificación de una diferencia de color.

### 4.3.2 Medición de pH

Se realizó de acuerdo con la metodología descrita en la literatura (NOM-F-317-S-1978). El pH de los procesos se midió utilizando un potenciómetro, que se calibró con tampón de pH 7 y pH 4. Una vez obtenidos los productos liofilizados obtenidos de la extracción, se prosiguió a caracterizar y determinar su peso molecular, viscosidad, pH, contenido de proteína, contenido de ácido glucurónico, temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión.

Control 1: polisacárido de glicosaminoglicano aviar sal sódica de ácido hialurónico de cresta de gallo (cod. H5388-100 mg, Sigma Aldrich).

La medición del pH se realizó según la metodología descrita en la literatura NOM-F-317-S-1978 (1978) utilizando un potenciómetro (ver Fig. 15). El pH de los procesos se medirá utilizando un potenciómetro, que se calibrará con tampón de pH 7 y pH 4. El monitoreo de pH para los extractos de los tratamientos, se realizó utilizando un potenciómetro Oakton 550 con sonda.



**Figura 15.** Monitoreo de pH para los extractos de los tratamientos, se realizó utilizando un potenciómetro Oakton 550 con sonda.

### 4.3.3 Cuantificación de ácido hialurónico: método de carbazol

Bitter and Muir (1962), argumentan que la reacción de los ácidos urónicos con carbazol, es uno de los métodos más satisfactorios para estimar polisacáridos y proteoglicanos durante los procesos de extracción y purificación de varios órganos, tejidos, así como medir cuantitativamente glicosaminoglicanos utilizados como fármacos para determinar ácidos urónicos en métodos cromatográficos. En este caso, el contenido de HA se determinó midiendo la concentración de ácidos urónicos, utilizando una reacción mediante el ensayo de carbazol Cesaretti, Luppi, Maccari, and Volpi (2003), Srisantisaeng et al. (2013) y Da Rosa et al. (2007), con las modificaciones correspondientes.

**Curva estándar:** se empleó un estándar de HA Sigma Aldrich® que se empleó para preparar una solución madre con solvente acetato de sodio 5% y ácido acético 0.5 M donde se establecieron 5 concentraciones (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 mg/mL) las cuales fueron aforadas a 1 mL.

**Reacción de carbazol:** Se tomaron 665  $\mu$ L (dilución de la solución madre/tratamientos), posteriormente se colocó ácido sulfúrico con tetraborato de sodio 0.125 M. Se realizaron calentamientos a 100 °C durante 10 min, y posteriormente un enfriamiento de 15 min. Se agregó el reactivo de carbazol 0.125% y nuevamente se volvió a someter a calentamiento (durante 10 min). Una vez enfriadas las muestras, se prosiguió a enfriar realizar las lecturas de las muestras a 530 nm en un espectrofotómetro 6715 UV-VIS JENWAY empleando celdas de cuarzo.

### 4.3.4 Concentración de proteína

La concentración de proteína refleja la pureza del polímero, aunque es importante mencionar que es imposible eliminar por completo todas las proteínas extrañas, pero la mayoría de la literatura de productos afirma tener niveles muy bajos o mínimos de proteína y el contenido de proteína de los procesos de extracción (Akram & Zhang, 2020).

De las muestras filtradas, se cuantificó el contenido de proteína en el NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies) Spectrophotometer V3.8. Software Nanodrop 1000 3.8, Programa A-280. para la medición de proteínas purificadas (ThermoScientific, 2010).

Se emplearon 2  $\mu$ L de la muestra por cada tratamiento por triplicado. Controlado por el software Spectrum 10.4.2 (Perkin Elmer Ltd, Bucks, Reino Unido). En este caso, se empleó el Software Nanodrop 1000 3.8, Programa A-280, para la medición de proteína purificada. Se utilizaron 2  $\mu$ L de la muestra por cada tratamiento por triplicado (ver Fig. 16).



**Figura 16.** NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies) Spectrophotometer V3.8.

### 4.3.5 Análisis espectral UV-VIS

El ácido hialurónico absorbe al máximo a una longitud de onda de 190-200 nm (Kulkarni et al., 2018). Utilizando celdas de cuarzo con dimensiones de 1 cm de ancho a una temperatura de 15 °C. En la Figura 17, muestra el análisis espectral UV-Vis se realizó utilizando un espectrofotómetro Cary 8454 UV-Vis Diode Array System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU., para confirmar que los extractos obtenidos existe presencia de ácido hialurónico, de acuerdo con el patrón de absorción de ácido hialurónico comercial y lo indicado por la literatura (Da Rosa et al., 2007).

**Control:** polisacárido de glicosaminoglicano aviar sal sódica de ácido hialurónico de cresta de gallo (Cod. H5388-100 mg, Sigma Aldrich).

**Muestras:** Extractos purificados, métodos de extracción (MT y UAI).



**Figura 17.** Espectrofotómetro, Mod Cary 8454. UV-VIS Diode Array System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.).

### 4.3.6 Espectroscopía FT-IR

En la Figura 18, se muestra el Espectrómetro FT-IR Frontier SP8000 (Perkin Elmer) empleado, controlado por el software Spectrum 10.4.2 (Perkin Elmer Ltd, Bucks, Reino Unido). Los grupos funcionales, se identificaron utilizando el Perkin Elmer Spectrum Two ATR-FTIR, sobre el número de onda que va desde 4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$  (Hafsa et al., 2017).

**Control:** polisacárido de glicosaminoglicano aviar sal sódica de ácido hialurónico de cresta de gallo (cod. H5388-100 mg, Sigma Aldrich).

**Muestras:** Extractos purificados, métodos de extracción (MT y UAI).



**Figura 18.** Espectrómetro FT-IR Frontier SP8000 (Perkin Elmer). Controlado por el software Spectrum 10.4.2 (Perkin Elmer Ltd, Bucks, Reino Unido).

### 4.3.7 Prueba de citotoxicidad

*Método:* MTT (ensayo colorimétrico que mide la viabilidad, la proliferación y la citotoxicidad celular).

*Líneas celulares:* L929 (fibroblastos de ratón) y HaCat (queratinocitos humanos).

#### Controles

*Control 1:* polisacárido de glicosaminoglicano aviar sal sódica de ácido hialurónico de cresta de gallo (cod. H5388-100 mg, Sigma Aldrich).

*Control 2:* sal sódica del ácido hialurónico de *Streptococcus equi* (cod. 53747, Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) filtradas previamente con filtros de 0.22 µm.

#### Tratamientos

De las muestras extraídas y controles comerciales, se siguió la metodología de L. O. Alcântara et al. (2023), mediante la prueba de contacto directo según la norma ISO 10993-5:2009 (Instrumentation, 2007; Standard, 2009).

*Preparación de las muestras:* fueron previamente diluidas en PSB y filtradas a través de un filtro de jeringa de 0.22 micrómetros. Éstas se diluyeron en medio DMEM a las siguientes concentraciones: 1,0.5, 0.25 y 0.125 g/mL.

*Preparación de las células:* la prueba de citotoxicidad se realizó de acuerdo con la norma ISO 10993-5 (ISO, 2009). Los fibroblastos (L929) y los queratinocitos (HaCat) adquiridos en el Banco de Células de Río de Janeiro–BCRJ) se cultivaron en DMEM completo (suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico estreptomycin/penicilina y piruvato de sodio 1 mM (solo para Hacat)) y cuando alcanzaron el 80% de confluencia se resaltaron con tripsina-EDTA y se centrifugó a 200 xg durante 6 min a 25 °C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en DMEM nuevamente.

La densidad celular se ajustó a  $6 \times 10^4$  células/mL, utilizando el método de exclusión de azul tripano (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) para realizar posteriormente el conteo en cámara de Neubauer.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, añadiendo 100  $\mu$ L/pocillo ( $6 \times 10^3$  células/pocillo) y se cultivaron en un invernadero en condiciones estándar (37 °C, 5% de CO<sup>2</sup> y 95% de humedad) durante 24 h. Luego, se eliminó el medio de cultivo y se reemplazó con 100  $\mu$ L de cada muestra en las concentraciones de prueba: 1, 0.5, 0.25 y 0.125 g/mL, las placas se incubaron durante 24 h. Como control negativo (C-), se utilizaron células cultivadas en DMEM completo. Para evaluar la viabilidad celular, se utilizó el método colorimétrico con MTT, que en presencia de células metabólicamente viables se convierte en cristales de formazán, un compuesto de color púrpura con una densidad óptica de 570 nm.

Después de 24 h de tratamiento, se extrajo el contenido de los pocillos y se lavó con solución salina tampón fosfato (PBS) pH 7.4. Luego, se agregaron 100  $\mu$ L de solución de MTT al 10% (el MTT se diluyó en DMEM completo). Las placas se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar durante 4 h. Se descartó el contenido de los pocillos y se agregaron 100 microlitros de ~98% DMSO/pocillo para disolver los cristales de formazán que surgen de la reducción de MTT por las enzimas deshidrogenasas mitocondriales. La absorbancia de los pocillos se midió en un lector de microplacas (SpectraMax i3x, Molecular Device, Sunnyvale, EE. UU.) a 570 nm a una longitud de 570 nm.

El porcentaje de viabilidad celular (VC) se calculó mediante la ecuación:

$$VC (\%) = \frac{Abs570_{muestra}}{Abs570_{control}} \times 100$$

Donde:

**VC:** % viabilidad celular.

**Abs570<sub>muestra</sub>:** lectura de absorbancia a 570 nm.

**Abs570<sub>control</sub>:** lectura de absorbancia a 570 nm.

### 4.3.8 Actividad antioxidante

Para la determinar la capacidad antioxidante de estos extractos se evaluaron las siguientes actividades donde se prepararon soluciones madre de (estándares,

muestras a evaluar y un control de HA (*S. equi*) (4000 µg/mL), de las cuales se realizaron diluciones seriadas (4000, 2000, 1000, 500, 125, 50, 25 µg/mL).

Las actividades evaluadas (ver Tabla 9) de controles y muestras, se realizaron en placas Elisa de Poliestireno aforando cada pozo a 200 µL. Las lecturas de absorbancia, se efectuaron en un lector de placas (Molecular Devices, SpectraMax i3) (Blois, 1958; Decker & Welch, 1990; Dhongade & Chandewar, 2013; Duan, Zhang, Li, & Wang, 2006; Kato, Ninomiya, Tanaka, & Koketsu, 2016; Khatua, Roy, & Acharya, 2013; Negri, Possamai, & Nakashima, 2009; Wang, Jónsdóttir, & Ólafsdóttir, 2009).

**Tabla 9.** Actividad antioxidante evaluada en tratamientos seleccionados de MT y UAI.

<b>Actividad Antioxidante</b>	<b>Estándar (25 µg/mL- 4000 µg/mL)</b>	<b>S. equi (25 µg/mL- 4000 µg/mL)</b>	<b>Tratamientos HA</b>
a) Capacidad secuestrante del radical estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) 517 nm	Ácido ascórbico	Control	1: TCF-AA4Dc 2: TCF-AA8Dc 3: UCF-AA30c
b) Actividad quelante de los iones ferrosos (FIC) 562 nm	EDTA		4: UCF-AA60c 5: UCF-AA120c
c) Poder Antioxidante Reductor Férrico (FRAP) 700 nm	BHA		6: TCF-A4Dc 7: TCF-A8Dc
d) Inhibición del blanqueamiento del betacaroteno (BCB) 470 nm	Ácido Ascórbico		8: UCF-A30c 9: UCF-A60c 10: UCF-A120c

**4.3.8.1 Capacidad para eliminar el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)**

La capacidad depuradora del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) de los tratamientos se determinó según la metodología de Blois (1958), descrita por Duan et al. (2006), Kato et al. (2016) y Vale et al. (2019) con algunas modificaciones. En los pocillos denominados muestra se agregaron por separado 10 µL de cada muestra de ácido hialurónico (M1 a M10) y estándar *S. equi.*, y 190 µL de solución metanólica de DPPH (D9132, Sigma) a 78 µM. En el pocillo denominado blanco de muestra se colocaron por separado 10 µL de ácido hialurónico (tratamientos) y control, y 190 µL de metanol. En el pocillo denominado control negativo o control de muestra se agregaron 190 µL de solución metanólica de DPPH (D9132, Sigma) a 78 µM y 10 µL de metanol. Se utilizó ácido L-ascórbico (A5960, Sigma), un flavonoide natural, como control positivo, en concentraciones de 25, 50, 125, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 µg/mL, tratándose a las muestras de manera idéntica.

La microplaca de poliestireno de 96 pocillos denominada muestra, blanco de muestra, control negativo y control positivo se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad. Luego, las absorbancias se controlaron a 517 nm (Biochrom Asys,

modelo UVM 340). La capacidad de eliminación de radicales DPPH de las muestras y el control positivo, expresada como porcentaje, se calculó utilizando la siguiente ecuación y se presentó como media  $\pm$  desviación estándar, con dos decimales.

$$DPPH (\%) = \frac{[Abs_{Control\ Negativo} - (Abs_{Muestra} - Abs_{Blanco})]}{Abs_{Control\ Negativo}} \times 100$$

### 4.3.8.2 Poder de quelación de iones ferrosos (FIC)

La determinación del poder quelante de los iones ferrosos (FIC) se basó en Decker and Welch (1990), Sousa (2017) Vale et al. (2019), descrito por Wang et al. (2009).

En el tubo llamado muestra, que contiene, por separado, 100  $\mu$ L de cada muestra de ácido hialurónico (M1 a M10) y estándar *S. equi.*, por separado, 135  $\mu$ L de agua destilada, 5  $\mu$ L de cloruro ferroso ( $FeCl_2$ ) a 2 mM y 10  $\mu$ L de ferrozina 5 mM. En el tubo llamado blanco de la muestra se reemplazó la ferrozina por agua destilada, mientras que en el tubo llamado control negativo o control de muestra se reemplazó el volumen de muestra por agua destilada. Como control positivo se utilizó sal disódica etilendiaminotetraacética (EDTA) ( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ –E5134, Sigma) en concentraciones 25, 50, 125, 250, 500, 1000, 2000 y 4000  $\mu$ g/mL, siendo tratada de forma idéntica a las muestras. Todos los tubos (tratamiento, blanco, control negativo y control positivo) se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y las absorbancias se controlaron a 562 nm (Biochrom Asys, modelo UVM 340).

El poder de quelación del ión ferroso (FIC) de las muestras y del control positivo, expresado como porcentaje, se calculó mediante la Ecuación 2, presentándose como media  $\pm$  desviación estándar, con dos decimales.

$$FIC (\%) = \frac{[Abs_{Control\ Negativo} - (Abs_{Muestra} - Abs_{Blanco})]}{Abs_{Control\ Negativo}} \times 100\%$$

#### 4.3.8.3 Potencia de reducción de iones férricos (FRAP)

El poder reductor del ion férrico (FRAP) se determinó según la metodología descrita por Khatua et al. (2013), Sousa (2017) y Vale et al. (2019) con algunas modificaciones. Al tubo que contenía 100  $\mu$ L de muestras de ácido hialurónico (M1 a M10) y *S. equi* estándar, por separado, se agregaron 250  $\mu$ L de tampón fosfato 0.2 M (pH 6.6) y 250  $\mu$ L de ferricianuro de potasio al 1%. Los tubos se incubaron en baño maría a 50 °C durante 20 min, donde tuvo lugar la reacción.

Después de la incubación y enfriamiento del tubo, la reacción se detuvo agregando 250  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, bajo agitación vigorosa. El tubo se centrifugó a 9.280 x g durante 5 min. Luego, se retiraron 250  $\mu$ L de la capa superior de la mezcla de reacción y se transfirieron a un tubo limpio, al que se agregaron 250  $\mu$ L de agua destilada y 50  $\mu$ L de cloruro férrico ( $FeCl_3$ ) al 0.1%. Los tubos se agitaron y se extrajeron de ellos alícuotas de 200  $\mu$ L, que se transfirieron a una microplaca de poliestireno de 96 pocillos. La absorbancia se controló a 700 nm (Biochrom Asys, modelo UVM 340). Como control positivo se utilizó butilhidroxianisol (BHA, B1253, Sigma) en concentraciones de 25, 50, 125, 250, 500, 1000, 2000 y 4000  $\mu$ g/mL, tratándose las muestras de forma idéntica. Los resultados del FRAP se presentaron con tres decimales, debido a que correspondieron a las lecturas de absorbancia a 700 nm, generadas por el lector utilizado en este trabajo (Biochrom Asys, modelo UVM 340). Cuanto mayor sea la absorbancia de las muestras y del control positivo, mayor será el poder de reducción del ion férrico (FRAP).

#### 4.3.8.4 Actividad inhibidora del blanqueo del $\beta$ -caroteno (BCB)

La actividad inhibidora del blanqueo del  $\beta$ -caroteno (BCB) de las muestras analizadas se determinó en microplacas de poliestireno de 96 pocillos, utilizando el sistema de  $\beta$ -caroteno y ácido linoleico (Duan et al., 2006; Sousa, 2017; Vale et al., 2019). Inicialmente, se transfirió una alícuota de 4 mL de una solución de  $\beta$ -caroteno (C9750, Sigma), preparada en cloroformo a una concentración de 1 mg/mL, a un matraz que contenía 40 mg de ácido linoleico (L1376, Sigma) y 400 mg de Interpolación 40 (P1504, Sigma). En otro matraz se colocaron 4 mL de cloroformo, 40 mg de ácido linoleico y 400 mg de Tween 40. El cloroformo se evaporó de ambos matraces en un rotavapor (Fisatom, modelo 802) bajo presión y luego se agregaron lentamente al residuo semisólido 100 mL de agua destilada saturada con oxígeno, bajo agitación vigorosa durante 1 min hasta que se formó una emulsión estable. La primera se denominó emulsión con  $\beta$ -caroteno (EC $\beta$ ), y la segunda, emulsión sin  $\beta$ -caroteno (ES $\beta$ ), que se utilizó en el blanco de la muestra. En las microplacas se prepararon pocillos llamados tratamiento (que contienen 50  $\mu$ L de los tratamientos de ácido hialurónico y control, por separado, (+200  $\mu$ L de EC $\beta$ ), blanco (50  $\mu$ L de tratamiento de ácido hialurónico (tratamientos de HA) y estándar *S. equi*, por separado, + 200  $\mu$ L de ES $\beta$ ) y control negativo (50  $\mu$ L de MeOH + 200  $\mu$ L de EC $\beta$ ).

Las microplacas se dejaron en la mesa, a temperatura ambiente (20-23°C), y se monitorearon las absorbancias a 470 nm (Biochrom Asys, modelo UVM 340) en el tiempo inicial (0 min) y en intervalos de 30 min. hasta completar 420 min (tiempo final). Después de 24 h de exposición a la luz, se leyeron nuevamente las placas y se registró la actividad. Se utilizó ácido L-ascórbico (A5960, Sigma), en concentraciones de 25,

50, 125, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 µg/mL como control positivo, tratándose las muestras de manera idéntica.

La actividad inhibidora del blanqueo del β-caroteno (BCB), es decir, la actividad protectora sobre el β-caroteno, de los tratamientos analizados y el control positivo, se calcularon utilizando la Ecuación 3 (Dhongade & Chandewar, 2013) y los resultados, expresaron como porcentaje, se presentaron como media ± desviación estándar, con dos decimales.

$$BCB (\%) = \left( \frac{Abs_{Muestra} - Abs_{Blanco \ tiempo \ final}}{Abs_{Muestra} - Abs_{Blanco \ tiempo \ inicial}} \right) \times 100\%$$

### 4.3.9 Microscopía SEM-FEG

En la Figura 18, se observa el equipo donde se llevó a cabo el análisis SEM-FEG se realizó con un equipo ZEISS Auriga (Alemania) utilizando magnitudes de 1000 a 80.000× (ver Figura 18). Se siguió la metodología según L. O. Alcântara et al. (2023), con algunas modificaciones. Previamente, todas las muestras fueron recubiertas con una fina capa de oro durante un periodo de 60´ s en un Sputter Coated BAL-TEC SCD 005 en atmósfera de argón al vacío (L. O. Alcântara et al., 2023).

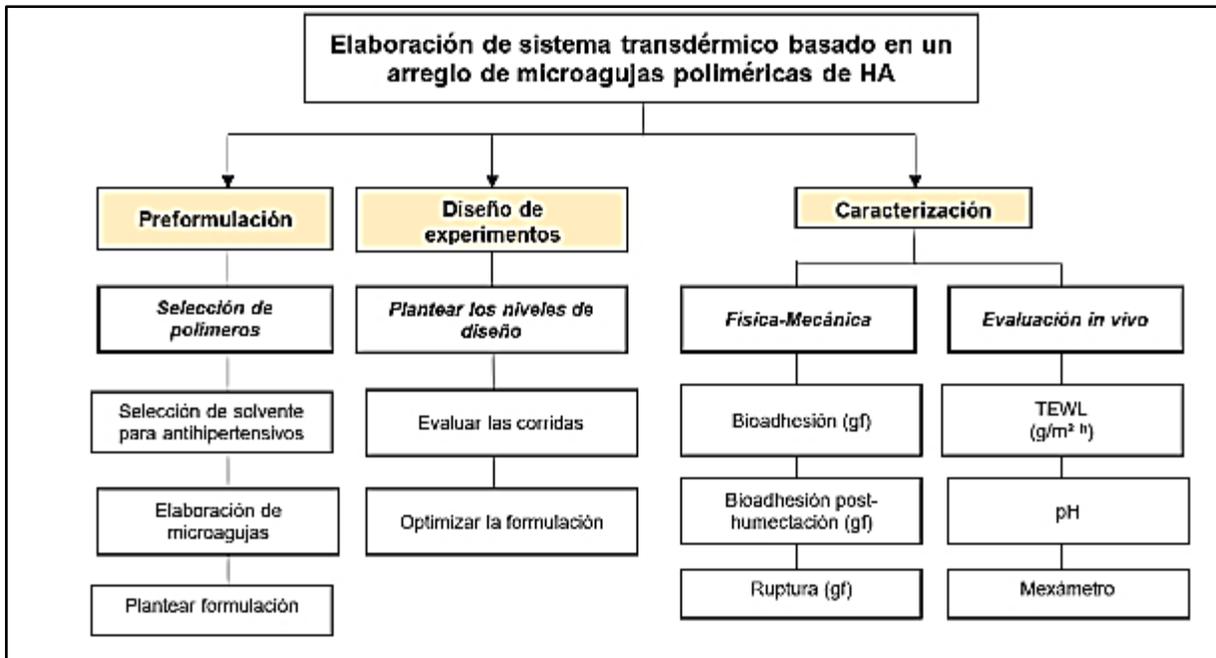
**Controles:** se utilizaron 2 controles de ácido hialurónico comercial las cuales se prepararon soluciones madre al 8% p/v: polisacárido de glicosaminoglicano aviar sal sódica de ácido hialurónico de cresta de gallo (cod. H5388-100 mg, Sigma Aldrich) y sal sódica del ácido hialurónico de *Streptococcus equi* (cod. 53747, Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) filtradas previamente con filtros de 0.22 µm.



**Figura 19.** Equipo empleado para hacer microscopía QUANTA FEG 450.

#### **4.4 Etapa IV: Elaboración de un sistema transdérmico basado en un arreglo de microagujas poliméricas**

Como se visualiza en la Fig. 20, la etapa final de este proyecto consistió primero en pruebas para colocar una formulación base. Posteriormente, esta sirvo para plantear un diseño de superficie respuesta con 17 formulaciones, basado en un compuesto central  $2^2$  estrellado que permitió encontrar una concentración idónea y óptima para cada antihipertensivo. Asimismo, se realizaron pruebas que se abordarán (físicas y químicas) para evaluar y optimizar la formulación, se realizaron nuevos arreglos de microagujas con la formulación optimizada donde se realizaron pruebas para caracterizar las propiedades. Por último, se planteó una validación del método espectrofotométrico para tener seguridad de los resultados obtenidos.



**Figura 20.** Plan de trabajo para el desarrollo del sistema transdérmico basado en un arreglo de microagujas poliméricas de HA.

### 4.4.1 Preparación del molde de microagujas en impresión 3D

De acuerdo con la metodología de Pineda, Bernad-Bernad, Rodríguez Cruz, and Escobar-Chávez (2020), los moldes empleados en este diseño se imprimieron en moldes 3D cuadrados con dimensiones de 2 x 2 cm y para las pruebas de resistencia a la ruptura donde se ocuparon moldes en forma de reloj con dimensiones de 2 x 12 cm.

La estructura maestra de las matrices de microagujas se diseñó utilizando el software SolidWorks (versión 2018 SP1.0, Dassault Systèmes SE, EE. UU.). Las piezas se imprimieron utilizando ácido poliláctico con una impresora 3D (Ender 3, Creality3D, EE. UU.). Luego, se agregó Smooth-Sil 950 (Platinum Silicones, Smooth-On, EE. UU.) en la estructura maestra y se aplicó al vacío durante 15 min. Finalmente, se secó en condiciones ambientales durante 17 h. Las piezas se separaron y el molde de silicona se utilizó para preparar las matrices de microagujas (ver Fig. 21).



**Figura 21.** Soluciones preparadas de Polyvinilalcohol (PVA), polivinilpirrolidona (PVP) y ácido hialurónico (HA).

#### 4.4.2 Formulaciones para elaboración de los parches transdérmicos

Se empleó un modelo de superficie (17 formulaciones) para encontrar la formulación óptima; el software utilizado fue Statgraphics Centurion XV (ver Tabla 10), basado en un compuesto central 2<sup>2</sup> estrellado. Se analizaron las formulaciones por cada antihipertensivo, y a partir de este diseño de superficie se obtuvo una formulación óptima para cada antihipertensivo. Estas formulaciones se caracterizaron mediante las siguientes pruebas: resistencia a la tracción o ruptura, prueba de bioadhesión, bioadhesión post humectación. La formulación óptima se caracterizó por la uniformidad del contenido de fármaco, el pH superficial, resistencia a la tracción o ruptura, prueba de bioadhesión y bioadhesión post humectación que fueron las variables de respuesta evaluadas y los factores a estudiar. Las variables fueron los porcentajes de ácido succínico y citroflex utilizados.

**Tabla 10.** Diseño experimental de las formulaciones según cada antihipertensivo (LOSAR, CAPTO, TELMI, AMLO).

LOTE	HA	PVA (%)	PVP (%)
1	0.125	1	1
2	0.0397	2	2
3	0.125	1	3
4	0.375	3	3
5	0.375	1	1
6	0.25	3.681	2
7	0.375	3	1
8	0.125	3	3
9	0.25	2	3.681
10	0.375	1	3
11	0.25	2	0.318
12	0.460	2	2
13	0.25	2	2
14	0.25	0.318	2
15	0.25	2	2
16	0.25	2	2
17	0.125	3	1

Donde: HA (ácido hialurónico), PVP (polivinilpirrolidona), PVA (acetato de polivinilo), losartán (L), captopril (CAPTO), telmisartán (TELM) y amlodipino (AMLO).

### 4.4.2.1 Reactivos

Para este diseño experimental se empleó ácido hialurónico de grado cosmético. Antihipertensivos: losartán (LOSAR), captopril (CAPTO), telmisartán (TELM) y amlodipino (AMLO). El solvente empleado para la disolución de los antihipertensivos fue Metanol (J.T Baker), Polivinilalcohol de baja (PVA) Química Meyer, Polivinilpirrolidona gylsa (PVP K29/32).

#### Preparación de soluciones:

##### Antihipertensivos

Se prepararon 4 soluciones de antihipertensivo (LOSAR, CAPTO, TELM y AMLO), los cuales se disolvieron de manera independiente disolviendo 60 mg en 8 mL de metanol con agitación durante 60 min.

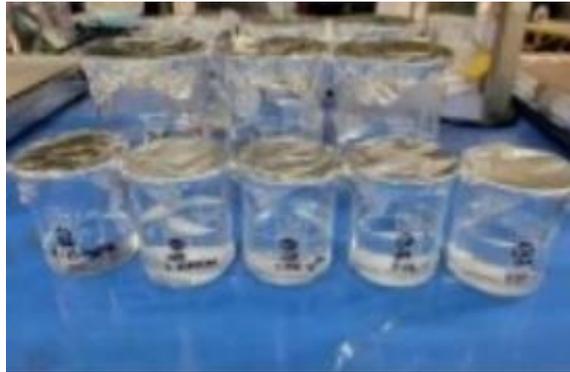
##### Polímeros

Se prepararon 5 soluciones por cada polímero, éstas se utilizaron para las mezclas del diseño experimental y por antihipertensivo.

- Soluciones de HA: 0.039%, 0.25%, 0.125%, 0.375%, 0.460%.
- Soluciones de PVA: 0.318%, 1%, 2%, 3%, 3.681%.
- Soluciones de PVP: 0.318%, 1%, 2%, 3%, 3.681%.

##### Elaboración de los arreglos de microagujas

Una vez preparadas las soluciones de polímeros, se prosiguió a realizar las mezclas con 10 mL de PVA, 12 mL de PVP y 2 mL de la mezcla en proporción 1:1 de HA con cada antihipertensivo. Cada tratamiento se mantuvo en agitación durante 30 min y se almacenaron en tubos de centrifuga (ver Fig. 22).



**Figura 22.** Soluciones preparadas de PVA, PVP y HA.

Se vertió cada la solución filmogénica en cada molde, para llevar los moldes a vacío durante 10 min, se eliminaron las burbujas y finalmente se terminó de llenar cada molde con 3 mL. El secado se llevó a cabo durante 2 días a temperatura ambiente.

Para los moldes de resistencia a ruptura; se midieron 12 mL de la solución filmogénica que fueron colocados en los moldes ya mencionados. El secado también se realizó en condiciones ambientales durante 3 días (ver Fig. 23).



**Figura 23.** Elaboración de sistemas transdérmicos: a) Equipo de vacío y b) Secado de los arreglos de microagujas en condiciones ambientales.

**Secado:** una vez que los moldes se llenaron al borde se colocaron en una barra de nivelada. Después 36 h el agua del polímero se evaporó, los arreglos de microagujas se desmoldaron cuidadosamente.

**Almacenamiento:** se colocaron en papel encerado y luego en bolsas de polietileno a 4 °C para su posterior evaluación en las pruebas mecánicas.

Se analizaron las formulaciones para obtener 4 preliminares, las cuales fueron caracterizadas realizando los siguientes tests: prueba de bioadhesión, bioadhesión posterior a la humectación y resistencia a la ruptura. Algunas otras variables complementarias fueron: TEWL, eritema, humectación, pH superficial.

Los tratamientos antes mencionados se llevaron a cabo con la finalidad de obtener formulaciones preliminares para cada antihipertensivo.

La formulación óptima se caracterizó por la uniformidad del contenido del fármaco en función de: pH superficial, resistencia a la tracción, prueba de bioadhesión y bioadhesión post-humectación.

#### 4.4.3 Caracterización de los sistemas transdérmicos con base en microagujas de HA cargadas con antihipertensivos

##### 4.4.3.1 Pruebas mecánicas: bioadhesión y bioadhesión post-humectación

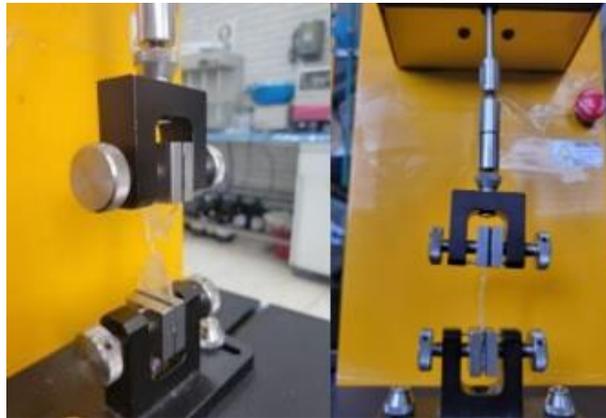
En estas pruebas mecánicas se siguió la metodología de Almazan, Castañeda, Torres, and Escobar-Chavez (2020), con algunas modificaciones, utilizando el texturómetro (Brookfield CT3 Texture Analyzer, EE.UU. con TexturePro CT Software) que tiene una celda de carga de 4500 g, utilizando la sonda cilíndrica (cilindro perplex de 1.27 cm<sup>2</sup>) y TP (0.95 cm<sup>2</sup>). Las condiciones para la prueba fueron: velocidad pre-prueba de 2 mm/s, fuerza de carga de 6.8 gf y una velocidad de 0.5 mm/s. Permitted ejercer esa fuerza sobre el antebrazo en cuestión y evaluar la bioadhesión en la superficie marcada de 2 cm x 2 cm. La bioadhesión post-humectación es similar a la bioadhesión, consiste en una prehidratación con agua destilada utilizando un hisopo sobre la superficie de la piel colocando el parche para posteriormente colocar el sistema transdérmico y efectuar la prueba anteriormente descrita (ver Fig. 24).



**Figura 24.** Equipo (Brookfield modelo CT3 Texture analyzer, USA con TexturePro CT Software) para pruebas mecánicas.

#### **4.4.3.2 Prueba de resistencia a la ruptura**

Las pruebas de resistencia se llevaron a cabo con la metodología establecida de Almazan et al. (2020) con algunas modificaciones, fue utilizado el equipo (Brookfield modelo CT3 Texture analyzer, USA con TexturePro CT Software) y se programó para obtener el punto de quiebre más alto. Se utilizaron parches en forma de reloj de arena con 10 mm de separación para la pinza de agarre superior e inferior quedando una distancia de separación de 100 mm, para determinar la fuerza con la que se rompe el parche (Fig. 25).



**Figura 25.** Equipo (Brookfield modelo CT3 Texture analyzer, USA con TexturePro CT Software) empleado para pruebas tensión a la fractura.

#### 4.4.3.3 Pruebas complementarias de los sistemas transdérmicos *in vivo*

Las pruebas complementarias se llevaron a cabo siguiendo la metodología de Serrano-Castañeda et al. (2023) con modificaciones, donde en trabajos previos también han sido evaluadas las variables de respuesta los cuales son indicadores para observar los cambios en la piel durante su aplicación. De esta manera, dichos métodos de penetración cutánea también son utilizados en otros laboratorios a nivel mundial con la intención de evaluar los cambios que pueden generar en la barrera de permeabilidad y estructuras de la piel (ver Fig. 26).

- **Pérdida de agua transepidérmica (TEWL):** parámetro indispensable para analizar la función barrera de la piel. La base de este proceso es la difusión de agua en el estrato córneo. La medición de TEWL permite evaluar la función de barrera intrínseca del estrato córneo.
- **Eritema:** El enrojecimiento y la hinchazón son síntomas de enfermedades en piel. Los dermatólogos realizan la prueba de eritema para diagnósticos clínicos así como pruebas de alergia, mediciones de melanoma y determinación del color de la cicatriz (Mohd Ariffin & Hasham, 2020).
- **Hidratación:** Esta variable de respuesta es importante ya que al revelar resultados bajos de hidratación en piel pueden demostrar un estado de deshidratación dando como resultado una piel que luce opaca, áspera y sin elasticidad. En el tratamiento integral de un paciente con heridas crónicas, la aplicación de sustancias humectantes es muy recomendable, tanto para el cuidado de heridas como para la prevención de nuevas lesiones, y da como

resultado una mejora en la cicatrización y una disminución del dolor (Mohd Ariffin & Hasham, 2020).

- **pH:** El crecimiento de biofilm en una herida genera un cambio en el pH de la epidermis, ya sea a ácido o alcalino, pero más comúnmente de ácido a alcalino, lo que es un indicador temprano de infección. Por lo tanto, reducir los niveles de pH (es decir, tener un pH ácido) mejoraría el estado de la herida (Mohd Ariffin & Hasham, 2020).

Para las variables complementarias en piel se empleó un sistema adaptador multisonda (C+K Electronic MPA 2, TM 300, Courage + Khazaka electronic GmbH, Köln, Alemania) para medir en piel humana las siguientes variables:

- Pérdida de agua transepidérmica (Transepidermal Water Loss: TEWL).
- pH (pH metro, Science MED SM-3BW).
- Eritema (Mexameter, C+K Electronic MX 18).
- Hidratación (Corneometer, C+ K Electronic CM 825).



**Figura 26.** Sistema adaptador multisonda (C+K Electronic MPA 2, TM 300, Courage + Khazaka electronic GmbH, Köln, Alemania).

## 5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la microscopía de la histología de los cortes realizados, las imágenes se capturaron y procesaron en el Software Image Pro<sup>®</sup> Express v.6.0 (Media Cybernetics) y el software Software ImageJ<sup>®</sup>. Para análisis de FT-IR y UV-VIS, se graficaron en el programa OriginPro 8.0. En los métodos de extracción (MT y UAI) se realizó una cuantificación de HA, contenido de proteína, color, pH, que se llevaron a cabo por triplicado y los datos obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de varianza ANOVA por prueba Tukey utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20 y Sigma Plot 14.0 con nivel de significancia del 95%.

Procesamiento de datos para pruebas de antioxidantes (capacidad secuestrante del radical estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), actividad quelante de los iones ferrosos (FIC), poder antioxidante reductor férrico (FRAP), inhibición del blanqueamiento del betacaroteno (BCB)), se realizaron por triplicado, los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza ANOVA por prueba Tukey utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20 y graficados en Sigma Plot 14.0 con nivel de significancia del 95%.

En la prueba de citotoxicidad, las pruebas se realizaron por cuadruplicado y los datos obtenidos fueron graficados en graficaron GraphPad Prims y Sigma Plot 14.0 8.0, mientras que análisis de varianza ANOVA por prueba Tukey se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20 con nivel de significancia del 95%.

Para la elaboración de los parches, se utilizó el programa Design-Expert<sup>®</sup> Software, V13, empleando un diseño de superficie con 17 formulaciones basado en un

compuesto central 2<sup>2</sup> estrellado. Posteriormente, para el análisis estadístico de los resultados de las variables de respuesta, se evaluaron con el programa Mini Tab.

Para la evaluación de las variables de los parches transdérmicos, se empleó el software Brookfield's TexturePro Software para CT3 Texture Analyzer para la medición de las variables (B, BP y R) y para las variables de (pH, M, TEWL) se empleó el dermoanalizador Courage + Khazaka electronic GmbH (Corneometer®, Mexámeter®, Tewameter®).

El análisis SEM-FEG se realizó con un equipo ZEISS Auriga (Alemania) con una magnitud de 1000 a 80 000×. para la captura de las micrografías, para los tratamientos de HA, se empleó un Software a XT Microscope Control v6.2.8 build 3161.Supervisor. Finalmente, para la elaboración de las microagujas con los extractos de HA, los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza ANOVA por prueba Tukey utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20 y graficados en Sigma Plot 14.0 con nivel de significancia del 95%.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

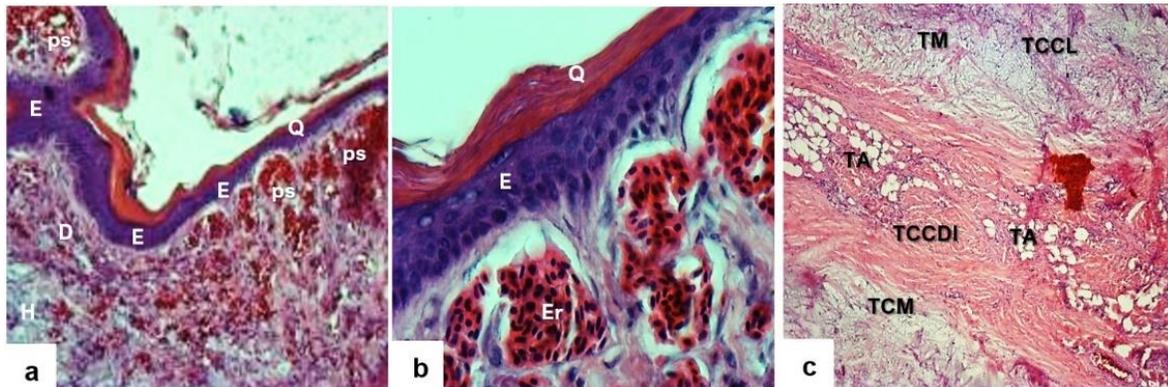
### 6.1 Descripción histológica de las crestas de *Gallus gallus domesticus*

Una vez realizadas las tinciones anteriores, se observó que la composición de la cresta de *Gallus gallus domesticus* de 6 sem y 28 sem presentaron características estructurales similares. Sin embargo, el tamaño es menor en los primeros ya que viven menos tiempo.

La epidermis de las aves está compuesta por un epitelio estratificado escamoso cornificado, similar al de los mamíferos, pero más delgado. La terminología empleada para referirse a los diferentes estratos epidérmicos es diferente en estas especies: se menciona un estrato basal, un estrato intermedio (equivalente al estrato espinoso de los mamíferos), estrato de transición (estrato granuloso) y estrato córneo. El término de estrato germinativo también se usa para designar todas las capas de la epidermis excepto el estrato córneo. La piel de las aves se considera, a diferencia de los mamíferos, un órgano lipogénico por la excesiva cantidad de lípidos que se encuentran en las células epidérmicas. La epidermis en estas especies sintetiza triacilgliceroles, fosfolípidos, ácidos grasos libres, monogliceroles y digliceroles (Ortiz & Rodríguez, 2004).

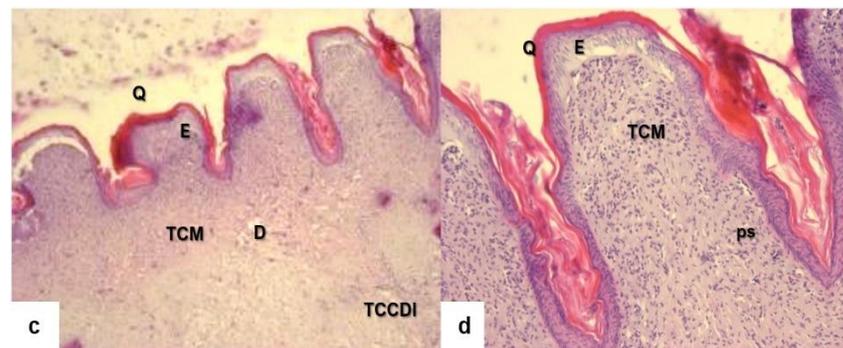
La dermis presenta vasos sanguíneos que forman una densa red, como ya se mencionó, comparable a la del tejido eréctil. Dicha red puede modificar la plétora sanguínea de las formaciones cutáneas que nos ocupan (T. Nakano et al., 1996; Schwarze & Schröder, 1985).

En las Figuras 27 y 28 se puede identificar la epidermis, compuesta de epitelio escamoso estratificado cornificado, con la capa de queratina de color rojo intenso, seguida de varias capas de células epiteliales de tonalidad basófila, constituyendo los estratos arriba mencionados. La dermis está formada por tejido conectivo colágeno denso irregular (TCCDI), el cual, se encuentra debajo de la epidermis que rodea gran cantidad de vasos sanguíneos que constituyen un plexo sanguíneo subepidérmico muy desarrollado. Ortiz and Rodríguez (2004) y Eurell and Frappier (2013), mencionan que la dermis se subdivide en un estrato superficial y un estrato profundo, este último incluye una capa de TCCDI y un estrato laxo compuesto por tejido colágeno laxo (TCCL), el cual también contiene grasa (tejido adiposo), una vascularización desarrollada, musculatura lisa y folículos de las plumas. A nivel de la cresta, este tejido se asocia con la hipodermis, que presenta tejido conectivo adiposo blanco y tejido conectivo mucoide. En la parte central de la estructura de la cresta, se encuentra una zona de TCCDI.



**Figura 27.** Gallo doméstico de 28 semanas. Cresta. Corte transversal.

**Tinción HE. a (100X).** Se observa la epidermis (**E**) con una capa de queratina visible (**Q**). Debajo se localiza la dermis (**D**), cuya porción papilar presenta un plexo sanguíneo bien desarrollado (**ps**) y en su porción reticular está formada por tejido conectivo colágeno denso irregular. **b (400X).** Acercamiento al plexo sanguíneo compuesto por vasos sanguíneos y que contienen eritrocitos (**Er**). **c (40X).** La hipodermis está formada por tejido conectivo colágeno laxo y tejido conectivo mucosoide. Zona de la parte media de la cresta, donde se observa la hipodermis de tejido conectivo mucoso (**TM**) y tejido conectivo colágeno laxo (**TCCL**) y una porción central formada por tejido conectivo colágeno denso irregular (**TCCDI**) con algunas zonas de tejido adiposo (**TA**).

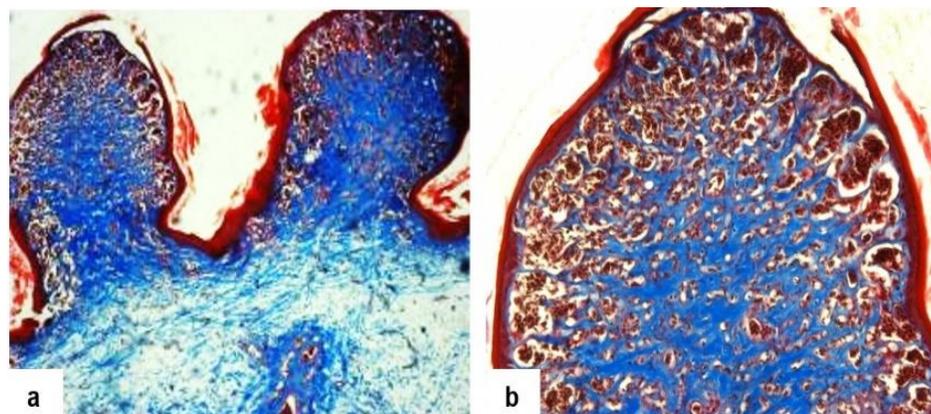


**Figura 28.** Gallo doméstico de 6 sem. Cresta. Corte transversal. Tinción: HE.

**Tinción: HE. c (40X).** Se observa una epidermis (**E**) relativamente delgada, aunque con su capa de queratina superficial (**en rojo**) bien desarrollada. Debajo se observa la dermis (**D**), formada por un tejido de aspecto mesenquimatoso, muy celular. La dermis presenta ese tejido conectivo mesenquimatoso (**TCM**) con gran densidad celular. También se observa el plexo sanguíneo subepidérmico en formación (**ps**). **d (40X).** Zona profunda de la cresta: se observan regiones de tejido conectivo colágeno denso irregular (**TCCDI**) y tejido conectivo mesenquimatoso (**TCM**).

Esto coincide con lo que Schwarze and Schröder (1985) describen: que la estructura de la cresta del gallo consta de una “lámina fundamental media, integrada por trabéculas de tejido conjuntivo con células adiposas incluidas. A los lados de dicha lámina hay sendas de capas de tejido conjuntivo mucoso, colágeno y encima la piel con una epidermis cornificada”.

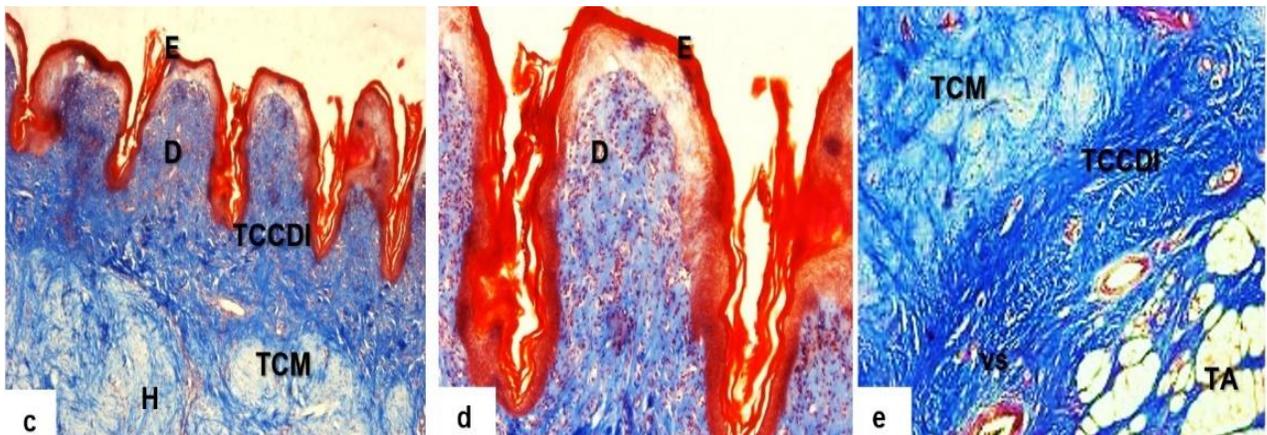
En la Fig. 29 (a, b) se presenta la histología de la tinción de Tricrómica de Masson en el ejemplar de 28 semanas. Donde el epitelio presenta mayor tamaño y la dermis del plexo subepidérmico es desarrollado.



**Figura 29.** Gallo doméstico de 28 sem. Cresta. Corte transversal. Tinción: Tricrómica de Masson.

**A (40X).** Se observa la epidermis (**E**) con una capa de queratina (**Q**). Debajo de la epidermis se observa la dermis (**D**), de tejido conectivo colágeno denso irregular y un plexo subepidérmico notable. Mas profunda está la hipodermis (**H**), de tejido conectivo colágeno laxo y tejido conectivo mucoide. **B (100X).** Acercamiento de un pico de la cresta, donde se observa el tejido conectivo colágeno denso irregular (**TCCDI**) de la dermis y su gran plexo sanguíneo subepidérmico (**ps**).

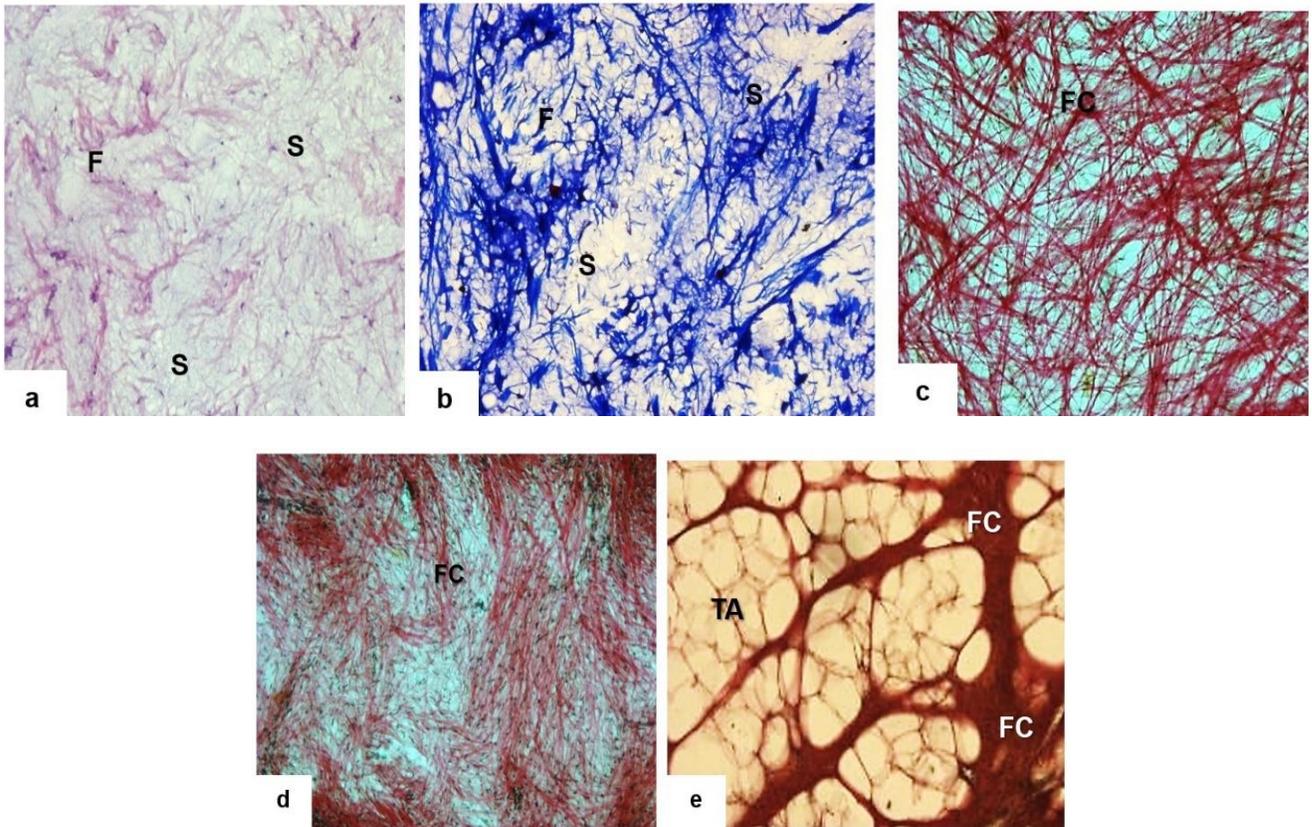
Por otra parte, una cresta de un gallo doméstico de 6 semanas (Fig. 30 c, d), se observa un epitelio estratificado escamoso cornificado relativamente delgado, que constituye la epidermis, mientras que la dermis presenta un plexo subepidérmico en desarrollo con estructura similar, pero de menor tamaño una dermis semejante formada por TCCDI con zonas de tejido conectivo mesenquimatoso, muy celular. La hipodermis presenta zonas de tejido conectivo adiposo, TCCL y tejido conectivo mucoide. En el centro de igual forma se observa una zona importante de TCCDI.



**Figura 30.** Gallo doméstico de 6 sem (c-d) y Gallo doméstico de 28 sem (e). Cresta. Corte transversal. Tinción: Tricrómica de Masson.

**C (40X).** Se observa la epidermis (**E**), y debajo de esta la dermis (**D**), con un plexo subepidérmico en desarrollo (**ps**). Debajo de la dermis está la hipodermis, rica en tejido adiposo. **D (100X).** Acercamiento de la parte superficial de la cresta, donde se aprecia la epidermis con queratina abundante (roja) y el plexo sanguíneo subepidérmico (**ps**) en desarrollo, sobre una base de tejido conectivo colágeno denso irregular (**TCCDI**). **E (40X).** En la parte interior de la cresta se encuentra abundante en tejido conectivo colágeno denso irregular (**TCCDI**) y también de tejido conectivo adiposo (**TCA**).

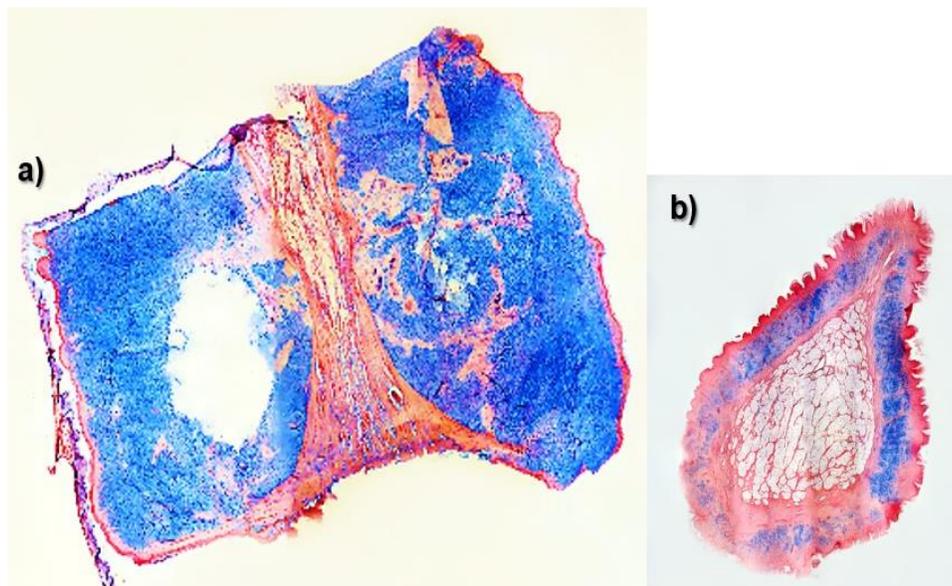
La Fig. 31 (a-b) muestra a la sustancia fundamental en la tinción de HE y Tricrómica de Masson respectivamente. La tinción de Verhoeff, una diferencia del tamaño de las fibras de colágeno que se muestran más grandes y gruesas en el ejemplar de 28 sem (31-c) que un ejemplar de 6 sem que además muestra un exceso de tejido adiposo en la parte central (Fig. 31-d, e).



**Figura 31.** Gallo doméstico, 28 sem (a-c). Tejido conectivo mucoide. Gallo doméstico, 6 sem (d y e).

**A (100 X).** Tinción HE. Tejido conectivo mucoide. Fibras de colágena (**F**), sustancia fundamental (**S**). **B (100 X).** Tinción Tricrómica de Masson. Fibras de colágena (**F**). **D, E (100 X)** Tinción de Verhoeff, contrastada con Van Gieson. Fibras de colágeno tipo I (en rojo) (**FC**), tejido adiposo (**TA**).

A pesar de mostrar la presencia de sustancia fundamental en HE y Tricrómica de Masson, fue necesario contrastar también con azul de Alcian pH 2.5 para evidenciar la presencia de ácido hialurónico en ambas muestras, por lo que la Fig. 32, muestra la epidermis se identifica de color rojo-rosa y la dermis la zona predominante de sustancia fundamental (ácido hialurónico). Por su parte, el gallo doméstico de 6 sem de edad se identifica una disminución de la presencia de TCCL en favor de una mayor cantidad de TCCDI, lo que también aparentemente resulta en una menor cantidad de tejido conectivo mucoide. Sin embargo, en estos cortes también se observan zonas dérmicas con cantidades importantes de tejido conectivo mesenquimatoso, lo cual indudablemente nos indica una remodelación progresiva de la estructura para llegar a su desarrollo final en el animal adulto, como está mostrado en el ejemplar de 28 sem. La visualización del desarrollo parcial del prominente plexo sanguíneo subepidérmico que se observa en el animal adulto reafirma lo aseverado.



**Figura 32.** Mapa estructural de la cresta. de *Gallus gallus domesticus*. Tinción con Azul Alcian pH 2.5, 40X.

La transición de los tejidos conectivos ordinarios en la cresta del gallo que ocurre de un individuo joven a un adulto, radica en el cambio de las trabéculas de colágena que se vuelven más delgadas y se abren para la producción y formación de tejido conectivo mucoso, mientras se mantiene un eje central de TCCDI para mantener firme la estructura de la cresta. El valor de realizar las tinciones de las crestas en este trabajo, es que el aumento de tejido conectivo mucoso representa un aumento de ácido hialurónico para la extracción con nuestro método, pues es un componente importante de la sustancia fundamental (HA) del tejido que nos ocupa. Dada su poca incursión sobre la morfología, previamente, autores como Da Rosa et al. (2007), Da Rosa et al. (2012), Da Rosa et al. (2007) y Srisantisaeng et al. (2013), quienes han empleado condiciones controladas utilizando exclusivamente gallos de raza de 6 semanas en condiciones controladas.

En este trabajo de investigación, en esta etapa de descripción morfológica e histológica de la cresta, fue imprescindible que además de las tinciones, pudiera elaborarse un mapa morfológico sobre cómo se identifica y luce la estructura completa de un corte característico de la cresta de *Gallus gallus domesticus* ya que la literatura, se limita a textos descriptivos o algunas zonas de la cresta de gallo.

La epidermis está compuesta por un epitelio estratificado escamoso cornificado más delgado que el descrito en mamíferos (Gázquez Ortiz, 2004) que en el caso de la dermis, está formada por tejido conectivo colágeno denso irregular (TCCDI), presenta vasos sanguíneos que forman un plexo subepidérmico. Debajo se observa tejido conectivo colágeno laxo (TCCL), zonas de tejido de aspecto mesenquimatoso y adiposo blanco (TCA) con una vascularización desarrollada. Hipodermis: presenta TCA y tejido conectivo mucoide (TCM). En esta parte central de la cresta, se encuentra

una zona de TCCDI que constituye una lámina media, integrada por trabéculas de tejido conjuntivo con células adiposas incluidas (Schwarze & Schröder, 1985).

Dicho lo anterior, en la Fig. 33, se pueden visualizar los cortes de las crestas donde;

a1) Corte inicial histológico de *Gallus gallus domesticus* de 6 sem para formol, a2)

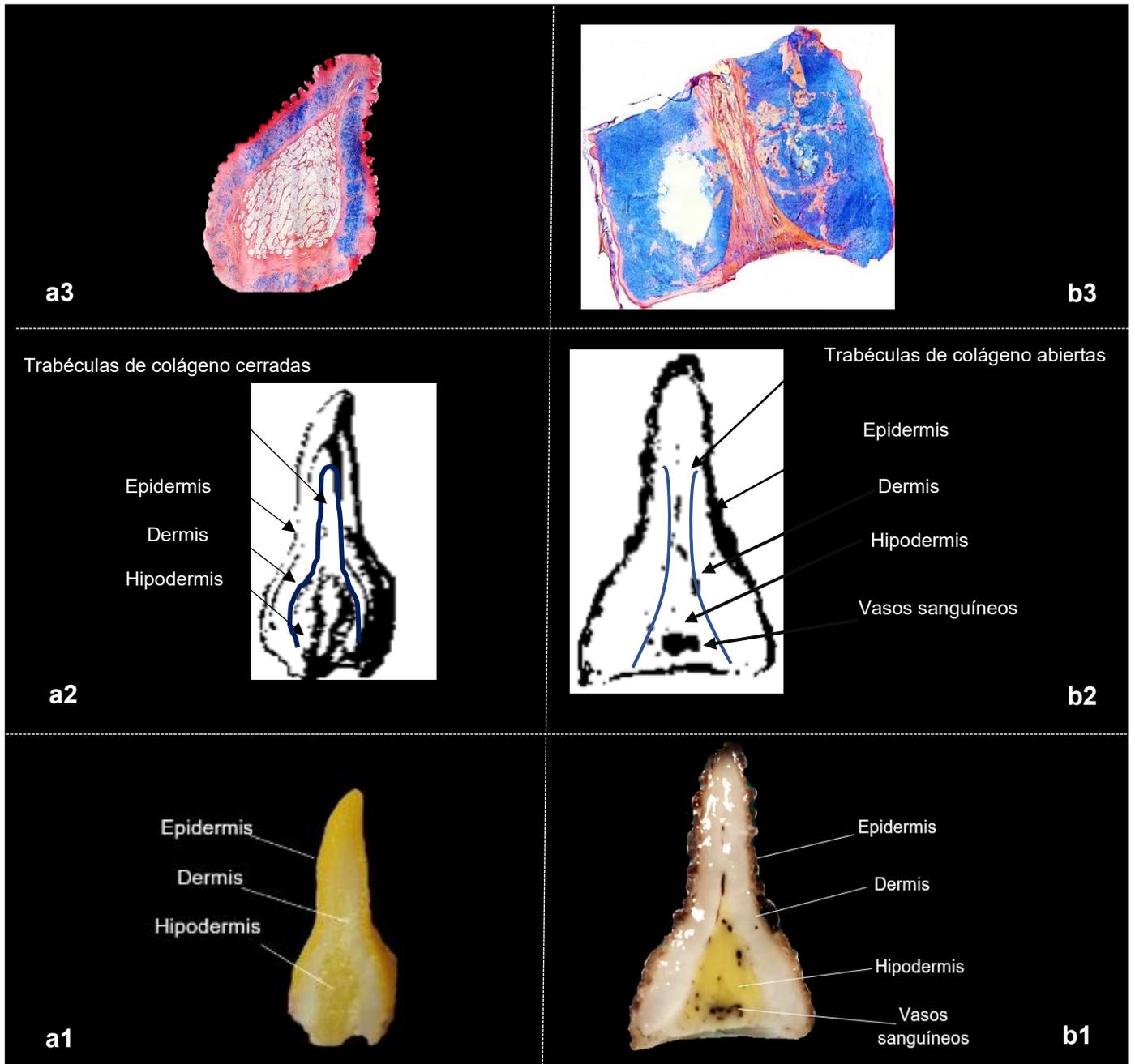
Esquema final de la estructura morfológica de *Gallus gallus domesticus* de 6 sem y a3)

Tinción de con azul de Alcian pH 2.4 y HA se tiñe de color azul.

b1) Corte inicial histológico de *Gallus gallus domesticus* de 28 sem para formol, b2)

Esquema final de la estructura morfológica de *Gallus gallus domesticus* de 28 sem y

b3) Tinción de con azul de Alcian pH 2.4 donde HA se tiñe de color azul.



**Figura 33.** Diferencias en las morfológicas entre: (a1-a3) cresta de *Gallus gallus domesticus* de 6 sem y (b1-b3) cresta de *Gallus gallus domesticus* de 28 sem.

### 6.2 Análisis proximal de las crestas de *Gallus gallus domesticus*

Como se puede observar en la Tabla 11, se muestra el análisis proximal de las crestas de *Gallus gallus domesticus* donde su composición fue la siguiente: sólidos totales (34.55%), grasa (4.09%), cenizas (0.36%), proteína (22.02%), extracto libre de nitrógeno (8.63%) y humedad (65.44%).

En la literatura, es difícil encontrar un perfil completo de análisis proximal de la cresta de *Gallus gallus domesticus*. Así que, para comparar los valores obtenidos en este trabajo, fue necesario considerar otros valores obtenidos de otras partes del pollo. Se puede observar que el contenido de sólidos totales se encuentra en valores cercanos en el contenido de sólidos totales en crestas de pollo 32-52 sem (30.82%) (Costa-Soares, 2017) y carne de pollo (25%) (Arenas de Moreno, 2000). El contenido de grasa obtenido en este trabajo fue de 4%, mientras que, en otros trabajos, han indicado que las crestas de pollos de 32-52 sem (15%), carne de pollo (7%) y piel de pollo (30%). En cuanto al contenido de proteína en este trabajo (22%), comparado con otros autores, han reportado un 15% en crestas de pollo, en carne 19%, piel 12% (Arenas de Moreno, 2000; Márquez et al., 2006; Pulido-Córdoba, 2009). Como ya se mencionó, el contenido de cada proximal está relacionado con cada parte de un ejemplar por ejemplo la tráquea de *Gallus gallus domesticus* se han reportado un valor de hasta 68% (Kaewbangkerd et al., 2023).

El contenido de humedad obtenido (65%), fue un valor cercano al obtenido en carne de pollo 74%, piel de pollo 56% y crestas de pollo 58% (Arenas de Moreno, 2000; Márquez et al., 2006; Pulido-Córdoba, 2009).

**Tabla 11.** Análisis proximal de las crestas de *Gallus gallus domesticus*.

En este trabajo		Costa- Soares, (2017)	Arenas de Moreno, L., <i>et al.</i> (2000)	Márquez, E., <i>et al.</i> (2006)	Pulido- Córdoba (2009)	Kaewbangkerd <i>et al.</i> (2023)
Materia prima	Crestas <i>Gallus gallus domesticus</i>	Crestas 32-52 sem	Carne	Piel	Cresta	Tráquea
STT (%)	34.550±1.460	30.82	25.1	*	*	*
Grasa (%)	4.090±0.680	15.7	7.75	30.57	*	14.4±0.42
Cenizas (%)	0.360±0.070	*	0.97	*	*	3.3±0.01
Proteína (%)	22.020±2.150	15.7	19.7	12	*	68.0±0.84
ELN (%)	8.630±1.000	*	*	*	*	14.3±0.07
Humedad (%)	65.440±1.460	*	74.9	56.43	58.8	82.6±0.05

\*Valores no reportados por el autor.

### 6.3 Cuantificación del HA por reacción carbazol: curva de calibración

A continuación, se muestran las siguientes curvas de calibración con los 2 solventes usados (ver Figuras 35 y 37) durante las extracciones en ambos métodos: ácido acético 0.5 M y acetato de sodio 5%. Se logró estandarizar la técnica de cuantificación de ácido hialurónico de las absorbancias obtenidas estas resultaron ser homogéneas a diferencia de las pruebas anteriores.

Para iniciar con la cuantificación de HA, primeramente, fue necesario realizar la curva de calibración con el ácido hialurónico comercial y verificar la reacción según la literatura, y se obtuvo el cambio de coloración visual que variaba de un color púrpura a rosa mexicano, mientras el blanco presentó un color rosa tenue (ver Figuras 34 y 36) (Peluffo, 1955).

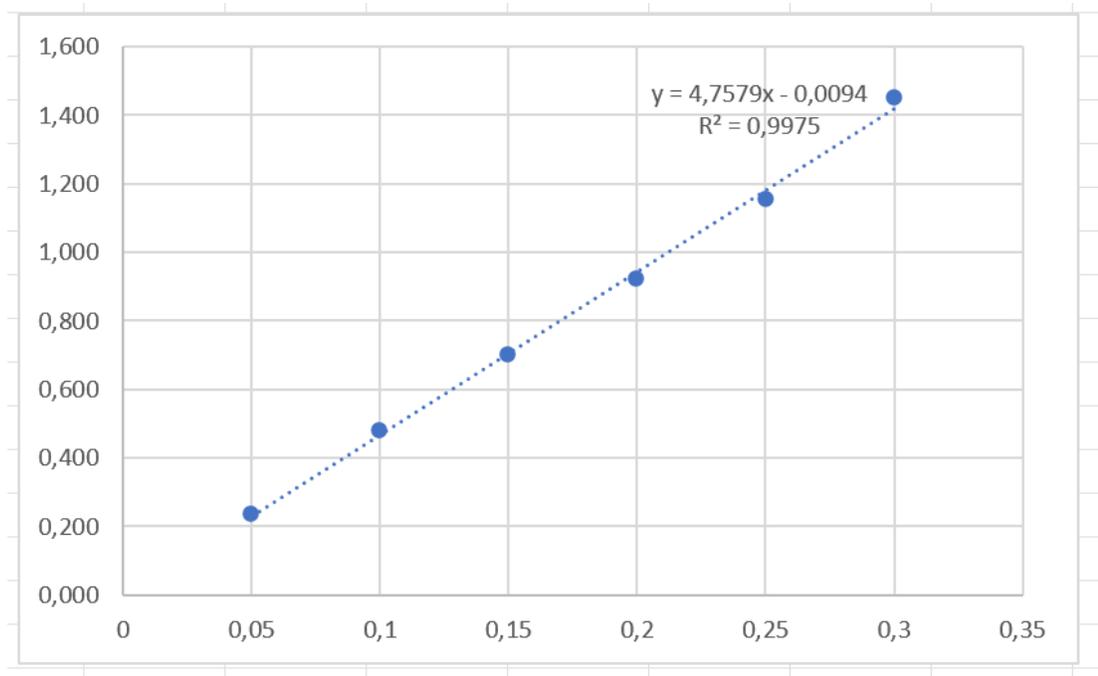
De acuerdo con Vilariño-Feltre (2015), menciona que el ácido glucurónico y sus isómeros producen, en presencia de ácido sulfúrico en caliente, un compuesto color púrpura. Dicho lo anterior, también indica que en la reacción de carbazol los ácidos hexurónicos calentados con ácido sulfúrico, en presencia de carbazol (benzopirrol), dan un compuesto color rosa de absorción espectrométrica característica.

Asimismo, la modificación que se plantea por Cesaretti et al. (2003), indica que se añade 4 veces más volumen que la muestra de disolución de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (Sigma-Aldrich) 25 mM en ácido sulfúrico (1.84 g/mL) y se calienta la mezcla durante 10 min a 100 °C. Arias B et al. (1989), indica que la finalidad de estos calentamientos con el ácido sulfúrico es hidrolizar el polisacárido, porque el ácido sulfúrico hidroliza el enlace glucosamina y el ácido glucurónico mientras que el tetraborato de sodio aumenta la sensibilidad de la reacción.

Posteriormente, se añade el mismo volumen de carbazol (Sigma-Aldrich) 0.125 % p/v en etanol absoluto que el de muestra y se vuelve a calentar 10 min a 100 °C, ya que, a esta temperatura, el carbazol reacciona en muy poco tiempo con los glicosaminoglicanos derivados de la hidrólisis y se forma un producto coloreado (ver Figuras 35 y 37) ocasionado por la conjugación de dobles enlaces en carbonos  $\beta$ . Además, los iones borato del  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  en disolución aumentan la sensibilidad del producto coloreado, por lo que es posible discriminar cantidades menores de reactivo inicial (Cesaretti et al., 2003; Vilariño-Feltre, 2015).



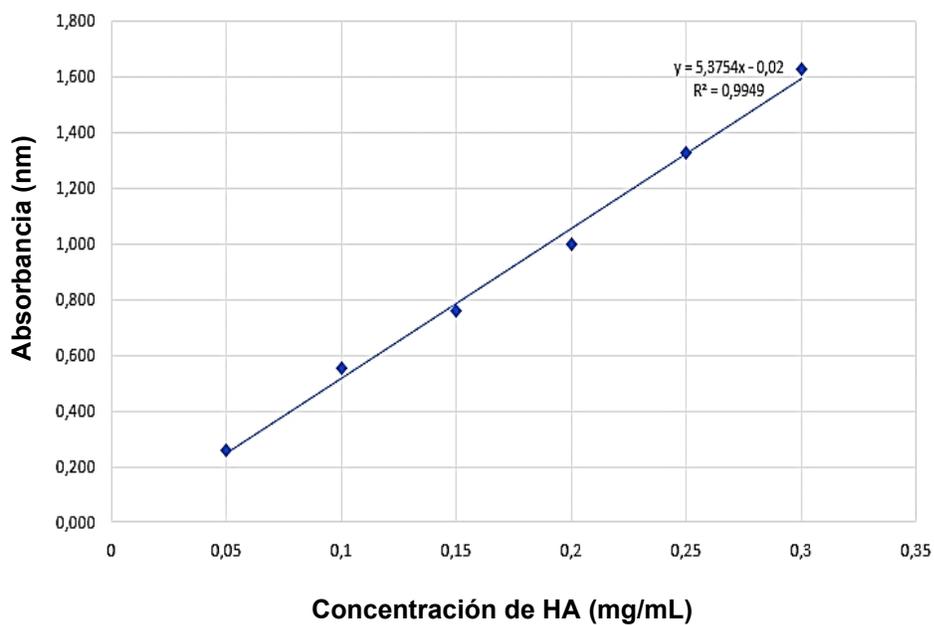
**Figura 34.** Reacción de carbazol de la solución madre con ácido hialurónico con ácido acético 0.5 M (AA).



**Figura 35.** Curva de calibración de la solución madre de ácido hialurónico con solvente ácido acético 0.5 M (AA).



**Figura 36.** Curva de calibración de solución de ácido hialurónico con acetato de sodio 5% (A).



**Figura 37.** Reacción de carbazol de la solución madre ácido hialurónico con acetato de sodio 5% (A).

### 6.4 Desarrollo y ejecución de los procesos de purificación del HA mediante reacción de carbazol

Durante el proceso de purificación se tuvieron algunas complicaciones en los rendimientos de ácido hialurónico de extracción ya que los extractos tenían una apariencia turbia y esto afectaba en la reacción de carbazol. Así que, en función de este hecho, se propusieron 5 procesos de purificación para cada solvente (A y AA) basados en la literatura (Callejas-Quijada et al., 2023). Un paso aspecto que se destaca de cada proceso es la hidrólisis, que se llevó a cabo en diferentes etapas de cada proceso pues eso podía afectar directamente en el rendimiento de HA.

A continuación, se describe en que consistió cada uno.

**Proceso 1:** a partir de los extractos se tomaron 20 mL, sometieron a un proceso de hidrólisis con papaína a 50 °C durante 30 min a pH 7. Posteriormente, las muestras se sometieron a centrifugación (5000 rpm a 4°C) durante 30 min. Se desechó el precipitado y el sobrenadante se filtró con filtro de rutina, 0.45 µm y 0.22 µm. Se tomaron 10 mL de muestra y se colocaron 15 mL de alcohol etílico y luego se centrifugó (5000 rpm a 4°C). Se separó sobrenadante y precipitado, donde éste último fue resuspendido en el solvente inicial.

**Proceso 2:** los extractos se centrifugaron 5000 rpm, 4 °C durante 15 min. El precipitado se desechó mientras que el sobrenadante se filtró con filtro de rutina, 0.45 µm y 0.22 µm. Se tomaron 10 mL de muestra y se colocaron 15 mL de alcohol etílico y luego se centrifugó durante 15 min (5000 rpm a 4°C). Nuevamente se repitió el proceso de lavado agregando 15 mL de alcohol etílico para centrifugarse durante 15 min (5000 rpm a 4°C). El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 15 mL de solvente inicial (AA ó A).

Posteriormente, se sometieron a un proceso de hidrólisis con papaína a 50 °C durante 30 min pH 7. Después de la hidrólisis, se sometieron a centrifugación (5000 rpm a 4°C) durante 30 min. Se desechó el precipitado y el sobrenadante se filtró con filtro de rutina, 0.45 µm y 0.22 µm. Se tomaron 10 mL de muestra y se colocaron 15 mL de alcohol etílico y se centrifugó (5000 rpm a 4°C). El precipitado fue resuspendido en el solvente inicial y fue agregado alcohol etílico para precipitar bajo las mismas condiciones de centrifugación, sin embargo, al no haber un precipitado solo se tomó la parte del fondo la cual fue resuspendida en el solvente original.

**Proceso 3:** a partir de los extractos se tomaron 20 mL, sometieron a un proceso de hidrólisis con papaína a 50 °C durante 30 min a pH 7. Posteriormente, las muestras se sometieron a centrifugación (5000 rpm a 4°C) durante 30 min. Se desechó el precipitado y del sobrenadante se tomaron 10 mL de muestra y se colocaron 15 mL de alcohol etílico para centrifugarse (5000 rpm a 4°C). Finalmente, el precipitado fue resuspendido en el solvente inicial.

**Proceso 4:** se inició con 5 gr de crestas de *Gallus gallus domesticus*, las cuales se secaron a 50 °C. Posteriormente, se desengrasaron durante 48 h con acetona con cambios cada 24 h. Se sometió a un secado durante 2 h para evaporar los residuos de los solventes. Las crestas desengrasadas, se colocaron en un buffer de fosfatos 20 mM, pH 7. Se sometieron a un proceso de hidrólisis durante 30 min. Las muestras se aforaron con 30 mL para cada solvente y luego se colocaron en agitación durante 72 h con cambios de solvente cada 24 h. Los extractos se sometieron a centrifugación a 5000 rpm a 4°C durante 30 min.

El sobrenadante se filtró, y se tomaron 10 mL de muestra y colocando 15 mL de alcohol etílico para centrifugar nuevamente. El precipitado fue resuspendido en el solvente inicial y filtrado.

**Proceso 5:** a partir de los extractos se tomaron 20 mL, se sometieron a un proceso de hidrólisis durante 30 min. Posteriormente, las muestras se sometieron a centrifugación (5000 rpm a 4°C). Se tomaron 10 mL de muestra y se colocaron 15 mL de alcohol etílico y luego se centrifugó (5000 rpm a 4°C). Se separó sobrenadante y precipitado, donde éste último, fue resuspendido en el solvente inicial y alcohol etílico. Una vez que se centrifugó el precipitado se resuspendió en solvente (AA o A) para filtrarse.

La Tabla 12, muestra un resumen de los procesos de purificación, donde se tomó una muestra de cada proceso (precipitado y sobrenadante) para analizar en qué etapa de cada proceso se cuantificaba un mayor rendimiento.

**Tabla 12.** Procesos de mejora para el proceso de purificación.

<b>Tratamientos</b>	<b>Acetato de sodio 5% (A)</b>	<b>Ácido Acético 0.5 M (AA)</b>	<b>Observaciones</b>
Proceso 1	<b>P1, P1S</b>	<b>P1, P1S</b>	Hidrólisis se realiza al principio.
Proceso 2	<b>P2, P2S</b>	<b>P2, P2S</b>	Protocolo base, hidrólisis.
Proceso 3	<b>P3, P3S</b>	<b>P3, P3S</b>	Extracto disuelto en alcohol, agitación 24 h, 4-8 °C. Precipitado, hidrólisis.
Proceso 4	<b>P4, P4S</b>	<b>P4, P4S</b>	Crestas secas desengrasadas, buffer de fosfatos; hidrólisis, solvente, extracciones cada 24 h (72 h), protocolo base.
Proceso 5	<b>P5, P5S</b>	<b>P5, P5S</b>	Protocolo base.

P1 (proceso 1), P1S (proceso 1, sobrenadante), P2 (proceso 2), P2S (proceso 2, sobrenadante), P3 (proceso 3), P3S (proceso 3, sobrenadante), P4 (proceso 4), P4S (proceso 4, sobrenadante), P5 (proceso 5), P5S (proceso 5, sobrenadante).

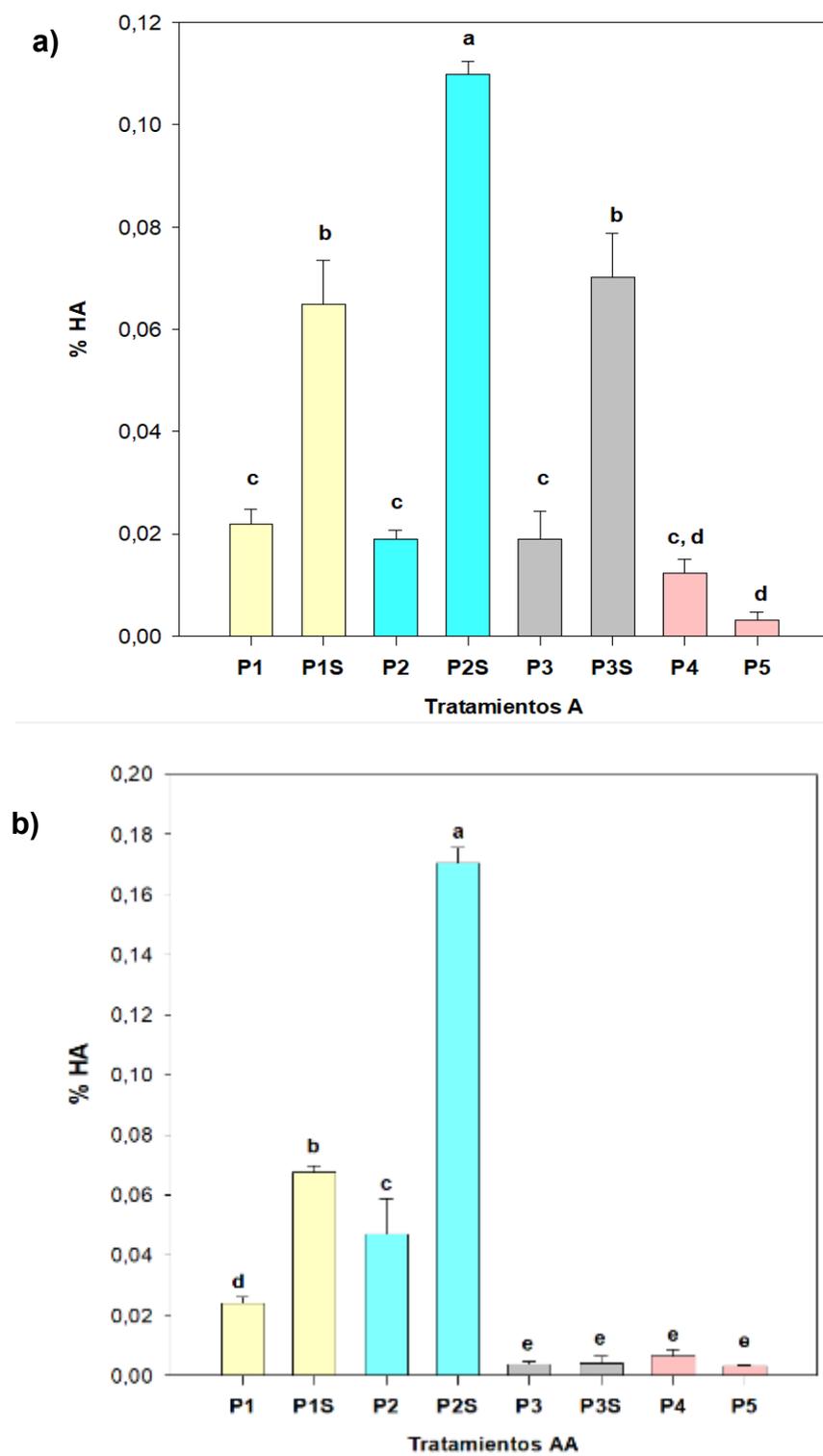
De manera visual la Fig. 38, muestra la coloración que evidencia el resultado después de agregar el reactivo de carbazol de entre tonalidades púrpura a rosa mexicano coloración característica de la tinción del polímero.



**Figura 38.** Reacción de carbazol de los procesos de purificación empleados con A y AA.

En el análisis estadístico, los tratamientos que presentaron mayor rendimiento y diferencias estadísticas el Proceso 2 (P2) y su sobrenadante (P2S) con respecto a los demás procesos de purificación de ambos solventes (A, AA) y con respecto al blanco de cada solvente (ver Fig. 39, lado derecho) en comparación con el resto de los procesos. La Fig. 39, muestra el rendimiento de contenido de HA de los tratamientos de cada proceso de purificación donde se realizó la toma de muestra de (precipitado y sobrenadante). La concentración podría asociarse a que cuando visualmente la tinción tiende a ser púrpura la concentración podría ser mayor, de acuerdo con los rendimientos cuantificados en la reacción de carbazol. Otro punto importante, podría ser la variación de la edad, raza, peso, etc., que pueden estar asociados a la diferencia en el rendimiento final son aspectos que no se controlan al ser residuos en masa.

En este caso, se sugiere que sean almacenados por lote para realizar análisis químico proximal (humedad y extracto etéreo) para estimar que cantidad podría obtenerse y realizar ajustes de la cantidad de solvente en la etapa de desengrasado.



**Figura 39.** Rendimiento de HA extraído con: a) acetato de sodio 5% (A) y b) ácido acético 0.5 M (AA). Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey.

### 6.4.1 Análisis de FT-IR de los extractos del proceso de purificación

La literatura menciona que la transmitancia del HA aislado, se identifica picos característicos de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  (Kanchana, Arumugam, Giji, & Balasubramanian, 2013). De los procesos de purificación mencionados, se analizaron con FT-IR para verificar que además de la cuantificación de HA, estuvieran presentes los grupos funcionales de HA como en el control comercial (HA de Rooster comb).

Para ello, se muestran los resultados de los diagramas en la Fig. 40. De los 5 procesos de purificación HA, también se estudiaron en espectroscopia FT-IR y se comparó con HA de Rooster comb de cada solvente como control (Figura 40 a y b).

Se identificaron vibraciones en la banda 3390  $\text{cm}^{-1}$ , éstas se pueden identificar en la Fig. 39 (a) y (b), donde las bandas principales indican vibraciones de estiramiento O–H y N–H (Hafsa et al., 2017). Otros autores, han identificado estas vibraciones a 3437,15  $\text{cm}^{-1}$ , que se atribuye al estiramiento O-H unido con hidrógeno y a la vibración de estiramiento N-H de la cadena lateral N-acetil (Kanchana et al., 2013). Algunos 3500  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al enlace O-H del anillo (Pérez-Gumeta et al., 2018).

De esta manera, se comprueba que el rango de la banda de absorción oscila de 3400–3100  $\text{cm}^{-1}$ , que se asigna a la vibración de estiramiento O–H y N–H de las cadenas laterales de N-acetilo involucradas en los enlaces de hidrógeno (Gilli, Kacuráková, Mathlouthi, Navarini, & Paoletti, 1994).

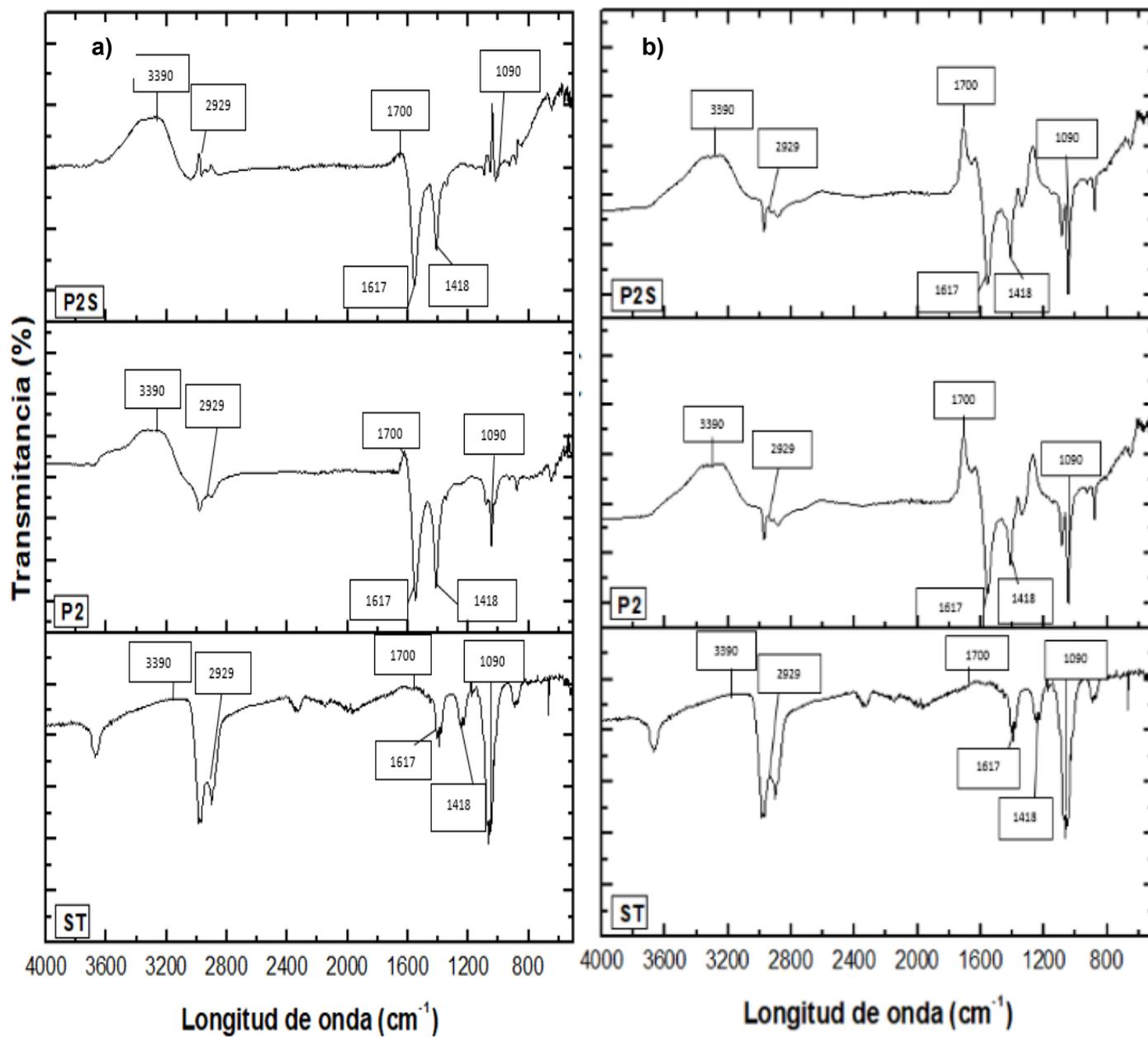


Figura 40. FT-IR de los procesos empleados en purificación disueltos en: a) A y b) AA.

Se mostró otro pico, a una banda  $2929\text{ cm}^{-1}$ , (ver Fig. 40 a y b) que podría ser atribuido al estiramiento metil C-H responsable del ácido glucurónico. Kanchana et al. (2013), mencionan que en un estándar de *S. equi* el espectro de FT-IR presentó un pico a  $2929.87\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye al estiramiento C-H de metilo responsable del ácido glucurónico. Esta banda presenta similitud con Hafsa et al. (2017), donde el estándar de HA rooster comb a  $2925\text{ cm}^{-1}$  mencionan que están presentes las vibraciones de estiramiento C-H. Otro estudio, reportó a  $2916.73\text{ cm}^{-1}$ , se observa un grupo de bandas superpuestas de intensidad moderada que se deben a las vibraciones de estiramiento del C-H (Y. Wu, 2012b).

Asimismo, las bandas correspondientes a los enlaces Csp<sup>3</sup>-H de los ciclos de los carbohidratos presentes en  $2960\text{ cm}^{-1}$ , se ha atribuido que éstos aparecen entre los  $3000$  y  $2840\text{ cm}^{-1}$  los cuales son muy estables (Pérez-Gumeta et al., 2018).

Otra banda característica es a  $1700\text{ cm}^{-1}$  (ver Fig. 40 a y b), que corresponde al grupo carbonilo del ácido glucurónico, confirmando su presencia (Pérez-Gumeta et al., 2018). Hafsa et al. (2017), mencionan que las bandas de absorción alrededor de  $1650$ ,  $1551$  y  $1324\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la amida I, II y III mientras que el grupo C-O-C se identifica en la banda  $1150\text{ cm}^{-1}$  (puente O) y a  $1041\text{ cm}^{-1}$  el grupo C-OH. Después de la degradación ultrasónica en algunos casos el patrón espectral general no cambia al disminuir el peso molecular del HA, dicho lo anterior también existen algunas diferencias en altura y forma de algunas bandas de absorción.

Se encontró otro pico característico a  $1617\text{ cm}^{-1}$  (ver Fig. 40 a y b), autores mencionan que las bandas a  $1617\text{ cm}^{-1}$ , se pueden atribuir a los modos de estiramiento asimétrico (C=O) de los grupos carboxilo planares (Hafsa et al., 2017).

En la región de  $1418\text{ cm}^{-1}$ , el pico que se halló en el espectro (ver Fig. 40 a y b), por lo que la banda  $1409\text{ cm}^{-1}$  se pueden atribuir a los modos de estiramiento simétrico (C–O) de los grupos carboxilo planares (Hafsa et al., 2017).

De los 2 picos anteriores ( $1617\text{ cm}^{-1}$  y  $1418\text{ cm}^{-1}$ ), se observa en la Fig. 40 a y b, en la literatura indica que los valores cercanos a  $1540$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  podrían atribuirse a enlaces Csp<sup>3</sup>-Csp<sup>3</sup> (Pérez-Gumeta et al., 2018). En la banda  $1090\text{ cm}^{-1}$  (ver Fig. 38 a y b), Pérez-Gumeta et al. (2018), indican que a esta banda, se encuentra el enlace C–N, lo cual confirma la presencia de glicosaminoglicanos familia a la que pertenece al HA.

Se menciona que, la región espectral de  $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ , es muy característica de los carbohidratos y sensible a la cristalinidad, donde dicha región comprende 4 bandas y puede ser más nítida e intensa para la muestra que para el patrón comercial (L. O. Alcântara et al., 2023). Por otra parte, Gilli et al. (1994), verificaron que lo anterior podría estar vinculado en un aumento en el grado de polimerización, vinculado al peso molecular, en oligómeros de hialuronato de sodio que conduce a una disminución significativa en el área de pico comprendida de  $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ .

Algunos picos finales no fueron visibles y definidos como otros reportes, sin embargo, pueden deberse a que los extractos estaban disueltos en 2 solventes diferentes, el nivel de pureza posiblemente es distinto, así como la fuente de extracción. Según L. Alcântara et al. (2022), en estudios previos, los espectros de una muestra extraída de HA, no mostró bandas características de los grupos sulfatados, como  $1236\text{ cm}^{-1}$  atribuido a la vibración S—O, y  $858$  y  $826\text{ cm}^{-1}$  relacionados con la vibración —C—O—S, por lo que se puede inferir que los GAG sulfatados podrían estar en baja concentración. Es importante mencionar que, las muestras analizadas no presentaron

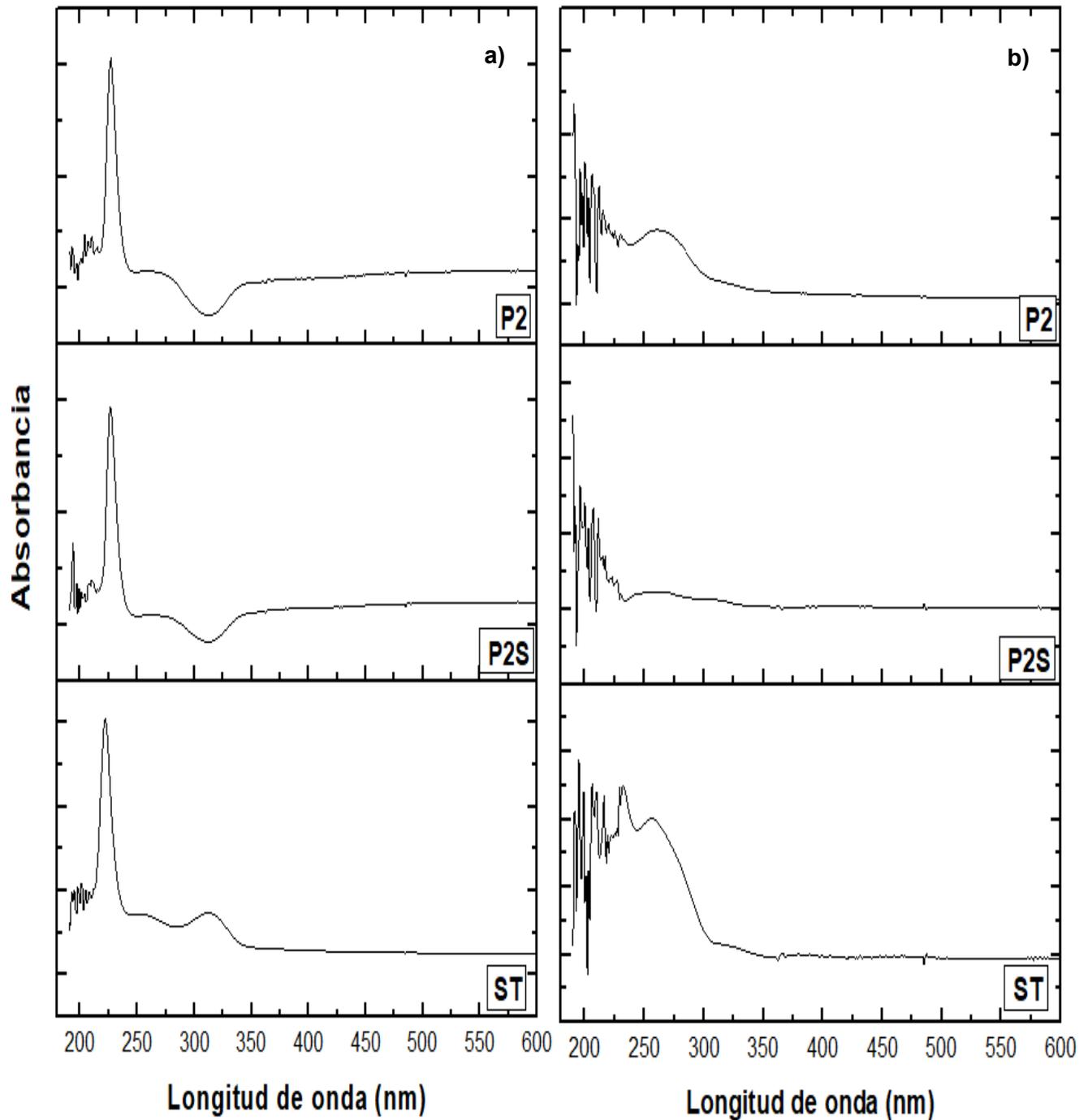
picos definidos en esa región espectral, lo que podría explicar una consecuencia de la interferencia con algunas impurezas, por ejemplo, la fuente de ácido hialurónico y las condiciones de extracción que también pueden influir en la estructura molecular de las muestras. Asimismo, la nitidez de las bandas también comprende, la microestructura del biopolímero con más dominios cristalinos, lo que indica que en algunos casos los extractos podrían presentar más cristalinidad que el estándar (L. O. Alcântara et al., 2023).

### 6.4.2 Análisis de UV-VIS de los extractos del proceso de purificación

Lapcik, Dammer, and Valko (1992), se ha mencionado en estudios previos, que el ácido hialurónico se absorbe como máximo en una longitud de onda de 190-200 nm. Para confirmar que la muestra obtenida es ácido hialurónico, se estudió el patrón de absorción del ácido hialurónico utilizando un espectrofotómetro.

Además de la cuantificación de HA, también se realizó UV-VIS para verificar que estuvieran presentes los grupos funcionales de HA en los extractos y el control comercial. De los 5 procesos de purificación antes propuestos, se tomaron los espectros descritos asociados a la literatura y al estándar comercial de HA. Para ello, se muestran los resultados obtenidos en la Fig. 41, donde el Proceso 2 (P2) y su sobrenadante P2S, presentaron una mayor afinidad con el espectro del estándar. En este caso, la Fig. 41-a se visualiza el pico característico a 225 nm aproximadamente con el solvente acetato de sodio al 5% (A), mientras en la Figura 41-b para AA (solvente ácido acético 0.5 M), se observa el pico máximo a 200 nm acompañado de otros picos de menor magnitud que estar asociados a impurezas relacionadas al contenido de proteína.

Hafsa et al. (2017), compararon los espectros UV de HA-N y HA-LMw que indica que fueron similares y que no hubo daño de este último durante la degradación ultrasónica. Mientras que Pérez-Gumeta et al. (2018), al obtener HA por método químico y enzimático empleando humor vítreo de *Oreochromis niloticus* (residuos acuícolas). El barrido espectral de UV-VIS de 190-1100 nm mostró una longitud de onda de máxima absorbancia de 213 nm para el estándar, 237 nm para el extracto químico, 257 nm para el extracto enzimático y 205 nm para el obtenido por la optimización.



**Figura 41.** Espectro de UV-VIS de los procesos empleados en purificación disueltos en: a) A y b) AA.

De acuerdo con Pérez-Gumeta et al. (2018), explican que esta banda se debe a la transición electrónica  $n \rightarrow \pi^*$  del grupo carbonilo presente en el ácido glucurónico y a la transición  $n \rightarrow \sigma^*$  de los heteroátomos (O y N) presentes en la estructura del HA. Dřímalová, Velebný, Sasinková, Hromádková, and Ebringerová (2005), hallaron que los espectros ultravioleta (UV) y RMN de HA-LMw y HA fueron similares después de la degradación ultrasónica a pH 7.5, sin embargo, en condiciones de degradación severas (tratamientos a largo plazo, pH ácido o alcalino y en presencia de oxidantes), la despolimerización estuvo acompañada por la destrucción de ambos residuos de azúcar constituyentes y la formación de estructuras insaturadas detectables por absorción UV.

Y. Wu (2012a), encontró que los espectros UV-Vis del HA-LMw (87 kDa), HA-N (1535 kDa) casi se traslapaban al no existir diferencias significativas entre los espectros UV-Vis antes y después de la degradación del HA-N por tratamiento con ozono.

Kulkarni et al. (2018), al extraer HA de crestas de gallos mencionan que se verificó una absorción máxima a 191.4 nm. Lapcik et al. (1992), mencionan que en la caracterización de ácido hialurónico obtuvieron una absorción máxima a 200 nm espectroscópica de complejos de cobre (II) de HA (espectros UV de solución de HA puro antes y después de la adición de ión cobre).

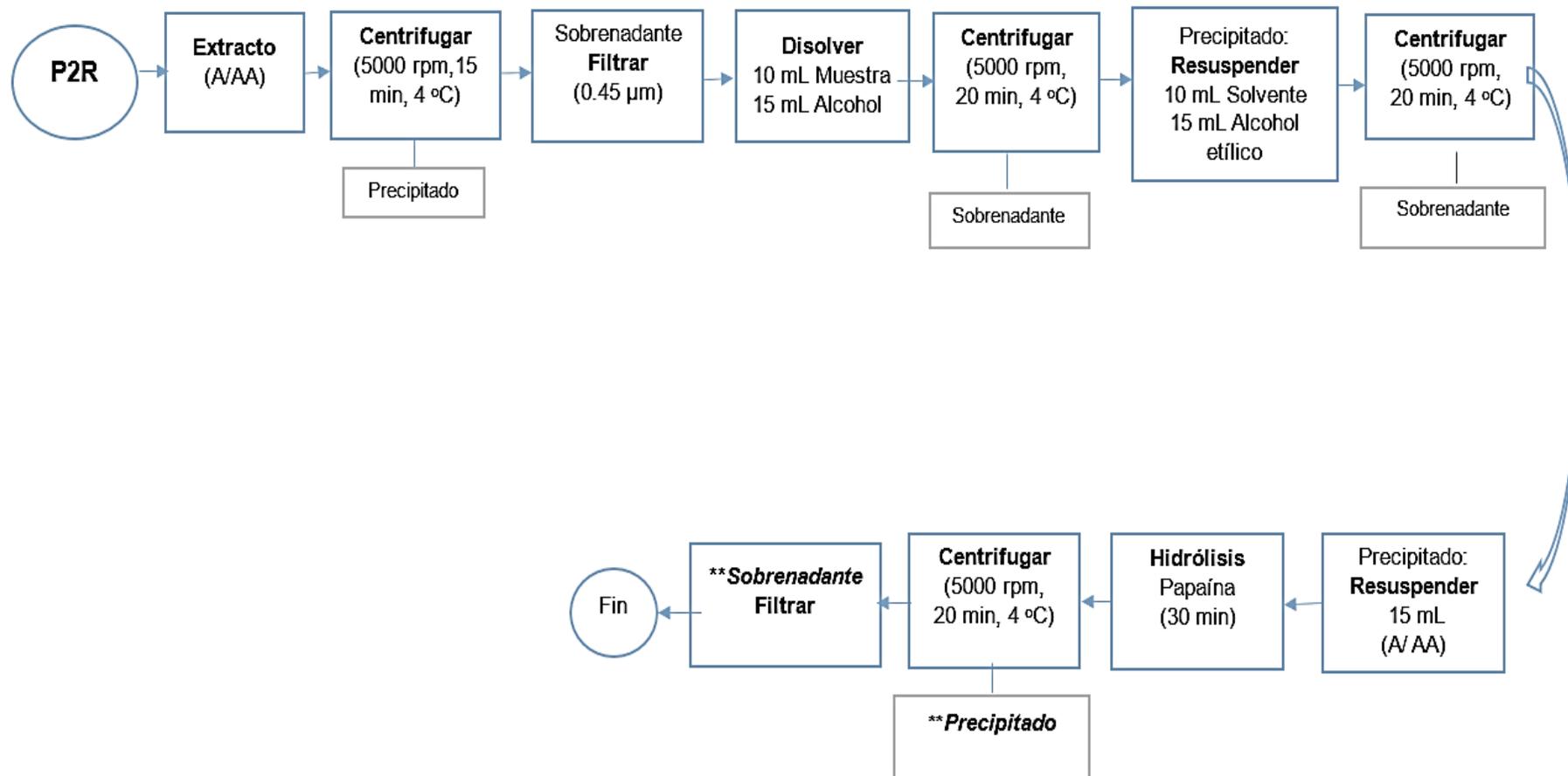
### 6.5 Selección del proceso de purificación

Una vez obtenidos los extractos, de los procedimientos preliminares, se seleccionó el proceso en este caso el Proceso 2 (P2) (ver Fig. 42), el cual presentó mayor rendimiento y una mejor identificación de la huella dactilar y los grupos funcionales de con respecto al HA, así como de UV-Vis. De esta manera, se realizaron ajustes finales para mejorar la cuantificación del contenido de ácido hialurónico.

El Proceso 2 con las modificaciones pertinentes, quedó de la siguiente manera; una vez obtenidos los extractos, primeramente, se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min a 4 °C.

El precipitado se desechó, mientras que el sobrenadante, se filtró con un filtro 0.45 µm y se disolvió con 10 mL de muestra con 15 mL de alcohol etílico. Enseguida, se centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 20 min a 4 °C y el sobrenadante fue desechado. Por otro lado, el precipitado se disolvió con 10 mL de muestra con 15 mL de alcohol etílico. Nuevamente éste se centrifugó 5000 rpm durante 20 min 4 °C y el sobrenadante fue desechado.

El precipitado de la operación anterior se resuspendió en 15 mL de solvente (ácido acético 0.5 M o acetato de sodio 5%), este extracto se sometió a un proceso de hidrólisis con papaína a 50 °C durante 30 min a pH 7. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm, 20 min a 4 °C donde el solvente se filtró con 0.45 µm y finalmente, el precipitado se resuspendió en 15 mL de solvente de extracción.



**Figura 42.** Descripción del proceso de purificación seleccionado para los extractos obtenidos con A y AA.

### 6.6 Parámetros colorimétricos de los métodos UAI y MT

Es importante mencionar de este apartado en adelante, los resultados obtenidos son de los tratamientos para MT (TCF-A4D, TCF-A8D, TCS-A4D, TCS-A8D, TCF-AA4D, TCF-AA8D, TCS-AA4D, TCS-AA8D) y UAI (UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120 UCS-A30, UCS-A60, UCS-A120, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120 UCS-AA30, UCS-AA60, UCS-AA120), este parámetro se incluyó como parte de la caracterización visual para los extractos obtenidos del método de ultrasonido de alta intensidad UAI y método tradicional (MT), ya que en literatura no existe información precisa sobre qué apariencia presentan los extractos al emplear crestas frescas (CF) y crestas secas (CS), durante el proceso de extracción y posterior al proceso de purificación con A y AA. Żelechowska, Sadowska, and Turk (2010), usaron este parámetro también para medir el contenido de hidroxiprolina se determinó después de la hidrólisis del material. Dicho lo anterior, así que en esta sección se obtuvieron los parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) con un colorímetro en extractos crudos ( $c$ ) y purificados ( $p$ ).

El color es un atributo importante en alimentos, y se considera el criterio principal para la aceptación o rechazo de un producto (Centenaro, Mellado, & Prentice, 2011). En este caso, el color es importante para diferenciar la calidad y pureza final de los extractos finales. Una vez obtenidos la medición de los parámetros ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), se calculó  $\Delta E$  para evaluar y comparar la diferencia de color de los tratamientos antes y después del proceso de purificación.

### 6.6.1 Método tradicional (MT)

La Tabla 12, muestra los tratamientos de AA por método tradicional (MT), al calcular  $\Delta E$ , se puede identificar la diferencia de color comparando los extractos crudos (<sub>c</sub>) (TCF-AA4D<sub>c</sub>, TCF-AA8D<sub>c</sub>, TCS-AA4D<sub>c</sub>, TCS-AA8D<sub>c</sub>) y los tratamientos posteriori al proceso de purificación (<sub>p</sub>) (TCF-AA4D<sub>p</sub>, TCF-AA8D<sub>p</sub>, TCS-AA4D<sub>p</sub>, TCS-AA8D<sub>p</sub>).

Los valores L\* se refieren a la luminosidad de la muestra, los valores a\* representan la cuantificación de los compuestos de color rojo (valores positivos) y verde (valores negativos) y los valores b\* representan la cuantificación de los compuestos de color amarillo (valores positivos) y azul (valores negativos) (Araujo-Cerqueira, 2024). Los tratamientos de este proyecto, no mostraron diferencias significativas entre extractos crudos y purificados ni si las crestas eran CF o CS. Los tratamientos post purificación, presentan valores cercanos a 50, que indica una mayor luminosidad (ósea mayor aproximación hacia el blanco).

El parámetro a\* refiere a los valores positivos para rojo, negativos para verde, en la Tabla 13 los valores fueron negativos, por tanto, se observa una tendencia al color ligeramente verde principalmente en los tratamientos de CS.

Asimismo, el parámetro b\* (que indica tonalidad de amarillo-azul), de manera general presentaron diferencias estadísticas mas no significativas. Al presentar valores positivos, principalmente en los extractos crudos (<sub>c</sub>) con valores cercanos de (5-9), indicaron una tonalidad ligeramente amarilla, mientras que después del proceso de purificación (<sub>p</sub>), lo valores se encuentran entre (3-4).

En trabajos de Araujo-Cerqueira (2024), obtuvieron extractos de colágeno de *Scomberomorus cavalla* y se obtuvieron los valores: control L\*(30.86-48.58), a\*(-1.09-2.12) y b\*(1.26-6.02) y tratamiento L\*(50.18-55.04), a\*(-1,-3.96) y b\*(4.96-8.83).

Los valores de L\* y b\* presentaron un incremento debido al factor humedad durante la refrigeración presentando un valor L\* más claro (luminosidad) asociado a la producción de compuestos que promueven este brillo relativo por condiciones de almacenamiento y refrigeración. El grupo del tratamiento, adjudican que la luminosidad puede estar asociada al uso de gelatina de piel de atún, que actuó como protección, evitando un aumento menor, en comparación con el grupo control.

**Tabla 13.** Diferencia de color entre tratamientos crudos y purificados del método MT en AA.

Tratamientos	L*	a*	b*	$\Delta E$
<b>TCF-AA4D<sub>c</sub></b>	47.186±4.368 <sup>a</sup>	0.097±0.422 <sup>a</sup>	8.794±0.841 <sup>c</sup>	<b>9.508</b>
<b>TCF-AA8D<sub>c</sub></b>	39.626±4.256 <sup>a</sup>	-0.385±0.052 <sup>a</sup>	4.913±0.895 <sup>b,c</sup>	<b>8.825</b>
<b>TCS-AA4D<sub>c</sub></b>	47.186±4.368 <sup>a</sup>	0.097±0.422 <sup>a</sup>	8.794±0.841 <sup>b,c</sup>	<b>8.465</b>
<b>TCS-AA8D<sub>c</sub></b>	47.468±2.036 <sup>a</sup>	-0.343±0.337 <sup>a</sup>	5.823±0.822 <sup>b,c</sup>	<b>4.663</b>
<b>TCF-AA4D<sub>p</sub></b>	46.953±0.770 <sup>a</sup>	-0.411±0.052 <sup>a</sup>	3.153±0.306 <sup>b,c</sup>	<b>9.508</b>
<b>TCF-AA8D<sub>p</sub></b>	47.407±1.309 <sup>a</sup>	-0.356±0.050 <sup>a</sup>	3.227±0.316 <sup>a,b</sup>	<b>8.825</b>
<b>TCS-AA4D<sub>p</sub></b>	46.534±0.431 <sup>a</sup>	-0.498±0.081 <sup>a</sup>	4.127±0.359 <sup>a</sup>	<b>8.465</b>
<b>TCS-AA8D<sub>p</sub></b>	46.001±0.715 <sup>a</sup>	-0.413±0.037 <sup>a</sup>	3.716±0.347 <sup>a</sup>	<b>4.663</b>

\*Los valores son medias ± DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. Donde: Ácido acético 0.5 M (AA), extracto crudo (c) y extracto purificado (p).

La Tabla 14, muestra una comparación entre los tratamientos del solvente A, para cada parámetro de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), no se mostraron diferencias significativas más si estadísticas. El parámetro  $L^*$ , la luminosidad también se ve incrementada ligeramente después de la purificación con valores cercanos a 50, que indica una mayor luminosidad (ósea mayor aproximación hacia el blanco).

El parámetro  $a^*$ , los tratamientos no mostraron diferencias significativas, por lo que, al identificar valores negativos, se infiere que tienen una tendencia al color ligeramente verde principalmente en los tratamientos de CS.

El parámetro  $b^*$  (amarillo-azul), de manera general presentaron diferencias estadísticas mas no significativas. Los resultados presentaron fueron positivos, y al ser valores cercanos de (6-9) indica una tonalidad ligeramente amarilla, principalmente en los extractos crudos, mientras que después del proceso de purificación se acercan a valores menores a (3-3.5) que se aproxima más a un color azul con tendencia al blanco.

**Tabla 14.** Diferencia de color entre tratamientos crudos y purificados del método MT en A.

Tratamientos	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$
TCF-A4D <sub>c</sub>	37.607±1.791 <sup>b</sup>	-0.645±0.107 <sup>a</sup>	7.377±1.433 <sup>a, b</sup>	<b>9.508</b>
TCF-A8D <sub>c</sub>	38.743±3.805 <sup>b</sup>	-0.595±0.935 <sup>a</sup>	6.227±1.080 <sup>b, c</sup>	<b>8.825</b>
TCS-A4D <sub>c</sub>	52.278±9.982 <sup>a</sup>	-0.780±0.643 <sup>a</sup>	9.365±1.500 <sup>a</sup>	<b>8.465</b>
TCS-A8D <sub>c</sub>	46.552±1.335 <sup>a, b</sup>	-0.397±0.366 <sup>a</sup>	7.973±1.207 <sup>a, b</sup>	<b>4.663</b>
TCF-A4D <sub>p</sub>	46.421±0.908 <sup>a, b</sup>	-0.217±0.247 <sup>a</sup>	3.835±0.303 <sup>c, d</sup>	<b>9.508</b>
TCF-A8D <sub>p</sub>	47.108±0.525 <sup>a, b</sup>	-0.263±0.020 <sup>a</sup>	3.436±0.231 <sup>c</sup>	<b>8.825</b>
TCS-A4D <sub>p</sub>	46.246±0.360 <sup>a, b</sup>	-0.280±0.054 <sup>a</sup>	3.446±0.193 <sup>c</sup>	<b>8.465</b>
TCS-A8D <sub>p</sub>	47.093±0.470 <sup>a, b</sup>	-0.315±0.059 <sup>a</sup>	3.342±0.255 <sup>c</sup>	<b>4.663</b>

Los valores son medias ± DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. Donde: Acetato de sodio 0.5 M (A), extracto crudo (c) y extracto purificado (p).

Los tratamientos crudos (c) (TCF-A4D<sub>c</sub>, TCF-A8D<sub>c</sub>, TCS-A4D<sub>c</sub>, TCS-A8D<sub>c</sub>, TCF-AA4D<sub>c</sub>, TCF-AA8D<sub>c</sub>, TCS-AA4D<sub>c</sub>, TCS-AA8D<sub>c</sub>) provenientes de la extracción de MT, visualmente para los tratamientos de crestas frescas (CF) lucen de una coloración blanca turbia mientras que, para los tratamientos de crestas secas (CS) dan una tonalidad amarilla para crestas secas (CS) (Fig. 42). Esto podría deberse la modificación durante el proceso de desengrasado para crestas secas en ambos solventes (A, AA). Asimismo, podría deberse al tipo de solvente donde el ácido acético se extrae una mayor cantidad de proteínas por tanto las impurezas son mayores cuando los extractos están crudos. De manera que, es necesario establecer este parámetro para la calidad característico de los extractos crudos con la finalidad de tener un mayor conocimiento sobre el control durante la extracción antes y después del proceso de purificación y garantizar la eliminación de las impurezas (proteínas) que coadyuvarán a obtener un polímero.

Żelechowska et al. (2010), el color más pronunciado en los hidrolizados de pescado puede deberse a la presencia de proteína muscular residual que no se ha eliminado por completo, incluso después de los tratamientos de desproteización y desmineralización. El color más pronunciado en los hidrolizados de pescado podría deberse a la presencia de proteína muscular residual que no se ha eliminado por completo, incluso después de los tratamientos de desproteización y desmineralización. Asimismo, las características de cada materia prima también podrían contribuir a esta diferencia, ya que se trata de dos especies animales diferentes. La presencia de pigmentos amarillentos en la piel del atún se debe a la pigmentación natural de la piel del atún, reforzando la variación con respecto a los valores b\*, teniendo en cuenta además el tiempo de extracción, temperatura y época

del año, ya que pueden existir diferencias en la estructura química de los pigmentos naturales que pueden verse alteradas debido a estos factores (Sutrisno et al., 2020). Araujo-Cerqueira (2024), sugieren que la determinación de puntos de color, es fundamental en las extracciones de colágeno ya que cuando hay mayor presencia de compuestos amarillentos están asociados a aminoácidos libres.

Damasceno (2016), en un estudio de color para las muestras de caballa verdadera rociadas con bioactivos a base de quitosano al final del vigésimo día de análisis tuvieron una variación de  $L^*$ (48.42-54.34),  $a^*$ (6.06-11.91) y  $b^*$ (9.69-10.41). Es evidente que los valores de  $L^*$  y  $b^*$ , fueron muy cercanos a los valores encontrados para los filetes de caballa que fueron recubiertos con gelatina y TBHQ.

### 6.6.2 Método ultrasonido de alta intensidad (UAI)

Las Tabla 15, muestra los extractos de los tratamientos de UAI empleando CF y CS empleando AA, se evaluó cada parámetro de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) y se comparó la diferencia de color entre extractos ( $c$ ) y ( $p$ ).

Para los tratamientos extraídos con ácido acético al 0.5 M (AA), los tratamientos presentaron diferencias significativas de UCS-AA60p y UCS-AA120p con respecto a los demás tratamientos para el parámetro  $L^*$ . En el parámetro  $a^*$  los tratamientos purificados ( $p$ ) mostraron diferencias significativas con respecto a los tratamientos crudos ( $c$ ). En el parámetro  $b^*$  (UCF-AA30c, UCF-AA60c, UCF-AA120c) mostraron diferencias significativas.

Asimismo, el ácido acético (AA) al ser un ácido es ampliamente utilizado principalmente en la extracción de proteínas como el colágeno (León-López, Fuentes-Jiménez, Hernández-Fuentes, Campos-Montiel, & Aguirre-Álvarez, 2019) por tanto,

para este caso una mayor cantidad de proteínas implica una mayor capacidad para extraer impurezas como son las proteínas que el acetato de sodio al 5%.

Salem et al. (2024), extrajeron gelatina de piel de pescado enriquecida con extracto de berros aplicada a filete de tiburón liso refrigerado, donde obtuvieron al final del sexto día de análisis para las muestras valores de L\*, a\* y b\* (60.45, 2.13 y 10.12) en los que solo el valor de a\* se mostró inferior en relación a los encontrados en las muestras que contenían gelatina de piel de atún enriquecida con TBHQ, a diferencia de los valores de L\* y b\* que presentaron valores muy cercanos.

**Tabla 15.** Método UAI: Diferencia de color entre los tratamientos crudos y purificados extraídos con AA.

Tratamientos	L*	a*	b*	$\Delta E$
UCF-AA30 <sub>c</sub>	36.941±2.774 <sup>e</sup>	-0.672±0.117 <sup>b</sup>	7.522±1.261 <sup>f</sup>	<b>11.273</b>
UCF-AA60 <sub>c</sub>	33.818±0.664 <sup>d,e</sup>	-0.387±0.107 <sup>a,b</sup>	7.732±1.265 <sup>f</sup>	<b>13.686</b>
UCF-AA120 <sub>c</sub>	44.597±0.815 <sup>c,d</sup>	-0.527±0.089 <sup>a,b</sup>	5.702±0.607 <sup>f</sup>	<b>4.141</b>
UCS-AA30 <sub>c</sub>	37.403±1.062 <sup>b,c,d</sup>	1.240±0.214 <sup>a,b</sup>	12.038±0.468 <sup>e, f</sup>	<b>13.340</b>
UCS-AA60 <sub>c</sub>	39.420±0.830 <sup>b,c,d</sup>	1.317±0.122 <sup>a,b</sup>	10.784±0.741 <sup>d,e</sup>	<b>9.913</b>
UCS-AA120 <sub>c</sub>	36.405±3.078 <sup>a,b,c</sup>	1.452±0.285 <sup>a,b</sup>	12.073±1.514 <sup>c,d</sup>	<b>13.044</b>
UCF-AA30 <sub>p</sub>	47.347±1.123 <sup>a,b</sup>	-0.340±0.081 <sup>a</sup>	3.198±0.321 <sup>c,d</sup>	<b>11.273</b>
UCF-AA60 <sub>p</sub>	46.795±0.863 <sup>a, b</sup>	-0.282±0.050 <sup>a</sup>	3.384±0.435 <sup>c,d</sup>	<b>13.686</b>
UCF-AA120 <sub>p</sub>	47.801±1.404 <sup>a,b</sup>	-0.455±0.246 <sup>a</sup>	3.078±0.595 <sup>b,c,d</sup>	<b>4.141</b>
UCS-AA30 <sub>p</sub>	47.453±0.734 <sup>a,b</sup>	-0.344±0.033 <sup>a</sup>	3.410±0.260 <sup>a,b,c</sup>	<b>13.340</b>
UCS-AA60 <sub>p</sub>	46.442±0.937 <sup>a</sup>	-0.364±0.079 <sup>a</sup>	3.992±0.350 <sup>a,b</sup>	<b>9.913</b>
UCS-AA120 <sub>p</sub>	46.691±0.528 <sup>a</sup>	-0.336±0.071 <sup>a</sup>	4.252±0.314 <sup>a</sup>	<b>13.044</b>

\* Los valores son medias ± DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. Donde: Ácido acético 0.5 M (AA), extracto crudo (c) y extracto purificado (p).

La Tabla 16, muestra los tratamientos del método UAI con A. Los tratamientos con acetato de sodio al 5% (A), la diferencia de color de los tratamientos se encontró dentro del rango 1-3, de manera que, durante la extracción la diferencia de color fue mayor en crestas frescas (CF) que en secas (CS). Los 3 tiempos de extracción evaluados (30 min, 60 min y 120 min) fueron en decremento para CF:  $\Delta E$  (UCF-A30 = 9.52, UCF-A60 = 6.17, UCF-A120 = 4.87) y para CS:  $\Delta E$  (UCS-A30 = 2.32, UCS-A60 = 0.98, UCS-A120 = 1.49). Esto podría deberse porque el contacto del solvente en materia seca, toma mayor tiempo de contacto con el solvente y particularmente hablando de una sal como el acetato de sodio, por tanto, no se ve reflejado de manera inmediata.

La comparación para cada parámetro de color ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ). El parámetro  $L^*$ , se observa que existen diferencias significativas de los tratamientos de UCS-A30, UCS-A60 y UCS-A120. El parámetro  $a^*$  con A, los tratamientos mostraron valores negativos cercanos a cero, más cerca de la tonalidad ligeramente verde a neutro. Los tratamientos presentaron diferencias estadísticas y no significativas: UCF-A30<sub>c</sub>, UCF-A60<sub>c</sub>, UCF-A120<sub>c</sub>, UCS-A30<sub>c</sub>, UCS-A60<sub>c</sub>, UCS-A120<sub>c</sub>, UCF-A30<sub>p</sub>, UCF-A60<sub>p</sub>, UCF-A120<sub>p</sub>, pero si con respecto a UCS-A30<sub>p</sub>, UCS-A60<sub>p</sub>, UCS-A120<sub>p</sub>. El parámetro  $b^*$ , los extractos presentaron valores positivos, sin embargo, estos fueron mayores en los tratamientos con A (UCF-A30<sub>c</sub>, UCF-A60<sub>c</sub>, UCF-A120<sub>c</sub>, UCS-A30<sub>c</sub>, UCS-A60<sub>c</sub>, UCS-A120<sub>c</sub>) los extractos crudos se ven ligeramente reducidos en esa tonalidad amarilla (UCF-A30<sub>p</sub>, UCF-A60<sub>p</sub>, UCF-A120<sub>p</sub>, UCS-A30<sub>p</sub>, UCS-A60<sub>p</sub>, UCS-A120<sub>p</sub>) y en casos particulares también con diferencias significativas en purificados como (UCS-A30<sub>p</sub>, UCS-A60<sub>p</sub>, UCS-A120<sub>p</sub>).

**Tabla 16.** Método UAI: Diferencia de color entre los tratamientos crudos y purificados extraídos con A.

Tratamientos	L*	a*	b*	$\Delta E$
UCF-A30 <sub>c</sub>	38.650±2.018 <sup>c</sup>	-0.307±0.074 <sup>c</sup>	5.808±0.609 <sup>f</sup>	<b>9.525</b>
UCF-A60 <sub>c</sub>	41.925±2.636 <sup>b,c</sup>	-0.540±0.076 <sup>b, c</sup>	5.812±0.390 <sup>f</sup>	<b>6.171</b>
UCF-A120 <sub>c</sub>	42.950±0.453 <sup>b,c</sup>	-0.546±0.110 <sup>b, c</sup>	6.380±1.133 <sup>f</sup>	<b>4.873</b>
UCS-A30 <sub>c</sub>	44.400±0.534 <sup>b,c</sup>	-0.304±0.120 <sup>b, c</sup>	5.345±0.300 <sup>f</sup>	<b>2.320</b>
UCS-A60 <sub>c</sub>	45.288±1.325 <sup>b</sup>	-0.300±0.124 <sup>b, c</sup>	5.345±0.300 <sup>e,f</sup>	<b>0.985</b>
UCS-A120 <sub>c</sub>	44.556±0.750 <sup>a</sup>	-0.3578±0.185 <sup>b, c</sup>	5.432±0.248 <sup>e,f</sup>	<b>1.492</b>
UCF-A30 <sub>p</sub>	47.788±0.556 <sup>a</sup>	-0.342±0.061 <sup>b, c</sup>	3.123±0.346 <sup>d,e</sup>	<b>9.525</b>
UCF-A60 <sub>p</sub>	47.513±0.533 <sup>a</sup>	-0.345±0.044 <sup>b</sup>	3.200±0.396 <sup>c,d</sup>	<b>6.171</b>
UCF-A120 <sub>p</sub>	46.830±0.552 <sup>a</sup>	-0.396±0.087 <sup>b</sup>	3.434±0.176 <sup>b, c</sup>	<b>4.873</b>
UCS-A30 <sub>p</sub>	46.278±0.676 <sup>a</sup>	-0.478±0.087 <sup>a</sup>	3.994±0.256 <sup>a, b</sup>	<b>2.320</b>
UCS-A60 <sub>p</sub>	46.067±0.579 <sup>a</sup>	-0.596±0.088 <sup>a</sup>	4.820±0.444 <sup>a</sup>	<b>0.985</b>
UCS-A120 <sub>p</sub>	45.984±0.824 <sup>a</sup>	-0.644±0.067 <sup>a</sup>	5.106±0.399 <sup>a</sup>	<b>1.492</b>

\*Los valores son medias ± DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. Donde: Ácido acético 0.5 M (AA), extracto crudo (c) y extracto purificado (p).

Los tratamientos de cada método de extracción (MT, UAI), se identificó un incremento general del parámetro L\* en los tratamientos purificados principalmente en CS. Posiblemente, esté se relacionado con la cantidad de proteína que presentan los extractos pues los valores del parámetro L\* se encuentran en valores de 30-40 y después de la hidrólisis con papaína, pues la luminosidad incrementa ligeramente con valores de L\* que oscilan de 40-50 aproximadamente, y el aspecto de los tratamientos lucen más transparentes (ver Fig. 42). Este fenómeno ha sido observado también por Centenaro et al. (2011), donde al producirse 6 hidrolizados de 2 especies (pollo y pescado) los valores para el parámetro L\* se encontraron en un valores de 90.6-92.4. Centenaro et al. (2011), por otro lado, en el parámetro a\* los hidrolizados de hueso de pescado hidrolizado con Quimotripsina, hueso de pescado hidrolizado con Tripsina, hueso de pollo hidrolizado con Flavourzyme y hueso de pollo hidrolizado con Quimotripsina fueron similares. Finalmente, el hueso de pollo hidrolizado con

Flavourzyme, presentó el valor más bajo de  $b^*$  (4.5), mientras que hueso de pescado hidrolizado con Tripsina fue el más amarillo con un valor de 7.4. Estos valores son similares a los obtenidos en este trabajo, ya que también se puede observar en la Tabla 16, donde los extractos crudos presentan valores similares los extractos purificados desciende a valores cercanos de  $b^*$  3-4.

### 6.7 Medición de pH de los tratamientos extraídos de los métodos MT y UAI

En las Tablas 16 y 17, donde el parámetro de pH fue medido durante el proceso de extracción de ambos métodos de extracción: MT (TCF-A4D<sub>c</sub>, TCF-A8D<sub>c</sub>, TCS-A4D<sub>c</sub>, TCS-A8D<sub>c</sub>, TCF-A4D<sub>p</sub>, TCF-A8D<sub>p</sub>, TCS-A4D<sub>p</sub>, TCS-A8D<sub>p</sub>, TCF-AA4D<sub>c</sub>, TCF-AA8D<sub>c</sub>, TCS-AA4D<sub>c</sub>, TCS-AA8D<sub>c</sub>, TCF-AA4D<sub>p</sub>, TCF-AA8D<sub>p</sub>, TCS-AA4D<sub>p</sub>, TCS-AA8D<sub>p</sub>).

UAI (UCF-A30<sub>c</sub>, UCF-A60<sub>c</sub>, UCF-A120<sub>c</sub>, UCS-A30<sub>c</sub>, UCS-A60<sub>c</sub>, UCS-A120<sub>c</sub>, UCF-A30<sub>p</sub>, UCF-A60<sub>p</sub>, UCF-A120<sub>p</sub>, UCS-A30<sub>p</sub>, UCS-A60<sub>p</sub>, UCS-A120<sub>p</sub>) con ambos solventes (A, AA). Asimismo, después del proceso de purificación, se tomó el pH final después de los extractos filtrados.

Algunos residuos se eliminaron por centrifugación, para realizar la filtración empleando filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$  (Khanmohammadi, Khoshfetrat, Eskandarneshad, Sani, & Ebrahimi, 2014) y facilitar la cuantificación de ácido hialurónico y proteína obteniendo un extracto cristalino. La diferencia significativa en la cantidad de HA extraído para los diferentes tratamientos de extracción, puede deberse a que se proporciona la fuerza impulsora necesaria para la extracción con control de pH.

Khanmohammadi et al. (2014), explican durante su proceso de extracción observaron que la solución ácida (ácido acético), sirve para disolver los componentes de calcio de

las cáscaras de huevo eliminando cualquier residuo en la matriz mineral. De esta forma, la liberación de componentes neutralizantes ácidos durante el proceso de extracción ácida podría incrementar los valores de pH de las soluciones, lo que provoca una reducción en la fuerza impulsora durante la extracción, y teniendo un impacto del HA extraído para sin control de pH. También, se observó una disminución del HA extraído en la extracción con un control de pH después de 4 días. Esto podría estar relacionado con la reducción de la fuerza impulsora causada por la disminución del contenido de HA de las cáscaras de huevo, así como la degradación de HA con valores de pH ácidos. En la Tabla 17, se puede observar del MT extraídos con A, los tratamientos de extractos crudos MT (TCF-A4Dc, TCF-A8Dc, TCS-A4Dc, TCS-A8Dc) así como después de su proceso de purificación MT (TCF-A4Dp, TCF-A8Dp, TCS-A4Dp, TCS-A8Dp) mantuvieron un pH final neutro. Mientras que los extraídos con AA del MT (TCF-AA4Dc, TCF-AA8Dc, TCS-AA4Dc, TCS-AA8Dc), los extractos presentaron un pH ácido de 2.5-3.0, presentando diferencias significativas con respecto a los tratamientos posteriori a la purificación MT (TCF-AA4Dp, TCF-AA8Dp, TCS-AA4Dp, TCS-AA8Dp).

**Tabla 17.** Determinación de pH de extractos crudos y purificados disueltos A y AA.

<b>Tratamientos</b>	<b>pH</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>pH</b>
<b>TCF-A4D<sub>c</sub></b>	6.610±0.213 <sup>d</sup>	<b>TCF-AA4D<sub>c</sub></b>	2.567±0.036 <sup>c</sup>
<b>TCF-A8D<sub>c</sub></b>	6.886±0.046 <sup>c</sup>	<b>TCF-AA8D<sub>c</sub></b>	2.596±0.096 <sup>c</sup>
<b>TCS-A4D<sub>c</sub></b>	6.661±0.030 <sup>b,c</sup>	<b>TCS-AA4D<sub>c</sub></b>	3.634±0.472 <sup>c</sup>
<b>TCS-A8D<sub>c</sub></b>	5.933±0.545 <sup>a,b</sup>	<b>TCS-AA8D<sub>c</sub></b>	3.001±0.069 <sup>b</sup>
<b>TCF-A4D<sub>p</sub></b>	6.941±0.036 <sup>a,b</sup>	<b>TCF-AA4D<sub>p</sub></b>	6.444±0.206 <sup>a</sup>
<b>TCF-A8D<sub>p</sub></b>	6.952±0.015 <sup>a</sup>	<b>TCF-AA8D<sub>p</sub></b>	6.330±0.097 <sup>a</sup>
<b>TCS-A4D<sub>p</sub></b>	6.872±0.020 <sup>a</sup>	<b>TCS-AA4D<sub>p</sub></b>	6.774±0.110 <sup>a</sup>
<b>TCS-A8D<sub>p</sub></b>	6.937±0.003 <sup>a</sup>	<b>TCS-AA8D<sub>p</sub></b>	6.608±0.106 <sup>a</sup>

\* Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. Donde: Acetato de sodio 5% (A), extracto crudo (c) y extracto purificado (p).

Con respecto al método de UAI, en la Tabla 18, se identifica que los extraídos con A: (UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120, UCS-A30, UCS-A60, UCS-A120, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120) presentaron un pH de 6.8-7.91 para extractos crudos y purificados mientras que los tratamientos extraídos con AA: (UCS-AA30c, UCS-AA60c, UCS-AA120c, UCF-AA30c, UCF-AA60c, UCF-AA120c) presentaron un pH ácido y después del proceso de purificación (UCS-AA30p, UCS-AA60p, UCS-AA120p, UCF-AA30p, UCF-AA60p, UCF-AA120p, UCS-AA30p, UCS-AA60p, UCS-AA120p) los pH finales de los tratamientos fueron de 6 aproximadamente.

**Tabla 18.** Determinación de pH de los extractos crudos y los obtenidos después del proceso de purificación disueltos en A y AA.

Tratamientos	pH	Tratamientos	pH
UCF-A30 <sub>c</sub>	7.912 $\pm$ 0.205 <sup>a</sup>	UCF-AA30 <sub>c</sub>	3.090 $\pm$ 0.161 <sup>d</sup>
UCF-A60 <sub>c</sub>	7.440 $\pm$ 0.162 <sup>a</sup>	UCF-AA60 <sub>c</sub>	3.072 $\pm$ 0.203 <sup>b, c, d</sup>
UCF-A120 <sub>c</sub>	7.600 $\pm$ 0.498 <sup>a</sup>	UCF-AA120 <sub>c</sub>	2.988 $\pm$ 0.019 <sup>b, c</sup>
UCS-A30 <sub>c</sub>	6.882 $\pm$ 0.044 <sup>a</sup>	UCS-AA30 <sub>c</sub>	3.473 $\pm$ 0.066 <sup>b, c</sup>
UCS-A60 <sub>c</sub>	6.873 $\pm$ 0.023 <sup>b, c</sup>	UCS-AA60 <sub>c</sub>	3.528 $\pm$ 0.018 <sup>b</sup>
UCS-A120 <sub>c</sub>	6.862 $\pm$ 0.068 <sup>b, c</sup>	UCS-AA120 <sub>c</sub>	3.536 $\pm$ 0.015 <sup>a</sup>
UCF-A30 <sub>p</sub>	6.980 $\pm$ 0.020 <sup>b, c</sup>	UCF-AA30 <sub>p</sub>	6.346 $\pm$ 0.030 <sup>a</sup>
UCF-A60 <sub>p</sub>	6.984 $\pm$ 0.030 <sup>b, c</sup>	UCF-AA60 <sub>p</sub>	6.439 $\pm$ 0.056 <sup>a</sup>
UCF-A120 <sub>p</sub>	6.992 $\pm$ 0.015 <sup>b, c</sup>	UCF-AA120 <sub>p</sub>	6.447 $\pm$ 0.067 <sup>a</sup>
UCS-A30 <sub>p</sub>	6.923 $\pm$ 0.052 <sup>a, b</sup>	UCS-AA30 <sub>p</sub>	6.166 $\pm$ 0.276 <sup>a</sup>
UCS-A60 <sub>p</sub>	6.956 $\pm$ 0.009 <sup>a</sup>	UCS-AA60 <sub>p</sub>	6.333 $\pm$ 0.347 <sup>a</sup>
UCS-A120 <sub>p</sub>	6.967 $\pm$ 0.028 <sup>a</sup>	UCS-AA120 <sub>p</sub>	6.148 $\pm$ 0.093 <sup>a</sup>

\* Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. Donde: Acetato de sodio 5% (A), extracto crudo (c) y extracto purificado (p).

Romruen, Karbowiak, Auras, and Rawdkuen (2024), observaron los valores similares que en sus análisis 3, 4, 5 y 6 no hubo diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, en los demás sí hubo diferencia, demostrando que la gelatina logró mantener valores de pH por debajo de lo considerado ideal para pescado fresco en el rango de hasta 7, incluso al final del último análisis.

Según Damasceno (2016), evaluó el efecto de los recubrimientos bioactivos a base de quitosano sobre la vida útil y la seguridad de la caballa refrigerada (*S. cavalla*), encontró valores de pH para el grupo control de 7.64, mientras que para los grupos que contenían los recubrimientos el pH estaba por debajo de 7 al final del día 21 de análisis.

Finalmente, de manera general se puede observar que el pH extraídos con acetato de sodio al 5% (A), se mantuvieron en un pH de entre 6-8, sin importar el método de extracción (MT y UAI) o si la materia prima (crestas) provenían eran de CS o CF. En el caso de los tratamientos extraídos con ácido acético 0.5 M (AA), se puede observar que los tratamientos crudos de MT y UAI, presentaron un pH cercano a 3, mientras que después del proceso de purificación los tratamientos cambiaron su pH a 6 aproximadamente.

### 6.8 Cuantificación del HA del método ultrasonido de alta intensidad (UAI) y método tradicional (MT)

Previamente, los diseños del proceso para método tradicional (MT) y método ultrasonido de alta intensidad (UAI) se basaron en la recopilación de literatura de Callejas-Quijada et al. (2023) para su posterior comparación.

El contenido de HA, fue medido durante el proceso de extracción de ambos métodos de extracción con ambos solventes (A, AA): MT: TCF-A4D, TCF-A8D, TCS-A4D, TCS-A8D, TCF-AA4D, TCF-AA8D, TCS-AA4D, TCS-AA8D.

UAI: UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120, UCS-A30, UCS-A60, UCS-A120, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120, UCS-AA30, UCS-AA60, UCS-AA120.

A continuación, se explicará el rendimiento de HA que se obtuvo según el tipo de materia prima de crestas frescas (CF) y crestas secas (CS), tipo de solvente (A, AA) y el tipo de método empleado (MT, UAI).

La Fig. 42, muestra los tratamientos evaluados donde se cuantificó el contenido de % HA, de manera general se observa que los tratamientos mostraron las diferencias significativas entre las crestas frescas (CF) y crestas secas (CS), donde CF mostraron un mayor rendimiento.

Los tratamientos con mayor rendimiento fueron los tratamientos extraídos por UAI: UFC-AA120, UFC-AA30, UFC-A120, UFC-A60 seguido de UFC-A30, TCF-AA8D, TCF-AA4D y TCF-A8D. En este caso, los tratamientos de las crestas frescas (CF) de los métodos MT y UAI presentaron un rendimiento en un rango de 7-8% HA.

Kaewbangkerd et al. (2023), mencionan que recientemente, el UAI ha ganado enorme atención en la industria alimentaria debido a que proporciona diversas ventajas, incluyendo la mejora del rendimiento además de ser un proceso no tóxico y ecológico.

En este caso, a pesar de que el rendimiento de MT fue similar a UAI, sin embargo, el tiempo de extracción fue menor que en la extracción tradicional efectuado en 4 y 8 días sin importar el tipo de solvente. Esto ha sido mencionado en trabajos de Kaewbangkerd et al. (2023), quienes indicaron que el tratamiento con ultrasonido podría ayudar a alcanzar un mayor rendimiento en un período de tiempo más corto en comparación con los métodos convencionales. Esto se observó en la extracción de colágeno con ultrasonido que alcanzó un nivel máximo de 6.28% a las 36 h y en un método tradicional 42 h para la extracción con ácido.

También se han observado las mejoras extrayendo componentes una mejora en el rendimiento en cartílago esternal de pollo tratado, pulmones de pollo, medusas, tendones bovinos, entre otros. Se ha observado que, en la extracción de colágeno mediante UAI, la cavitación ultrasónica se puede abrir la estructura de las fibrillas de colágeno mejorando significativamente la extracción ácida y la solubilización del colágeno (Akram & Zhang, 2020; Khong et al., 2018; D. Li, Mu, Cai, & Lin, 2009; Y. Zou et al., 2020).

Asimismo, la extracción asistida por ultrasonidos se considera una "tecnología verde" que permite extraer proteínas animales y vegetales debido a sus ventajas de alta eficiencia, ahorro de energía y enfoque respetuoso con el medio ambiente (Ojha, Aznar, O'Donnell, & Tiwari, 2020).

Otros factores de importancia son el tiempo, intensidad y temperatura de extracción y por tanto, la clave para mejorar la tasa de extracción, rendimiento y tiempos de extracción radica en encontrar y ajustar estos parámetros para la extracción ultrasónica (Arzeni et al., 2012).

Las crestas frescas (CF) presentaron diferencias significativas con respecto a las crestas secas (CS) y no hubo interferencia entre usar el solvente de acetato de sodio 5% o ácido acético 0.5 M. Las crestas secas (CS), los tratamientos de MT mostraron un 2%, mientras que los tratamientos de UAI 4%. Se han empleado solventes orgánicos y sales inorgánicas, como acetato de sodio y CPC (cloruro de cetilpiridinio), para extraer y separar HA del líquido sinovial bovino mediante la formación del complejo HA-CPC (Callejas-Quijada et al., 2023; Kulkarni et al., 2018; Matsumura, De Saiegui, Herp, & Pigman, 1963).

El uso de solventes orgánicos, se ha utilizado en la extracción de HA de las cáscaras de huevo mediante un tratamiento con ácido acético seguido del uso de un contactor con camisa de agua colocado sobre un agitador magnético que maximiza la extracción de HA al poner en contacto las cáscaras de huevo con alícuotas de solución de ácido acético. La precipitación de HA se realizó con isopropanol seguida de centrifugación y suspensión en una solución de acetato de sodio (Khanmohammadi et al., 2014).

Khanmohammadi et al. (2014), realizaron extracciones con ácido acético de 1-6 días de 4-8 M. Boas (1949), empleó acetato de sodio al 5% durante 10 días, para extraer HA y posteriormente precipitó con alcohol etílico, mientras que las proteínas fueron removidas con cloroformo y finalmente el precipitado fue suspendido en acetato de sodio.

Kulkarni et al. (2018) y Kang et al. (2010), extrajeron el polímero usando acetato de sodio al 5 % durante 10 días con cambios cada 24 h. Donde después se precipitó el polímero con alcohol etílico y para desproteinizar se empleó cloroformo y finalmente ser secado. Los tiempos de extracción por método tradicional son variables ya que hay autores que utilizan tiempos de extracción que pueden ser de 4 h y 24 h (Da Rosa et

al., 2007; Srisantisaeng et al., 2013), 1-6 días (Khanmohammadi et al., 2014) o incluso 10 días (Boas, 1949; Kulkarni et al., 2018).

El planteamiento inicial para método tradicional, fue mantener una agitación constante a temperatura ambiente realizando los cambios de solvente además de utilizar CS y CF para observar cuál de las 2 generaba mayor rendimiento. Ya que este tipo de agitación constante es imprescindible para que el solvente de extracción y asegurar un mayor contacto con la materia prima. En este caso, también fue el iniciar con un preacondicionamiento para eliminar residuos grasos que quedaban en las extracciones por este método que se quedó con 2 secados: uno secado inicial directo de las crestas a 50 °C cortadas, para disolver la mayor cantidad de grasa presente y otro secado posterior, para evaporar residuos de acetona y hexano. De esta manera, el planteamiento consistió en usar una menor cantidad de solventes y separar la mayor cantidad posible de grasa con acetona en menos tiempo (Callejas-Quijada et al., 2023).

Lo anterior, puede deberse a una influencia en el acondicionamiento de las crestas como pérdidas posibles de ácido hialurónico durante el secado previo al desengrase para eliminar la mayor cantidad de grasa.

La temperatura de secado en el preacondicionamiento, es una condición no definida aún ya que algunos autores reportan haber manejado condiciones de 45-50 °C (Callejas-Quijada et al., 2023). Sin embargo, cabe señalar que algunos autores han reportado temperaturas durante la extracción de hasta 70-90 °C (Callejas-Quijada et al., 2023).

Otros autores, también manejaron temperaturas superiores a los 50 °C fueron Srisantisaeng et al. (2013), quienes deshidrataron crestas a temperatura ambiente con

3 cambios de acetona y los tejidos se secaron a 80 °C para obtener un peso del tejido constante (Takuo Nakano, Nakano, & Sim, 1994; Srisantisaeng et al., 2013).

Después del proceso de extracción, Srisantisaeng et al. (2013) emplearon papaína usando un tampón de fosfato de sodio 0.1 M que contenía EDTA 0.005 M, clorhidrato de cisteína 0.005 M y azida de sodio al 0.02 % con pH de 6.5. Asimismo, el cloroformo también ha utilizado como disolvente en la extracción de HA de crestas de gallo con para reducir costos del uso de enzimas (Callejas-Quijada et al., 2023; Da Rosa et al., 2012; Kulkarni et al., 2018). Sin embargo, cuando se desea llevar a un proceso escalado algunas limitantes de utilizar este tipo de solventes químicos o sales resultan ser de costo elevado además de generar residuos altamente contaminantes.

Después del proceso de extracción, los extractos tenían un aspecto turbio de color blanco para crestas frescas y uno ligeramente amarillo en el caso de las crestas secas. El método empleado consistió en una extracción químico-enzimática en una proporción de 2 mg/mL del extracto a una temperatura de 50°C durante 30 min (Kilara & Shahani, 1977), con los solventes químicos (acetato de sodio 5% y ácido acético 0.5 M) y posteriormente una hidrólisis enzimática con papaína para eliminar impurezas como las proteínas durante el proceso de agitación (Abdallah, Fernández, Matias, & Bronze, 2020; Callejas-Quijada et al., 2023; Da Rosa et al., 2007). El uso de papaína, tripsina, pepsina y pronasa han sido previamente para las técnicas tradicionales en el aislamiento de glicosaminoglicanos su principal función es la degradación del tejido y la descomposición de las fracciones proteicas (Abdallah et al., 2020).

Úrgeová and Vulganová (2016), al evaluar la hidrólisis enzimática 3 enzimas (papaína, pepsina y tripsina) en la extracción de HA los resultados demostraron que la tripsina

es más eficaz que la papaína y la pepsina. Sin embargo, al tratarse de matrices diferentes, el tipo de enzima empleada para hidrólisis en crestas es la papaína.

En cuanto a los métodos empleados, varían también entre sí por el uso de diversos solventes, algunos de ellos poco económicos. Si HA, se extrae de crestas de gallo/pollo o de bivalvos de moluscos, los tejidos se desengrasan primero utilizando acetona; luego, la papaína, utilizada como enzima, se hierve para desnaturalizar la enzima para que finalmente la muestra obtenida se precipite con etanol y acetato de sodio (Callejas-Quijada et al., 2023). Conviene mencionar que, la temperatura de activación es un punto crítico entre la activación misma de la enzima y la degradación del polímero, como ya se mencionó usar una temperatura superior a 50 °C ya sea a nivel tejido o extracto. En este caso, la temperatura de activación es de 50 °C (Kilara & Shahani, 1977; Srisantisaeng et al., 2013) mientras que otros, reportan temperatura a 60 °C (Pérez-Gumeta et al., 2018) lo que hace que dependa también del tipo de materia prima que se esté manejando.

Asimismo, los solventes empleados para las extracciones (acetato de sodio 5 % y ácido acético 0.5 M) son más económicos y además de no afectar la contaminación del medio ambiente garantizan la extracción.

Da Rosa et al. (2007), las crestas molidas se desengrasaron en solución de cloroformo y metanol (2:1, v/v) durante 24 h a 25 °C. Los tejidos fueron secados e hidratados en buffer de digestión (100 mM acetato de sodio pH 5.0, 5.0 mM cisteína y 5.0 mM EDTA disódico) y después se agregó una solución de papaína en este buffer.

Kulkarni et al. (2018) emplearon crestas de gallo en trozos pequeños con una picadora de acero inoxidable para desengrasar cada 24 h durante 10 días y después evaporar residuos. Se extrajo luego 10 veces con 100 mL de acetato de sodio al 5%. Donde el

material fue puro, blanco y de apariencia fibrosa se precipitó con citrato de sodio salino antes ser purificado.

Srisantisaeng et al. (2013), realizaron una digestión proteolítica de las crestas secas (150 mg), se llevó a cabo utilizando papaína dos veces cristalizada (4 y 8  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de crestas seco) a 65 °C durante 4 h con 5 mL de tampón de fosfato de sodio (pH 6,5) que contenía 5 mmol/L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 5 mmol/L de clorhidrato de cisteína y 0.2 g/L de azida de sodio. Después de la proteólisis, la suspensión se desproteinizó mediante la adición de aproximadamente 2.69 mL de 200 g/L de TCA frío (4 °C) para dar una concentración final de 70 g/L de ácido tricloroacético (TCA) en la mezcla, se mantuvo a 4 °C durante la noche y se centrifugó a 7000 $\times$ g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se dializó (límite de peso molecular 6000-8000 Da, CelluSep [MFPI, Seguin, Tx, EE. UU.]) en agua corriente del grifo durante 24 h, seguido de agua destilada fría durante otras 24 h. Después de la diálisis, se conservó HA para su posterior análisis. Se realizó una digestión enzimática cruda (16 y 32  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de cresta seco) a 50 °C y pH 7.5 utilizando el mismo tampón y el mismo tiempo de digestión que para la digestión con papaína.

Pérez-Gumeta et al. (2018), extrajeron el polímero del humor vítreo donde, el método químico, consistió en el uso de NaCl al 0.2% como solvente y posteriormente fue centrifugado a 4000 rpm durante 20 min a 25 °C. El sobrenadante, fue tratado con bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB) al 1%, dejando reposar por 15 min después del centrifugado el precipitado se agregó CaCl 0.9 M y 1.23 mL de etanol acuoso, y después de centrifugar el sobrenadante se lavó con 0.6 mL de cloroformo al volumen resultante se le agregó 5.1 mL de etanol y 5.1 mL de acetona. Se dejó reposar

12 h y el precipitado de cada tratamiento y se dejó secar en tubos para ser almacenado en refrigeración a 4 °C.

En la extracción enzimática: el humor vítreo, se desengrasó con acetona y secó a 60 °C durante 6 h, la solubilización se realizó con acetato de sodio 100 mM, pH 5.5, EDTA 5 mM y cisteína 5 mM. Agregando papaína se incubando de 24 h a 60°C, 100 rpm. Posteriormente, se puso a ebullición 10 min, centrifugó a 4000 rpm durante 15 min y se añadieron 3 volúmenes de etanol saturado con acetato de sodio con respecto al sobrenadante y se almacenó a 4°C durante 24 h.

Dadas las variables durante un método de extracción tradicional, se buscan nuevas alternativas con métodos actuales para mejorar la extracción así Graciela, José Juan, Gieraldin, Xóchitl Alejandra, and Gabriel (2023), han sugerido previamente el uso de tecnologías emergentes para la extracción de ácido hialurónico en particular, con la posibilidad de obtener rendimientos mayores en menos tiempo. El ultrasonido, no sólo representa una alternativa rápida, eficiente y confiable para mejorar la calidad de los alimentos, sino que también tiene el potencial de desarrollar nuevos productos con una funcionalidad única. El ultrasonido de alta intensidad (UAI), con un rango de frecuencia que oscila entre 16 y 100 kHz, y 10/1000 W/cm<sup>2</sup> de potencia, podría tener una amplia variedad de aplicaciones en la industria alimentaria. Está relacionado con la cavitación, el calentamiento, la agitación dinámica, las tensiones de corte y la turbulencia (Arzeni et al., 2012).

Puede causar cambios químicos y físicos en un medio viscoso mediante la generación cíclica y el colapso de cavidades. El aumento de presión y temperatura en la proximidad de estas cavidades, es la base de los efectos químicos y mecánicos observados. El colapso rápido de las burbujas produce fuerzas de corte en el líquido

circundante que son lo suficientemente fuertes como para romper los enlaces covalentes en materiales poliméricos que se disuelven en la fase de masa (Arzeni et al., 2012).

Autores como da Rocha and Noreña (2020), extrajeron compuestos bioactivos del orujo de uva utilizando un tratamiento de ultrasonidos (250, 350 y 450 W durante 5, 10 y 15 min) y observó que la extracción realizada durante 10 min resultó en un contenido máximo de antocianina (45% más). Además, los fenólicos y la antocianina se extrajeron de las cáscaras de jabuticaba utilizando un baño de ultrasonidos (a 25 y 40 kHz) y se observó que la extracción máxima tuvo lugar a 25 kHz durante 10 min de tiempo de exposición (Fernandes, Fonteles, Rodrigues, de Brito, & Tiwari, 2020).

El proceso de extracción con solventes, también es un proceso de transferencia de masa sólido-líquido, donde este efecto, daña las paredes celulares por ejemplo de las plantas, permitiendo que los solventes penetren fácilmente en las muestras para mejorar la transferencia de masa. Gallo, Ferrara, and Naviglio (2018), mencionan que la aplicación del proceso de extracción asistida por ultrasonido en relación con la reducción del ciclo de extracción en componentes naturales requiere más horas o incluso días utilizando procesos tradicionales. A través de esta técnica de extracción se han extraído polifenoles, minerales odorantes, así como sustancias orgánicas.

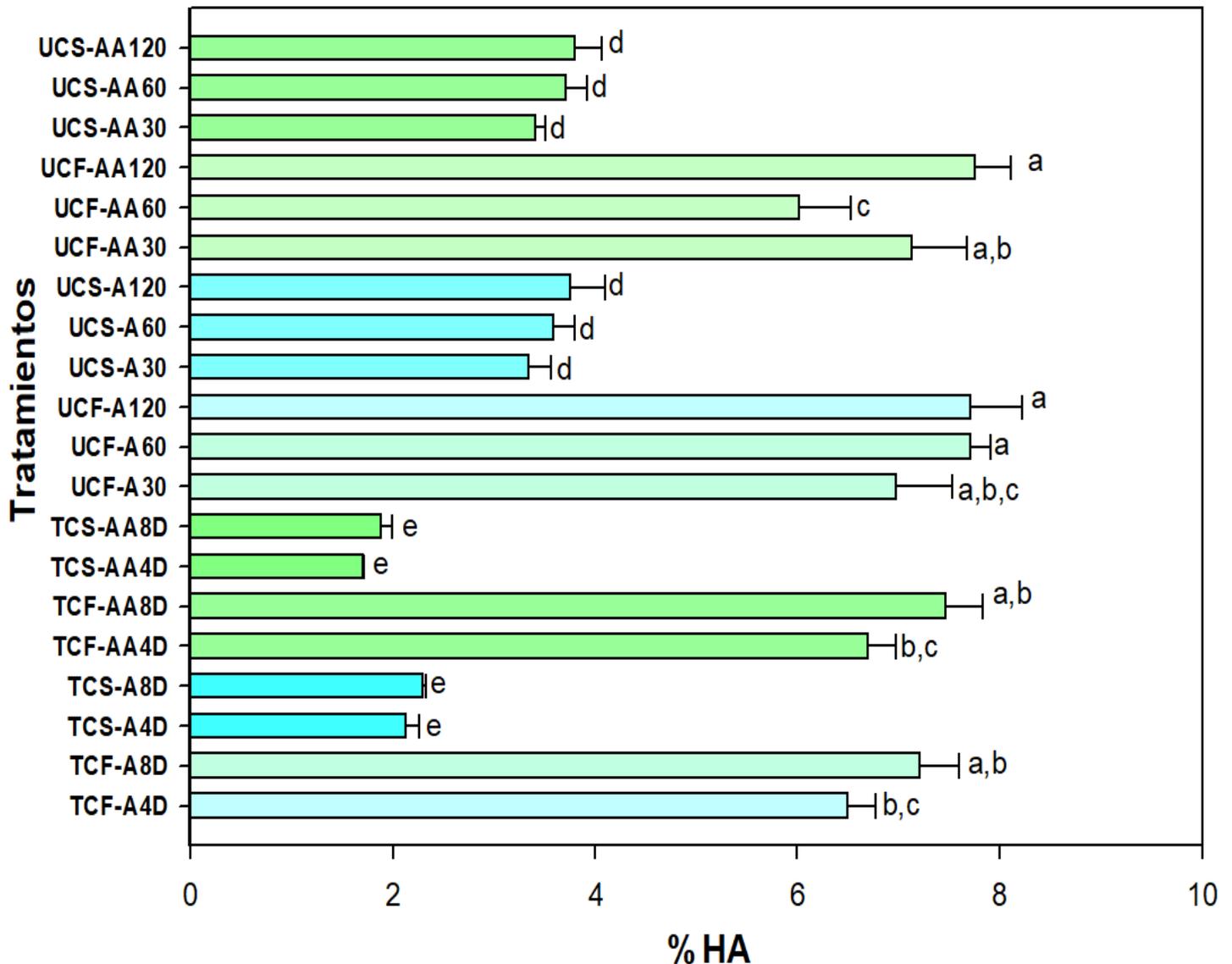
Los resultados mecánicos, muestran una máxima penetración del disolvente dentro de las células al mejorar el efecto de difusión y cavitación, lo que permite la ruptura de las paredes celulares además de liberar los compuestos en su medio (Gallo et al., 2018). Por lo tanto, se obtienen mayores rendimientos con esta tecnología utilizando una duración más corta y bajas condiciones de operación. Sin embargo, varios estudios informaron que este tipo de extracciones representan otro derivado de la técnica

tradicional considerando alimentos y productos naturales que son ecológica y económicamente viables. Las principales ventajas, son las reducciones en los tiempos de operación y extracción, la cantidad y energía del disolvente utilizado durante las operaciones unitarias y las emisiones de CO<sup>2</sup> (Bhargava, Mor, Kumar, & Sharanagat, 2021). Graciela et al. (2023), mencionan que las extracciones tradicionales para la extracción de HA involucran extracción química, enzimática o combinada. Sin embargo, la diferencia del proceso de extracción depende de factores: el costo, el impacto ambiental, el rendimiento y nivel de pureza se ven incrementados en la medida de la cantidad y calidad de polímero extraído.

En este trabajo, los tratamientos MT (TCF-8D, TCF-4D, TCF-A8D, TCF-A4D) se obtuvieron rendimientos cercanos a 8%, que está dentro de lo reportado por T. Nakano and Sim (1989), quienes extrajeron HA de crestas y barbillas de estirpes (White Leghorn, 52 sem) por método químico-enzimático con ácido clorhídrico 4 N con un rendimiento de 23±3% en peso seco 14±2% en peso seco. Por otro lado, Srisantisaeng et al. (2013) obtuvieron un rendimiento menor al obtenido en este trabajo, ya que la fuente fueron pollos (Arbor Acres, edad 5-6 sem de 2.4-2.6 kg) por método tradicional (químico-enzimático) utilizando una enzima comercial donde se obtuvo un rendimiento 0.465-0.493% en peso seco en comparación que con la enzima proteolítica (0.397-0.439% peso seco) obtenida de las vísceras de los mismos. Pérez-Gumeta et al. (2018), realizó una extracción tradicional de HA del humor vítreo de tilapia utilizando 2 métodos: químico-enzimático y químico. En el primero (químico-enzimático) se utilizó acetato de sodio 100 mM obteniendo un rendimiento mayor ( $8 \times 10^{-3}$ % peso seco) que el método químico (rendimiento  $2.2 \times 10^{-3}$  % peso seco). Los tratamientos efectuados con UAI (UFC-AA120, UFC-AA60, UFC-AA30, UFC-A120, UFC-A60, UFC-A30)

también mostraron un rendimiento cercano al 8% similar al método tradicional (TCF-8D, TCF-4D, TCF-A8D, TCF-A4D) sin embargo, cabe señalar que estos implicaron un menor tiempo de extracción.

El método tradicional (MT), se desarrolló para tener un control y un punto de comparación con respecto al método UAI, pues como ya se mencionó, algunos autores sugieren que la principal desventaja de estos métodos de extracción es que consumen mucho tiempo, requiriendo de 2-4 días y tienen un rendimiento relativamente bajo (Kaewbangkerd et al., 2023), aunque en este caso los rendimientos entre ambos tratamientos fueron similares (ver Fig. 44). Por lo tanto, se deberían buscar enfoques alternativos que proporcionen mayores rendimientos en períodos de tiempo más cortos. Pocos autores, han incursionado sobre la inclusión del método de ultrasonido de alta intensidad por lo que Hafsa et al. (2017), extrajeron ácido hialurónico (HA) de cresta de gallo donde no se reporta un rendimiento, sin embargo, se puso a prueba un extracto de HA bajo peso molecular mediante degradación ultrasónica en comparación con un estándar para evaluar sus actividades antioxidantes y antiglicación.



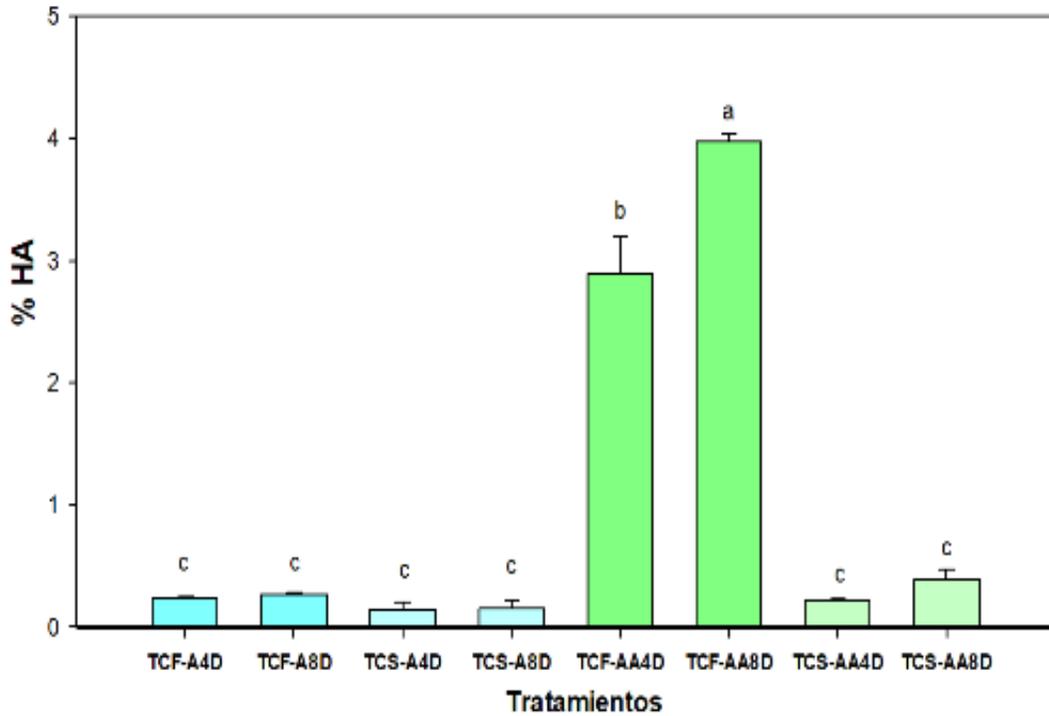
**Figura 44.** Comparación del contenido de % HA entre los métodos MT y UAI presente en los tratamientos extraídos con acetato de sodio 5% (A) y ácido acético 0.5 M (AA) respectivamente. Los valores son medias ± DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey.

Finalmente, se cuantificó el contenido de ácido hialurónico de los residuos que son los precipitados del último paso del proceso de purificación (ver Fig. 45 y 46) con esto se comprobó y comparó que si se obtiene una menor concentración en este paso a diferencia de los extractos finales (Figura 44).

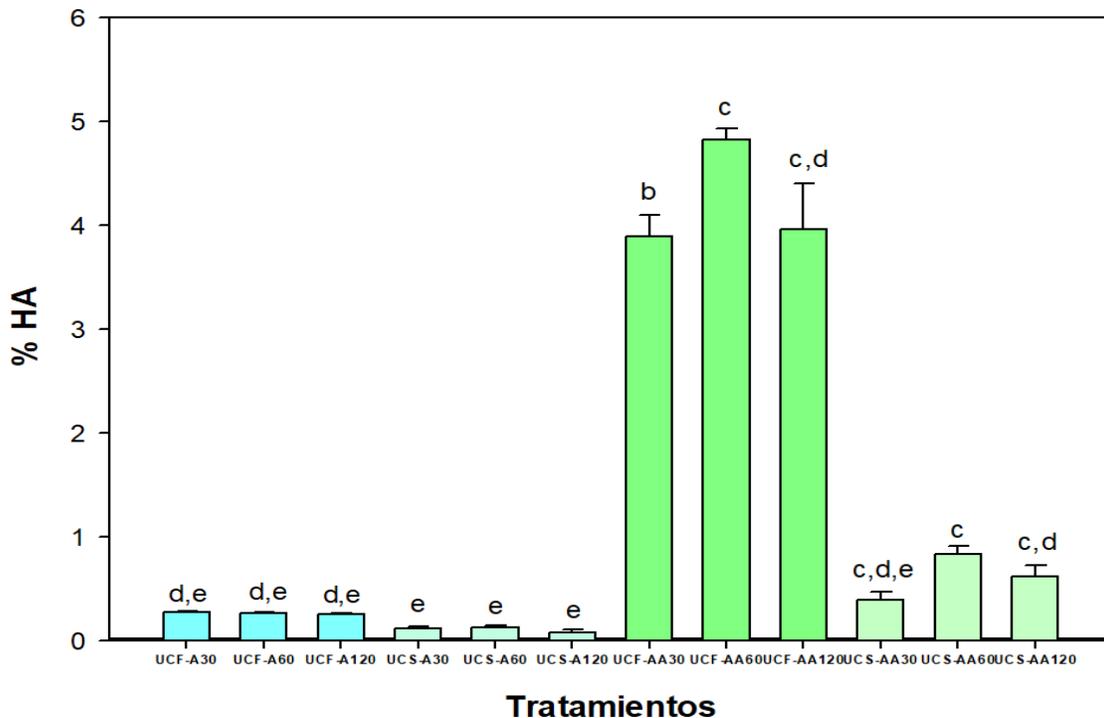
La Fig. 45, muestra los residuos del método tradicional (MT) es claro que en la mayoría de los tratamientos el contenido de HA no supera ni el 1% tanto en CS como en CF. Sin embargo, los tratamientos TCF-AA4D y TCF-AA8D donde se emplearon las crestas frescas con ácido acético 0.5 M presentaron un contenido del 3-4% en la extracción de 4 y 8 días respectivamente.

En la Fig. 46, se observa el rendimiento de los residuos de los tratamientos para UAI durante la purificación tampoco superó el 1%. Sin embargo, el solvente de ácido acético 0.5 M, también generó una mayor cantidad de residuo en el contenido de ácido hialurónico en el método tradicional y método de UAI. Algunos autores han sugerido que el ácido acético, ha sido empleado en los procesos de extracción que resulta ser muy práctico y económico. Como ya se mencionó, en los métodos tradicionales, no garantizan que los tejidos tengan una mayor superficie de contacto entre cada extracción cada 24 h cuando se trata de extraer durante 10 días.

En cuanto a los rendimientos de las crestas frescas, presentaron un mayor rendimiento en MT y UAI. En el método tradicional, ya han utilizado solventes como acetato de sodio que garantizan la extracción del polímero. Kulkarni et al. (2018), extrajo HA de crestas únicamente de machos por método químico utilizando acetato de sodio 5% como solvente.



**Figura 45.** Contenido de % HA presente en MT extraídos con acetato de sodio 5% (A) y ácido acético 0.5 M (AA). Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras diferentes ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey.



**Figura 46.** Contenido de % HA presente en los residuos del UAI extraídos con acetato de sodio 5% (A) y ácido acético 0.5 M (AA), respectivamente. Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey.

### 6.9 Cuantificación de proteína del método de ultrasonido de alta intensidad (UAI) y método tradicional (MT)

Para la cuantificación de proteína de los tratamientos, fue necesario realizarse después de a hidrólisis y previa filtración con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  para que los extractos estuvieran transparentes y no interfirieran en la absorbancia de las muestras. NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies) Spectrophotometer V3.8. Software Nanodrop 1000 3.8, Programa A-280, para la medición de proteínas purificadas. Se emplearon 2  $\mu\text{L}$  de la muestra por cada tratamiento por triplicado.

La Fig. 47, las crestas secas presentaron diferencias significativas con respecto a las crestas frescas sin importar el método de extracción (MT, UAI). También se muestran los mejores tratamientos para cada método de extracción para MT (TCF-A4D, TCF-A8D, TCF-AA4D, TCF-AA8D) y UAI (UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120). Los tratamientos UCS-AA120, UCS-AA60 mostraron diferencias significativas con respecto a todos los tratamientos de ambos métodos (UAI y MT).

Dicho lo anterior, las CF presentaron diferencias estadísticas entre un solvente y otro, pero no significativas, valores de  $<0.5$  mg/mL. Mientras que las CS, presentaron una mayor cantidad de proteína, lo que puede ser atribuible a una posible pérdida de HA durante el proceso de desengrase, pues en el caso particular de las crestas secas, se utilizaron 2 solventes; acetona y hexano. Esto también revela que, durante el manejo de materia prima, las crestas frescas al contener un menor contenido de proteína, es mejor desengrasarlas y someterlas directo a extracción que tratar de eliminar el exceso de grasa con solventes apolares. Sin duda, es necesario considerar el contenido de grasa en cada lote para tener un extracto libre de grasa y proteína.

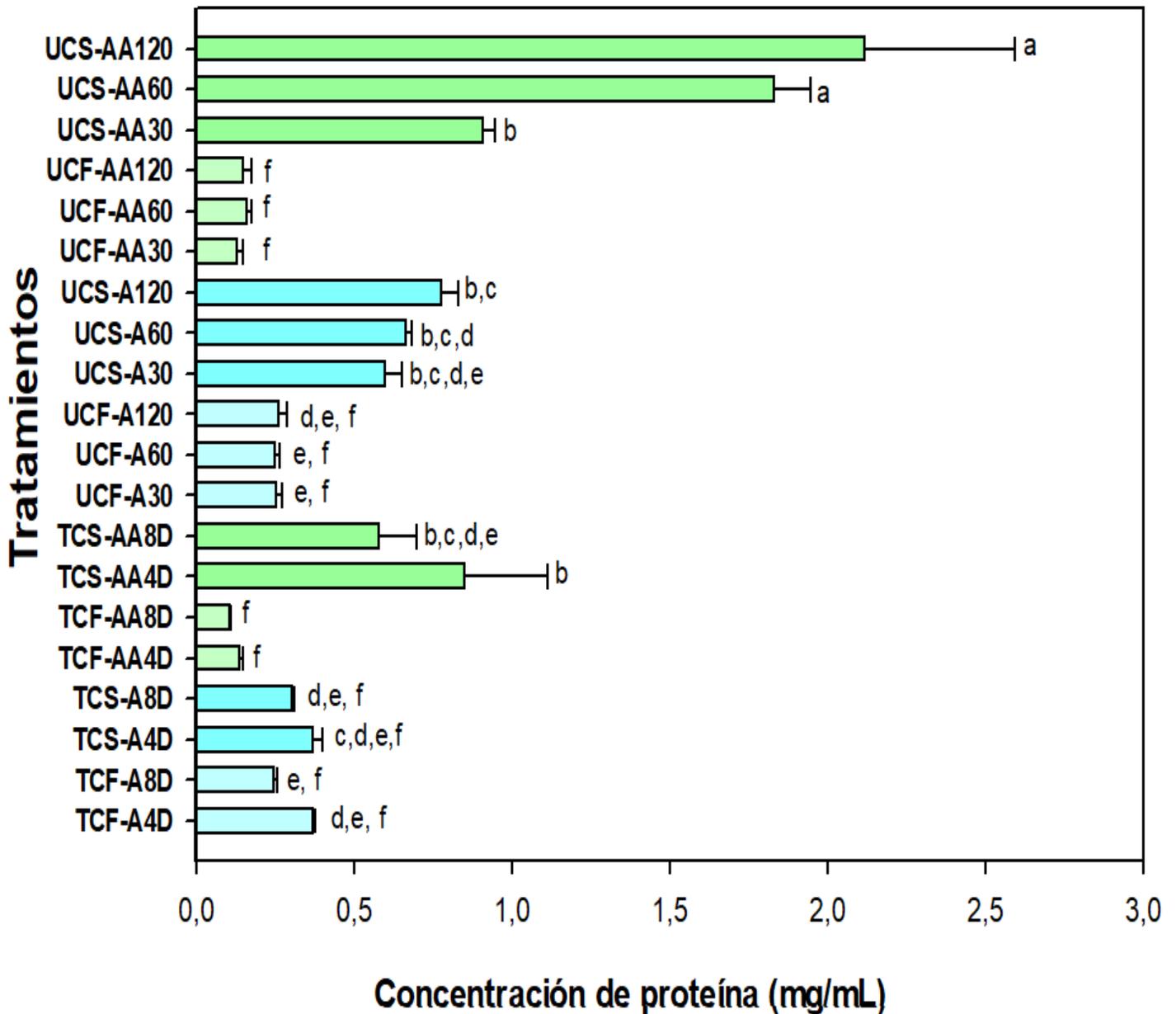
Otra razón, es que posiblemente las crestas secas no se sometieron primero un proceso de rehidratación con sales como en el curtido de pieles ya que esto permite que las fibras de colágeno retengan agua, de lo contrario, por la falta de humedad se compactan la piel se vuelve delgada y dura, menos disponible para permear y tener menor acceso al HA. Por ejemplo en el curtido de pieles, la adición de sales, facilita la penetración cuando la piel esta fresca y cuando ha estado mucho tiempo en congelación podría deshidratarse y plegarse evitando que las sales o enzimas no puedan permear con efectos contrarios en la disminución o anulación de la capacidad de hinchamiento, teniendo aumento de las propiedades de resistencia, superficie, grosor o aumento de la porosidad de las fibras de colágeno (Bravo et al., 2013). Lo anterior, pudo haber impedido que los solventes de extracción (A, AA) no permearn suficientemente el tejido para extraer HA.

Sin embargo, cabe señalar que dicha cantidad residual posterior de la hidrólisis, tiene como función principal disolver las proteínas, por lo tanto, los tratamientos de MT y UAI, no superan una concentración superior a 2 mg/mL. Esto sugiere, que el ácido acético parece ser un solvente viable para los procesos de extracción y purificación de ácido hialurónico. Autores como Balazs (1979), reportaron un contenido de proteína del 0.4% y una lectura de absorbancia a 257 nm ( $A_{257}$ : 0.243). Mientras que, Hafsa et al. (2017), obtuvo un valor de  $A_{280}$ : 0.198. Al tratarse de un método de extracción químico-enzimático, implicó primero en que las crestas de los pollos éstas estuvieron expuestas en constante contacto con el medio. Una vez que los extractos estuvieron completos, se prosiguió con la extracción enzimática que consistió en una hidrólisis con papaína. Como ya se mencionó, la extracción enzimática descompone las

proteínas de alto peso molecular en polipéptidos de bajo peso molecular y promueve la liberación de proteínas de las materias primas (Tabtabaei & Diosady, 2013).

Los tratamientos UCS-A120, UCS-A60, UCS-A30, TCS-AA8D y TCS-AA4D, presentaron ~0.5 mg/mL. El método UAI, tiene implicaciones directas en el tiempo, ya que una vez efectuada la hidrólisis el contenido de proteínas se ve reducido en el mismo orden de magnitud con respecto al método tradicional (MT), lo que hace que el método UAI para la extracción de HA, sea efectuado en el menor tiempo.

Y. Zou et al. (2021), mencionan que la extracción asistida por ultrasonido, se considera una “tecnología verde” para extraer proteínas animales y vegetales debido a sus ventajas de alta eficiencia, ahorro de energía y enfoque ecológico. Las variables de importancia son: tiempo de tratamiento, intensidad y temperatura de extracción son factores importantes al utilizar el método UAI. En esta investigación, permanecieron constantes intensidad y temperatura en tratamientos de UAI y el tiempo de extracción evaluado en 30, 60 y 120 min. Aunque la literatura indica que es imposible eliminar por completo las proteínas extrañas, los productos comerciales presentan niveles muy bajos o mínimos de proteínas; por ejemplo, una evaluación de laboratorio de ocho productos comerciales de hialuronato de sodio indicó que la concentración de proteínas variaba de 3.33-13.83 ppm (Hafsa et al., 2017). En definitiva, El método UAI, tiene implicaciones directas en el tiempo, ya que una vez efectuada la hidrólisis el contenido de proteínas se ve reducido en el mismo orden de magnitud con respecto al método tradicional (MT), lo que hace que el método UAI para la extracción de HA, sea efectuado en el menor tiempo.



**Figura 47.** Comparación del contenido de proteína presente en los tratamientos del método MT de los extractos empleando acetato de sodio 5% (A) y ácido acético 0.5 M (AA) respectivamente. Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras difieren ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey.

### 6.10 Selección de tratamientos de los métodos de extracción

De los tratamientos mencionados, se seleccionaron 10 tratamientos en función del rendimiento de HA (%), contenido de proteína (mg/mL) y tipo de solvente (A, AA) para método tradicional (MT) y método de ultrasonido de alta intensidad (UAI), los cuales se pueden visualizar en la Tabla 19.

Por lo que partir de esta sección se referirá en función de los siguientes tratamientos en pruebas de antioxidantes (DPPH, FIC, FRAP, BCB), citotoxicidad y elaboración de parches transdérmicos en las secciones siguientes.

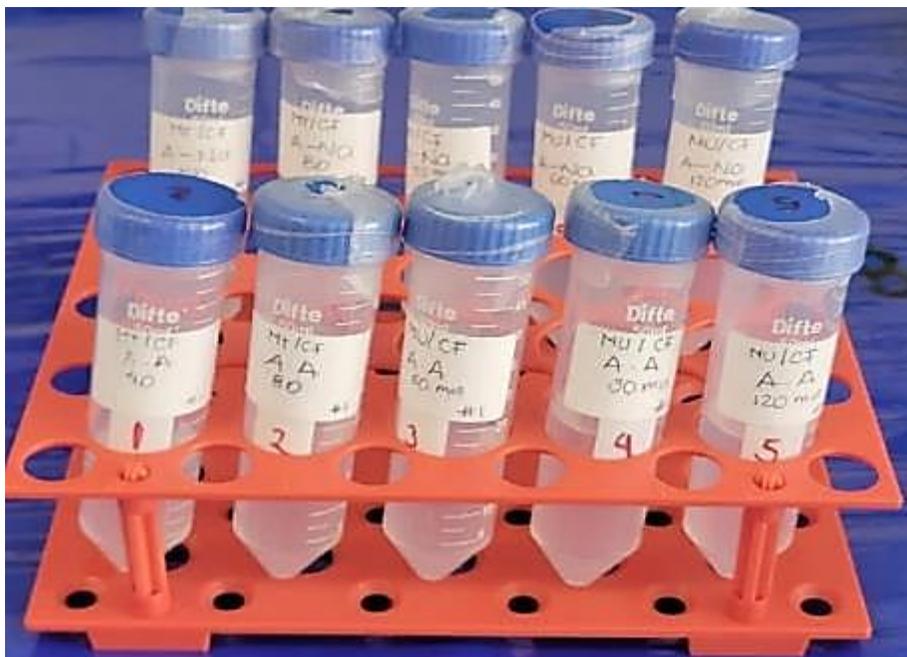
**Tabla 19.** Tratamientos seleccionados de los métodos de extracción MT y UAI de crestas frescas (CF).

<b>Solvente</b>	<b>Ácido Acético 0.5 M</b>	<b>Acetato de sodio 5%</b>
<b>Método Tradicional</b>	1: TCF-AA4D	6: TCF-A4D
	2: TCF-AA8D	7: TCF-A8D
	3: UCF-AA30	8: UCF-A30
<b>Método Ultrasonido</b>	4: UCF-AA60	9: UCF-A60
	5: UCF-AA120	10: UCF-A120

Es evidente que los trabajos de investigación relacionados con la extracción de HA se limitan a especificar, describir y mostrar imágenes sobre el aspecto del ácido hialurónico en extracción y purificación.

En este proyecto se consideró primordialmente describir y reportar cómo se visualizan los extractos de ácido hialurónico en las etapas antes mencionadas. Por tanto, en la Fig. 48, se observa un color transparente acuoso libre de impurezas, con una textura de una solución de glicerina con cierta adherencia a la piel, ligeramente viscoso-aceitoso sin importar si están disueltos en A o en AA.

Se recomienda que para verificar la diferencia entre un extracto crudo y purificado se recomienda al lector regresar a las Tablas 13-16 de este trabajo, para observar la diferencia de color y el aspecto visual.



**Figura 48.** Tratamientos seleccionados de los métodos de extracción MT y UAI con de ambos solventes (A, AA) con mayor rendimiento provenientes de crestas frescas (CF).

### 6.11 Actividad antioxidante de HA obtenidos de los métodos MT y UAI

De los métodos de extracción MT y UAI; se escogieron los tratamientos de mayor rendimiento para evaluar la actividad antioxidante: TCF-AA4D, TCF-AA8D, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120, TCF-A4D, TCF-A8D, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120. Como ya se mencionó, de los tratamientos con mayor rendimiento, se evaluaron 4 actividades antioxidantes: capacidad de eliminación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), poder de quelación de iones ferrosos (FIC), poder reductor de los iones férricos (FRAP) y actividad inhibidora del blanqueo del  $\beta$ -caroteno (BCB), se trabajaron 8 concentraciones (25, 50, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000  $\mu\text{g/mL}$ ) en controles y tratamientos. La materia prima que mayor rendimiento presentó fueron tratamientos de las extracciones por MT y UAI en donde se emplearon CF.

En cada actividad evaluada, se consideró su respectivo control positivo y además un control positivo de HA (*S. equi*) para comparar sus efectos con los extractos con los tratamientos seleccionados. A continuación, se desglosan los resultados obtenidos de cada actividad evaluada.

### 6.11.1 Capacidad de eliminación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

El radical libre DPPH es un radical libre estable y éste ha sido ampliamente aceptado como una herramienta para estimar las actividades de eliminación de radicales libres de los antioxidantes (Hu, Lu, Huang, & Liang, 2004).

Se puede observar en la Tabla 20 y Fig. 49, los resultados del control positivo para determinación de DPPH C1: (ácido ascórbico: Á. asc) presentó diferencias significativas y a medida del incremento en la concentración el porcentaje de inhibición también presentó el mismo comportamiento y se observa que, a mayor concentración, existe una mayor actividad en el ácido ascórbico del 99.59% en una concentración de 4000 µg/mL.

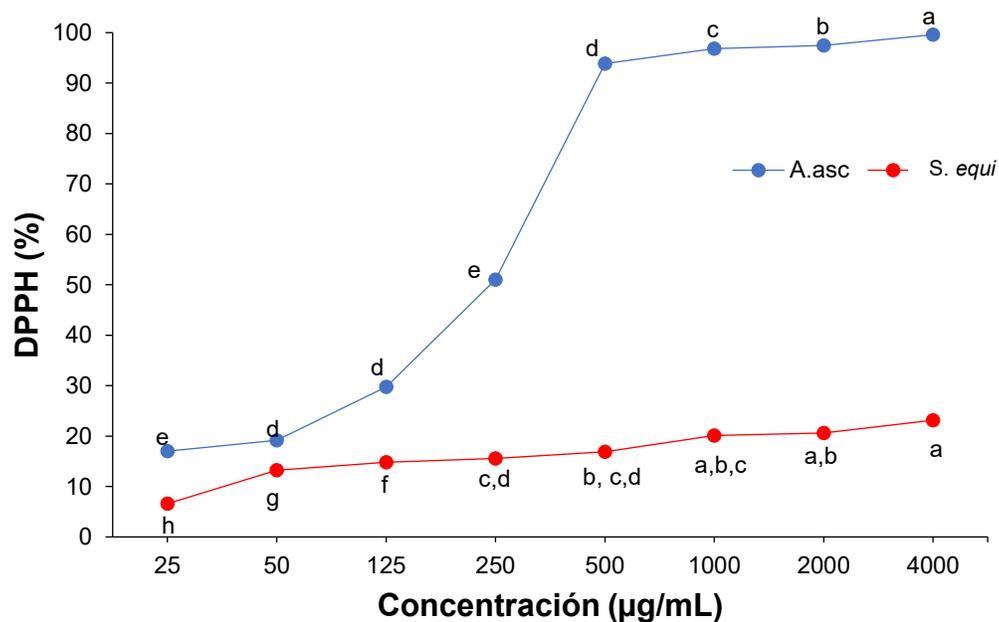
En el caso del control positivo de HA: C2 (*Streptococcus equi*: *S. equi*), se presentaron diferencias estadísticas en la mayoría de las concentraciones observándose un incremento gradual de la eliminación del radical finalmente a 4000 µg/mL donde es evidente un porcentaje de inhibición del 23.146%.

Araujo-Cerqueira (2024), al realizar la prueba de DPPH en control y muestras se trabajaron 6 concentraciones (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 µg/mL), donde el ácido ascórbico a la concentración 2000 µg/mL, el cual presentó 95% del porcentaje de inhibición. Este control positivo, también se empleó en este trabajo ya que para una concentración de 4000 µg/mL el porcentaje inhibido fue 99.59%. En cuanto a las muestras, las soluciones de gelatina con TBHQ en concentraciones de 0.01, 0.02 y 0.03%, se obtuvo el mayor porcentaje para la solución de gelatina + 0.03% TBHQ con un porcentaje de inhibición de 66.675%.

**Tabla 20.** Capacidad de eliminación de radicales DPPH del control positivo A. asc. y estándar S. equi. en concentraciones de 25-4000 µg/mL y la concentración efectiva (CE<sub>50</sub>).

Concentración (µg/mL)	DPPH (%)	
	A. asc.	S. equi
25	17.006±0.363 <sup>h</sup>	6.587±0.369 <sup>e</sup>
50	19.146±0.155 <sup>g</sup>	13.238±1.362 <sup>d</sup>
125	29.745±0.471 <sup>f</sup>	14.839±1.838 <sup>d</sup>
250	51.045±0.531 <sup>e</sup>	15.545±3.601 <sup>c,d</sup>
500	93.871±0.553 <sup>d</sup>	16.889±0.693 <sup>b,c,d</sup>
1000	96.845±0.299 <sup>c</sup>	20.101±1.441 <sup>a,b,c</sup>
2000	97.486±0.004 <sup>b</sup>	20.595±0.040 <sup>a,b</sup>
4000	99.597±0.316 <sup>a</sup>	23.146±2.102 <sup>a</sup>
EC <sub>50</sub> (µg/mL)	237.750	12.645

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ). Prueba Tukey. Donde: ácido ascórbico (A. asc.) y *Streptococcus equi* (S. equi).



**Figura 49.** Capacidad de eliminación de radicales DPPH del control positivo A. asc y estándar de HA (S. equi).

Este se diferencia del control comercial de HA (*S. equi*) que, a esa misma concentración, presenta un porcentaje menor de 23.146 % (ver Tabla 20, Fig. 50).

Yamaguchi, Takamura, Matoba, and Terao (1998), un mecanismo importante de antioxidación implica la eliminación de radicales de hidrógeno. El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) tiene un radical libre de hidrógeno con una absorción característica a 517 nm, lo que permite su detección ya que el color púrpura de la solución de DPPH se desvanece rápidamente cuando reacciona con eliminadores de radicales de protones.

De esta manera, se observa que HA comercial, no presenta una actividad antioxidante como el ácido ascórbico. Este fenómeno también se presentó en el trabajo de C. Ke, Sun, Qiao, Wang, and Zeng (2011), la actividad de eliminación de radicales DPPH de la LMw-HA fue mostrada en todas las concentraciones aunque en definitiva, menor que la del ácido ascórbico.

Sadhasivam, Muthuvel, Pachaiyappan, and Thangavel (2013), aislaron HMw-HA de 13, 65,863 Da del hígado de la raya *Aetobatus narinari* donde el efecto de eliminación de radicales DPPH del HA también fue mínimo en comparación con el ácido ascórbico y el poder reductor fue dependiente de la concentración, mostrando un 31.2% de efecto de eliminación a 200 g/mL. Sin embargo, Hafsa et al. (2017), agregaron esta prueba en sus estudios para evaluar qué porcentaje de actividad presentaban tanto un control comercial como los extractos obtenidos.

Campo et al. (2004), mencionan la actividad antioxidante de HA y C4S (condroitín 4-sulfato) en ratas inducidas con  $\text{CCl}_4$ , ambos en altas concentraciones (25 mg/mL) actuaron como potentes antioxidantes, atenuando la peroxidación lipídica. La hipótesis probable sobre el mecanismo por el cual HA y C4S podría ser porque se reducen los radicales libres basados en sus estructuras de ambos polímeros presentan estructuras reticuladas con grupos carboxílicos en algunas posiciones y éstos pueden interactuar con iones metálicos como  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{2+}$ , que son responsables de iniciar la reacción de Fenton, por lo que estas moléculas pueden funcionar como quelantes de metales. Dicha actividad, puede atribuirse a la presencia de grupos carboxílicos, que pueden interactuar con los radicales libres. Asimismo, a partir de los porcentajes de inhibición se puede calcular la concentración efectiva ( $\text{CE}_{50}$ ), que induce la mitad del efecto máximo. Los resultados de la actividad eliminación del radical DPPH del control positivo, ácido ascórbico (A. asc.) y *Streptococcus equi* (S. equi) (Tabla 20, Fig. 50). Donde se obtuvo para ácido ascórbico (A. asc): 237.750  $\mu\text{g/mL}$  y S. equi: 12.645  $\mu\text{g/mL}$ .

El DPPH es un radical libre estable, cuando se expone a los captadores de radicales, la absorbancia disminuye significativamente y este ensayo es aplicable a sistemas hidrofóbicos (D. O. Kim, Lee, Lee, & Lee, 2002). Kanchana et al. (2013), extrajeron HA de *A. plueronectes*, encontraron que la actividad secuestrante de radicales DPPH de mostró una actividad mínima de 19.77 % a 0.2 mg/mL y una actividad máxima de 54.42 % a 1 mg/mL en comparación con el control de ácido ascórbico. La máxima actividad antioxidante actividad de eliminación de DPPH fue 54.42%, lo que podría usarse como agente antioxidante natural. Chunlin Ke et al. (2009), reportaron las actividades de

eliminación de radicales DPPH más altas de 46.83% y 52.24%, a una concentración de 1600  $\mu\text{g/mL}$ .

Los polisacáridos crudos de la cápsula parcialmente purificados mediante cromatografía en columna de intercambio aniónico para proporcionar polisacáridos en cápsula parcialmente purificados, mostraron una actividad de eliminación de radicales DPPH más fuerte que los polisacáridos crudos de la cápsula en el rango de 200-1600  $\mu\text{g/mL}$ . Se ha informado sobre la destacada actividad antioxidante de HA en cresta de gallo; Balogh, Illés, Székely, Forrai, and Gere (2003), se aseveró que la actividad antioxidante la cual promover su uso en medicina o en la industria como alimento como ingrediente natural con propiedades antioxidantes (Rosa, Hoelzel, Viera, Luiz Manique Barreto, & Beirão, 2008).

Z. Chen, Bertin, and Froidi (2013) y Alexander, Browse, Reading, and Benjamin (1999), mencionan que la potencia o eficacia de un fármaco se puede medir de varias maneras; muchas técnicas, ampliamente utilizadas en biología y farmacología, se basan en el análisis de curvas de concentración-efecto a través de la medición de la concentración del fármaco necesaria para dar el efecto máximo ( $G_{\text{max}}$ ) o el 50% de la respuesta máxima ( $EC_{50}$ ). Con respecto al ensayo DPPH, la  $EC_{50}$  es la concentración de antioxidante necesaria para obtener una inhibición radical del 50%.

En la Tabla 21, del solvente de ácido acético 0.5 M de los métodos MT y UAI en los tratamientos de HA (TCF-AA4D, TCF-AA8D, UCF-AA30, UCF-AA60 y UCF-AA120). De manera general, no se presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre las concentraciones evaluadas de cada tratamiento con excepción de UCF-AA60.

En el método tradicional (MT), el tratamiento TCF-AA4D presentó una actividad de eliminación de radicales DPPH del 30.551% a una concentración de 4000  $\mu\text{g/mL}$  y corresponde a la extracción de 4 días con ácido acético al 0.5 M, por lo que a diferencia de la extracción de 8 días (TCF-AA8D), el porcentaje se vió reducido significativamente en un 50%. Se deduce que posiblemente, a mayor tiempo de extracción donde el polímero podría verse degradado por la agitación constante prolongada.

La extracción por método de ultrasonido de alta intensidad (UAI), también disueltos en ácido acético al 0.5 M, el tratamiento UCF-AA60= 21.11%, implicó un tiempo de extracción de 60 min, presentando el mayor porcentaje de inhibición a diferencia de la extracción de 30 min de extracción con el mismo solvente (UCF-AA30=11.75%), mientras que el menor porcentaje reportado para este método fue la extracción de 120 min UCF-AA120=6.07% a una concentración de 4000  $\mu\text{g/mL}$ .

Asimismo, la actividad antioxidante de los compuestos está dada por el valor de  $EC_{50}$ , se calcula a partir de una reducción del 50% de la concentración inicial de DPPH (Neuza & Moreno, 2010). Cabe destacar que, a menor valor de  $EC_{50}$ , mayor es la actividad antioxidante del compuesto analizado, donde el valor es obtenido por regresión lineal y quiere decir que, para tener una capacidad de eliminación de radicales DPPH del 50%, se necesitaría una concentración de muestra mínima.

Como ya se mencionó, los tratamientos con mayor porcentaje de inhibición para este radical fueron: TCF-AA4D y UCF-AA60, la EC<sub>50</sub> se reportó de 10.076 µg/mL y 11.132 µg/mL respectivamente, mientras que el mayor valor de EC<sub>50</sub> fue del tratamiento UCF-AA30 con 31.783 µg/mL. En otras palabras, para tener una capacidad de eliminación de radicales DPPH del 50% (CE<sub>50</sub>), se necesitaría una concentración de TCF-AA4D =10.076 µg/mL y UCF-AA60=11.132 µg/mL.

No obstante, los mejores tratamientos para cada método fueron: MT (TCF-AA4D =30.551%) y UAI (UCF-AA60=21.119%), presentaron mayores porcentajes de inhibición del radical DPPH a una concentración de 4000 µg/mL, que *S. equi* (23.14%) como fuente comercial de HA.

**Tabla 21.** Capacidad de eliminación de radicales DPPH de los métodos (MT, UAI) disueltos en AA de HA en concentraciones de 25 a 4000 µg/mL y la concentración efectiva (CE<sub>50</sub>).

Concentración (µg/mL)	DPPH (%)				
	TCF-AA4D	TCF-AA8D	UCF-AA30	UCF-AA60	UCF-AA120
25	23.630±4.924 <sup>a</sup>	3.805±1.403 <sup>a</sup>	4.496±4.348 <sup>a</sup>	-	-
50	24.349±2.504 <sup>a</sup>	3.880±0.606 <sup>a</sup>	6.656±3.993 <sup>a</sup>	-	-
125	25.490±3.392 <sup>a</sup>	4.762±5.305 <sup>a</sup>	7.557±1.121 <sup>a</sup>	-	-
250	26.045±4.281 <sup>a</sup>	6.141±2.642 <sup>a</sup>	7.696±3.897 <sup>a</sup>	0.355±0.118 <sup>c</sup>	-
500	26.382±5.013 <sup>a</sup>	7.145±0.800 <sup>a</sup>	8.232±0.325 <sup>a</sup>	3.472±4.083 <sup>b</sup>	-
1000	26.930±3.458 <sup>a</sup>	8.488±4.459 <sup>a</sup>	8.936±5.132 <sup>a</sup>	18.083±3.790 <sup>a</sup>	0.899±0.801 <sup>a</sup>
2000	29.547±0.365 <sup>a</sup>	9.397±2.504 <sup>a</sup>	9.788±0.000 <sup>a</sup>	19.611±1.258 <sup>a</sup>	2.821±0.635 <sup>a</sup>
4000	30.551±6.324 <sup>a</sup>	13.922±8.847 <sup>a</sup>	11.758±2.875 <sup>a</sup>	21.119±1.316 <sup>a</sup>	6.079±0.928 <sup>a</sup>
EC <sub>50</sub> (µg/mL)	10.076	19.084	31.783	11.132	29.617

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Prueba Tukey. Las medias con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ). (-) No se registró actividad.

Un polímero afín mencionado es el quitosano y sus derivados, por ejemplo Chaiwong et al. (2020), sintetizaron el carboximetil quitosano (CMCH) de diferentes pesos moleculares de quitosano (LMw, MMw y HMw) en las propiedades antioxidantes e hidratantes. Los resultados del DPPH, indicaron que la muestra L-CMCH mostró la actividad de extracción más alta. Por lo que, las actividades de L-CMCH, M-CMCH y H-CMCH. En cuanto al IC<sub>50</sub>, los valores de DPPH radicales de las actividades de extracción L-CMCH fue de 1.70 mg/mL.

Asimismo, cuando Younes, Hajji, et al. (2014), extrajeron quitosano de camarón (*Metapenaeus monoceros*), también encontraron un valor de IC<sub>50</sub> se determinó entre 1.62-2.20 mg/mL para el quitosano de camarón (*Metapenaeus monoceros*) a diferentes concentraciones. Por lo que el radical DPPH del quitosano y sus derivados (CMCH), aumentaron a medida que la concentración aumentaba. Esto podría deberse probablemente a la pobre capacidad de quitosano para el hidrógeno que impide la ruptura de cadena (Younes, Sellimi, Rinaudo, & Jellouli, 2014). Algunos estudios sugirieron que el levantamiento radical DPPH de quitosano aumentó con la disminución de Mw confirmando así la fuerte actividad antioxidante, que depende del tamaño de las partículas (Heux, Brugnerotto, Desbrières, Versali, & Rinaudo, 2000).

En los tratamientos donde se empleó acetato de sodio al 5% como solvente de extracción: TCF-A4D, TCF-A8D, UCF-A30, UCF-A60 y UCF-A120 (ver Tabla 22). Se puede observar que, para cada concentración la única concentración a la que todos presentaron diferencias significativas fue a la concentración de 4000 µg/mL, y se corrobora que a mayor concentración se observa un mayor porcentaje de inhibición. Los mejores tratamientos obtenidos de DPPH fueron muy similares, el control empleado *S. equi* (23.146%) como fuente comercial de HA y MT (TCF-A4D =23.573%) y UAI (UCF-A120=31.414%), presentaron valores similares de porcentajes de inhibición del radical DPPH a una concentración de 4000 µg/mL (ver Tabla 22).

**Tabla 22.** Capacidad de eliminación de radicales DPPH de los métodos (MT, UAI) disueltos en A de HA en concentraciones de 25 a 4000 µg/mL y la concentración efectiva (CE<sub>50</sub>).

Concentración (µg/mL)	DPPH (%)				
	TCF-A4D	TCF-A8D	UCF-A30	UCF-A60	UCF-A120
25	-	7.086±2.242 <sup>c</sup>	7.468±0.683 <sup>c</sup>	-	4.107±0.090 <sup>d</sup>
50	-	11.984±1.280 <sup>a,b</sup>	7.557±0.562 <sup>c</sup>	1.835±1.405 <sup>c,d</sup>	6.049±0.056 <sup>d</sup>
125	-	11.185±3.091 <sup>b,c</sup>	8.395±3.777 <sup>b,c</sup>	1.825±0.960 <sup>c,d</sup>	11.843±2.814 <sup>c</sup>
250	-	11.293±1.748 <sup>b,c</sup>	9.942±3.254 <sup>a,b,c</sup>	5.975±0.955 <sup>b</sup>	12.116±2.889 <sup>c</sup>
500	13.403±1.575 <sup>b</sup>	12.254±0.542 <sup>a,b</sup>	10.768±3.127 <sup>a,b,c</sup>	5.266±1.829 <sup>b,c</sup>	13.666±1.499 <sup>b,c</sup>
1000	14.891±2.307 <sup>b</sup>	12.426±0.649 <sup>a,b</sup>	12.399±2.762 <sup>a,b,c</sup>	5.169±2.155 <sup>b,c</sup>	14.460±0.842 <sup>b,c</sup>
2000	15.460±2.115 <sup>b</sup>	15.446±0.865 <sup>a,b</sup>	14.478±1.131 <sup>a,b</sup>	7.653±0.067 <sup>b</sup>	16.952±0.000 <sup>b</sup>
4000	23.573±4.709 <sup>a</sup>	16.335±0.930 <sup>a</sup>	16.535±0.443 <sup>a</sup>	13.562±0.239 <sup>a</sup>	31.414±1.648 <sup>a</sup>
EC <sub>50</sub> (µg/mL)	11.940	23.642	18.488	18.797	7.399

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Prueba de Tukey. Las medias con diferentes letras cuando (p ≤ 0.05). (-) No se registró actividad.

Sin embargo, la  $CE_{50}$  de los mismos tratamientos los valores fueron; MT (TCF-A4D =11.940  $\mu\text{g/mL}$ ) y UAI (UCF-A120=7.399  $\mu\text{g/mL}$ ). Finalmente, la mayor  $CE_{50}$  para cada método de extracción fueron MT (TCF-A8D=23.642  $\mu\text{g/mL}$ ) y UAI (UCF-A60 =18.797  $\mu\text{g/mL}$ ). Hafsa et al. (2017), quienes calcularon la  $IC_{50}$ : HMw-HA= 1430  $\mu\text{g/mL}$  y LMw-HA= 760  $\mu\text{g/mL}$  que son valores superiores y quiere decir que, para tener una capacidad de eliminación de radicales DPPH del 50% se requiere una mayor concentración que los obtenidos en este trabajo.

C. Ke et al. (2011), en los que la capacidad de eliminación de DPPH, ambas muestras eran de bajo peso molecular por lo que los porcentajes de inhibición fueron: (LMw HA  $4.52 \times 10^4$  Da=53.63%) y (LMw HA:  $1.45 \times 10^5$  Da=59.38%) en una concentración de 1.6 mg/mL. Sadhasivam et al. (2013), mencionan sobre el efecto del poder reductor en función de la concentración de las muestras donde la inhibición se produjo de manera dependiente de la dosis. Los valores de  $IC_{50}$  se registraron como 12.5 g/mL para estándar y muestra.

Ai, Wang, Yang, Zhu, and Lei (2008), determinaron la actividad antioxidante del quitosano aislado de larvas de mosca *in vitro* por el método DPPH encontraron que el quitosano tiene la capacidad de secuestrar radicales libres.

En otro caso, Rosa et al. (2008), donde el efecto del quitosano sobre el radical libre DPPH fue de 57.1% a 0.5 mg/mL, el cual no coincide con el valor al encontrado en este experimento por HA, a la concentración más baja (10  $\mu\text{g/mL}$ ), que fue del 83.94%. Se ha asociado el comportamiento antioxidante del HA con otros polímeros como el quitosano y sus derivados. Por ejemplo, Kanatt, Chander, and Sharma (2008), demostraron que la combinación de quitosano y extracto de menta, en la misma proporción, actúan como un potente agente antibacteriano-antioxidante que podría

emplearse para conservar y aumentar la vida útil en productos cárnicos. Dicho lo anterior, el quitosano y HA son polímeros con estructuras similares de tal manera que probablemente si éste último, es añadido a los productos cárnicos también actúe como antioxidante.

Chaiwong et al. (2020), sintetizaron carboximetilquitosano (CMCH) de diferentes pesos moleculares de quitosano, el mejor tratamiento para DPPH, mostró una alta actividad depuradora y el valor de  $CI_{50}$  de DPPH fue 1.70 mg/mL.

Younes, Hajji, et al. (2014), también encontraron que el valor de  $CI_{50}$  se determinó entre 1.62-2.20 mg/mL para el quitosano de camarón (*Metapenaeus monoceros*) además de que la capacidad de eliminación de radicales DPPH del quitosano y CMCH aumentó en proporción al aumento de la concentración.

Zhao, Huang, Hu, Mao, and Mei (2011), informaron que el CMCH era un mejor antioxidante que quitosano nativo, especialmente en términos de su poder reductor, capacidad de eliminación de radicales DPPH, así como capacidad quelante de iones ferrosos. En el caso del quitosano nativo, las capacidades de absorción y retención de humedad del quitosano dependían del peso molecular. La capacidad de retención de agua del CMCH está relacionada con la presencia de cargas eléctricas positivas y un alto peso molecular que facilitan la adherencia a la piel cuando se implementa como humectante para la piel.

Muzzarelli and Muzzarelli (2005), revelaron que una solución de CMCH al 0.25% era comparable con un propilenglicol al 20% en términos de capacidad de retención de humedad con una viscosidad equivalente al ácido hialurónico (HA), un compuesto con una excelente propiedad de retención de humedad.

Se ha demostrado que la degradación ultrasónica de los polisacáridos mejora la capacidad de eliminación de radicales hidroxilo y anión superóxido, la capacidad de quelación de iones de hierro y el poder reductor (Zhou, Wang, Ma, & He, 2008). La implicación es que en los tratamientos del método UAI de este trabajo, se emplearon 3 tiempos de extracción y se pueden observar las diferencias con ambos solventes (A, AA) (Tabla 22).

S. Li et al. (2016), menciona que, este fenómeno podría implicarse a una disminución del peso molecular y viscosidad del HA, puede influir en sus bioactividades. Además, la larga cadena principal y alta viscosidad de los polisacáridos, disminuyen las propiedades de absorción y difusión, lo que podría limitar su actividad biológica, por lo tanto, un método eficaz para resolver este problema es degradando la cadena principal. Sin embargo, ninguna de las muestras analizadas mostró una actividad en torno al 50%. Esta puede ser una característica de las muestras, que en comparación con *S. equi.*, que es HA comercial, mostraron una actividad similar.

En cuanto a la capacidad secuestrante del radical DPPH, se puede observar que hubo una dependencia de la dosis entre la concentración y el porcentaje de actividad para el control positivo como y los 10 tratamientos analizados. Este fenómeno, también ha sido observado por C. Ke et al. (2011), en los que la capacidad de eliminación de DPPH, ambas muestras eran de bajo peso molecular y los porcentajes de inhibición fueron: (LMw HA:  $4.52 \times 10^4$  Da=53.63%) y (LMw HA:  $1.45 \times 10^5$  Da = 59.38%) en una concentración de 1.6 mg/mL.

El control positivo ácido ascórbico (C1), presentó los mayores porcentajes de inhibición, mientras que el control de *S. equi* (C2) no superó el 30% en todas las concentraciones evaluadas. De los tratamientos, la mayoría no presentó diferencias significativas, también se observaron porcentajes de inhibición que superan a ambos controles como el caso de UFC-AA60, TCF-A4D, TCF-A8D, UFC-A30, UFC-A60 y UFC-A120. De los 10 tratamientos, TCF-AA4D y UCF-AA120, presentaron diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos. Esto se traduce en que, el método tradicional (MT) fue el mejor tratamiento extraído con ácido acético durante 4 días (TCF-AA4D) y para el método de ultrasonido de alta intensidad (UAI), la extracción de durante 120 min, ya que con el mismo solvente de extracción resultan ser viables para conservar una significativa actividad de eliminación del radical DPPH. Asimismo, los tratamientos rondaron en un rango de inhibición de entre 20-30%, cabe destacar que estamos hablando de productos naturales, obtenidos a partir de residuos industriales. El origen y las condiciones de este material pueden haber afectado el potencial antioxidante de estas muestras. Sin embargo, estos resultados son prometedores y deberían investigarse más a fondo.

### 6.11.2 Poder reductor de los iones férricos (FRAP)

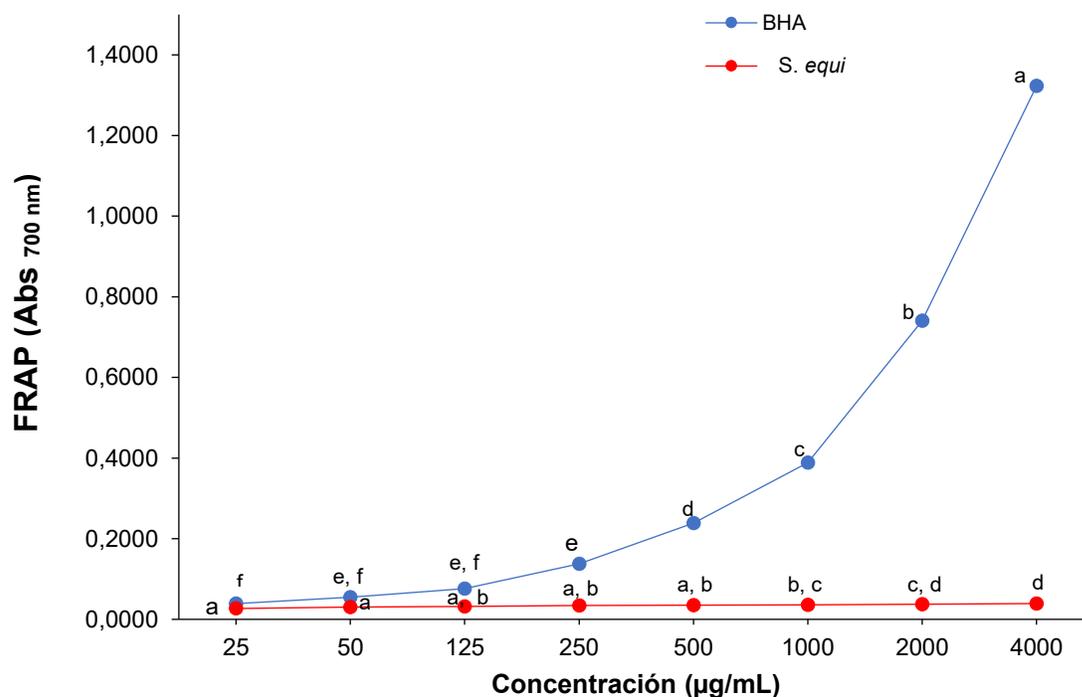
Los resultados del poder reductor del ión férrico (FRAP) del control positivo, BHA y estándar *S. equi*. En la Tabla 23, se puede observar el poder reductor del ión férrico (FRAP), expresado en valores de absorbancia monitoreados a 700 nm, de los controles positivos: BHA y *S. equi*. Se puede observar que a una Abs<sub>700 nm</sub> para (BHA=1.323) y (*S. equi* = 0.039) a una concentración de 4000 µg/mL. Es evidente, que el BHA a esa concentración, como control positivo, tiene una mayor absorbancia a 700 nm, por tanto, un mayor poder reductor del ión férrico (FRAP) en comparación con el control comercial de HA (*S. equi*) (ver Fig. 50). El valor obtenido para el control de BHA es cercano a lo reportado por Araujo-Cerqueira (2024), pues a Abs<sub>700 nm</sub>, el control positivo de BHA presentó una absorbancia de 1.222 a 2000 µg/mL.

A pesar de la linealidad entre la concentración de BHA (hasta 500 µg/mL) y la lectura de absorbancia a 700 nm, no se calcularon los valores de EC<sub>50</sub> en controles y tratamientos (TCF-AA4D, TCF-AA8D, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120, TCF-A4D, TCF-A8D, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120), considerando que los resultados de FRAP corresponden a las lecturas de absorbancia a 700 nm. Esto se también se realizó en el trabajo de Araujo-Cerqueira (2024), quien determinó poder de reducción del ión férrico (FRAP) la linealidad presentada del BHA también correspondió a la concentración de BHA (hasta 500 µg/mL) y la lectura de absorbancia a 700 nm aquí tampoco se calcularon los valores de CE<sub>50</sub> por tanto, los resultados de FRAP se reportaron de acuerdo con las lecturas de absorbancia a 700 nm.

**Tabla 23.** Poder reductor del ión férrico (FRAP) del control positivo BHA y *S. equi* en las concentraciones de 25 a 4000 µg/mL.

Concentración (µg/mL)	FRAP (Abs <sub>700 nm</sub> )	
	BHA	<i>S. equi</i>
25	0.039±0.002 <sup>f</sup>	0.027±0.003 <sup>d</sup>
50	0.055±0.005 <sup>e,f</sup>	0.031±0.002 <sup>c,d</sup>
125	0.076±0.001 <sup>e,f</sup>	0.032±0.003 <sup>b,c</sup>
250	0.138±0.003 <sup>e</sup>	0.035±0.004 <sup>a, b</sup>
500	0.239±0.006 <sup>d</sup>	0.035±0.003 <sup>a,b</sup>
1000	0.389±0.001 <sup>c</sup>	0.036±0.002 <sup>a,b</sup>
2000	0.741±0.061 <sup>b</sup>	0.038±0.003 <sup>a</sup>
4000	1.323±0.137 <sup>a</sup>	0.039±0.001 <sup>a</sup>

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Prueba de Tukey. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Donde: Butilhidroxianisol (BHA) y *Streptococcus equi* (*S. equi*). (-) No se registró actividad. Valores expresados en valores de absorbancia monitoreados a 700 nm (Abs<sub>700 nm</sub>).



**Figura 50.** Poder de reducción del ión férrico (FRAP), expresado en valores de absorbancia monitoreados a 700 nm, del control positivo BHA y estándar *S. equi*.

La Tabla 24, muestra los tratamientos TCF-AA4D, TCF-AA8D, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120 extraídos con ácido acético al 0.5 M (AA). Donde la mayor absorbancia a 700 nm de poder reductor del ión férrico, fue en el tratamiento para el MT (TCF-AA4D = 0.040) que involucró 4 días de extracción con ácido acético al 0.5 M. Mientras que, el método UAI, reportó la mayor absorbancia para el tratamiento UCF-AA120= 0.037 que implicó 120 min de extracción con el mismo solvente. De igual manera, la mayoría de estos tratamientos no presentaron diferencias significativas entre las concentraciones, con la excepción de TCF-AA4D y UCF-AA120. Dichas absorbancias, son relativamente menores con respecto al control positivo de FRAP que es BHA = 1.323 y *S. equi* = 0.039. Por lo que, en valores que los mejores tratamientos fueron similares al control de HA.

**Tabla 24.** Poder reductor del ión férrico (FRAP) de los métodos (MT y UAI) en concentraciones de 25 a 4000 µg/mL.

Concentración (µg/mL)	FRAP (Abs <sub>700 nm</sub> )				
	TCF-AA4D	TCF-AA8D	UCF-AA30	UCF-AA60	UCF-AA120
25	0.032±0.001 <sup>d</sup>	0.034±0.003 <sup>a</sup>	0.029±0.001 <sup>b,c</sup>	0.029±0.001 <sup>c</sup>	0.029±0.001 <sup>d</sup>
50	0.036±0.002 <sup>b,c,d</sup>	0.032±0.001 <sup>b,c</sup>	0.028±0.001 <sup>c</sup>	0.031±0.001 <sup>a,b,c</sup>	0.031±0.001 <sup>d</sup>
125	0.035±0.000 <sup>c,d</sup>	0.033±0.000 <sup>b,c</sup>	0.029±0.002 <sup>b,c</sup>	0.032±0.002 <sup>a</sup>	0.032±0.002 <sup>b,c</sup>
250	0.035±0.002 <sup>b,c,d</sup>	0.032±0.000 <sup>c</sup>	0.033±0.005 <sup>a</sup>	0.031±0.001 <sup>a,b,c</sup>	0.035±0.004 <sup>a,b</sup>
500	0.036±0.005 <sup>a,b,c</sup>	0.032±0.000 <sup>c</sup>	0.031±0.004 <sup>a,b</sup>	0.032±0.001 <sup>a,b</sup>	0.036±0.003 <sup>a,b</sup>
1000	0.037±0.005 <sup>a,b</sup>	0.033±0.001 <sup>b,c</sup>	0.028±0.001 <sup>c</sup>	0.029±0.002 <sup>b,c</sup>	0.037±0.005 <sup>a</sup>
2000	0.039±0.001 <sup>a,b,c</sup>	0.032±0.000 <sup>c</sup>	0.031±0.005 <sup>a,b</sup>	0.030±0.002 <sup>a,b,c</sup>	0.039±0.002 <sup>a</sup>
4000	0.040±0.005 <sup>a</sup>	0.033±0.002 <sup>a,b</sup>	0.031±0.001 <sup>a,b,c</sup>	0.030±0.002 <sup>a,b,c</sup>	0.037±0.003 <sup>a</sup>

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Prueba de Tukey. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Valores expresados en absorbancia monitoreados a 700 nm (Abs<sub>700 nm</sub>).

Un polímero afín previamente mencionado, es el quitosano y algunos derivados. Chaiwong et al. (2020), sintetizaron el carboximetil quitosano (CMCH) de diferentes pesos moleculares de quitosano incluyendo LMw, MMw y HMw en las propiedades antioxidantes e hidratantes. Se observó que el control podría reducir ligeramente los iones férricos a ferrosos. L-CMCH presentó la capacidad más alta para reducir el ión férrico a ferroso seguido de M-CMCH y H-CMCH. De esta manera, Chaiyana, Leelapornpisid, Phongpradist, and Kiattisin (2016), indican que este efecto podría ser atribuido a la sustitución de los grupos -NH por grupos de -COO en la estructura del CMCH no sólo al nivel de solubilidad, sino también a las actividades antioxidantes. Aunque algunos estudios sugirieron los efectos de los pesos moleculares a las actividades antioxidantes del FRAP, tal efecto no fue evaluado en el estudio actual.

En la Tabla 25, se muestran los tratamientos (TCF-A4D, TCF-A8D, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120) evaluados para la actividad de poder reductor del ión férrico (FRAP) de los métodos (MT y UAI). Dichos tratamientos, mostraron diferencias estadísticas entre las concentraciones evaluadas. Por ejemplo, del método tradicional (MT), los tratamientos extraídos con acetato de sodio al 5%, la mayor absorbancia de poder reductor del ión férrico en el tratamiento TCF-A4D=0.038 µg/mL, que involucró 4 días de extracción. Mientras que, el método UAI que reportó la mayor absorbancia para el UCF-A60=0.035, implicó 60 min de extracción. Dichas absorbancias, son relativamente menores con respecto al control positivo de FRAP que es BHA = 1.323 y  $S. equi = 0.039$ . Por lo que podemos observar, que los valores obtenidos de los mejores tratamientos disueltos en A también similares al control de HA.

**Tabla 25.** Poder reductor del ión férrico (FRAP) de los métodos (MT y UAI) de las muestras de HA de 25 a 4000 µg/mL, expresado en valores de absorbancia monitoreados a 700 nm.

Concentración (µg/mL)	FRAP (Abs <sub>700 nm</sub> )				
	TCF-A4D	TCF-A8D	UCF-A30	UCF-A60	UCF-A120
25	0.028±0.002 <sup>b</sup>	0.030±0.002 <sup>a</sup>	0.032±0.001 <sup>b</sup>	0.035±0.001 <sup>a,b</sup>	0.028±0.001 <sup>b</sup>
50	0.029±0.002 <sup>b</sup>	0.030±0.001 <sup>a,b</sup>	0.033±0.002 <sup>b</sup>	0.033±0.000 <sup>c</sup>	0.030±0.001 <sup>a,b</sup>
125	0.032±0.001 <sup>b</sup>	0.028±0.002 <sup>a,b</sup>	0.034±0.001 <sup>b</sup>	0.033±0.001 <sup>b,c</sup>	0.029±0.001 <sup>b</sup>
250	0.035±0.004 <sup>a</sup>	0.030±0.002 <sup>a</sup>	0.038±0.007 <sup>a</sup>	0.035±0.001 <sup>a,b</sup>	0.029±0.000 <sup>b</sup>
500	0.036±0.003 <sup>a</sup>	0.030±0.001 <sup>a,b</sup>	0.032±0.001 <sup>b</sup>	0.034±0.003 <sup>a,b</sup>	0.030±0.001 <sup>a,b</sup>
1000	0.037±0.005 <sup>a</sup>	0.030±0.001 <sup>a,b</sup>	0.031±0.003 <sup>b</sup>	0.035±0.002 <sup>a</sup>	0.028±0.001 <sup>b</sup>
2000	0.039±0.002 <sup>a</sup>	0.029±0.001 <sup>a,b</sup>	0.031±0.002 <sup>b</sup>	0.034±0.002 <sup>a,b,c</sup>	0.029±0.001 <sup>b</sup>
4000	0.038±0.001 <sup>a</sup>	0.028±0.001 <sup>a</sup>	0.031±0.001 <sup>b</sup>	0.035±0.000 <sup>a,b,c</sup>	0.030±0.003 <sup>a</sup>

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Prueba de Tukey. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Valores expresados en absorbancia monitoreados a 700 nm (Abs<sub>700 nm</sub>).

En otras palabras, no hubo diferencia en entre los tratamientos de los métodos de extracción (MT y UAI) ni con el tipo de solvente (A, AA) empleado, pero si con respecto al control positivo que es BHA. El resto de los tratamientos tuvo un comportamiento similar al control 2 (C2) *S. equi*.

Los resultados del poder reductor de los iones férricos, para la metodología utilizada, se expresan en valores de absorbancia. Así, cuanto mayor sea el valor de absorbancia de las muestras, mayor será su potencial reductor, mayor será su actividad antioxidante. De los hallazgos en este estudio, los 10 tratamientos analizados y el control *S. equi*, presentaron valores de absorbancia en torno a 0.020-0.040.

Dichos valores, son inferiores a los encontrados por Araujo-Cerqueira (2024), pues al determinar FRAP en sus muestras, las lecturas a  $Abs_{700\text{ nm}}$  en gelatina fueron de 0.555 y gelatina + TBHQ a concentraciones (0.01%, 0.02% y 0.03%), se obtuvieron absorbancias 0.186, 0.349 y 0.531, respectivamente.

### 6.11.3 Poder de quelación de iones ferrosos (FIC)

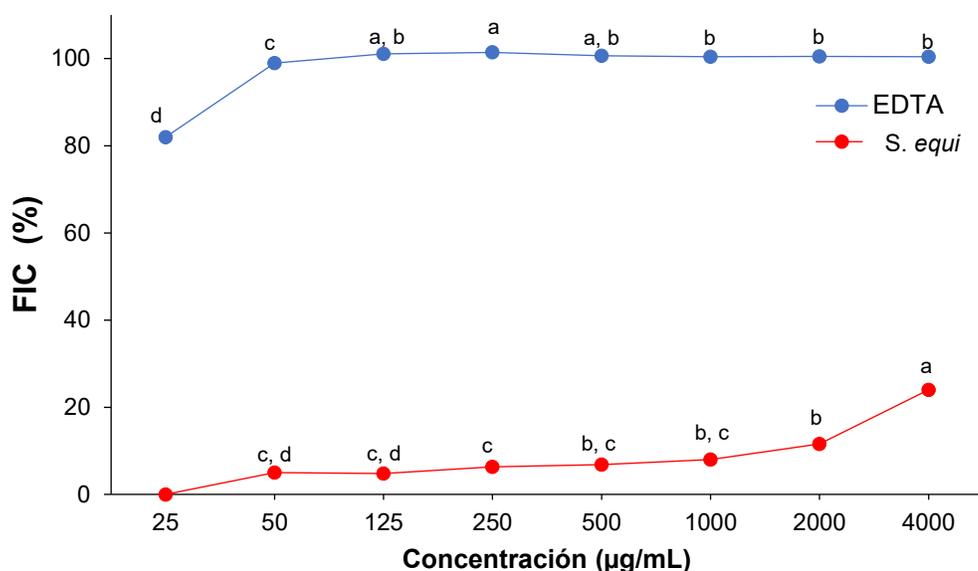
Los resultados del poder de quelación de iones ferrosos (FIC) del control positivo, EDTA y estándar *S. equi* acompañados de los valores de EC<sub>50</sub> (Tabla 26, Fig. 51).

En este caso, el control positivo de EDTA mostró un porcentaje de 100% de poder de quelación de iones ferrosos a partir de una concentración de 50 µg/mL. Esto coincide con los hallazgos de Araujo-Cerqueira (2024), ya que el control de EDTA también presentó 100% de inhibición a partir de la concentración 500 µg/mL aproximadamente. Sin embargo, que el control positivo de ácido hialurónico (*S. equi*), presentó un porcentaje menor de 23.9% a una concentración de 4000 µg/mL, lo que indica que posiblemente no presenta tanto poder para quelar iones ferrosos (ver Tabla 26).

**Tabla 26.** Poder de quelación de iones ferrosos (FIC) del control positivo (EDTA) y *S. equi* en concentraciones de 25 a 4000 µg/mL.

Concentración (µg/mL)	FIC (%)	
	EDTA	<i>S. equi</i>
25	42.790±0.350 <sup>d</sup>	-
50	98.388±0.569 <sup>c</sup>	4.991±0.636 <sup>c,d</sup>
125	101.038±0.139 <sup>a,b</sup>	4.799±1.902 <sup>c,d</sup>
250	101.399±0.132 <sup>a</sup>	6.326±0.514 <sup>c</sup>
500	100.609±0.282 <sup>a,b</sup>	6.843±0.419 <sup>b,c</sup>
1000	100.425±0.200 <sup>b</sup>	7.974±0.818 <sup>b,c</sup>
2000	100.505±0.082 <sup>b</sup>	11.565±0.570 <sup>b</sup>
4000	100.389±0.186 <sup>b</sup>	23.989±4.670 <sup>a</sup>
EC <sub>50</sub> (µg/mL)	26.242	9.816

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Prueba de Tukey. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Valores expresados en absorbancia monitoreados a 700 nm (Abs<sub>700 nm</sub>). Donde: Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y *Streptococcus equi* (*S. equi*). (-) No se registró actividad.



**Figura 51.** Poder de quelación de iones ferrosos (FIC) del control positivo (EDTA) y *S. equi* en concentraciones de 25 a 4000 µg/mL.

A continuación, en la Tabla 27, se observan los tratamientos seleccionados extraídos con ácido acético 0.5 M (AA) de los tratamientos (TCF-AA4D, TCF-AA8D, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120). El método tradicional (MT) disueltos en ácido acético 0.5 M (AA), a una concentración de 4000 µg/mL, el tratamiento con mayor porcentaje de poder de quelación de iones ferrosos fue TCF-AA4D=24.642%, el cual consistió en una extracción durante 4 días. El método de ultrasonido de alta intensidad (UAI) de mayor porcentaje de quelación de iones ferrosos (FIC) fue el tratamiento UCF-AA30=38.966%, que se extrajo durante 30 min, mientras que para los siguientes 2 tiempos de extracción (UCF-AA60, UCF-AA120), el porcentaje se redujo.

**Tabla 27.** Poder de quelación de iones ferrosos (FIC) de los métodos (MT y UAI) de HA de 25 a 4000 µg/mL y la concentración efectiva (CE<sub>50</sub>).

Concentración (µg/mL)	FIC (%)				
	TCF-AA4D	TCF-AA8D	UCF-AA30	UCF-AA60	UCF-AA120
25	3.612±4.950 <sup>d</sup>	5.761±1.674 <sup>d</sup>	2.606±0.437 <sup>c</sup>	-	2.514±1.845 <sup>c</sup>
50	6.811±3.256 <sup>d</sup>	5.207±0.950 <sup>c,d</sup>	3.840±2.519 <sup>c</sup>	-	3.379±2.557 <sup>c</sup>
125	11.493±5.222 <sup>c,d</sup>	7.925±6.249 <sup>b,c,d</sup>	3.375±2.064 <sup>c</sup>	-	8.972±2.696 <sup>b,c</sup>
250	14.480±3.768 <sup>b,c,d</sup>	7.048±9.617 <sup>a,b,c,d</sup>	4.205±2.236 <sup>c</sup>	4.225±4.783 <sup>c</sup>	6.278±6.551 <sup>b,c</sup>
500	16.007±0.609 <sup>b,c</sup>	17.234±2.853 <sup>a,b,c</sup>	5.693±1.419 <sup>c</sup>	5.396±2.895 <sup>c</sup>	12.676±1.275 <sup>a,b</sup>
1000	17.426±1.472 <sup>a,b,c</sup>	18.376±2.433 <sup>a,b</sup>	6.378±0.237 <sup>c</sup>	7.400±1.889 <sup>c</sup>	16.829±0.696 <sup>a,b</sup>
2000	20.746±0.711 <sup>a,b</sup>	18.040±6.614 <sup>a,b</sup>	18.172±5.89 <sup>b</sup>	12.844±2.50 <sup>b</sup>	18.942±5.139 <sup>a</sup>
4000	24.642±3.445 <sup>a</sup>	19.447±1.748 <sup>a</sup>	38.966±1.816 <sup>a</sup>	25.388±1.49 <sup>a</sup>	20.613±4.18 <sup>a</sup>
EC <sub>50</sub> (µg/mL)	9.458	12.074	5.409	7.639	10.152

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Prueba de Tukey. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Valores expresados en absorbancia monitoreados a 700 nm (Abs<sub>700 nm</sub>). (-) No se registró actividad.

Dada la información deficiente sobre la evaluación de antioxidantes (FIC) en HA, se ha comparado con la evaluación de algunos biopolímeros similares. Sae-Leaw, O'Callaghan, Benjakul, and O'Brien (2016), extrajeron hidrolizados de gelatina producidos durante y después de la extracción de gelatina, para evaluar características y actividades antioxidantes de los hidrolizados de piel de lubina donde se presentó acción quelante de los iones ferrosos con una variación entre el 20-60%. Dicha actividad, fue observada por He et al. (2021), evaluaron el efecto ultrasónico sobre la estructura del colágeno, en la correlación entre los cambios estructurales y su hidrólisis enzimática. De esta manera, la muestra de control (colágeno extraído) presentó aproximado del 30%, este dato también coinciden con los datos obtenidos de Araujo-Cerqueira (2024), donde el control (gelatina), presentó 30.87% de quelación de iones ferrosos, y el mejor de tratamiento al evaluar el poder de quelación de los iones ferrosos, la solución de gelatina con TBHQ 0.03% mostró un mayor efecto presentado un 63.64%.

Como ya se mencionó, existe cierta afinidad del HA con el quitosano, algunos autores como Avelelas et al. (2019), trabajaron este polímero soluble en agua y quitooligosacáridos a partir de materia prima de *P. henslowii* (pereiópodos y conchas) y quitosano comercial, la capacidad de quelación de quitosano soluble en agua fue baja en concentraciones de entre 0.062 mg/mL y 1 mg/mL. Por el contrario, el EDTA como control, exhibió una excelente capacidad de quelación de iones ferrosos de aproximadamente  $74.6 \pm 4.1\%$  a concentración de 0.062 mg/mL. Sin embargo, en este proyecto se obtuvo un porcentaje mayor en los tratamientos de HA de ambos métodos (MT y UAI) que el control de HA (*S. equi* = 23.989%).

Al calcular la concentración efectiva ( $CE_{50}$ ) se obtuvieron (MT: TCF-AA4D = 9.458  $\mu\text{g/mL}$ ) y (UAI: UCF-AA30 = 5.409  $\mu\text{g/mL}$ ). En este caso, el mejor tratamiento fue similar al control (*S. equi*  $CE_{50}$  = 9.816  $\mu\text{g/mL}$ ). Por otro lado, la concentración efectiva se incrementó para los tratamientos MT (TCF-AA8D = 12.074  $\mu\text{g/mL}$ ) y UAI (UCF-AA120 = 10.152  $\mu\text{g/mL}$ ).

En la Tabla 28, muestra que los tratamientos extraídos con acetato de sodio al 5% (A) por ambos métodos de extracción (MT y UAI) mostraron diferencias significativas entre las concentraciones principalmente a una concentración de 4000  $\mu\text{g/mL}$ , concentración a la que se obtuvieron valores de actividad más altos en todos los tratamientos al evaluar el poder quelante de los iones ferrosos. Por tanto, también hubo una dependencia de la dosis entre la concentración y el porcentaje de actividad antioxidante. El mejor tratamiento del MT fue TCF-A4D: 64.94% y para UAI fue UCF-A60: 31.22%.

**Tabla 28.** Poder de quelación de iones ferrosos (FIC) de los métodos (MT y UAI) de HA de 25 a 4000 µg/mL y la concentración efectiva (CE<sub>50</sub>).

Concentración (µg/mL)	FIC (%)				
	TCF-A4D	TCF-A8D	UCF-A30	UCF-A60	UCF-A120
25	-	-	-	6.314±0.645 <sup>f</sup>	6.073±0.433 <sup>e</sup>
50	-	1.106±1.046 <sup>d</sup>	-	9.044±1.872 <sup>e</sup>	7.949±0.821 <sup>d,e</sup>
125	3.560±0.102 <sup>c,d</sup>	2.634±0.782 <sup>d</sup>	6.206±0.516 <sup>c</sup>	9.212±0.483 <sup>e</sup>	7.420±0.779 <sup>c,d,e</sup>
250	5.416±5.854 <sup>d</sup>	4.598±0.457 <sup>c,d</sup>	6.146±1.437 <sup>c</sup>	13.422±0.996 <sup>d</sup>	8.222±0.450 <sup>c,d</sup>
500	8.014±5.491 <sup>d</sup>	6.146±13.811 <sup>b,c</sup>	7.825±1.660 <sup>b,c</sup>	17.390±0.605 <sup>c</sup>	9.657±0.526 <sup>c</sup>
1000	17.258±3.460 <sup>c</sup>	14.817±3.537 <sup>c</sup>	9.048±0.991 <sup>b</sup>	17.150±0.609 <sup>c</sup>	9.321±0.475 <sup>c,d</sup>
2000	37.763±2.225 <sup>b</sup>	21.143±5.644 <sup>a,b</sup>	9.537±1.109 <sup>b</sup>	22.008±0.975 <sup>b</sup>	12.159±0.870 <sup>b</sup>
4000	64.943±1.442 <sup>a</sup>	30.343±1.597 <sup>a</sup>	29.104±0.763 <sup>a</sup>	31.221±0.409 <sup>a</sup>	18.340±0.989 <sup>a</sup>
EC <sub>50</sub> (µg/mL)	2.981	7.811	7.987	7.141	15.666

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. (-) No se registró actividad.

De las 5 concentraciones evaluadas 4000 µg/mL, mostró una actividad superior al 40% en todos los tratamientos incluyendo a los 2 controles (C1, C2). Mientras que a 0.25 µg/mL, la actividad se vio reducida. Los tratamientos que mostraron diferencias significativas fueron UCF-AA60 y TCF-A4D. Los valores obtenidos en este proyecto, se encuentran entre el rango de los autores mencionados donde los extractos presentan una actividad FIC y al ser antioxidantes, podrían actuar eliminando iones metálicos prooxidativos. Los tratamientos del método tradicional, disueltos en ácido acético 0.5 M (AA), a una concentración de 4000 µg/mL presentó el tratamiento con mayor porcentaje de poder de quelación de iones ferrosos fue TCF-A4D =64.943% y TCF-AA4=24.642% que implicaron una extracción durante 4 días. El método de ultrasonido de alta intensidad (UAI), el tratamiento extraído también con A de mayor porcentaje de quelación de iones ferrosos (FIC) fueron UCF-A60=31.221% y UCF-AA30 =38.966% que se extrajeron durante 60 min.

### 6.11.4 Actividad inhibidora del blanqueamiento del $\beta$ -caroteno (BCB)

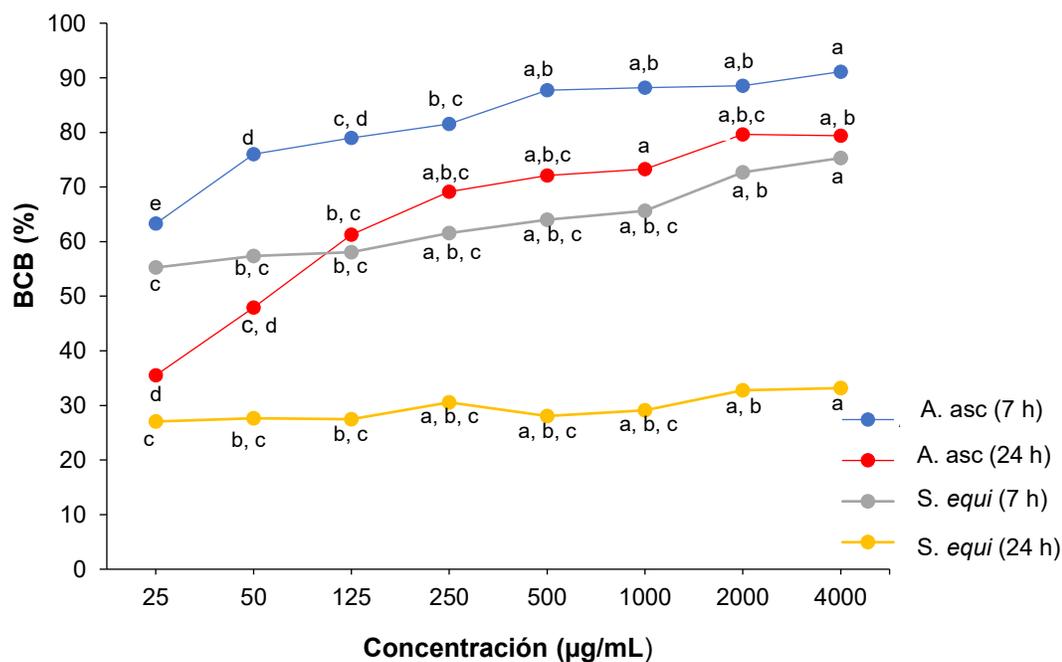
La Tabla 29, muestra el porcentaje de inhibición de las medidas durante las 7 y 24 horas de exposición a la luz para medir la actividad inhibidora del  $\beta$ -caroteno ácido ascórbico (A. asc) y estándar S. *equi* (Tabla 28). Donde los resultados, presentaron que el control positivo de esta prueba (actividad inhibidora del  $\beta$ -caroteno ácido ascórbico) mostró el mayor porcentaje a 4000  $\mu\text{g/mL}$  las 7 h = 91.111% y 24 h = 79.401%. De manera general, se mostraron algunas diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas de ambos controles. Estos valores son similares al estudio realizado por Araujo-Cerqueira (2024), quien reportó para la actividad inhibidora del  $\beta$ -caroteno (ácido ascórbico) que a una concentración de 2000  $\mu\text{g/mL}$  obtuvo 95.165%, mientras que para el segundo control S. *equi*: 7 h = 75.303% y 24 h = 33.174%, respectivamente. De los 2 tiempos evaluados, el valor de  $\text{CE}_{50}$  únicamente se calculó a las 24 h que fueron A. asc (24 h) = 74.062  $\mu\text{g/mL}$  y S. *equi* (24 h) = 14.652  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, donde se mostraron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas (Tabla 29).

En la Fig. 52, se puede observar la comparación de los tiempos de los 2 controles empleados se distingue que el ácido ascórbico presenta una mayor actividad de blanqueamiento de BCB que HA comercial (S. *equi*).

**Tabla 29.** Actividad inhibitora del blanqueamiento con BCB del control positivo A. asc. y S. equi a concentraciones de 25 a 4000 µg/mL, incubados durante 7 y 24 h.

Concentración (µg/mL)	BCB (%)			
	A. asc (7 h)	A. asc (24 h)	S. equi (7 h)	S. equi (24 h)
25	63.292±0.162 <sup>e</sup>	35.508±6.731 <sup>d</sup>	55.245±0.964 <sup>c</sup>	27.045±4.729 <sup>c</sup>
50	76.000±0.347 <sup>d</sup>	47.945±7.239 <sup>c,d</sup>	57.377±0.048 <sup>b,c</sup>	27.616±4.210 <sup>b,c</sup>
125	78.974±1.765 <sup>c,d</sup>	61.246±0.873 <sup>b,c</sup>	58.090±8.598 <sup>b,c</sup>	27.453±4.546 <sup>b,c</sup>
250	81.545±6.481 <sup>b,c</sup>	69.152±1.417 <sup>a,b,c</sup>	61.582±1.791 <sup>a,b,c</sup>	30.565±3.936 <sup>a,b,c</sup>
500	87.710±8.922 <sup>a,b</sup>	72.124±2.435 <sup>a,b,c</sup>	64.003±3.559 <sup>a,b,c</sup>	28.079±5.418 <sup>a,b,c</sup>
1000	88.161±6.911 <sup>a,b</sup>	73.253±1.047 <sup>a</sup>	65.610±6.004 <sup>a,b,c</sup>	29.090±5.953 <sup>a,b,c</sup>
2000	88.536±0.815 <sup>a,b</sup>	79.635±1.882 <sup>a,b,c</sup>	72.694±8.509 <sup>a,b</sup>	32.775±5.680 <sup>a,b</sup>
4000	91.111±7.981 <sup>a</sup>	79.401±1.234 <sup>a,b</sup>	75.303±6.275 <sup>a</sup>	33.174±5.599 <sup>a</sup>
EC <sub>50</sub> (µg/mL)	-	74.062	-	14.652

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras (p ≤ 0.05). Prueba de Tukey. Donde: A. asc.: ácido ascórbico, S. equi.: *Streptococcus equi*, BCB: β-caroteno. (-) No se registró actividad.



**Figura 52.** Actividad inhibitora del blanqueamiento con β-caroteno (BCB) del control positivo A. asc (ácido ascórbico) y S. equi. en concentraciones de 25 a 4000 µg/mL, incubados durante 7 y 24 h.

La Tabla 30, muestra los tratamientos correspondientes a MT y UAI disueltos en AA: (Tabla 30 y Tabla 31). Los tratamientos TCF-AA4D, TCF-AA8D, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120, mostraron resultados de 70% de actividad a partir de una concentración de 1000 µg/mL. De los tratamientos extraídos con ácido acético al 0.5 M (AA), del método tradicional (MT) con el mayor porcentaje de inhibición de BCB fue para el tratamiento TCF-AA4D (7 h) = 81.833% (ver Tabla 30) y TCF-AA4D (24 h) = 40.330% (ver Tabla 30) con una reducción de la mitad de la actividad a una concentración 4000 µg/mL. De esta manera, TCF-AA4D en la concentración más alta después de 24 h, logró mantener la actividad inhibitoria (protección) del betacaroteno en torno al 40%. Del método de ultrasonido de alta intensidad (UAI), el tratamiento con mayor porcentaje de inhibición de BCB fue UCF-AA120 (7 h) = 84.434% y UCF-AA120 (24 h) = 21.544%, con una reducción de la mitad de la actividad a una concentración 4000 µg/mL. Araujo-Cerqueira (2024), determinó la actividad de blanqueamiento de β-caroteno (BCB) de las soluciones de gelatina (66.292%) y gelatina con TBHQ (0.01%, 0.02% y 0.03%), se obtuvieron los siguientes porcentajes 83.36-90.32%. Estos valores coinciden con TCF-AA4D, UCF-AA120, TCF-A4D, TCF-A8D, UCF-A30, en la lectura de 7 h pues posteriormente fue evidente un descenso después de las 24 h. El valor de CE<sub>50</sub> únicamente se calculó para las 24 h en el tratamiento TCF-AA8D (7 h) = 26.552 µg/mL. Sin embargo, después de la lectura de 24 h, la CE<sub>50</sub> para los mayores porcentajes de inhibición fueron: TCF-AA4D (24 h) = 6.043 µg/mL y UCF-AA120 (24 h) = 11.670 µg/mL. Mientras que, los valores más altos para determinar la concentración efectiva CE<sub>50</sub> para cada método de extracción fueron: TCF-AA8D (24 h) = 23.024 µg/mL y UCF-AA60 (24 h) = 30.760 µg/mL, respectivamente.

## Resultados y discusión

**Tabla 30.** Actividad inhibitora del blanqueamiento con BCB de los métodos (MT y UAI) de las muestras de HA de 25 a 4000 µg/mL durante un período de 7 h y la concentración efectiva (CE<sub>50</sub>).

Concentración (µg/mL)	BCB (%)				
	TCF-AA4D (7 h)	TCF-AA8D (7 h)	UCF-AA30 (7 h)	UCF-AA60 (7 h)	UCF-AA120 (7 h)
25	56.844±1.327 <sup>e</sup>	49.410±0.913 <sup>e</sup>	65.415±9.592 <sup>a</sup>	66.739±0.363 <sup>d</sup>	67.163±2.160 <sup>e</sup>
50	60.146±0.303 <sup>d,e</sup>	59.109±1.667 <sup>d</sup>	68.913±0.360 <sup>a</sup>	68.015±2.605 <sup>d</sup>	69.990±2.705 <sup>d,e</sup>
125	65.907±1.269 <sup>c,d</sup>	58.226±1.598 <sup>d</sup>	72.172±10.780 <sup>a</sup>	68.164±0.821 <sup>d</sup>	78.865±1.369 <sup>a,b,c</sup>
250	66.751±1.352 <sup>c,d</sup>	63.323±1.397 <sup>c</sup>	73.307±0.626 <sup>a</sup>	70.155±0.508 <sup>c,d</sup>	74.525±1.008 <sup>b,c,d</sup>
500	69.583±3.382 <sup>b,c</sup>	70.391±0.892 <sup>b</sup>	74.892±2.943 <sup>a</sup>	73.635±0.744 <sup>b,c</sup>	74.032±2.479 <sup>c,d</sup>
1000	74.164±3.721 <sup>b</sup>	73.296±1.352 <sup>a,b</sup>	77.260±8.010 <sup>a</sup>	76.104±0.279 <sup>a,b</sup>	80.048±0.998 <sup>a,b</sup>
2000	75.392±4.273 <sup>a,b</sup>	76.703±0.431 <sup>a</sup>	79.160±8.589 <sup>a</sup>	76.452±3.101 <sup>a,b</sup>	82.816±1.799 <sup>a</sup>
4000	81.833±1.018 <sup>a</sup>	76.112±0.979 <sup>a</sup>	81.435±0.328 <sup>a</sup>	78.815±0.328 <sup>a</sup>	84.434±2.530 <sup>a</sup>
EC <sub>50</sub> (µg/mL)	-	26.552	-	-	-

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. (-) No se registró actividad.

**Tabla 31.** Actividad inhibitora del blanqueamiento de BCB de los métodos (MT y UAI) de las muestras de HA de 25 a 4000 µg/mL de 24 h y la concentración efectiva (CE<sub>50</sub>).

Concentración (µg/mL)	BCB (%)				
	TCF-AA4D (24 h)	TCF-AA8D (24 h)	UCF-AA30 (24 h)	UCF-AA60 (24 h)	UCF-AA120 (24 h)
25	22.117±4.948 <sup>b</sup>	4.345±0.233 <sup>d</sup>	5.736±2.622 <sup>b</sup>	6.823±1.858 <sup>b</sup>	8.853±0.658 <sup>d</sup>
50	27.056±9.847 <sup>a,b</sup>	4.783±0.784 <sup>d</sup>	8.070±1.425 <sup>a,b</sup>	7.365±0.445 <sup>b</sup>	9.081±0.769 <sup>d</sup>
125	28.173±6.495 <sup>a,b</sup>	5.154±0.693 <sup>c,d</sup>	8.966±0.193 <sup>a,b</sup>	7.445±2.555 <sup>b</sup>	9.500±0.838 <sup>d</sup>
250	29.733±2.788 <sup>a,b</sup>	5.545±0.142 <sup>c,d</sup>	8.129±0.480 <sup>a,b</sup>	7.629±1.756 <sup>b</sup>	10.282±0.216 <sup>d</sup>
500	30.497±5.559 <sup>a,b</sup>	7.792±1.012 <sup>b,c</sup>	8.352±2.570 <sup>a,b</sup>	8.737±1.252 <sup>b,c</sup>	11.684±1.414 <sup>c,d</sup>
1000	33.136±3.515 <sup>a,b</sup>	7.061±0.567 <sup>b</sup>	9.326±2.879 <sup>a,b</sup>	9.295±0.951 <sup>b,c</sup>	15.694±2.627 <sup>b,c</sup>
2000	37.336±9.655 <sup>a,b</sup>	11.253±0.510 <sup>a</sup>	12.899±0.924 <sup>a</sup>	10.275±0.839 <sup>b,c</sup>	19.960±2.713 <sup>a,b</sup>
4000	40.330±4.206 <sup>a</sup>	11.934±1.061 <sup>a</sup>	12.686±2.773 <sup>a</sup>	12.712±1.076 <sup>a</sup>	21.544±1.702 <sup>a</sup>
EC <sub>50</sub> (µg/mL)	6.043	23.024	28.285	30.760	11.670

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey. (-) No se registró actividad.

La Tabla 32, muestra los tratamientos correspondientes a MT y UAI disueltos en acetato de sodio al 5% (A): TCF-A4D, TCF-A8D, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120 (Tabla 32 y Tabla 33), registraron los mismos valores de actividad a partir de una concentración de 500 µg/mL. La mayoría de cada tratamiento, presentó diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas y de manera general los tratamientos presentaron un porcentaje de inhibición similar durante las primeras 7 h. Mientras que después de las 24 horas, hubo una reducción de más del 50% para los tratamientos del método tradicional (MT) y del método de ultrasonido de alta intensidad (UAI). De los tratamientos extraídos con acetato de sodio 5% (A), el método tradicional (MT) con el mayor porcentaje de inhibición de BCB a las 7 h fue TCF-A4D (7 h) = 83.630% y a las 24 h TCF-A4D (24 h) = 34.363%, con una reducción de la mitad de la actividad a una concentración 4000 µg/mL.

Del método de ultrasonido de alta intensidad (UAI), el tratamiento con mayor inhibición del también extraídos con acetato de sodio al 5% (A) con el mayor porcentaje de inhibición de BCB fue UCF-A30 (7 h) = 82.873% y UCF-A30 (24 h) = 19.736%, con una reducción de la mitad de la actividad a una concentración 4000 µg/mL.

El valor de  $CE_{50}$  únicamente se calculó para las 24 h en el tratamiento TCF-A4D (7 h) = 10.870 µg/mL. Sin embargo, después de la lectura de 24 h, la  $CE_{50}$  para los mayores porcentajes de inhibición fueron: TCF-A4D (24 h) = 5.728 µg/mL y UCF-A30 (24 h) = 12.351 µg/mL. Mientras que los valores más altos para determinar la concentración efectiva  $CE_{50}$  para cada método de extracción fueron: TCF-A8D (24 h) = 7.390 µg/mL y UCF-A120 (24 h) = 29.749 µg/mL, respectivamente.

**Tabla 32.** Actividad inhibidora del blanqueamiento (BCB) de los métodos (MT y UAI) de 25 a 4000 µg/mL de 7 h.

Concentración (µg/mL)	BCB (%)				
	TCF-A4D (7 h)	TCF-A8D (7 h)	UCF-A30 (7 h)	UCF-A60 (7 h)	UCF-A120 (7 h)
25	56.650±0.591 <sup>f</sup>	64.606±0.91 <sup>c</sup>	62.052±2.862 <sup>d</sup>	59.272±0.269 <sup>c</sup>	56.141±1.141 <sup>d</sup>
50	68.417±0.591 <sup>e</sup>	65.506±0.293 <sup>c</sup>	64.479±0.461 <sup>c,d</sup>	59.210±1.847 <sup>c</sup>	60.719±0.861 <sup>c</sup>
125	70.023±1.460 <sup>d,e</sup>	70.468±8.020 <sup>b,c,d</sup>	66.321±0.945 <sup>c</sup>	61.089±1.766 <sup>c</sup>	61.787±0.576 <sup>c</sup>
250	73.293±6.922 <sup>c,d,e</sup>	74.403±1.009 <sup>a,b,c</sup>	67.120±1.404 <sup>c</sup>	70.130±1.484 <sup>b</sup>	72.059±1.015 <sup>b</sup>
500	75.171±1.197 <sup>b,c,d</sup>	78.180±1.013 <sup>a,b</sup>	75.131±1.501 <sup>b</sup>	72.758±0.468 <sup>b</sup>	72.991±3.830 <sup>b</sup>
1000	77.851±0.979 <sup>a,b,c</sup>	78.671±4.076 <sup>a,b</sup>	81.216±0.237 <sup>a</sup>	75.344±4.293 <sup>b</sup>	77.897±0.761 <sup>a</sup>
2000	82.903±0.742 <sup>a,b</sup>	82.264±0.514 <sup>a</sup>	82.330±0.233 <sup>a</sup>	81.137±0.615 <sup>a</sup>	78.601±0.264 <sup>a</sup>
4000	83.630±1.036 <sup>a</sup>	83.435±3.814 <sup>a</sup>	82.873±0.168 <sup>a</sup>	81.726±0.365 <sup>a</sup>	79.204±0.736 <sup>a</sup>
EC <sub>50</sub> (µg/mL)	10.870	-	-	-	-

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando (p ≤ 0.05). (-) No se registró actividad. Prueba de Tukey. (-) No se registró actividad.

**Tabla 33.** Actividad inhibidora del blanqueamiento (BCB) de los métodos (MT y UAI) de 25 a 4000 µg/mL de 24 h.

Concentración (µg/mL)	BCB (%)				
	TCF-A4D (24 h)	TCF-A8D (24 h)	UCF-A30 (24 h)	UCF-A60 (24 h)	UCF-A120 (24 h)
25	5.994±0.807 <sup>c</sup>	7.654±0.616 <sup>d</sup>	6.212±0.669 <sup>d</sup>	6.746±0.175 <sup>b</sup>	6.172±1.245 <sup>b</sup>
50	7.748±0.508 <sup>b,c</sup>	6.967±0.245 <sup>d</sup>	6.516±0.325 <sup>d</sup>	6.056±0.825 <sup>b</sup>	6.896±0.494 <sup>b</sup>
125	7.645±0.851 <sup>b,c</sup>	10.264±0.571 <sup>c,d</sup>	8.550±0.366 <sup>d</sup>	6.053±0.156 <sup>b</sup>	5.620±0.801 <sup>b</sup>
250	7.274±0.539 <sup>b,c</sup>	10.066±0.765 <sup>c,d</sup>	10.344±0.497 <sup>c,d</sup>	6.532±2.048 <sup>b</sup>	6.858±0.873 <sup>b</sup>
500	9.741±0.616 <sup>b,c</sup>	15.761±0.640 <sup>c</sup>	14.257±1.327 <sup>b,c</sup>	7.269±0.878 <sup>b</sup>	7.143±0.392 <sup>b</sup>
1000	11.679±0.682 <sup>c</sup>	22.479±1.935 <sup>b</sup>	15.364±1.545 <sup>a,b,c</sup>	9.006±2.506 <sup>b</sup>	11.441±0.685 <sup>a</sup>
2000	28.292±4.171 <sup>b</sup>	29.829±2.702 <sup>a</sup>	19.114±3.099 <sup>a,b</sup>	15.853±1.563 <sup>a</sup>	11.180±0.508 <sup>a</sup>
4000	34.363±2.819 <sup>a</sup>	26.299±4.926 <sup>a,b</sup>	19.736±3.368 <sup>a</sup>	17.747±0.710 <sup>a</sup>	11.355±0.836 <sup>a</sup>
EC <sub>50</sub> (µg/mL)	5.728	7.390	12.351	13.554	29.749

Los valores son medias ± DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando (p ≤ 0.05). Prueba de Tukey. (-) No se registró actividad.

Los tratamientos (TCF-AA4D, TCF-AA8D, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120, TCF-A4D, TCF-A8D, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120), presentaron algunas similitudes de comportamiento en la gráfica. Por ejemplo, a medida que la concentración del extracto de HA incrementó, también el porcentaje de inhibición se vio repercutido. En este caso,

la concentración de 4000  $\mu\text{L/mL}$ , se muestra en la línea superior con el mayor % de inhibición del comportamiento de todos los tratamientos y controles.

Con respecto al resto de los tratamientos, la mayoría presentó similitud con sus excepciones como (UFC-AA120), que se refiere al tratamiento de UAI extraído con ácido acético durante 120 min. Todos los tratamientos analizados, mostraron resultados prometedores para la actividad inhibidora del blanqueamiento del  $\beta$ -caroteno (BCB) después de 7 h de exposición a la luz.

Durante el período de 24 h de exposición a la luz, el control positivo logró mantener su actividad protectora en torno al 70%, mientras que *S. equi.* y los tratamientos TCF-AA4D, TCF-AA8D, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120, TCF-A4D, TCF-A8D, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120, presentaron una reducción en la actividad protectora del betacaroteno.

Otra característica que se debe observar es que los tratamientos del método tradicional (MT) disueltos en acetato de sodio al 5% (A), MT: TCF-A4D, TCF-A8D y UAI: UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120, presentaron mayor poder protector (%) después de 24 h, y los tratamientos disueltos en ácido acético 0.5 M MT: TCF-AA4D, TCF-AA8D) y UAI: UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120 (ver Tablas 31 y 32). La metodología utilizada para obtener los tratamientos, características y manipulación pudieron haber influido a estos resultados y de los 10 tratamientos, así todos presentaron resultados prometedores para las actividades antioxidantes probadas.

MT (TCF-AA4D: 30.5%) disuelto en AA y MU (UCF-A120: 31.4%) disuelto en acetato de sodio al 5% (A), fueron los tratamientos de cada método de extracción, presentaron mayor capacidad de captación del radical DPPH. Mientras que los tratamientos; UAI (UCF-AA30: 38.9%) y MT (TCF-A4D: 64.9%) fueron las que presentaron mayor poder

quelante de iones férricos (FIC). Para el poder reductor de los iones hierro (FRAP), los valores de absorbancia obtenidos fueron bajos al compararlos con los controles, siendo el registro más alto en la muestra MT (TCF-A4D: 0.040).

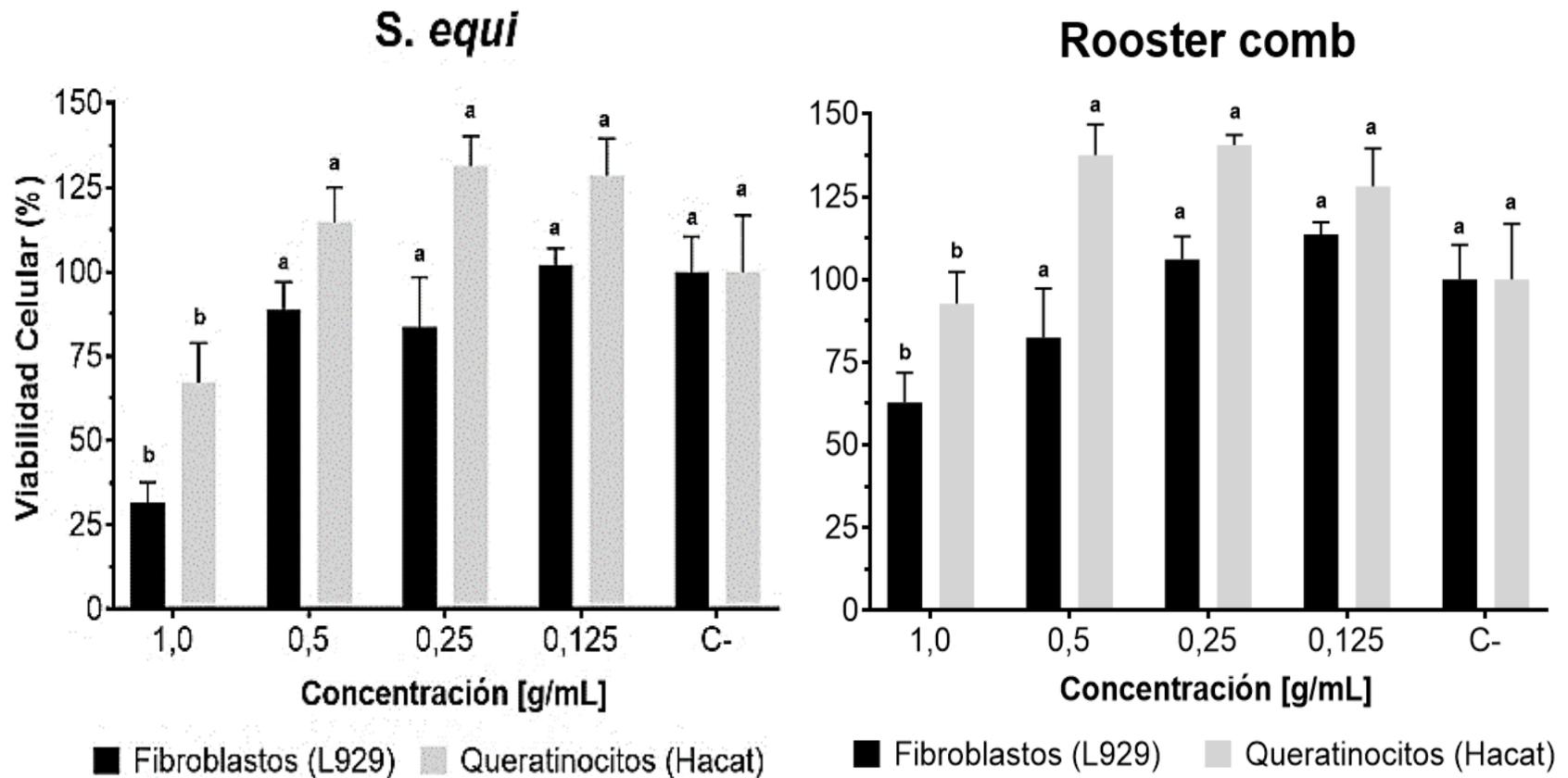
En la actividad inhibitoria del blanqueamiento del  $\beta$ -caroteno (BCB) durante 7 h de exposición a la luz, el tratamiento MU (UCF-AA120) que corresponde a 120 min de extracción disuelto en AA, presentó mayor actividad antioxidante con 84.4% de actividad. Sin embargo, después de 24 h de exposición, la muestra MT (TCF-A4D) que corresponde a 4 días de extracción con A, mostró el mayor potencial antioxidante con una actividad del 40.3% en la concentración más alta probada. De las actividades analizadas, la muestra MT (TCF-A4D) fue la que presentó mayores registros de potencial antioxidante. Sin embargo, todas las muestras analizadas deben investigarse más a fondo. La fuente y metodología de extracción, el disolvente utilizado, el protocolo de aislamiento e incluso el almacenamiento tienen una influencia directa en el potencial antioxidante de estas muestras. Por lo tanto, todas estas características deben tenerse en cuenta a la hora de seleccionar el tratamiento más eficaz.

Finalmente, la actividad de DPPH el tratamiento TCF-AA4D y UFC-A120, presentaron una actividad similar alrededor del 30%. Para FRAP, las absorbancias oscilaron de 0.035-0.040 de los tratamientos (TCF-AA4D, TCF-A4D, UCF-AA120, UCF-AA60). En cuanto a FIC, los tratamientos con los mejores porcentajes de inhibición fueron: TCF-A4D y UFC-AA30. La lectura de BCB de las 7 h las mejores actividades de inhibición reportadas son TCF-A4D y UCF-AA120. Mientras que, para las 24 h, los tratamientos con mejor actividad fueron TCF-AA4D y TCF-A4D.

### 6.12 Evaluación de la citotoxicidad de HA

De los métodos de extracción MT y UAI, se escogieron los mejores tratamientos para evaluar la citotoxicidad: TCF-AA4D, TCF-AA8D, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120, TCF-A4D, TCF-A8D, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120.

La Fig. 53, muestra la viabilidad celular evaluada en los controles de HA: *S. equi* y C2: Rooster comb (RC) probado en 2 líneas celulares (fibroblastos y queratinocitos) en 4 concentraciones diferentes (1, 0.5, 0.25 y 0.125 g/mL). La concentración de 1 g/mL, se presentó una reducción de la viabilidad celular de los controles (*S. equi*, RC) de 75% (fibroblastos) y 50% (queratinocitos) traducido en una reducción de un 20-25% respectivamente y esta misma concentración presentó diferencias significativas con respecto al control negativo (que contenía solo la línea celular y medio de cultivo) donde la viabilidad se mantuvo en 100% para todos los casos. A una concentración de 0.25 y 0.125 g/mL, ambas líneas celulares mantuvieron en una viabilidad cercana a 100% y en queratinocitos específicamente, estas concentraciones presentaron un porcentaje >100% que se traduce en proliferación celular. Los componentes presentes en los tratamientos presentaron un efecto interesante y similar a C1 y C2 en las 2 líneas celulares, esto puede explicarse y asociarse de porque HA está ampliamente distribuido desde células procariotas hasta eucariotas. Es producido principalmente por células mesenquimales, así como otros tipos de células. HA es abundante en la piel, 50% del HA corporal, vítreo del ojo, cordón umbilical y líquido sinovial pero también está presente en todos los tejidos y fluidos del cuerpo; tejidos esqueléticos, válvulas cardíacas, pulmón, aorta, próstata, túnica albugínea, cuerpos cavernosos y el cuerpo esponjoso del pene. (Papakonstantinou, Roth, & Karakiulakis, 2012).



**Figura 53.** Viabilidad celular en un rango de concentración de 0.125-1.0 (g/mL): C1: *S. equi* y C2: RC evaluados en fibroblastos y queratinocitos. Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey.

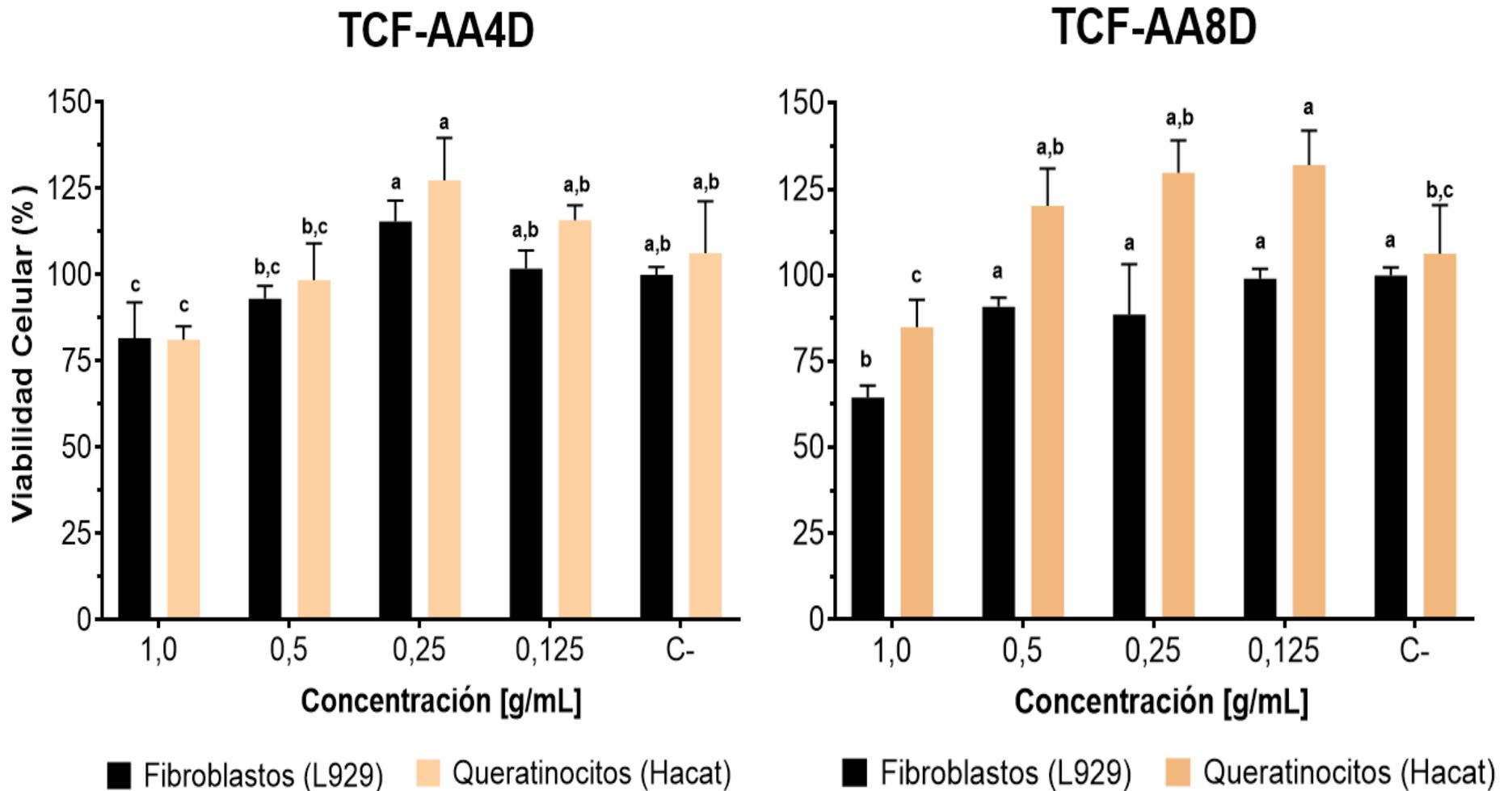
En la Fig. 54, se visualizan los tratamientos del método tradicional (MT) extraídos con AA. De las 4 concentraciones evaluadas, la concentración 0.25 g/mL presentó diferencias significativas con respecto al control negativo (C-) y también con respecto al resto de las concentraciones (1.0, 0.5 g/mL) para fibroblastos y queratinocitos.

El tratamiento TCF-AA8D, el control negativo (C-), muestra similitud con las concentraciones (0.5, 0.25 g/mL) y a diferencia de la concentración 1.0 g/mL y 0.125 g/mL en fibroblastos y queratinocitos. Esto se traduce en que, la concentración de 1 g/mL, reduce la viabilidad celular alrededor de un 40%, pero a medida que se diluye la concentración por ejemplo (0.125 g/mL), incrementa la viabilidad celular hasta un 25% más a diferencia del control negativo, que únicamente contiene las células con el medio. Es evidente entonces, que las 2 líneas celulares presentaron una reducción del 25% aproximadamente a una concentración de 1 g/mL, mientras que a 0.25 y 0.125 g/mL se mostró una proliferación de un 25% superior a C (-).

de Souza et al. (2024), previamente han utilizado el linaje de fibroblastos de ratón L929 y el linaje HacaT de queratinocitos humanos, argumentan que son los principales tipos de células de la piel y desempeñan papeles importantes en el proceso de cicatrización y se emplean con frecuencia para estudios de cicatrización y citotoxicidad *in vitro* (Guo, Huang, Sun, & Wang, 2015; López-García, Lehocký, Humpolíček, & Sába, 2014). La literatura indica que, el proceso de cicatrización *in situ* modula inicialmente la proliferación y migración de los queratinocitos para formar una nueva epidermis. Posteriormente, una fibroblastos para formar una nueva matriz extracelular, predominantemente colágena (de Souza et al., 2024).

Bainbridge (2013); Morton and Phillips (2016), mencionan que los fibroblastos, por su parte, participan en el proceso de cicatrización de heridas, asistiendo en el mecanismo de reparación y remodelación tisular, participando en procesos fundamentales como la rotura del coágulo de fibrina y presentando propiedades esenciales en la proliferación celular, estableciendo elementos estructurales como el colágeno, elastina, proteínas de la matriz extracelular y metaloproteinasas de la matriz.

Por lo tanto, las funciones biológicas del HA involucran la modulación de procesos intrincados (migración celular, proliferación celular e inflamación) de manera que, la funcionalidad de este polímero también está relacionada con la homeostasis del agua, el llenado del espacio intercelular, así como la absorción de impactos. Se obtuvo este incremento de proliferación celular de los extractos de HA obtenidos, según Sadhasivam et al. (2013), identificaron que cuando HA fue purificado del hígado de raya, tuvo un comportamiento similar ya que presenta la misma capacidad que HA del cordón umbilical humano para inhibir la proliferación celular.



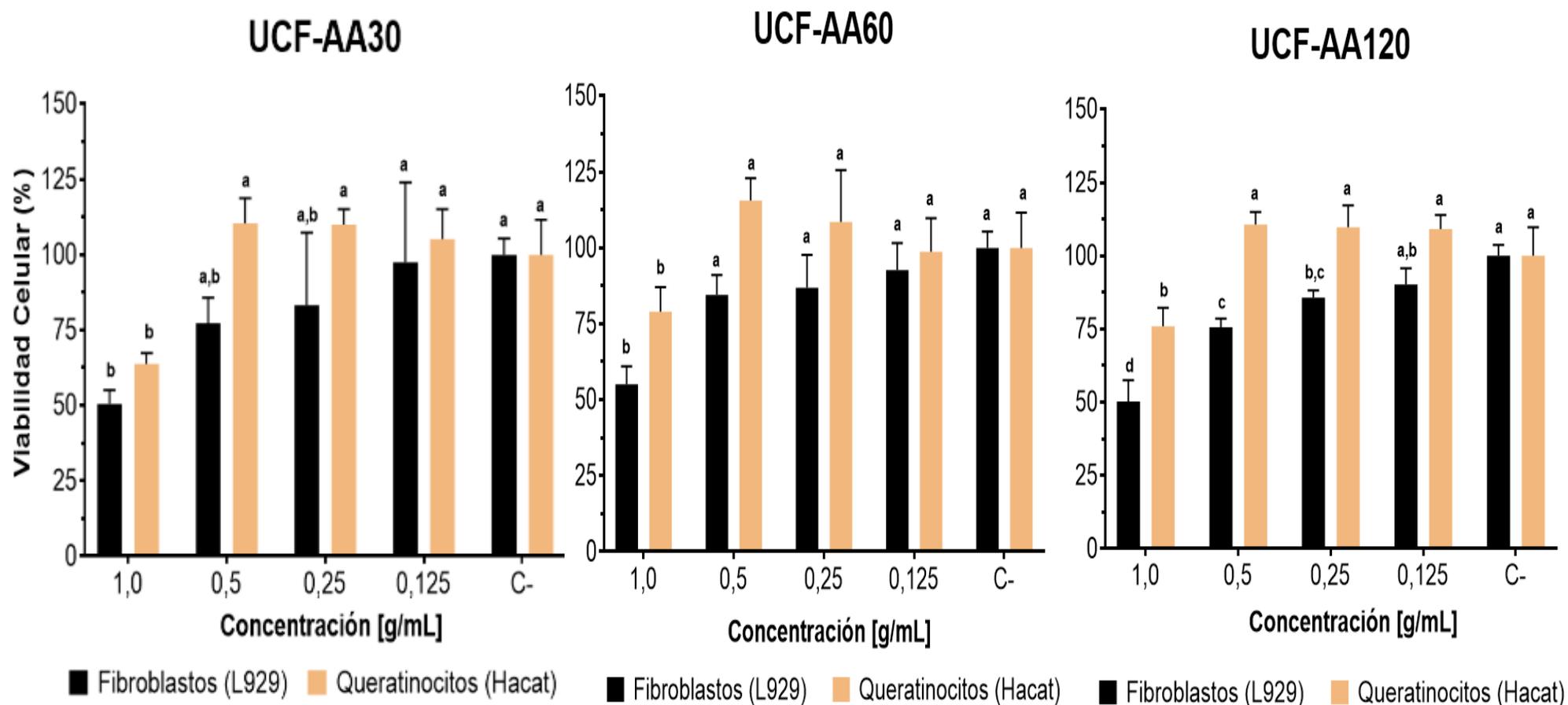
**Figura 54.** Viabilidad celular de los tratamientos del método tradicional (MT) extraídos con ácido acético al 0.5 M (AA). Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey.

La Fig. 55, los tratamientos de UAI extraídos con AA, mostraron un comportamiento similar presentando diferencias significativas con respecto a C (-). El tratamiento UFC-AA60 y UFC-AA120 implican una extracción de 60 min y 120 min con el mismo solvente. En este caso, ambos a una concentración de 1.0 g/mL, mostró diferencias significativas con respecto de A una concentración de 1 g/mL, la línea de fibroblastos se redujo 50% y 25% para queratinocitos. De esta forma, a 0.125 g/mL los tratamientos se comportaron como el C (-) donde la proliferación de queratinocitos también fue evidente en concentraciones de 0.5 y 0.25 g/mL en los 3 tratamientos de UAI. Aunque este dato difiere un poco de lo que mencionan Guo et al. (2015), ya que los fibroblastos al usarse como las células principales de la dermis, y los fibroblastos de ratón L929 se utilizan con frecuencia en la investigación de la piel. Según la clasificación de citotoxicidad de la Farmacopea de EE. UU., muestras evaluadas de HA de diferentes pesos moleculares no fueron tóxicas o casi no fueron tóxicas en concentraciones de 0.01% y 0.1% y ligeramente tóxicas cuando la concentración alcanzó el 0.5%.

Papakonstantinou et al. (2012), abordan sobre el papel fisiológico de este GAG no sulfatado, el cual quizá puede tener capacidades para regular las funciones celulares, como su proliferación y migración. Esto también en función del peso molecular, por ejemplo, un HA de 340 kDa secretado por las células lisas vasculares humanas regula su proliferación y migración. Por tanto, este GAG de alto peso molecular también puede actuar como una sustancia denominada factor de crecimiento endotelial vascular (VGEF). El peso molecular de HA, puede desempeñar diferentes funciones según su masa molecular, por ejemplo, LMw-HA (rango: 1–25 × 10<sup>4</sup> Da), puede actuar en la etapa inflamatoria del proceso de cicatrización, junto con la fibronectina guiando la invasión y proliferación de los fibroblastos, también juega un papel clave en el

depósito de colágeno en el sitio de la herida, promoviendo la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos que es esencial en la contracción de la herida. Cuando el peso molecular es alto (HMw-HA > 6 × 10<sup>6</sup> Da), el efecto es antiinflamatorio; controlando así el reclutamiento de células inflamatorias, producción de citocinas y migración de células madre (Graça, Miguel, Cabral, & Correia, 2020; Sadhasivam et al., 2013).

de Souza et al. (2024), evaluaron citotoxicidad empelando queratinocitos, se observó una mayor sensibilidad a los tratamientos de concentraciones del 5% y 10% con porcentajes de alteración de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial y lisosomal superiores al 70%. Para los fibroblastos, con viabilidad celular a concentraciones ≤ 5%, y variación del 10-45 % de inhibición de la actividad mitocondrial y del 0-75% de la actividad lisosomal. Porcentajes de inhibición superiores al 30% de citotoxicidad media según ISO 10993-5.40. La mayor inhibición de la viabilidad celular de los queratinocitos en comparación con L929, podría sugerir una mayor sensibilidad del tejido epitelial que la del tejido conectivo.

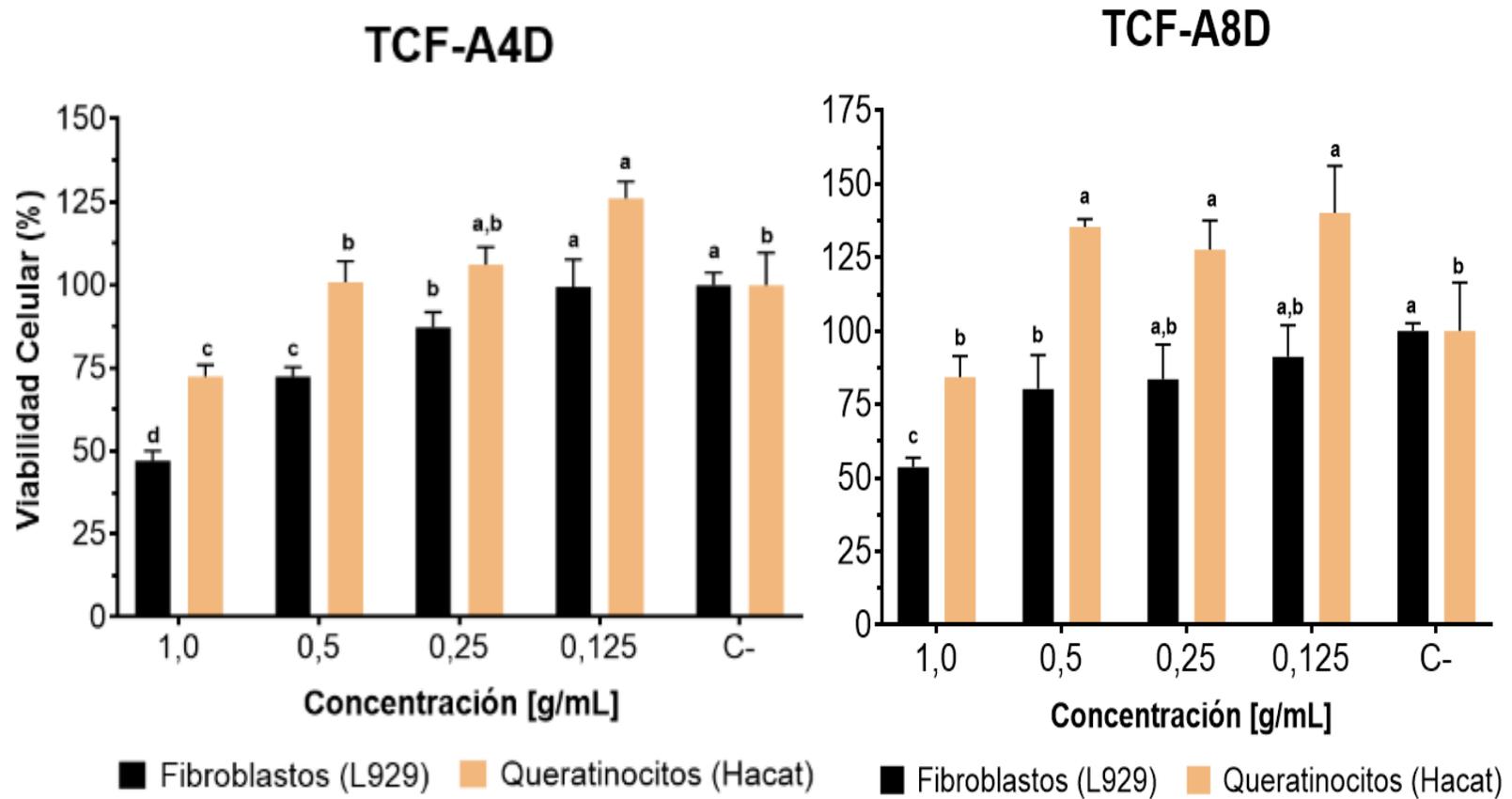


**Figura 55.** Viabilidad celular de los tratamientos del método de ultrasonido de alta Intensidad (UAI) extraídos con ácido acético al 0.5 M (AA). Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey.

En la Fig. 56, se muestra los tratamientos del método de extracción tradicional (MT) y se observa a los tratamientos de MT extraídos con A. Los tratamientos, presentaron diferencias significativas con respecto a C (-) y reducción de la viabilidad celular del 50% en fibroblastos y 25% en queratinocitos a una concentración de 1 g/mL, mientras que a 0.125 g/mL, se mostró una proliferación de un 25% superior a C (-) sobre todo en la extracción de 8 días.

En el caso del tratamiento TCF-A4D, se puede observar que en la extracción de 4 días con acetato de sodio al 5%, mostró un comportamiento similar que el control negativo, incluso con un incremento del 25% en queratinocitos, lo que se traduce en que el extracto de HA de este tratamiento podría estar induciendo a la proliferación celular. En el tratamiento TCF-A8D (extracción de 8 días), las concentraciones evaluadas mostraron diferencias estadísticas. Los fibroblastos presentaron una reducción del 20% de fibroblastos, mientras que los queratinocitos indujeron a una proliferación celular en las concentraciones (0.5 g/mL, 0.25 g/mL y 0.125 g/mL).

L. Alcântara et al. (2022), evaluaron citotoxicidad de un extracto de HA de tilapia mediante extracción tradicional químico-enzimática y un control HA comercial, utilizando también células fibroblastos (L929) en concentraciones de (0.25, 0.5 y 1 mg/mL). Se observó que las muestras de HA en las concentraciones probadas no hubo diferencia estadísticamente significativa a las 24 h y 48 h.



**Figura 56.** Viabilidad celular de los tratamientos del método tradicional (MT) extraídos con acetato de sodio 5% (A). Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey.

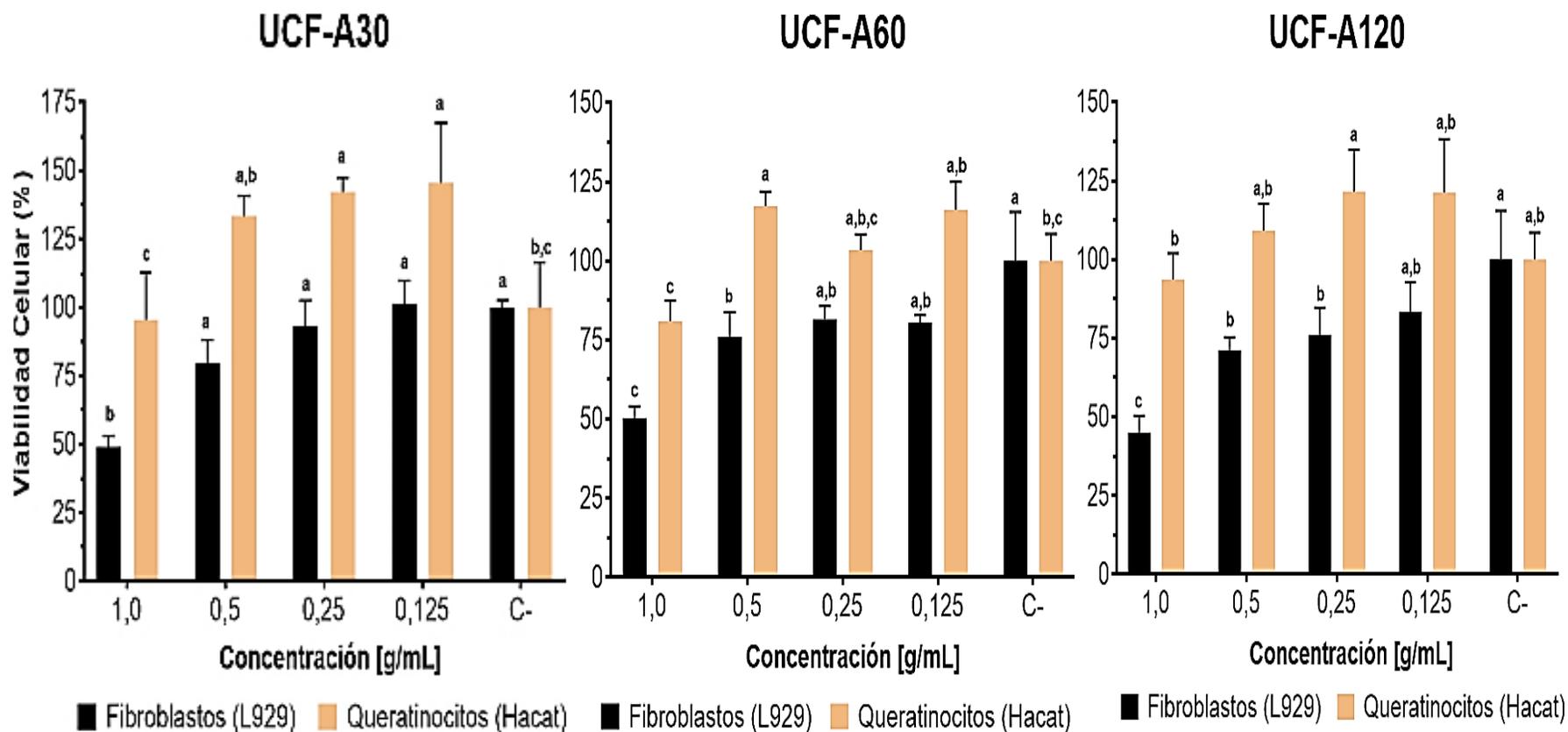
La Fig. 57, muestra los tratamientos del método UAI (UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120) que fueron extraídos con solvente acetato de sodio al 5% (A).

En un panorama general, los tratamientos presentaron diferencias significativas con respecto del control negativo en la concentración de 1 g/mL, pues la viabilidad celular, se ve reducida en un 50% para fibroblastos y aproximadamente 20-25% para queratinocitos.

En las concentraciones 0.5, 0.25 y 0.125 g/mL, la línea de fibroblastos, se mantuvo con una viabilidad cercana a C (-), mientras que en queratinocitos se presentaron incrementos alrededor del 25%.

Los resultados, indicaron que la viabilidad celular fue superior al 100%, esto indica que no sólo los tratamientos evaluados no son citotóxicos, sino que también estimulan la proliferación de las 2 líneas de células preferentemente en queratinocitos.

Los tratamientos de HA, al igual que los fibroblastos, desempeñan un papel biológico importante durante el proceso de curación. Se ha de mostrado que el HA del globo ocular de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) por ejemplo, es un biopolímero de fuente sostenible con potencial para ser utilizado en aplicaciones biomédicas, como la regeneración de la piel, pues además de promover la secreción de citocinas, coadyuva en la maduración de monocitos a macrófagos, estimulando la angiogénesis con propiedades inflamatorias (L. Alcântara et al., 2022).



**Figura 57.** Viabilidad celular de los tratamientos del método de ultrasonido de alta intensidad (UAI) extraídos con ácido acético al 0.5 M (AA). Los valores son medias  $\pm$  DE basadas en 4 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ). Prueba de Tukey.

La evaluación de los 10 tratamientos con las 2 líneas celulares (Hacat y L929) de los métodos MT y UAI evaluados en las concentraciones (1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 g/mL). Los resultados revelaron que el porcentaje de viabilidad celular se mantuvo en 100% para el control negativo (C-) en las 2 líneas celulares y controles (*S. equi* y RC). En la mayoría de tratamientos, se superan la viabilidad del 100% en las concentraciones de 0.125 g/mL y 0.25 g/mL y 0.5 g/mL pues a una concentración de 1.0 g/mL todos los tratamientos la viabilidad celular se reduce de manera considerable hasta alrededor de un 60%.

La actividad antiproliferativa de HA en fibroblastos en este experimento también fue evidente en los tratamientos evaluados, y esto también se ha observado como un fenómeno que reduce la proliferación celular de los fibroblastos pues se ha visto en embriones de pollo (Cortivo, Brun, Rastrelli, & Abatangelo, 1991) fetales de conejo (Mast, Diegelmann, Krummel, & Cohen, 1993) y de conejo (Wiig, Abrahamsson, & Lundborg, 1996), tampoco fue la excepción con las crestas de *Gallus gallus domesticus*. Este efecto también se ha correlacionado con el peso molecular y aunque en este trabajo aún se desconoce el peso molecular de los tratamientos, algunos datos reportan que HA de 3600-500 kDa, inhibe igualmente la proliferación celular (Wiig et al., 1996).

El mejor tiempo para UAI fue excelente en los 3 tratamientos evaluados, sin embargo, la extracción de 30 min (UCF-A60, UCF-AA60) con ambos solventes (A, AA) a una concentración de 0.125 g/mL, podría ser prometedora para conservar una excelente viabilidad celular y promover la proliferación celular. Para el método tradicional (MT) con ambos solventes (A, AA), la extracción de 4 días presenta una viabilidad de ambas líneas celulares (L929 y Hacat) y a esa concentración (0.125 g/mL) el comportamiento el control negativo y el C1 (rooster comb), incluso con un incremento de casi 30% para queratinocitos.

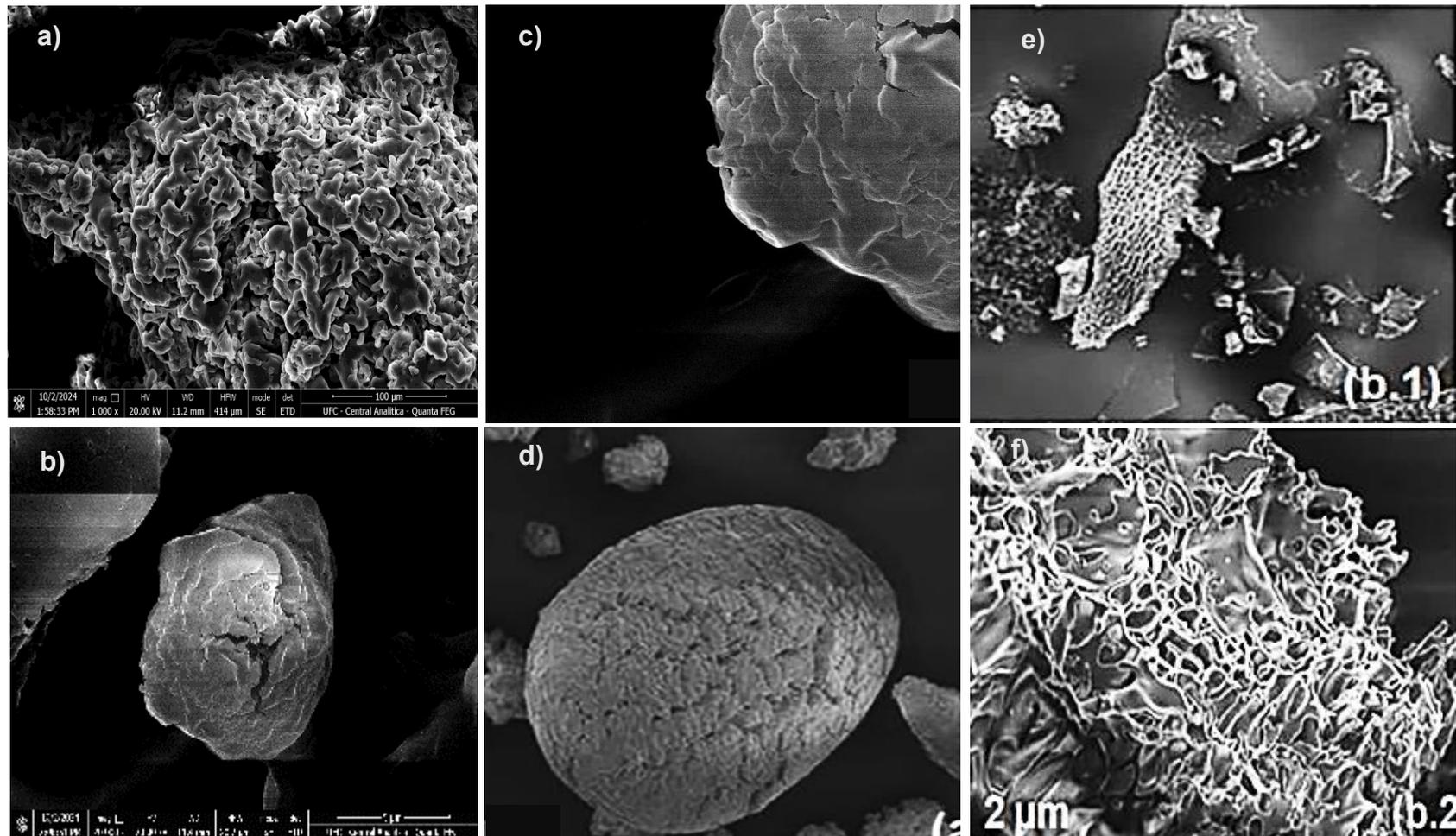
Las mejores concentraciones para la proliferación de los extractos fueron 0.125 g/mL y 0.25 g/mL. Mientras que, los mejores tratamientos para fibroblastos (TCF-AA4D y UCF-A60) y queratinocitos (UCF-AA30 y UFC-AA60). La viabilidad celular en el rango de concentración 0.125-1.0 (g/mL), un porcentaje de viabilidad celular igual o superior al 70% indica no citotoxicidad (ISO 10993-5). Por tanto, las muestras con un porcentaje de viabilidad celular igual o superior al 70% se consideran no citotóxicas.

Una viabilidad celular superior al control negativo (por encima del 100%), indica una probable modulación positiva de la proliferación celular, esto se observó en los tratamientos UAI con ambos solventes, pues además de no ser tóxicos, indujeron a una mayor proliferación celular en comparación con los controles (*S. equi*, Rooster Comb y C (-)).

### 6.13 Microscopía SEM-FEG de HA

De los métodos de extracción MT y UAI; se escogieron los mejores tratamientos para evaluar la actividad antioxidante: TCF-AA4D, TCF-AA8, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120, TCF-A4D, TCF-A8D, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120. La Fig. 58, muestra las micrografías de la microscopía electrónica de barrido de los controles empleados: a) C1: *Streptococcus equi* (*S. equi*) y b) C2: rooster comb (RC) y c-d) *Streptococcus equi* comercial y e-f) extracto de *Oreochromis niloticus* (tilapia) (L. O. Alcântara et al., 2023). El control C1 (*S. equi*), muestra una estructura aglomerada, en forma de cerebro rugosa y plegada con varias semiestructuras de formas irregulares (ver Fig. 58-a). Por su parte, el C2: Rooster Comb, se asocia más a una estructura globular con líneas amorfas y algunas fisuras (ver Figura 58-b). Mientras que, la Fig. 58 c-d, presenta similitud con *S. equi*, ya que corresponde c) *Streptococcus equi*, que se presentaba una estructura predominantemente aglomerada, globular, densa con forma irregular (L. O. Alcântara et al., 2023).

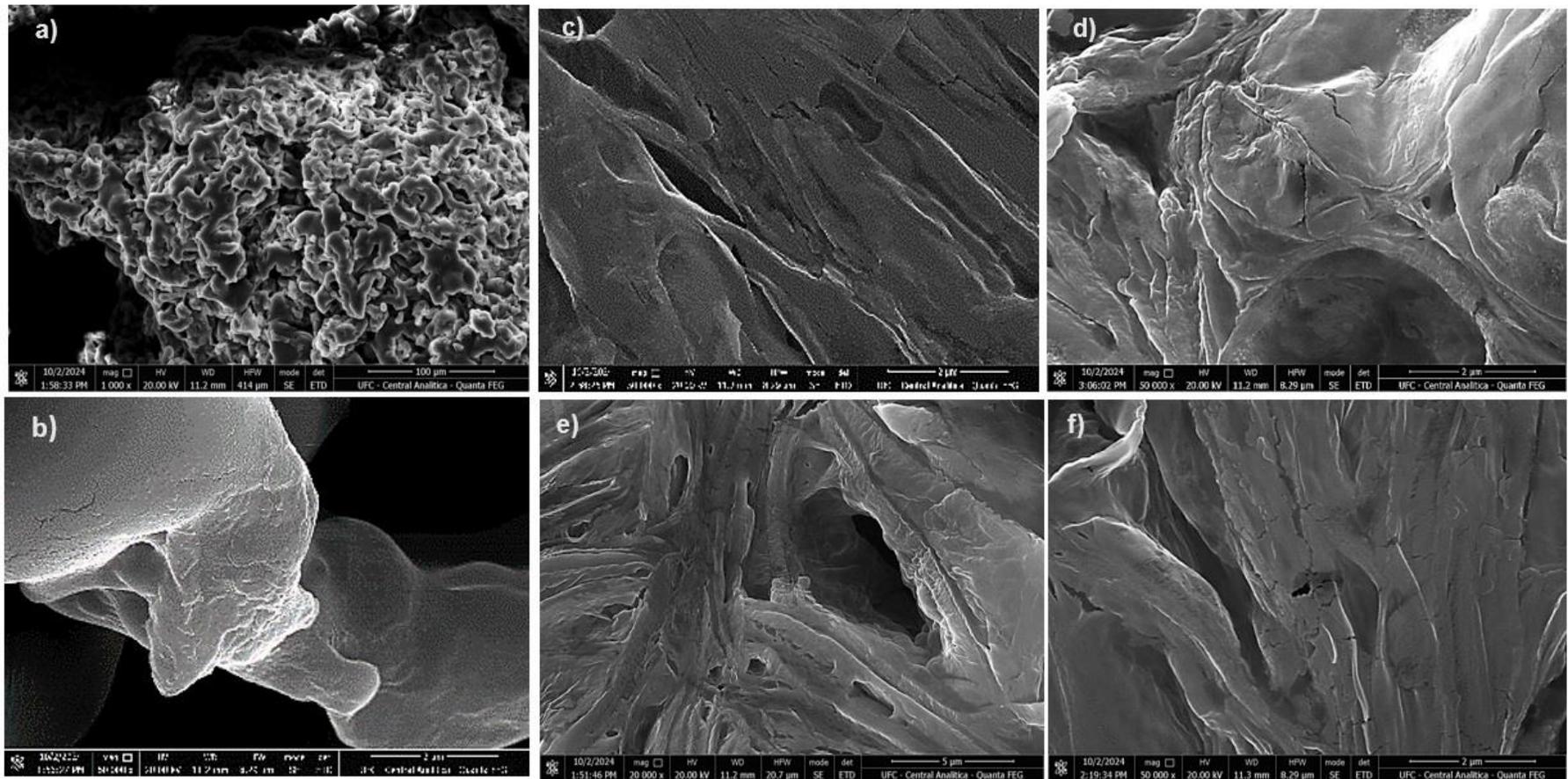
La Fig. 58 e-f, muestra en la micrografía de un extracto de HA (tilapia), la cual presentó características completamente diferentes al estándar de *Streptococcus equi* (ver Figura 58 c-d) se observaron estructuras laminadas y regulares que están asociadas con un patrón de alta cristalinidad en estructuras lamelares (L. O. Alcântara et al., 2023). Esta estructura también ha sido observada en otros polisacáridos: quitosano y gránulos de almidón ya que de acuerdo con Seidi et al. (2022), se identificó que este patrón presenta alta cristalinidad en estructuras laminares en quitosano.



**Figura 58.** Microscopía electrónica de barrido SEM-FEG: a) C1: *S. equi*, b) C2: RC, c-d) HA comercial: *S. equi*. Tomado y modificado de: L. O. Alcântara et al. (2023) y e-f) Extracto de *Oreochromis niloticus*. Tomado y modificado de: L. O. Alcântara et al. (2023).

La Fig. 59 c-d, se muestran los tratamientos correspondientes al método tradicional (MT) disueltos en acetato de sodio 5% (A), donde se observa en las micrografías estructuras fibrosas y porosas amorfas con algunas grietas. Resultaron ser completamente diferentes a C1, posiblemente debido a la naturaleza de las fuentes de obtención ya que los tratamientos son de fuente animal mientras que C1 es bacterial. En el caso de C2 (rooster comb), se describen en la literatura como estructuras fibrosas e irregulares para un hialuronato de sodio comercial y coinciden con la descripción observada en las micrografías (Pouyani, Harbison, & Prestwich, 1994).

La Fig. 59 e-f muestra las micrografías de los tratamientos correspondientes al método tradicional (MT) disueltos en ácido acético 0.5 M (AA) y se observó que las estructuras presentan un aspecto similar entre los tratamientos de ambos métodos MT y UAI tampoco se presentaron cambios por el tipo de solvente.



**Figura 59.** Microscopía SEM-FEG de controles: **a) C1:** *S. equi* y **b) C2:** RC. Micrografías de los tratamientos extraídos por método MT: **(c)TCF-A4D:** Extracción 4 días, crestas frescas disueltas en **A**, **(d) TCF-A8D:** Extracción 8 días, crestas frescas disueltas en **A**. **(e) TCF-AA4D:** Extracción 4 días, crestas frescas disueltas en **AA**, **(f) TCF-AA8D:** Extracción 8 días, crestas frescas disueltas en **AA**.

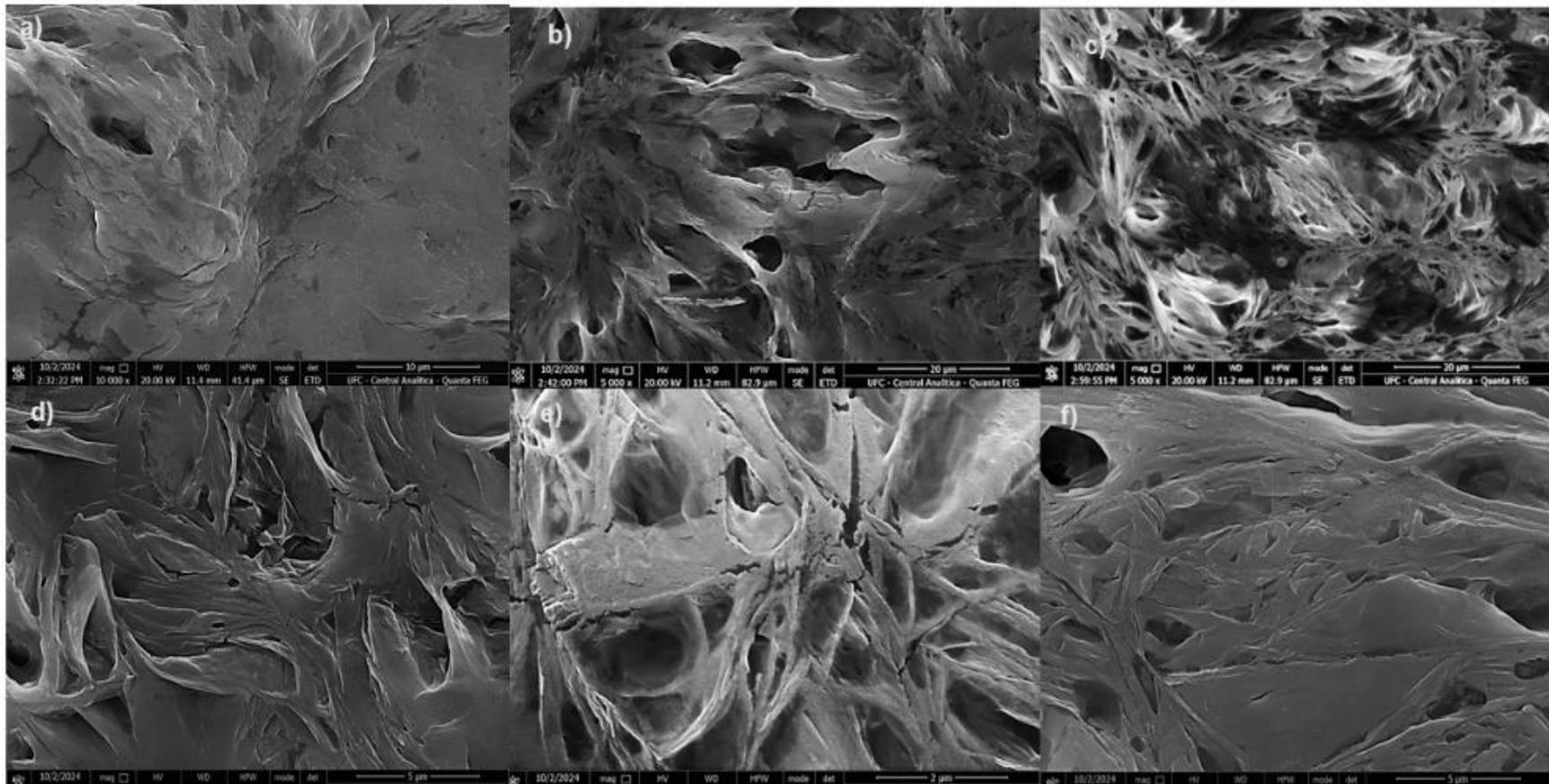
En la Fig. 60, se observan las micrografías correspondientes a los tratamientos de ultrasonido de alta intensidad (UAI). Aunque las estructuras no son globulares como el C2 (rooster comb), los tratamientos en ambos solventes (A y AA) se describen con una estructura amorfa hueca de aspecto fibroso y poroso de estructura lamelar con algunas grietas visibles.

Esta última descripción, podría estar relacionada con lo que mencionan Park, Ma, Higaki, and Takahara (2016), ya que también observaron una superficie irregular con alta porosidad para ácido hialurónico comercial, donde ésta coadyuva al combinarse con otros materiales, indica que los nanotubos fibrosos de imogolita rígidos interactúan fuertemente con la red de HA o entre sí proporcionando una resistencia mecánica. Asimismo, Pouyani et al. (1994), encontraron estructuras fibrosas e irregulares para un hialuronato de sodio comercial de origen animal. Finalmente, las micrografías electrónicas mostraron poros alargados y una red con una apariencia predominantemente "en forma de lámina".

Los tratamientos correspondientes a los métodos de extracción MT y UAI, no mostraron diferencias morfológicas o estructurales aparentes entre sí. Sin embargo, con respecto al C2: RC, se observaron algunos cambios de estructura pues a pesar de obtenerse de la misma fuente (animal) posiblemente los solventes y el estado natural pudieron haber interferido durante la manipulación y procesamiento de los tratamientos.

La naturaleza de los tratamientos es líquida para cada solvente (A y AA), mientras que los controles comerciales ya se encontraban en estado sólido. Fue necesario someterlas a un proceso de secado a 30 °C durante 2 h aproximadamente para eliminar la cantidad excedente de agua y quedarse con los sólidos. Algunos autores han empleado temperaturas cercanas o inferiores a 50 °C como parte de las condiciones extracción o hidrólisis del polímero, ya que, por encima de 50 °C, la estructura del polímero podría verse afectada (Callejas-Quijada et al., 2023; Selyanin et al., 2015).

Otro aspecto indirecto, fue el manejo de las muestras, ya que posiblemente durante su traslado y almacenamiento el polímero pudo haberse degradado. No obstante, para estudios posteriores, se recomienda realizar una microscopía con los extractos liofilizados como los controles (C1, C2) para verificar si existe algún cambio en dichas estructuras por el estado natural en el que se trabajaron. Otra recomendación, podría ser calcular el peso molecular de los extractos y comparar si existe algún cambio en la estructura morfológica cambia en función de éste.



**Figura 60.** Micrografías de los tratamientos extraídos con método UAI: **a) UCF-AA30:** Extracción 30 min, crestas frescas disueltas en AA, **b) UCF-AA60:** Extracción 60 min, crestas frescas disueltas en AA, **c) UCF-AA120:** Extracción 120 min, crestas frescas disueltas en AA, **d) UCF-A30:** Extracción 30 min, crestas frescas disueltas en A, **e) UCF-A60:** Extracción 60 min, crestas frescas disueltas en A, **f) UCF-A120:** Extracción 120 min, crestas frescas disueltas en A.

### **6.14 Optimización y análisis estadístico de las formulaciones de sistemas transdérmicos con base en microagujas poliméricas de HA cargadas con antihipertensivos**

Los datos obtenidos de las pruebas mecánicas y fisicoquímicas de las microagujas fueron analizados utilizando el programa estadístico StatGraphics Centurion XV para obtener la optimización de la formulación. Según el modelo seleccionado: diseño de superficie con 17 formulaciones, basado en un compuesto central  $2^2$  estrellado. Se desglosa en 5 concentraciones evaluadas de los polímeros HA, PVA y PVP (ver Tabla 34). Fue evaluado el comportamiento de losartán (LOSAR), captopril (CAPTO), telmisartán (TELMI) y amlodipino (AMLO). A continuación, se muestran los resultados obtenidos de los 4 antihipertensivos mencionados con las 17 formulaciones para la elaboración de microagujas. La función principal del diseño experimental es evaluar los 5 niveles de concentración de mayor a menor considerando un nivel más de cada extremo de los 3 polímeros, para mapear las formulaciones más estables y compararlas entre sí y de esta forma, predecir un comportamiento futuro para optimizar recursos y aplicar los sistemas transdérmicos en la piel sin alterar demasiado sus condiciones normales.

**Tabla 34.** Diseño experimental de las formulaciones según cada antihipertensivo.

LOTE	HA	PVA (%)	PVP (%)
1	0.125	1	1
2	0.0397	2	2
3	0.125	1	3
4	0.375	3	3
5	0.375	1	1
6	0.25	3.681	2
7	0.375	3	1
8	0.125	3	3
9	0.25	2	3.681
10	0.375	1	3
11	0.25	2	0.318
12	0.460	2	2
13	0.25	2	2
14	0.25	0.318	2
15	0.25	2	2
16	0.25	2	2
17	0.125	3	1

Donde: HA (ácido hialurónico), PVP (polivinilpirrolidona), PVA (acetato de polivinilo), losartán (L), captopril (CAPTO), telmisartán (TELMi) y amlodipino (AMLO).

Piñón-Segundo, Nava-Arzaluz, and Ganem-Rondero (2017), mencionan que las microagujas pueden considerarse sistemas híbridos, entre agujas hipodérmicas y parches transdérmicos, que son capaces de perforar la piel de forma indolora, atravesando el tejido subcutáneo y eludiendo la barrera de permeabilidad cutánea. De acuerdo con su estructura, las microagujas pueden actuar como un canal para dirigir el fármaco hacia la piel o pueden ser el sistema de administración por sí mismas.

Enseguida se hablará de los efectos más relevantes de las variables de respuesta y sus efectos sobre los factores estudiados. Estas variables de respuesta fueron (ruptura (R), bioadhesión post-humectación (BP), bioadhesión (B), mexámetro (M), potencial de hidrógeno (pH), tewámetro (TEWL)), evaluadas en LOSAR, AMLO, TELMI y CAPTO, ya que el modelo estadístico permitió identificar los límites de las concentraciones de los polímeros en la formulación para los factores: HA (%), PVP (%), PVA (%). A partir de ello, se obtuvieron 4 formulaciones optimizadas que se describen más adelante. El establecer 5 niveles de concentración de los factores: HA (%), PVP (%), PVA (%), generaron variaciones en los resultados de las pruebas.

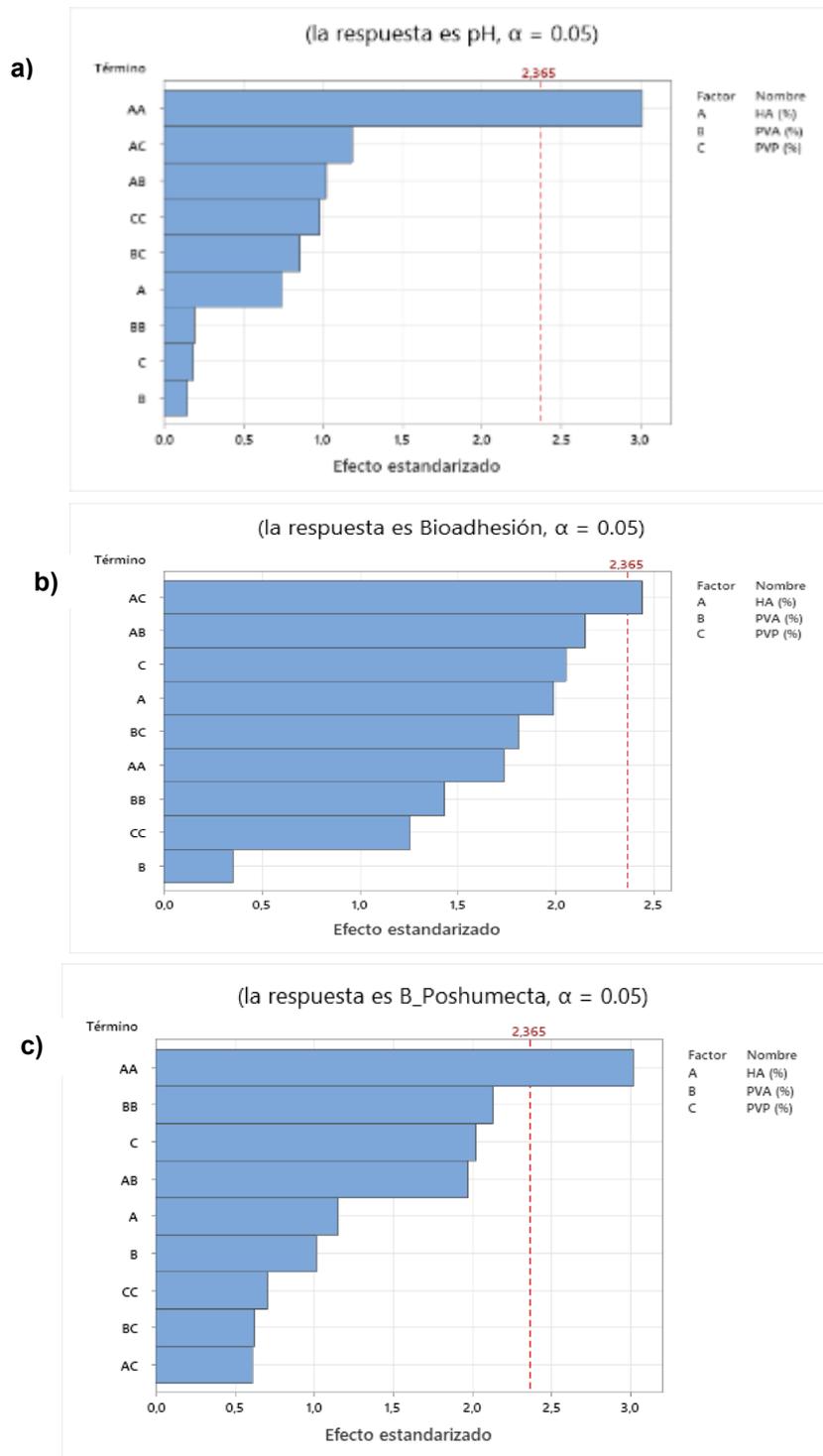
Los resultados de cada prueba de las 17 formulaciones de la Tabla 34, se analizaron de forma estadística con la prueba de ANOVA ocupando  $\alpha=0.05\%$ . Para que se considere que un factor cuenta con un efecto significativo, debe tener un valor ( $p<0.05$ ), de no ser el caso, se considera que el factor no tiene ningún impacto (Castillo-Carmona, 2022).

La Fig. 61 (a-c), muestra el diagrama de Pareto de losartán (LOSAR), las 3 variables de respuesta evaluadas (pH, bioadhesión, bioadhesión-posthumectación), tuvieron un efecto significativo en las formulaciones.

La Fig. 61-a, muestra la variable de respuesta pH, presenta efecto significativo en la concentración de HA (%) interacción AA, lo que se traduce en que, una concentración alta de ácido hialurónico en las microagujas la cual podría afectar negativamente el pH de la piel, pues con esta prueba, lo que se busca es no alterar el estado natural de la piel y sus condiciones sino más bien, definir la concentración adecuada HA posterior a la aplicación del sistema transdérmico.

La Fig. 61-b, indica la bioadhesión como variable de respuesta, esta se ve afectada negativamente en la interacción HA (%) y PVP (%), cuando las concentraciones son altas. Este fenómeno ya se había sido observado en estudios de Anguiano-Almazan (2017), argumentan que puede atribuirse a que PVP K30, es un polímero adhesivo y al utilizar concentraciones altas la bioadhesión del parche sería aumentada asimismo por la adición de HA.

La Fig. 61-c, la variable bioadhesión poshumectación, presentó que, a altas concentraciones de HA, la bioadhesión no favorece de manera positiva, ya que después de la humectación, HA podría desintegrarse más rápido antes de la liberación del antihipertensivo. Esto puede deberse a la naturaleza hidrofílica del polímero, pues tiene varios OH en su estructura que afectan esta variable cuando la zona de la piel es previamente humectada por lo que es necesario regular el efecto durante la liberación del fármaco (Xu et al., 2021).



**Figura 61.** Diagrama de Pareto. Losartán. Regresión de superficie de respuesta de: **a)** pH, **b)** Bioadhesión y **c)** Bioadhesión poshumectación.

De los fármacos antihipertensivos, el losartán potásico (bloqueador del receptor de angiotensina II) es un agente de primera línea para tratar la hipertensión sin complicaciones en personas con diabetes, insuficiencia cardíaca, nefropatía o hipertrofia ventricular izquierda. También, se puede utilizar como agente de segunda línea en el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva, disfunción sistólica, infarto de miocardio y enfermedad de la arteria coronaria en aquellos intolerantes a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (Almazan et al., 2020; de Toro, 2008). Los parches transdérmicos o un sistema híbrido (parche con microagujas) liberan el fármaco a una velocidad constante durante un período prolongado (días), lo que permite que la concentración plasmática del fármaco permanezca dentro del rango terapéutico (Donnelly & Singh, 2015). Las principales ventajas que ofrece un parche transdérmico son: eliminación del primer paso hepático, evitar dosis múltiples o reacciones adversas como problemas digestivos asociados a la administración oral para lograr niveles plasmáticos constantes del fármaco, indoloras, fáciles de usar, seguras, aumentan el intervalo de tiempo de actividad y permiten retirar el sistema instantáneamente. Por tanto, las microagujas están destinadas a mejorar la administración del fármaco losartán (Almazan et al., 2020).

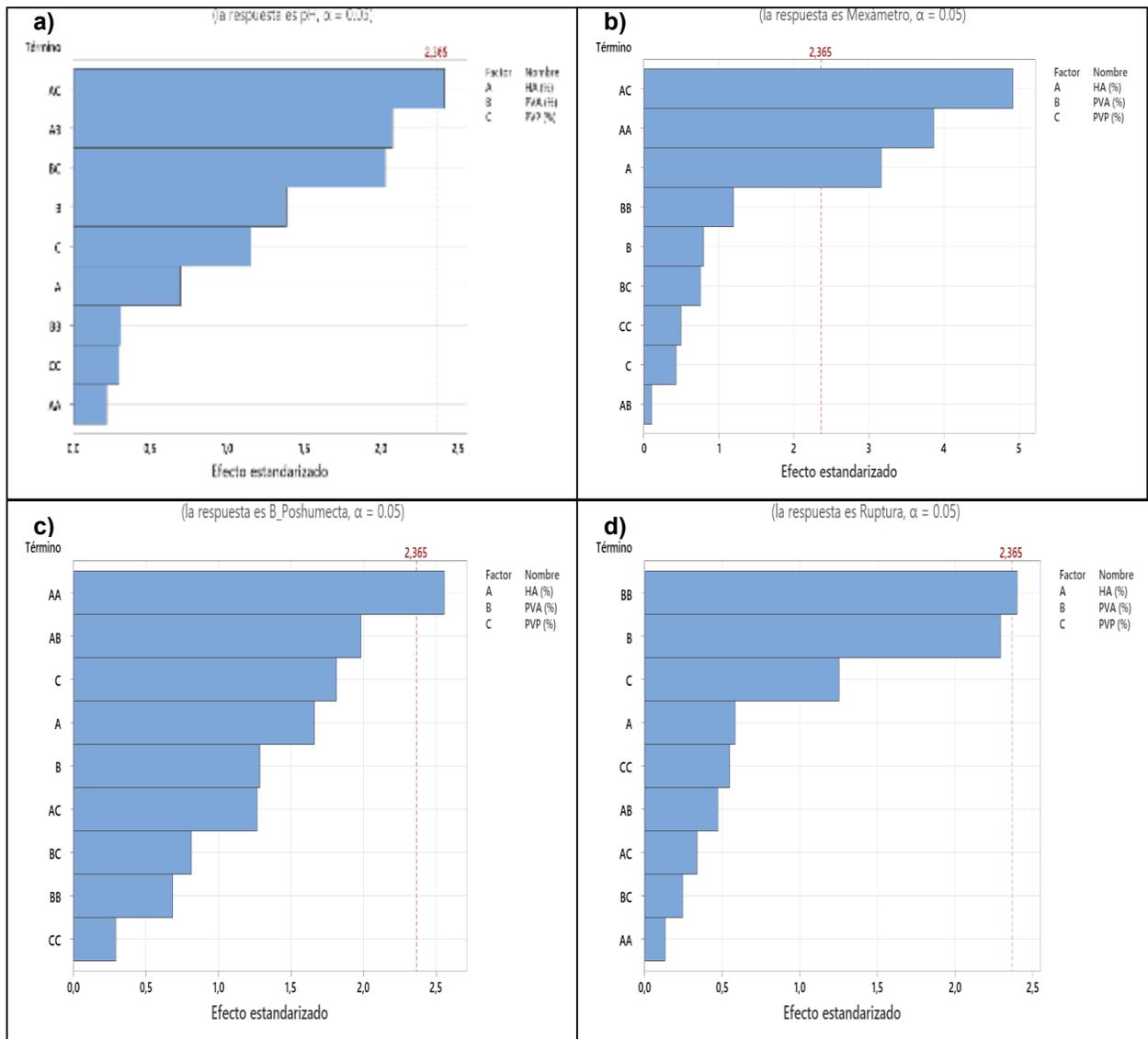
La Fig. 62 (a-d), muestra el diagrama de Pareto de captopril (CAPTO), las 4 variables de respuesta evaluadas (pH, bioadhesión, bioadhesión-posthumectación), tuvieron un efecto significativo en las formulaciones.

En la Fig. 62-a, se observa que la variable de respuesta de pH, presenta efecto significativo en la interacción HA (%)-PVP (%), indicando que a concentraciones elevadas con CAPTO podría alterar el pH de la piel.

Por otra parte, en la Fig. 62-b, donde la variable de respuesta mexámetro, la misma interacción (HA (%)-PVP (%)), indica que ambos polímeros en altas concentraciones en conjunto con CAPTO, dado que podrían afectar en la humectación o irritación del parche en la piel. Se recomienda verificar en la optimización pues al medir esta variable de respuesta, se está considerando también al eritema como un indicador de la irritación de la piel de lo contrario, podría interferir en las formulaciones de microagujas cuando van dirigidas a casos de quemaduras donde la piel afectada es altamente sensible a cambios de pH, salinidad, humedad, etc. (Castillo-Carmona, 2022). Asimismo, en dermatología, se utiliza para diagnósticos clínicos objetivos, pruebas de alergia, mediciones de melanoma y determinación del color de la cicatriz (Mohd Ariffin & Hasham, 2020). Otra interacción de importancia, en la Fig. 62-b, de esta misma variable de respuesta con el antihipertensivo (CAPTO), también es la interacción de HA (%)-HA (%), presenta que, a altas concentraciones de HA, afecta negativamente después de colocar el parche previamente humectando la piel.

La Fig. 62-c, muestra la variable de respuesta de bioadhesión post-humectación, muestra que, el factor HA % muestra que habría impactos el cambio de pH de la piel posterior a la aplicación de microagujas por un exceso de acidez en la piel.

Fig. 62-d, muestra la variable de respuesta de la ruptura, la interacción relevante fue el efecto de la interacción PVA (%)-PVA (%), pues a altas concentraciones de este polímero, se ve afectado el esfuerzo a la ruptura (R). Castillo-Carmona (2022), menciona que la resistencia a la ruptura, es un parámetro crítico de calidad de este pues depende directamente la capacidad de las agujas de penetrar la dermis y entregar al fármaco a su sitio de absorción.



**Figura 62.** Diagrama de Pareto. Captopril. Regresión de superficie de respuesta de: **a)** pH, **b)** Mexámetro, **c)** Biadhesión poshumectación y **d)** Ruptura.

En la Fig. 63, se muestra el diagrama de Pareto de telmisartán (TELMI), donde las 3 variables de respuesta (tewámetro, mexámetro, ruptura), mostraron efectos para mejorar en las microagujas se desglosan a continuación.

La Fig. 63-a, presenta un efecto significativo en la interacción de PVP (%) en las microagujas ya que emplearlo en combinación con TELMI, la variable TWEL se ve incrementada. La Figura 63-b, el caso del mexámetro, se ve afectada con la interacción de HA (%) y PVP (%), PVP (%) y PVA (%)-PVP (%), por lo que en combinación con TELMI, afectarían la irritación o compatibilidad de las condiciones de la piel como ya se mencionó.

Finalmente, la Fig. 63-c, la ruptura, se vió notablemente afectada por la concentración de PVP (%). Este es un parámetro idóneo para la manipulación y aplicación del parche, pues si los parches son muy frágiles, podrían modificar su superficie fácilmente resultando en una ineffectividad terapéutica y/o complicando su manipulación (Arroyo-Vázquez, 2014).

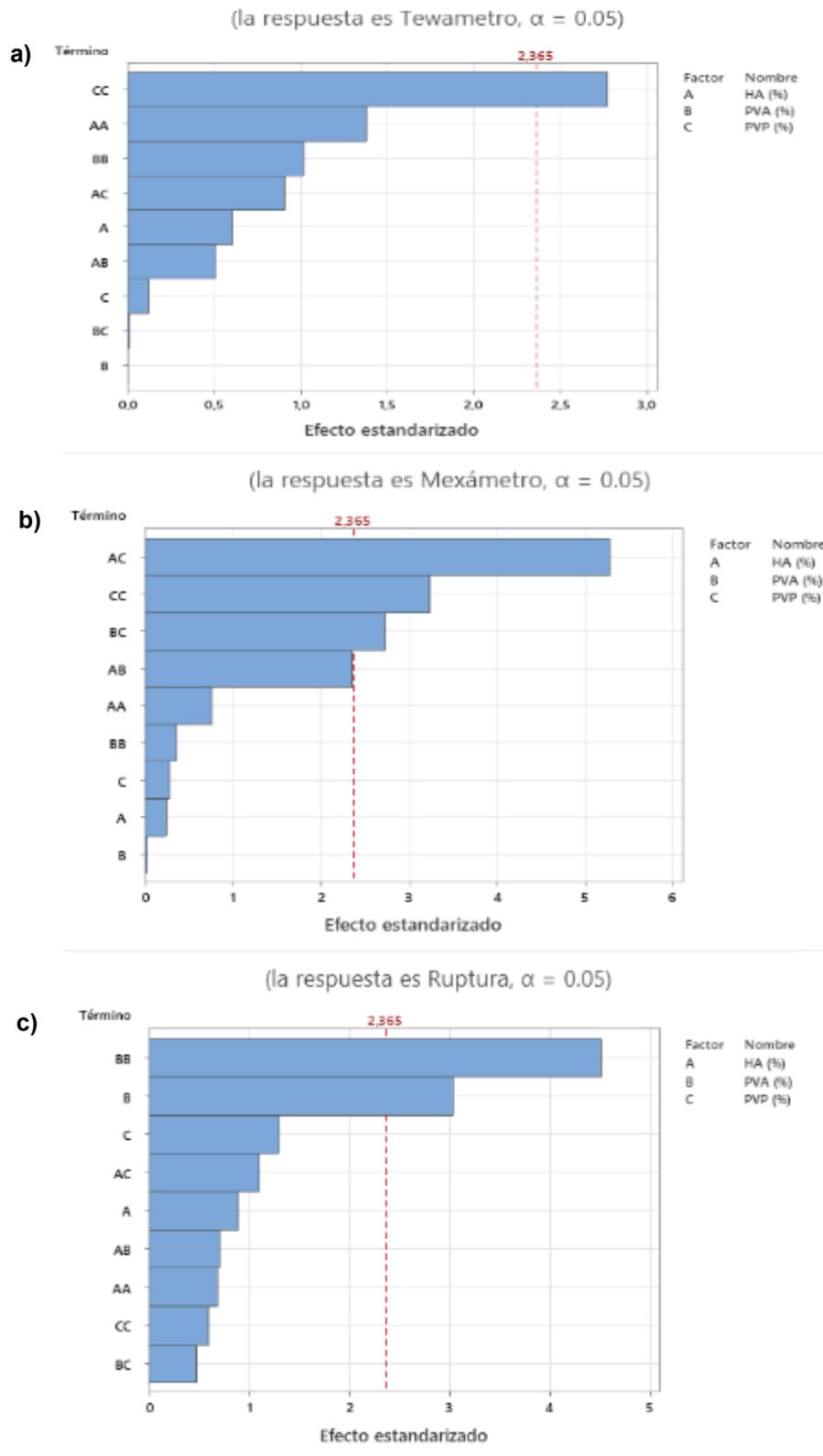


Figura 63. Diagrama de Pareto. Telmisartán. a) Tewámetro, b) Mexámetro y c) Ruptura.

En la Fig. 64-a, muestra el diagrama de Pareto de amlodipino (AMLO), la interacción de pH vs. HA (%), PVA (%), PVP (%), tanto la concentración de HA como el efecto de HA y PVA, se ven afectados cuando se combinan con el amlodipino. En la Fig. 64-b, la ruptura se ve afectada según la concentración de HA. Podría verse más elástica y, por tanto, menos resistente mientras el equipo aplica la fuerza necesaria para romper el parche. Es importante mencionar que, la textura final física del parche de microagujas fue más rígido y quebradizo a diferencia de los otros antihipertensivos. De manera que, tanto polímeros como antihipertensivos también otorgan propiedades finales en textura y resistencia, en este caso es el amlodipino. Kaynak, Bogacz, Ski, and Sahin (2011), mencionan que este antihipertensivo es una dihidropiridina de tercera generación, bloqueador de los canales de calcio tipo “L” de acción prolongada utilizada en el tratamiento de la hipertensión y angina de pecho. La farmacocinética del AMLO es muy diferente a la de otros fármacos de su clase, presenta un valor de pKa de 8.7, por lo tanto, posee una fuerte afinidad por las membranas celulares (Kaynak et al., 2011).

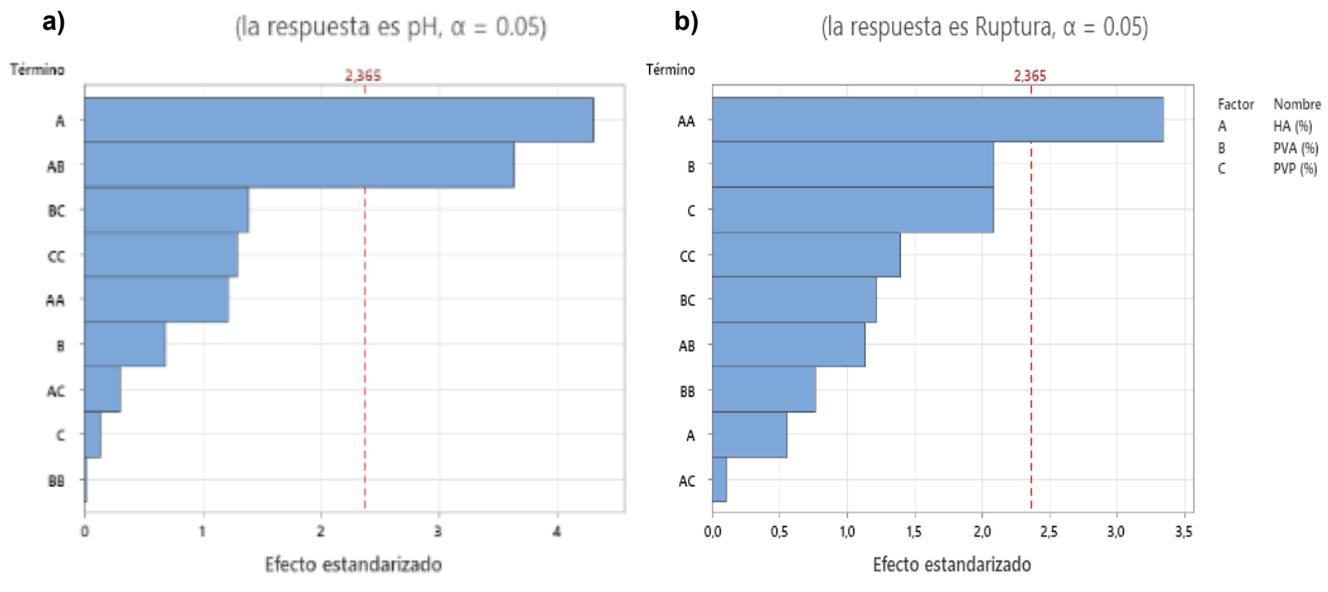
Imenshahidi, Roohbakhsh, and Hosseinzadeh (2024), en el ensayo de acceso comunitario MICARDIS® (MICCAT-2) en 1619 pacientes, 675 de ellos, tenían presión arterial que no respondía al tratamiento convencional. La administración de telmisartán (40 mg) controló con éxito la presión arterial en el 79% de los pacientes. Un estudio clínico en 414 pacientes hipertensos, mostró que 40 mg/día de telmisartán es más eficaz que 80 mg/día de valsartán en el control de la presión arterial matutina.

Imenshahidi et al. (2024), han mencionado que telmisartán, en comparación con otros fármacos antihipertensivos (losartán, valsartán, ramipril, atenolol y perindopril), ha demostrado un efecto superior en pacientes con hipertensión leve a moderada,

especialmente al final del intervalo de dosificación. En voluntarios sanos, se ha demostrado que 80 mg de telmisartán bloquean los efectos de la angiotensina II en aproximadamente un 90% en concentraciones plasmáticas máximas y después de 24 h, permanece aproximadamente un 40% de inhibición y también ha presentado una eficacia para reducir la presión arterial ya que en un metaanálisis de 28 ensayos controlados aleatorizados en 5157 pacientes con diferentes inhibidores de la éste mostró un mejor control de la presión arterial y tolerabilidad en pacientes hipertensos (Z. Zou, Xi, Yuan, Zhu, & Shi, 2009).

Darma, Rasyid, and Rivai (2021), indican que el captopril es el más recetado es un fármaco antihipertensivo y contra la insuficiencia cardíaca clasificado dentro de la clase de los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA).

Al-Majed, Assiri, Khalil, and Abdel-Aziz (2015), losartán es un antagonista del receptor de angiotensina II con actividad antihipertensiva debida principalmente al bloqueo selectivo de los receptores AT1 y el consiguiente efecto presor reducido de la angiotensina II. Se utiliza en el tratamiento de hipertensión e insuficiencia cardíaca, especialmente en pacientes que desarrollan tos con inhibidores de la ECA, por lo que se ha indicado que la dosis habitual de losartán potásico es de 50 mg una vez al día para hipertensos.



**Figura 64.** Diagrama de Pareto. Amlodipino. Regresión de superficie de respuesta de: **a)** pH y **b)** Ruptura.

### **6.15 Incorporación de los tratamientos obtenidos de HA para la elaboración de microagujas y análisis de variables de respuesta en cada antihipertensivo**

El diseño de superficie respuesta con 17 formulaciones, basado en un compuesto central 2<sup>2</sup> estrellado, permitió encontrar una concentración idónea y óptima para cada antihipertensivo. Fue fundamental durante la primera parte del proceso, se realizó con ácido hialurónico comercial. Posteriormente con los tratamientos seleccionados para optimizar recursos y reducir el desperdicio de insumos y lograr la elaboración de las microagujas.

Guadarrama-Escobar et al. (2024), mencionan que el hecho de aplicar un diseño de experimentos, permite evaluar, determinar y anticipar factores críticos en el proceso de elaboración de los parches, con la finalidad de obtener información necesaria para optimizar una formulación con características óptimas de bajo costo de fabricación.

Se obtuvo la formulación óptima para LOSAR, CAPTO, TELMI, AMLO. También se realizó la caracterización fisicoquímica de la formulación óptima, mediante pruebas de dimensiones, resistencia a la ruptura, bioadhesión, bioadhesión poshumectación, pH superficial y ruptura.

Se lograron elaborar los sistemas transdérmicos con arreglo microagujas poliméricas con HA de los tratamientos previamente seleccionados del MT (TCF-AA4D, TCF-AA8D, TCF-A4D y TCF-A8D) y UAI (MUCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120) disueltos con acetato de sodio 5% y ácido acético 0.5 M (ver Tabla 35).

Arroyo-Vázquez (2014), indican que la aplicación de microagujas o sistemas transdérmicos sobre la piel puede mejorar la administración de fármacos ya existentes, permite el desarrollo de nuevos compuestos y abre las puertas a sistemas basados en

microprocesadores con el fin de controlar la liberación de principios activos de forma continua en respuesta a las necesidades del organismo en un momento determinado.

**Tabla 35.** Tratamientos seleccionados de HA de los métodos MT y UAI.

<b>Solvente</b>	<b>AA</b>	<b>A</b>
<b>MT</b>	1: TCF-AA4D	6: TCF-A4D
	2: TCF-AA8D	7: TCF-A8D
	3: UCF-AA30	8: UCF-A30
	4: UCF-AA60	9: UCF-A60
<b>UAI</b>	5: UCF-AA120	10: UCF-A120

Se prepararon 10 soluciones madre de los tratamientos MT (TCF-AA4D, TCF-AA8D, TCF-A4D y TCF-A8D) y UAI (MUCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120), las cuales se ajustaron a las concentraciones de HA (ver Tabla 36) para cada fármaco (LOSAR, CAPTO, TELMI y AMLO). De manera complementaria, las formulaciones también se prepararon las 4 concentraciones correspondientes de HA (%), PVP (%) y PVA (%).

**Tabla 36.** Fórmulas óptimas para la elaboración de parches de cada antihipertensivo.

<b>Antihipertensivo</b>	<b>HA (%)</b>	<b>PVP (%)</b>	<b>PVA (%)</b>
<b>LOSAR</b>	0.24	2.52	1.67
<b>CAPTO</b>	0.20	2.66	3.68
<b>TELM</b>	0.46	0.31	0.48
<b>AMLO</b>	0.03	2.59	3.61

Las pruebas físicas (bioadhesión, bioadhesión post-humectación, ruptura) así como las pruebas complementarias (mexámetro, pH, TEWL) se realizaron directamente en piel humana. Almazan et al. (2020); Arroyo-Vázquez (2014), mencionan que es primordial, porque permite brindar condiciones reales para la experimentación pues al ser viable incluso después de su extirpación. Arroyo-Vázquez (2014), indica que la transdérmica de fármacos está limitada por la capa protectora de la piel (el estrato

córneo), por tanto, se tiene la necesidad de nuevos métodos para mejorar la permeabilidad en piel y aumentar la gama de fármacos que puedan administrarse por esa vía. Por lo que el desarrollo agujas de tamaño micrómetro (más finas que el diámetro de un cabello humano) permiten penetrar la capa superior de la piel sin llegar a dermis. Un ejemplo de ello, son las microagujas constituyen la base de una novedosa técnica para administrar fármacos potentes sin causar dolor. Si perforan el estrato córneo, permiten el acceso del fármaco hacia estructuras internas de la piel, donde se difunde y es absorbido por los capilares para ser transportado a circulación sistémica. Arroyo-Vázquez (2014), indican que la energía superficial de la piel humana limpia y seca es de aproximadamente 27 din/cm y este valor aumenta cuando la piel está sucia o no lavada. La piel húmeda o impura puede considerarse más hidrófila (con una mayor energía superficial) y una piel limpia-seca más lipofílica (menor energía superficial), se ha demostrado que la energía superficial de la piel humana *in vivo* aumenta con la humedad y temperatura. Por lo tanto, la energía superficial del parche transdérmico debe ser menor que el valor energético superficial crítico más bajo reportado para la piel (27 din/cm). Sin embargo, esta es una condición necesaria, pero no suficiente para la adhesión. No es aceptable un polímero sensible a la presión si induce reacciones cutáneas, las principales reacciones cutáneas son de dos tipos: (a) irritación primaria de la piel y (b) sensibilización de la piel.

### 6.15.1 Evaluación de parámetros evaluados de los sistemas transdérmicos (arreglos de microagujas poliméricas) con las formulaciones optimizadas

De los tratamientos previamente seleccionados (TCF-AA4D, TCF-AA8, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-AA120, TCF-A4D, TCF-A8D, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120) de HA, fueron comparados con 2 controles comerciales de HA (C1: *S. equi*, C2: rooster comb). Se formularon y desarrollaron un total de 12 arreglos de sistemas transdérmicos de microagujas poliméricas con los extractos de HA y controles por cada antihipertensivo (LOSAR, TELMI, CAPTO y TELMI). A continuación, se desglosan los resultados obtenidos con las variables evaluadas (TEWL, M, pH, B, BP, R).

#### 6.15.1.1 TEWL

Castillo-Carmona (2022), menciona que la pérdida de agua transepidermal (TEWL) es un proceso natural pasivo que ocurre en estrato córneo, en el cual el agua de las capas más profundas de la epidermis permea hasta las superiores para regular humedad y temperatura de la piel y se utiliza para evaluar la función de barrera hídrica de la piel. De manera que, es un método consolidado en dermatología evaluado *in vivo* o *in vitro* en la integridad de la barrera cutánea. Si este es alterado por agresión externa, podría ocurrir un desequilibrio reflejado en un aumento en el valor del parámetro (Elmahjoubi, Frum, Eccleston, Wilkinson, & Meidan, 2009; Machado, Salgado, Hadgraft, & Lane, 2010; Nangia, Patil, Berner, Boman, & Maibach, 1998).

Autores como Bernal-Chávez, Pérez-Carretero, Nava-Arzaluz, and Ganem-Rondero (2017), evaluaron la actividad moduladora de la absorción de dos derivados de alquilglicerol (alcohol batílico y alcohol quimílico) sobre las propiedades de barrera con pruebas biofísicas, los hallazgos confirman que los alquilglicerol tienen un efecto

retardante de la absorción en los fármacos estudiados. Por ejemplo, un tratamiento de la piel con Transcutol P®, aumentó de 64.6% en TEWL debido al efecto higroscópico de Transcutol P® pues se ha demostrado que este aumenta la hidratación (Ganem-Quintanar, Lafforgue, Falson-Rieg, & Buri, 1997). Así, la actividad potenciadora de la penetración de Transcutol P® se ha atribuido, a sus propiedades higroscópicas, capaces de absorber agua y modificar la composición del excipiente, que puede mejorar la penetración cutánea de ciertos fármacos.

La Tabla 37, muestra la evaluación de parámetros a la fórmula optimizada de CAPTO. Los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí y tampoco con respecto a los controles. Se observa que los valores para TEWL los 10 tratamientos fueron similares dentro del rango 14-32 g/m<sup>2</sup> h y los mayores valores corresponden a TCF-AA4D, TCF-AA8, UCF-AA30, UCF-AA, TCF-A4D, similares a C1 y C2.

Machado et al. (2010), indica que la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) corresponde a la densidad de flujo de vapor de agua en estado estacionario que permea el SC hacia el exterior. De esta manera, las mediciones de TEWL son de gran ayuda pues se utilizan rutinariamente en la industria farmacéutica y cosmética para proporcionar información sobre la respuesta de la piel a la irritación con los productos que se quieren lanzar al mercado y garantizar su eficacia. Las mediciones de TEWL con un dispositivo de flujo de vapor de agua calibrado, se pueden aplicar *in vitro*, ofrece una medición rápida y continua de la tasa ascendente de permeación de agua a través de la muestra de piel investigada.

Imhof, De Jesus, Xiao, Ciortea, and Berg (2016), mencionan que los avances recientes, que el diseño de instrumentación para TEWL, también los ha llevado a la aplicación de para caracterizar las propiedades de barrera de la piel humana tanto *in*

*vitro* como *in vivo*. Serrano-Castañeda et al. (2023), indica que la TEWL es un parámetro indispensable para analizar la función barrera de la piel, donde el proceso analizado es la difusión de agua en el estrato córneo. Por ejemplo, un valor alto de TEWL, indica disfunción o deterioro de la función barrera. También mostró, cómo las formulaciones que contienen un agente humectante, como el D-pantenol, absorben agua del ambiente, donde TEWL detecta una mayor pérdida de agua en los tejidos con mayor cantidad de agua.

La Tabla 38, muestra que la mayoría de los tratamientos mostraron diferencias estadísticas con entre sí y con respecto a los controles. Los valores para TEWL de los 10 tratamientos estuvieron dentro del rango 21-34 g/m<sup>2</sup> h donde los únicos tratamientos que mostraron diferencias significativas fueron TCF-AA4D, UCF-AA60, TCF-A8D.

En la Tabla 39, indica que, losartán (LOSAR) en TEWL, los valores fueron C2:15.80 g/m<sup>2</sup> h y C1:18.40 g/m<sup>2</sup> h. Asimismo, los tratamientos TCF-AA4D, TCF-AA8D, TCF-AA60, TCF-A8D, UCF-A120, mostraron diferencias significativas y presentaron valores superiores a los controles C1 y C2.

La Tabla 40, muestra las microagujas elaboradas con telmisartán (TELM) de los cuales los controles se obtuvieron valores de C1:20 g/m<sup>2</sup> h y C2: 23.5 g/m<sup>2</sup> h. Los tratamientos que presentaron diferencias significativas fueron UFC-AA120, UFC-A30, UFC-A120 y C1.

### 6.15.1.2 pH

Se ha mencionado que el potencial de hidrógeno (pH) es un coeficiente que indica la capacidad de una sustancia de ionizarse y simboliza el grado de acidez de una sustancia. En la piel, el pH en la piel tiene la función de neutralizar agentes agresivos

e inhibir el crecimiento de bacterias para generar el medio en la flora de la piel. Si se vuelve alcalino, no se podrán sintetizar lípidos esenciales en epidermis y si el efecto es contrario, existe una deshidratación, pues si existen condiciones ácidas, se produce inflamación y enrojecimiento de la piel (Castillo-Carmona, 2022).

La piel en buen estado mantiene pH de 4.5-5.75 (Eucerin, 2025) y cuando se tiene una herida abierta, el pH pasa de ser de la piel al tejido que se encuentra en el lecho de la herida. Esta prueba evalúa la acidez que se tienen los arreglos debido a que al ser una formulación transdérmica para el daño tisular se necesita que tenga un pH que no interfiera con la regeneración de esta y se menciona que en casos de heridas abiertas el pH es de 7.15-8.9, mientras que de la dermis es de 7-7.2, cuando se tienen valores cercanos a 7, la regeneración incrementada en las primeras 2 fases de la regeneración hasta llegar la reepitelización donde la herida se cierra y recupera el pH de la epidermis el cual es de 5.5. Lo idóneo es que la formulación maneje pH cercanos a 7 pero un pH 5.5, beneficiaria a la piel al contar con un recubrimiento que cumpla funciones bactericidas (Castillo-Carmona, 2022). En este caso la Tabla 36, muestra los valores de pH obtenidos de la piel después de la aplicación de las microagujas formuladas con CAPTO. Los tratamientos TCF-AA4D, TCF-A4D y UFC-A30, presentaron diferencias significativas y los valores obtenidos para controles C1:5.93-C2:5.59, también se asemejan pues presentaron valores cercanos a un pH 6. En la Tabla 37, los tratamientos que muestran diferencias muestran la evaluación de parámetros a la fórmula optimizada de AMLO. Se observa que los valores estuvieron dentro de un rango 5.5-6.1 en tratamientos y controles. Asimismo, los tratamientos: UCF-A30, UCF-A60, TCF-A8D y UFC-AA120 presentaron diferencias significativas. Asimismo, la Tabla 38, muestra las microagujas elaboradas con LOSAR, los cuales no mostraron

diferencias significativas al leer un valor aproximado de pH 6.0 en la mayoría de los tratamientos. En la Tabla 39, los tratamientos esto ocurrió con TELMI 6.24-6.34 y los tratamientos que mostraron ser diferentes fueron TCF-AA8D y UFC-AA30. Mohd Ariffin and Hasham (2020), mencionan que la prueba de pH se realiza porque según el crecimiento de biofilm en una herida genera un cambio en el pH de la epidermis (ya sea a ácido o alcalino) lo que es un indicador temprano de infección, por tanto, sería necesario reducir los niveles de pH. El pH ácido o alcalino, puede causar irritación de la piel o afectar la absorción del fármaco ya que una de las características del principio activo para la penetración transdérmica es que debe estar en su forma no ionizada.

### **6.15.1.3 Mexámetro (M)**

Cuando existe algún factor externo o interno que provoque el estrés o la muerte celular, las células inflamatorias se acumulan en la zona afectada causando un enrojecimiento, un aumento en la temperatura y sensación de incomodidad a este proceso se le llama eritema (Castillo-Carmona, 2022).

Para esto, el Mexameter® MX 18, es una herramienta fácil, rápida y económica para medir los dos componentes, principales responsables del color de la piel: melanina y hemoglobina (eritema) por reflectancia. Dicha medición, se basa en la absorción/reflexión donde la sonda emite 3 longitudes de onda de luz específicas; un receptor (mide la luz reflejada por la piel), al definir la cantidad de luz emitida, se puede calcular la cantidad de luz absorbida por la piel. En medición de melanina; mide 2 longitudes de onda específicas (rojo: 660 nm e infrarrojo cercano: 880 nm), para corresponder a diferentes tasas de absorción por los pigmentos. En la medición de eritema; se utilizan 2 longitudes de onda específicas (verde: 568 nm y rojo: 660 nm),

corresponden al pico de absorción espectral de la hemoglobina para evitar otras influencias del color (Courage-khazaka, 2025).

La Tabla 37, muestra los valores de CAPTO en la variable mexámetro (M), donde se obtuvieron valores de 64.67-70.67 y los tratamientos que mostraron diferencias significativas son UCF-AA30, UCF-AA120, UCF-A30, UCF-A120.

Tabla 38, en el caso de los parches de microagujas elaboradas con AMLO, el rango de valores obtenidos es de 58.33-64.33. De manera general, los tratamientos significativamente diferentes fueron TCF-AA8D y UCF-A120.

La Tabla 39, muestra las microagujas de losartán, se obtuvieron datos de un rango 59-70.35. Los tratamientos no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles, excepto UCF-AA30, UCF-A30 y UCF-A120.

Este parámetro, es de importancia ya que, ya que es la síntesis de las variables de medición arrojadas por el mexámetro (eritema y melanina). Eritema está relacionado con el enrojecimiento y la hinchazón síntomas de varias enfermedades infecciosas y de la piel. La cuantificación del eritema y melanina es útil para el análisis de pruebas cutáneas y el manejo de enfermedades cutáneas incluyendo factores personales (edad, sexo, raza, sitio anatómico, propiedades de la superficie de la piel), factores ambientales (condiciones de luz, temperatura) y diferentes procedimientos influyen en el color de la piel (Fullerton et al., 1996).

En dermatología para medir la hidratación como variable de respuesta, pue un efecto de deshidratación da como resultado una piel que luce opaca, áspera y sin elasticidad. Esto puede observarse en un tratamiento integral de un paciente con hipertensión, diabetes o heridas crónicas, donde es de vital importancia la aplicación de sustancias humectantes, tanto para el cuidado de heridas como para la prevención de nuevas

lesiones. En este caso, además de los antihipertensivos que son de vital importancia en enfermedades crónico-degenerativas, se asume que el hecho de adicionar HA a la formulación serviría como un auténtico componente con propiedades humectantes y reparadoras para procesos de cicatrización por el contenido de OH en su estructura (Mohd Ariffin & Hasham, 2020; Xu et al., 2021).

### **6.15.1.4 Bioadhesión (B)**

La fuerza cohesiva es la fuerza interna que tiene un adhesivo que permite medir la capacidad de una sustancia de resistir la separación a un área u objeto, a mayor sea esta fuerza necesaria para que esta sustancia se separe mayor será la adhesión de la sustancia (Miravete, 2002). Los arreglos de microagujas deben poseer la capacidad de fijarse en la piel tanto por la fuerza mecánica que ejercen las microagujas, así como por las propiedades químicas de la formulación. La adhesión confiere al arreglo la capacidad de quedarse fijo sobre un área determinada y evita que este se retire de forma accidental con algún movimiento brusco (Castillo-Carmona, 2022).

Las microagujas elaboradas con CAPTO (Tabla 37), aquí se observa que los tratamientos y controles mostraron diferencias significativas. De los controles C1: 706.83 gf y C2: 1096.33 gf para los tratamientos de ambos métodos se obtuvieron valores similares a ambos controles.

Las microagujas elaboradas con AMLO (ver Tabla 38), muestran que en bioadhesión todos los tratamientos fueron diferentes significativamente entre sí y con respecto a los controles. Sin embargo, el orden de magnitud es el mismo para UCF-A30, UCF-A60, UCFA120 y TCF-A4D.

En la Tabla 39, se observan las microagujas elaboradas con los extractos de tratamientos de LOSAR, quienes mostraron diferencias significativas entre sí y con respecto a los controles. La mayoría de los tratamientos se asemejan más con el C1: 1542 gf, todos se encuentran dentro del mismo orden de magnitud.

En la Tabla 40, se muestran las microagujas elaboradas con el antihipertensivo telmisartán (TELMI), donde los controles C1: 693 gf y C2: 856.67 gf, mientras que el rango de valores de los tratamientos osciló de entre 587-1038 gf.

### **6.15.1.5 Bioadhesión post-humectación (BP)**

La transpiración es una función que lleva a cabo la piel en la cual el cuerpo libera sudor y reduce la temperatura corporal, sin embargo, este sudor puede generar que el arreglo se humedezca y pierda o gane fuerza su adhesión por lo que evaluar la adhesión bajo este contexto es necesario para evaluar su posible función en pacientes reales (Castillo-Carmona, 2022). En la Tabla 37, se puede observar que las microagujas de captopril (CAPTO) presentaron valores de entre 896-865 gf. Sin embargo, los tratamientos con diferencias significativas fueron: UCF-A120, UCF-A30, UCF-AA30 y TCF-AA8D. En el caso de amlodipino (AMLLO), muestra la Tabla 37, donde los valores oscilan de entre 1162-1163 gf. De esta forma, los tratamientos diferentes significativamente fueron: TCF-AA4D, TCF-AA8D, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120.

Para el caso de losartán (LOSAR) (ver Tabla 38), los controles (C1 y C2) LOSAR, se obtuvieron valores de 826 gf. Los tratamientos para este antihipertensivo, presentaron diferencias significativas para TCF-AA4D, TCF-AA8D, UCF-A30, UCF-A60, UCF-A120, el mayor valor fue UCF-AA120: 964 gf.

En la Tabla 39, se muestran las microagujas elaboradas con telmisartán, los controles y algunos tratamientos presentaron un valor similar a 947 gf. Asimismo, los tratamientos que presentaron diferencias significativas fueron: TCF-AA4D, TCF-AA8D, UCF-AA30, UCF-AA60.

La bioadhesión post-humectación, refiere a la humectación del parche transdérmico cuando ya es aplicado por la transpiración o condiciones externas (condiciones ambientales y el lavado), considera la humectación del parche transdérmico ya aplicado por la transpiración o por condiciones externas como las condiciones ambientales y el lavado. La falta de adhesión de los sistemas transdérmicos a la piel, es un factor crítico directamente relacionado con el suministro de fármacos y el efecto terapéutico. Como el proceso de absorción del fármaco, está relacionado con la partición del fármaco entre: parche transdérmico, piel y proceso de penetración del fármaco. Es fundamental un contacto completo de la piel sobre la superficie de suministro, porque si se separa parcialmente, la absorción del fármaco se ve afectada y por lo que lleva a un fracaso terapéutico. Por lo tanto, la calidad del contacto entre el parche y piel se refleja directamente en la consistencia de la administración del fármaco. La adherencia a la piel, se ve afectada por la forma, conformabilidad y oclusividad; en el caso de los parches redondos tienden a ser más seguros que los de una geometría más acentuada, el adhesivo debe asegurar la adherencia inicial, pero debe tener suficiente fuerza de cohesión para eliminarlo de forma limpia, sin dejar residuos (Gibson, 2016; P.-C. Wu, Tsai, Lin, & Huang, 2014). Para que cualquier adhesivo se adhiera a un sustrato, primero se debe satisfacer un requerimiento termodinámico fundamental: la energía superficial medida del adhesivo debe ser igual o inferior a la del adhesivo, o piel humana en este caso. A menos que esta condición

esté satisfecha, un material no puede adherirse a la piel. Sin embargo, esta es una condición necesaria pero no suficiente para la adhesión (Kuehl & Osuna, 2001).

### **6.15.1.6 Ruptura**

Los 4 antihipertensivos (TELMI, CAPTO, LOSAR, AMLO) que corresponden a las del parámetro de ruptura (R). En el análisis de ruptura en la Tabla 36, se puede observar el rango de valores obtenidos en la prueba: CAPTO 5164-5358 gf, donde en controles se obtuvieron y algunos tratamientos los datos fueron similares de alrededor C2: 5358.92 gf con excepción de TCF-AA4D y UCF-AA30.

La Tabla 37, para el antihipertensivo AMLO en particular, se obtuvieron valores inferiores de 1000 gf, físicamente las microagujas lucían más frágiles y quebradizas a diferencia del resto de las microagujas elaboradas con los otros antihipertensivos. La literatura sugiere que, para tener buenas propiedades de ruptura, los valores deberían ser superiores a 1000 gf, en este caso sería necesario ajustar la formulación óptima. La importancia de medir este parámetro, es que si los parches no son resistentes a la ruptura, se pueden presentar problemas de seguridad y eficacia terapéutica ya que al romperse no entregarían la dosis adecuada al paciente (Serrano-Castañeda, 2019).

En la Tabla 38, se visualizan las microagujas elaboradas con losartán 4027-5346 gf, donde todos los tratamientos presentaron diferencias significativas en todos los casos (tratamientos y controles).

En la Tabla 39, se muestran los datos obtenidos de las microagujas elaboradas con Telmisartán la mayoría mostró 4166-5397 gf. Se observaron algunas diferencias significativas de los tratamientos: TCF-AA8D, UCF-AA30, UCF-AA60, UCF-A30, UCF-A120. Esto explica porque Bharkatiya, Nema, Bhatnagar, and Bharkatiya (2010),

explican que la resistencia a la ruptura puede cambiar debido a la naturaleza del polímero o plastificante utilizado, de modo que un polímero blando y débil se caracteriza por una baja resistencia a la ruptura con poca elasticidad. Adicionalmente, esto puede también verse interferido por el tipo de antihipertensivo que cambia considerablemente la textura final a pesar de emplear los mismos extractos de HA.

Por otra parte, si fuera un polímero duro y quebradizo se caracterizaría por una resistencia a la ruptura y una baja elasticidad, un polímero blando y duro se caracteriza por una alta resistencia a la ruptura y una elasticidad moderada. Mientras que un polímero duro, presenta una alta resistencia a la ruptura y gran elasticidad (Bharkatiya et al., 2010).

Las microagujas son un dispositivo con una multiplicidad de agujas de tamaño micrométrico que están unidas a un soporte de base, existe una gran variedad de diseños, longitudes y materiales. La función de éstas, es que perforan el estrato corneo creando microcanales hidrofílicos transitorios a través de la piel, los microcanales proporcionan el acceso directo a la epidermis viable subyacente, sin llegar a los vasos sanguíneos y las fibras nerviosas localizadas en la dermis. La longitud de las microagujas tiene un papel importante en la absorción percutánea, se ha demostrado que las microagujas de 2.25 mm, presentan mayor penetración de fármaco, debido al grosor de la epidermis ya que es la capa más externa de la piel donde se encuentra el estrato córneo que funge como principal barrera de permeabilidad (Alkilani, McCrudden, & Donnelly, 2015).

Tabla 37. Captopril: microagujas de la fórmula optimizada en tratamientos de HA.

Formulación				Pruebas Mecánicas					
LOTE	HA (%)	PVA (%)	PVP (%)	TEWL (g/m <sup>2</sup> h)	pH	M	B (gf)	BP (gf)	R (gf)
TCF-AA4D	0.20	3.68	2.66	24.20±0.00 <sup>a</sup>	6.23±0.33 <sup>a</sup>	70.00±0.58 <sup>a, b, c, d</sup>	556.33±1.04 <sup>l</sup>	498.67±0.29 <sup>g</sup>	2308.75±2.75 <sup>h</sup>
TCF-AA8D	0.20	3.68	2.66	23.87±0.81 <sup>a</sup>	5.70±0.22 <sup>a, b, c</sup>	80.33±0.01 <sup>a, b, c, d</sup>	937.50±0.50 <sup>e</sup>	498.67±0.29 <sup>g</sup>	5377.00±0.39 <sup>a</sup>
UCF-AA30	0.20	3.68	2.66	20.23±0.06 <sup>a</sup>	5.53±0.15 <sup>b, c</sup>	84.00±5.57 <sup>a</sup>	1114.17±0.29 <sup>a</sup>	481.83±0.58 <sup>h</sup>	4840.75±2.75 <sup>g</sup>
UCF-AA60	0.20	3.68	2.66	27.10±0.00 <sup>a</sup>	5.73±0.03 <sup>a, b, c</sup>	70.00±4.25 <sup>a, b, c, d</sup>	773.17±0.76 <sup>h</sup>	481.83±0.58 <sup>h</sup>	5377.67±3.29 <sup>a</sup>
UCF-AA120	0.20	3.68	2.66	17.70±0.00 <sup>a</sup>	5.70±0.06 <sup>a, b, c</sup>	83.67±5.51 <sup>a</sup>	688.83±0.29 <sup>k</sup>	481.83±0.58 <sup>h</sup>	5383.50±0.97 <sup>a</sup>
TCF-A4D	0.20	3.68	2.66	31.70±0.00 <sup>a</sup>	5.31±0.19 <sup>c</sup>	65.67±7.64 <sup>a, b, c</sup>	698.67±0.29 <sup>j</sup>	481.83±0.58 <sup>h</sup>	5029.00±0.00 <sup>f</sup>
TCF-A8D	0.20	3.68	2.66	14.17±0.91 <sup>a</sup>	5.65±0.08 <sup>b, c</sup>	81.33±3.79 <sup>a, b</sup>	863.33±0.58 <sup>f</sup>	756.67±0.29 <sup>f</sup>	5029.00±0.00 <sup>f</sup>
UCF-A30	0.20	3.68	2.66	16.83±0.46 <sup>a</sup>	5.38±0.23 <sup>c</sup>	83.67±5.51 <sup>a</sup>	1011.17±0.29 <sup>c</sup>	952.50±0.00 <sup>a</sup>	5260.17±4.35 <sup>d</sup>
UCF-A60	0.20	3.68	2.66	17.90±0.00 <sup>a</sup>	5.80±0.15 <sup>a, b, c</sup>	68.33±9.24 <sup>a, b, c, d</sup>	841.17±0.29 <sup>g</sup>	875.50±0.87 <sup>c</sup>	5331.83±6.11 <sup>c</sup>
UCF-A120	0.20	3.68	2.66	19.30±0.00 <sup>a</sup>	5.74±0.04 <sup>a, b, c</sup>	55.67±8.08 <sup>a</sup>	986.00±0.50 <sup>d</sup>	841.67±0.29 <sup>e</sup>	5352.75±7.19 <sup>b</sup>
C1: <i>S. equi</i>	0.20	3.68	2.66	32.00±0.00 <sup>a</sup>	5.93±0.12 <sup>a, b</sup>	64.67±8.59 <sup>a, b</sup>	706.83±2.02 <sup>i</sup>	896.50±0.00 <sup>b</sup>	5164.83±0.76 <sup>e</sup>
C2: rooster comb	0.20	3.68	2.66	20.00±0.00 <sup>a</sup>	5.59±0.30 <sup>b, c</sup>	70.67±1.93 <sup>a, b, c, d</sup>	1096.33±0.58 <sup>b</sup>	865.67±0.29 <sup>d</sup>	5358.92±9.18 <sup>b</sup>

Los valores son medias ± DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ).

Tabla 38. Amlodipino: microagujas de la fórmula optimizada en tratamientos de HA.

Formulación				Pruebas Mecánicas					
LOTE	HA (%)	PVA (%)	PVP (%)	TEWL (g/m <sup>2</sup> h)	pH	M	B (gf)	BP (gf)	R (gf)
TCF-AA4D	0.03	3.61	2.59	21.30±0.00 <sup>e</sup>	5.83±0.12 <sup>a, b</sup>	53.00±3.61 <sup>a, b, c</sup>	853.33±1.04 <sup>j</sup>	781.00±0.00 <sup>a</sup>	959.83±7.75 <sup>c</sup>
TCF-AA8D	0.03	3.61	2.59	26.00±0.00 <sup>c, d, e</sup>	5.85±0.06 <sup>a, b</sup>	34.67±5.13 <sup>a</sup>	664.00±0.50 <sup>k</sup>	829.83±0.58 <sup>a</sup>	455.25±5.25 <sup>e</sup>
UCF-AA30	0.03	3.61	2.59	29.00±0.00 <sup>b, c</sup>	5.94±0.20 <sup>a, b</sup>	61.67±4.04 <sup>a, b, c</sup>	994.17±0.76 <sup>f</sup>	888.00±0.50 <sup>a</sup>	87.33±1.53 <sup>i</sup>
UCF-AA60	0.03	3.61	2.59	34.37±1.63 <sup>a</sup>	5.99±0.02 <sup>a, b</sup>	7.33±4.04 <sup>a, b, c</sup>	857.17±0.29 <sup>i</sup>	915.00±0.00 <sup>a</sup>	51.33±1.53 <sup>k</sup>
UCFAA120	0.03	3.61	2.59	24.63±2.02 <sup>c, d, e</sup>	6.12±0.02 <sup>a</sup>	69.67±4.01 <sup>a, b</sup>	892.33±0.58 <sup>h</sup>	912.00±0.00 <sup>a</sup>	68.33±1.04 <sup>j</sup>
TCF-A4D	0.03	3.61	2.59	22.70±0.00 <sup>d, e</sup>	5.94±0.05 <sup>a, b</sup>	54.00±0.39 <sup>a, b, c</sup>	1027.17±0.29 <sup>e</sup>	900.00±0.00 <sup>a</sup>	148.00±2.29 <sup>g</sup>
TCF-A8D	0.03	3.61	2.59	21.00±0.00 <sup>e</sup>	6.11±0.11 <sup>a</sup>	55.67±8.04 <sup>a, b, c</sup>	955.67±1.61 <sup>g</sup>	885.00±0.00 <sup>a</sup>	108.83±1.89 <sup>h</sup>
UCF-A30	0.03	3.61	2.59	27.70±0.00 <sup>c, d</sup>	6.04±0.10 <sup>a</sup>	38.33±9.45 <sup>a, b</sup>	1075.33±0.58 <sup>c</sup>	885.00±0.00 <sup>a</sup>	187.33±1.53 <sup>f</sup>
UCF-A60	0.03	3.61	2.59	33.30±0.00 <sup>a, b</sup>	6.03±0.14 <sup>a</sup>	58.33±9.22 <sup>a, b</sup>	1090.33±0.58 <sup>b</sup>	806.00±2.18 <sup>a</sup>	2242.83±8.02 <sup>a</sup>
UCF-A120	0.03	3.61	2.59	34.10±2.94 <sup>a, b</sup>	5.93±0.12 <sup>a, b</sup>	84.00±4.00 <sup>a</sup>	1068.83±0.29 <sup>d</sup>	1356.83±0.29 <sup>a</sup>	2247.83±8.61 <sup>a</sup>
C1: <i>S. equi</i>	0.03	3.61	2.59	23.00±0.00 <sup>d, e</sup>	5.93±0.12 <sup>a, b</sup>	58.33±5.17 <sup>a, b, c</sup>	1137.50±0.50 <sup>a</sup>	1163.00±0.00 <sup>a</sup>	552.67±0.69 <sup>d</sup>
C2: rooster comb	0.03	3.61	2.59	22.37±4.93 <sup>d, e</sup>	5.59±0.30 <sup>b</sup>	64.33±2.50 <sup>a, b</sup>	1137.50±0.50 <sup>a</sup>	1162.33±0.58 <sup>a</sup>	1842.33±8.28 <sup>b</sup>

Los valores son medias ± DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ).

Tabla 39. Losartán: microagujas de la fórmula optimizada en tratamientos de HA.

Formulación				Pruebas Mecánicas					
LOTE	HA (%)	PVA (%)	PVP (%)	TEWL (g/m <sup>2</sup> h)	pH	M	B (gf)	BP (gf)	R (gf)
TCF-AA4D	0.24	1.67	2.52	30.20±0.00 <sup>c</sup>	5.86±0.07 <sup>a</sup>	54.00±5.29 <sup>a</sup>	1022.50±1.73 <sup>l</sup>	906.67±0.29 <sup>e</sup>	5346.50±6.06 <sup>b</sup>
TCF-AA8D	0.24	1.67	2.52	26.00±2.12 <sup>b</sup>	5.72±0.12 <sup>a</sup>	55.67±6.43 <sup>a</sup>	1287.00±0.00 <sup>j</sup>	874.17±0.29 <sup>f</sup>	4950.50±0.00 <sup>h</sup>
UCF-AA30	0.24	1.67	2.52	25.70±0.70 <sup>b,c</sup>	5.85±0.12 <sup>a</sup>	77.33±7.77 <sup>a</sup>	1383.00±0.87 <sup>h</sup>	986.50±0.50 <sup>a</sup>	5026.50±0.00 <sup>g</sup>
UCF-AA60	0.24	1.67	2.52	23.90±0.00 <sup>c</sup>	5.83±0.08 <sup>a</sup>	73.00±3.11 <sup>a</sup>	1321.00±0.00 <sup>i</sup>	774.50±0.50 <sup>h</sup>	5167.00±0.00 <sup>d</sup>
UCF-AA120	0.24	1.67	2.52	18.60±0.00 <sup>e,f</sup>	6.02±0.07 <sup>a</sup>	50.67±6.35 <sup>a</sup>	1396.17±0.29 <sup>g</sup>	964.00±0.00 <sup>b</sup>	5066.00±0.00 <sup>f</sup>
TCF-A4D	0.24	1.67	2.52	18.30±0.00 <sup>e,f</sup>	5.94±0.05 <sup>a</sup>	57.67±7.51 <sup>a</sup>	1471.50±0.87 <sup>f</sup>	921.67±0.29 <sup>c</sup>	5333.50±0.00 <sup>c</sup>
TCF-A8D	0.24	1.67	2.52	20.97±0.15 <sup>d</sup>	5.95±0.04 <sup>a</sup>	58.67±6.69 <sup>a</sup>	1493.50±0.87 <sup>e</sup>	921.67±0.29 <sup>c</sup>	5124.00±0.00 <sup>e</sup>
UCF-A30	0.24	1.67	2.52	19.57±0.23 <sup>d,e</sup>	5.91±0.19 <sup>a</sup>	55.67±4.01 <sup>a</sup>	1503.67±0.29 <sup>d</sup>	826.67±0.29 <sup>g</sup>	5371.67±9.75 <sup>a</sup>
UCF-A60	0.24	1.67	2.52	16.80±0.00 <sup>f,g</sup>	5.89±0.11 <sup>a</sup>	65.33±3.43 <sup>a</sup>	1547.17±0.29 <sup>b</sup>	826.33±0.58 <sup>g</sup>	5075.00±0.00 <sup>f</sup>
UCF-A120	0.24	1.67	2.52	19.00±0.00 <sup>e</sup>	5.92±0.01 <sup>a</sup>	53.33±9.81 <sup>a</sup>	1278.83±0.58 <sup>k</sup>	826.67±0.29 <sup>g</sup>	4856.00±0.00 <sup>i</sup>
C1: <i>S. equi</i>	0.24	1.67	2.52	18.40±0.00 <sup>e,f</sup>	6.06±0.10 <sup>a</sup>	59.00±2.65 <sup>a</sup>	1542.33±0.58 <sup>c</sup>	826.33±0.58 <sup>g</sup>	4027.50±6.06 <sup>j</sup>
C2:rooster comb	0.24	1.67	2.52	15.80±0.13 <sup>g</sup>	6.03±0.03 <sup>a</sup>	70.33±0.87 <sup>a</sup>	1800.00±0.50 <sup>a</sup>	826.33±0.76 <sup>g</sup>	5164.67±0.76 <sup>d</sup>

Los valores son medias ± DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ).

Tabla 40. Telmisartán: microagujas de la fórmula optimizada en tratamientos de HA.

Formulación				Pruebas Mecánicas					
LOTE	HA (%)	PVA (%)	PVP (%)	TEWL (g/m <sup>2</sup> h)	pH	M	B (gf)	BP (gf)	R (gf)
TCF-AA4D	0.46	0.48	0.31	21.80±0.00 <sup>c,d,e</sup>	6.11±0.06 <sup>a,b</sup>	60.67±0.41 <sup>c,d</sup>	650.33±0.58 <sup>j</sup>	809.50±0.50 <sup>c</sup>	5291.50±0.00 <sup>d,e</sup>
TCF-AA8D	0.46	0.48	0.31	21.00±0.00 <sup>d,e</sup>	6.01±0.14 <sup>b</sup>	59.67±0.55 <sup>c,d</sup>	669.00±0.50 <sup>i</sup>	744.00±0.87 <sup>d</sup>	5397.00±0.00 <sup>a</sup>
UCF-AA30	0.46	0.48	0.31	22.77±0.06 <sup>c,d</sup>	6.06±0.09 <sup>b</sup>	50.67±4.51 <sup>d</sup>	707.17±0.29 <sup>g</sup>	699.50±0.50 <sup>e</sup>	5386.00±0.00 <sup>a</sup>
UCF-AA60	0.46	0.48	0.31	21.27±2.16 <sup>c,d,e</sup>	6.25±0.03 <sup>a,b</sup>	63.00±6.52 <sup>b,c,d</sup>	734.50±0.50 <sup>e</sup>	830.67±0.29 <sup>b</sup>	4166.50±0.00 <sup>h</sup>
UCF-AA120	0.46	0.48	0.31	26.50±0.00 <sup>a</sup>	6.26±0.04 <sup>a,b</sup>	78.33±6.43 <sup>a,b</sup>	1038.33±0.58 <sup>a</sup>	947.67±0.29 <sup>a</sup>	5383.00±0.00 <sup>a,b</sup>
TCF-A4D	0.46	0.48	0.31	21.10±1.56 <sup>d,e</sup>	6.10±0.03 <sup>a,b</sup>	78.00±9.54 <sup>a,b</sup>	565.67±0.29 <sup>l</sup>	948.00±0.00 <sup>a</sup>	5332.50±0.00 <sup>b,c,d</sup>
TCF-A8D	0.46	0.48	0.31	23.00±0.00 <sup>c,d</sup>	6.22±0.11 <sup>a,b</sup>	65.00±5.87 <sup>b,c,d</sup>	925.17±0.29 <sup>b</sup>	947.67±0.29 <sup>a</sup>	5310.00±0.00 <sup>c,d,e</sup>
UCF-A30	0.46	0.48	0.31	20.40±0.17 <sup>e</sup>	6.26±0.05 <sup>a,b</sup>	84.33±5.53 <sup>a</sup>	720.83±0.58 <sup>f</sup>	947.67±0.29 <sup>a</sup>	4242.83±1.36 <sup>g</sup>
UCF-A60	0.46	0.48	0.31	25.30±0.00 <sup>a,b</sup>	6.13±0.16 <sup>a,b</sup>	73.67±2.86 <sup>a,b,c</sup>	587.33±0.58 <sup>k</sup>	947.67±0.29 <sup>a</sup>	5346.00±0.00 <sup>a,b,c</sup>
UCF-A120	0.46	0.48	0.31	26.40±0.00 <sup>a</sup>	6.20±0.09 <sup>a,b</sup>	87.67±7.57 <sup>a</sup>	839.17±0.29 <sup>d</sup>	947.67±0.29 <sup>a</sup>	5264.08±0.02 <sup>e</sup>
C1: S. equi	0.46	0.48	0.31	20.30±0.00 <sup>e</sup>	6.24±0.08 <sup>a,b</sup>	77.00±3.43 <sup>a,b</sup>	693.83±0.58 <sup>h</sup>	947.67±0.29 <sup>a</sup>	5262.83±4.44 <sup>e</sup>
C2: rooster comb	0.46	0.48	0.31	23.50±0.00 <sup>b,c</sup>	6.34±0.03 <sup>a</sup>	63.67±0.23 <sup>b,c,d</sup>	856.67±0.76 <sup>c</sup>	947.50±0.50 <sup>a</sup>	4838.00±5.46 <sup>f</sup>

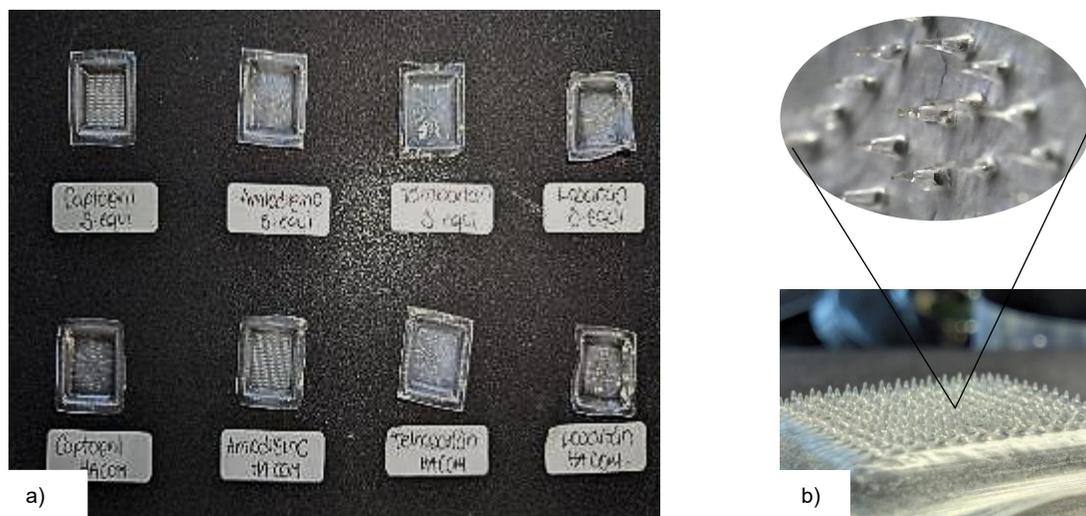
Los valores son medias ± DE basadas en 3 observaciones. Las medias con diferentes letras cuando ( $p \leq 0.05$ ).

Los resultados demuestran que en la Fig. 65, es posible utilizar los extractos de HA extraído por MT y UAI para la elaboración microagujas y aumentar la administración transdérmica de antihipertensivos (losartán, telmisartán, captopril y amlodipino). Esto se complementa con los resultados de citotoxicidad, donde los extractos son seguros a concentraciones de HA bajas, no son tóxicos durante el suministro de las microagujas y adicionalmente generan una optimización de los extractos de HA.

Estos hallazgos suman a la contribución de nuevas alternativas a los fármacos orales para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas no sólo para el empleo para problemas de hipertensión sino también utilizarse como una plataforma de un vehículo probándose con otros fármacos y dadas las bondades del HA aprovechar su uso también en el tratamiento de otras enfermedades en procesos de cicatrización de heridas p.e ((pie diabético, quemaduras, regeneración de tejidos internos (problemas gastrointestinales) y externos (enfermedades de la piel como el pénfigo, entre otros)).

Como resultado de esta investigación, se confirma que se logró formular, desarrollar y caracterizar un sistema transdérmico con base a un arreglo de microagujas poliméricas de HA provenientes de los mejores rendimientos de los métodos MT y UAI para llevar a cabo una innovación en el desarrollo de sistemas de administración de antihipertensivos con el objetivo de aumentar la biodisponibilidad de los principios activos, sin afectar el sistema digestivo (hígado) utilizando HA extraído de las crestas de *Gallus gallus domesticus* que dados los resultados de citotoxicidad no representan ser una amenaza para la salud humana al utilizarse en concentraciones muy bajas.

Sin embargo, en este caso, las concentraciones se reducen adicionalmente al emplear PVA y PVP como polímeros complementarios en la solución final. HA presenta beneficios adicionales que, además la humectación de la piel desde el primer contacto con la superficie ayuda en la bioadhesión y al mismo tiempo en la hidratación sin contar que la migración hasta el torrente sanguíneo podría relacionarse de manera indirecta con los procesos de cicatrización.



**Figura 65.** a) Parches de microagujas elaborados con las fórmulas optimizadas de los controles de HA, C1: *S. equi* (superior) y C2: rooster comb comercial con antihipertensivos (CAPTO, AMLO, TELMI y LOSAR). b) Acercamiento de la estructura de parche microagujas.

## 7 CONCLUSIONES

Las tinciones realizadas a las crestas de *Gallus gallus domesticus*, permitieron verificar la presencia de tejido mucoide para posteriormente extraer el polímero HA. De esta manera, se comprobó que el proceso de extracción de ácido hialurónico a partir de crestas de *Gallus gallus domesticus* utilizando el método UAI, presentó un mayor rendimiento que el método tradicional empleando crestas frescas. Los métodos evaluados (MT y UAI), se logró comprobar que los tratamientos UAI mostraron un rendimiento similar que MT. UAI en los tratamientos planteados en este proyecto, redujo significativamente el tiempo de extracción pues la extracción con UAI se realizó en un máximo de 120 min, mientras que en el MT la extracción duró de 4-8 días. Dicho lo anterior, se puede comprobar que la hipótesis menciona que la extracción de ácido hialurónico por el método UAI presenta un rendimiento mayor o igual que MT según los datos obtenidos más la ventaja que antecede es que la extracción se reduce hasta 48 veces en tiempo considerando apenas 4 días de extracción convencional con cualquiera de los 2 solventes empelados.

De los 2 solventes; el ácido acético 0.5 M, resulta ser práctico para extraer HA ya que, aunque el acetato de sodio 5% según la literatura, también es un excelente solvente de extracción, los costos no son muy prácticos pues se observó durante la extracción que el solvente por sí solo, es susceptible a contaminación por crecimiento de mohos y también posterior a la extracción, por tanto, esto podría ser un factor podría degradar al polímero de interés (HA).

Los tratamientos seleccionados, mostraron tener actividad antioxidantes y citotóxicas a una concentración 0.125 mg/mL. Con respecto a la microscopia SEM-FEG, los tratamientos no presentaron diferencias morfológicas entre los métodos MT y UAI.

Se logró establecer una plataforma de entrega de fármacos (microagujas) con buenas propiedades mecánicas y químicas. Las microagujas de las fórmulas optimizadas con los extractos de los tratamientos (MT y UAI) y antihipertensivos.

Se recomienda mejorar el rendimiento (% HA) con CF del método de extracción de UAI en las variables: tiempo de extracción, solvente, frecuencia. A través de la técnica de cuantificación “reacción de carbazol”, evaluar la vida de anaquel y verificar a través de FT-IR, UV-Vis, como pruebas de rutina que los extractos no hayan tenido algún daño durante su almacenamiento.

Del proceso de extracción UAI, una vez culminado el proceso de extracción, se sugiere seguir extrayendo y cuantificar en cada vez la cantidad de HA con la finalidad de evaluar cuantas veces se puede seguir extrayendo del mismo tejido antes de ser desechados.

Determinar el peso molecular del HA extraído y evaluar si su efecto antioxidante o citotóxico se ven afectados en función de éste. Realizar estudios de cromatografía y NMR para identificar a nivel molecular dichos extractos.

Mejorar las formulaciones de parches con los antihipertensivos (particularmente de AMLO ya que físicamente los arreglos de microagujas presentaron una apariencia quebradiza empleando el extracto de HA) y ajustar las concentraciones de antihipertensivos.

Finalmente, los estudios de liberación en un modelo *in vivo* permiten saber el efecto de las microagujas en ratas hipertensas. Los arreglos de microagujas cargados parches transdérmicos antihipertensivos formulados con HA, pueden ser considerados como un sistema novedoso como una alternativa a la vía oral en el tratamiento de los pacientes que padecen enfermedades crónico-degenerativas como la hipertensión o problemas gastrointestinales.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- A., G.-V. E. (2016). *Extracción y caracterización de colágeno ocino tipo I por medio de ultrasonido*. (Maestría). UAEH, Tulancingo Hidalgo. Retrieved from chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/js/pui/bitstream/231104/5036/1/AT20926.pdf>
- Abdallah, M., Fernández, N., Matias, A., & Bronze, M. (2020). Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources: Extraction and purification methods. *Carbohydrate Polymers*, 243, 116441. doi:10.1016/j.carbpol.2020.116441
- Adam, N., & Ghosh, P. (2001). Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial fluid. *Inflammation Research*, 50 (6), 294–299. doi:10.1007/pl00000247
- Ahmed Saeed Al-Japairai, K., Mahmood, S., Hamed Almurisi, S., Reddy Venugopal, J., Rebhi Hilles, A., Azmana, M., & Raman, S. (2020). Current trends in polymer microneedle for transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 587, 119673. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119673>
- Ai, H., Wang, F., Yang, Q., Zhu, F., & Lei, C. (2008). Preparation and biological activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica*. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 419-423.
- Akram, A. N., & Zhang, C. (2020). Extraction of collagen-II with pepsin and ultrasound treatment from chicken sternal cartilage; physicochemical and functional properties. *Ultrason Sonochem*, 64, 105053. doi:10.1016/j.ultsonch.2020.105053
- Al-Japairai, K., Mahmood, S., Almurisi, S., Venugopal, J., Hilles, A., Azmana, M., & Raman, S. (2020). Current Trends in Polymer Microneedle for Transdermal Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 587, 119673. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119673
- Al-Majed, A.-R. A., Assiri, E., Khalil, N. Y., & Abdel-Aziz, H. A. (2015). Chapter Three - Losartan: Comprehensive Profile. In H. G. Brittain (Ed.), *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (Vol. 40, pp. 159-194). New Jersey, USA.: Academic Press.
- Alcântara, L., Sousa, J., Andrade, F., Teixeira, E., Cerqueira, M., Silva, A., . . . Souza, B. (2022). Extraction and characterization of hyaluronic acid from the eyeball of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 226. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.12.016

- Alcântara, L. O., de Sousa, J. R., Andrade, F. K., Teixeira, E. H., Cerqueira, M. Â., da Silva, A. L. C., . . . de Souza, B. W. S. (2023). Extraction and characterization of hyaluronic acid from the eyeball of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 226, 172-183. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.016>
- Alexander, B., Browse, D. J., Reading, S. J., & Benjamin, I. S. (1999). A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC50. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 41(2), 55-58. doi:[https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(98\)00038-0](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(98)00038-0)
- Ali, R., Mehta, P., Arshad, M., Kucuk, I., Chang, M., & Ahmad, Z. (2020). Transdermal microneedles—a materials perspective. *Aaps Pharmscitech*, 21, 1-14.
- Alkilani, A. Z., McCrudden, M. T., & Donnelly, R. F. (2015). Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*, 7(4), 438-470. doi:10.3390/pharmaceutics7040438
- Almazan, E. A., Castañeda, P. S., Torres, R. D., & Escobar-Chavez, J. J. (2020). Design and Evaluation of Losartan Transdermal Patch by Using Solid Microneedles as A Physical Permeation Enhancer. *Iran J Pharm Res*, 19(1), 138-152. doi:10.22037/ijpr.2019.1100912
- Anadere, I., Chmiel, H., & Laschner, W. (1979). Viscoelasticity of “normal” and pathological synovial fluid. *Biorheology*, 16 (3), 179–184. doi:10.3233/bir-1979-16306
- Anguiano-Almazan, E. (2017). *Desarrollo, caracterización fisicoquímica y estudios de penetración in vitro a través de piel humana de losartán potásico formulado en parche transdérmico usando microagujas como promotor físico*. (Licenciatura ). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Cuautitlán, Edo. Mex. Retrieved from <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000758660>
- AOAC. (1990). *Association of Official Analytical Chemists. Direct method. Numbers: 925.10,923.03, 960. 52, 920. 39, 985.29.*
- Araujo-Cerqueira. (2024). *Avaliação da qualidade da cavala (scomberomorus cavalla) revestida com gelatina da pele do atum (thunnus albacares) enriquecida com TBHQ* (Máster). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil. Retrieved from <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/78540> Repositório UFC Brasil database.
- Arenas de Moreno, L., Vidal, Argelis, Huerta-Sánchez, Diana, Navas, Yannellys, Uzcátegui-Bracho, Soján, & Huerta-Leidenz, Nelson. (2000). Análisis comparativo proximal y de minerales entre carnes de iguana, pollo y res. . *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.*, 50 (4), 409-415. Retrieved from

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222000000400015&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222000000400015&lng=es&tlng=es)

- Arias B, J. L., Cerpa G, C., Pérez C, L., Muñoz A, L., Pozo G, V., & González Z, E. (1989). Composición relativa de glicosaminoglicanos en algunas neoplasias del canino. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 4(1). doi:10.5354/acv.v4i1.4522
- Arroyo-Vázquez, J. (2014). *Estudio de la penetración in vitro a través de piel humana de pravastatina sódica formulada en parches transdérmicos de quitosán usando microagujas como promotor físico*. (Licenciatura ). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Cuautitlán. Retrieved from <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000714076>
- Arya, J., Henry, S., Kalluri, H., McAllister, D. V., Pewin, W. P., & Prausnitz, M. R. (2017). Tolerability, usability and acceptability of dissolving microneedle patch administration in human subjects. *Biomaterials*, 128, 1-7.
- Arzeni, C., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 308–316. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.03.009
- Avelelas, F., Horta, A., Pinto, L. F. V., Cotrim Marques, S., Marques Nunes, P., Pedrosa, R., & Leandro, S. M. (2019). Antifungal and Antioxidant Properties of Chitosan Polymers Obtained from Nontraditional *Polybius henslowii* Sources. *Marine Drugs*, 17(4), 239. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/4/239>
- Bainbridge, P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care*, 22(8), 407-408, 410-412. doi:10.12968/jowc.2013.22.8.407
- Balazs. (1979). USA Patent No. 4,141,973. United States Patent: E. A. Balazs.
- Balazs, E. A. (1959). C14 Assays and Autoradiographic Studies on the Rooster Comb. *The Journal of Cell Biology*, 5(2), 319–326. doi:10.1083/jcb.5.2.319
- Balogh, G. T., Illés, J., Székely, Z., Forrai, E., & Gere, A. (2003). Effect of different metal ions on the oxidative damage and antioxidant capacity of hyaluronic acid. *Arch Biochem Biophys*, 410(1), 76-82. doi:10.1016/s0003-9861(02)00661-6
- Bartosova, L., & Bajgar, J. (2012). Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. *Curr Med Chem*, 19(27), 4671-4677. doi:10.2174/092986712803306358
- Bernal-Chávez, S. A., Pérez-Carreto, L. Y., Nava-Arzaluz, M. G., & Ganem-Rondero, A. (2017). Alkylglycerol Derivatives, a New Class of Skin Penetration Modulators. *Molecules*, 22(1), 185. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/1/185>

- Bezerra, F. W., De Oliveira, M. S., & Bezerra, P. N. (2020). *Extraction of bioactive compounds, in: Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*. India: Elsevier
- Bhargava, N., Mor, R. S., Kumar, K., & Sharanagat, V. S. (2021). Advances in application of ultrasound in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105293. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105293>
- Bharkatiya, M. M., Nema, R. K., Bhatnagar, M., & Bharkatiya, M. M. (2010). Designing and characterization of drug free patches for transdermal application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2, 35-39. doi:<https://doi.org/10.25004/IJPSDR.2010.020106>
- Bitter, T., & Muir, H. M. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, 4(4), 330–334. doi:10.1016/0003-2697(62)90095-7
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200. doi:10.1038/1811199a0
- Boas, N. F. (1949). Isolation of hyaluronic acid from the cock's comb. *J Biol Chem*, 181(2), 573-575.
- Boeriu, C. G., Springer, J., Kooy, F. K., van den Broek, L. A. M., & Eggink, G. (2013). Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013, 1-14. doi:10.1155/2013/624967
- Bravo, H., Parker, R., Tellez Monzón, L., Cesare Coral, M., Becker, R., & Visitación, L. (2013). Influencia del uso de acompletejantes en el baño de curtido sobre la calidad final del cuero. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79, 388-397.
- Bukhari, S., Roswandi, N., & Waqas, M. (2018). Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1-19. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188
- Callejas-Quijada, G., Escobar-Chavez, J. J., Campos-Lozada, G., Pérez-Marroquín, X. A., & Aguirre-Álvarez, G. (2023). Hyaluronic Acid-Extraction Methods, Sources and Applications. *Polymers (Basel)*, 15(16). doi:10.3390/polym15163473
- Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., D'Ascola, A., Ferlazzo, A. M., & Calatroni, A. (2004). The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride-induced liver fibrogenesis. *Chem Biol Interact*, 148(3), 125-138. doi:10.1016/j.cbi.2004.05.004

- Casas, M., Conde, E., & Domínguez, H. (2018). Ecofriendly extraction of bioactive fractions from *Sargassum muticum*. *Process Biochemistry*, 79, 166–173. doi:10.1016/j.procbio.2018.12.021
- Castillo-Carmona. (2022). *Desarrollo y caracterización de un arreglo de microagujas de metacrilato cargado con ceftriaxona como novedosa propuesta para tratamiento de quemaduras*. (Licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-Universidad Nacional Autónoma de México, San Sebastián Xhala, Cuautitlán. Retrieved from <https://web.siiia.unam.mx> SIIA UNAM database.
- Centenaro, G., Mellado, M., & Prentice, C. (2011). Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates of Fish and Chicken Bones. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3.
- Cervantes-López. (2007). Procesamiento avícola: "Las menencias: el 15% de un pollo". Retrieved from <https://www.wattagnet.com/articles/3123-las-menencias-el-15-de-un-pollo>
- Cesaretti, M., Luppi, E., Maccari, F., & Volpi, N. (2003). A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydrate Polymers*, 54(1), 59-61. doi:[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00144-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00144-9)
- Chaidedgumjorn, A., Suzuki, A., & Toyoda, H. (2002). Conductivity detection for molecular mass estimation of per-O-sulfonated glycosaminoglycans separated by high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 959 (1-2), 95–102. doi:10.1016/s0021-9673(02)00446-6
- Chaiwong, N., Leelapornpisid, P., Jantanasakulwong, K., Rachtanapun, P., Seesuriyachan, P., Sakdatom, V., . . . Phimolsiripol, Y. (2020). Antioxidant and Moisturizing Properties of Carboxymethyl Chitosan with Different Molecular Weights. *Polymers*, 12(7), 1445. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/7/1445>
- Chaiyana, W., Leelapornpisid, P., Phongpradist, R., & Kiattisin, K. (2016). Enhancement of antioxidant and skin moisturizing effects of olive oil by incorporation into microemulsions. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 6, 1847980416669488.
- Chemat, F., Rombaut, N., & Sicaire, A. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. . *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.06.03
- Chen, S., Chen, H., & Gao, R. (2015). Degradation of hyaluronic acid derived from tilapia eyeballs by a combinatorial method of microwave, hydrogen peroxide, and ascorbic acid. *Polymer Degradation and Stability*, 112, 117–121. doi:10.1016/j.polymdegradstab.201

- Chen, Z., Bertin, R., & Froidi, G. (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138, 414-420. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.001
- Corte-Sánchez, Yáñez-Ocampo, & Esquivel-Chirino. (2017). Use of hyaluronic acid as an alternative for reconstruction of interdental papilla. *Revista Odontológica Mexicana*, 21 (3), 199-207.
- Cortivo, R., Brun, P., Rastrelli, A., & Abatangelo, G. (1991). In vitro studies on biocompatibility of hyaluronic acid esters. *Biomaterials*, 12(8), 727-730. doi:[https://doi.org/10.1016/0142-9612\(91\)90020-B](https://doi.org/10.1016/0142-9612(91)90020-B)
- Costa-Soares, G. (2017). *Hyaluronic acid and collagen extraction from chicken combs* (Master of Science ). Universidade Católica Portuguesa, Lisboa, Portugal. Retrieved from <https://ciencia.ucp.pt/en/publications/hyaluronic-acid-and-collagen-extraction-from-chicken-combs> Available from Centre for Biotechnology and Fine Chemistry (CBQF) Universidade Católica Portuguesa database.
- Courage-khazaka. (2025). Mexameter® MX 18 Retrieved from <https://www.courage-khazaka.com/en/scientific-products/occupational-health/occupational-health/169-mexameter-e>
- da Rocha, C. B., & Noreña, C. P. Z. (2020). Microwave-Assisted Extraction and Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Grape Pomace. 16(1-2). doi:10.1515/ijfe-2019-0191
- Da Rosa, C. S., Rotta, J., & Barreto, M. (2007). Extraction, quantification and molar mass determination of hyaluronic acid extracted from chicken crest. *Alim. Nutr., Araraquara*, v.18, n.3,, 237-240.
- Da Rosa, C. S., Tovar, A., & Mourão, P. (2012). Purification and characterization of hyaluronic acid from chicken combs. *Ciência Rural*, 42(9), 1682–1687. doi:10.1590/S0103-84782012005000056
- Dardano, P., Battisti, M., Rea, I., Serpico, L., Terracciano, M., Cammarano, A., . . . De Stefano, L. (2019). Polymeric microneedle arrays: versatile tools for an innovative approach to drug administration. *Advanced Therapeutics*, 2(8), 1900036.
- Darma, N., Rasyid, R., & Rivai, H. (2021). Overview of the Determination of Captopril Levels in Pharmaceutical Preparations and Biological Matrices. *International Journal of Medical Sciences*, 6, 1-11. doi:10.47760/ijpsm.2021.v06i04.001
- de Souza, F. F., Castro-Silva, I., Mattos, A., Lopes, M., Barroso, W., Souza, B., . . . Silva, A. (2024). Emulgel based on fish skin collagen-microalgae-silver increased neovascularization and re-epithelialization of full thickness burn in

- rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 112. doi:10.1002/jbm.b.35399
- de Toro, M. B. (2008). *Farmacología para Fisioterapeutas*. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Decker, E. A., & Welch, B. J. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 674-677.
- Delgado, M., Herrera-Guillén, D., Medina Barragan, L., & Corredor-Gómez, J. (2017). Implementación de un sistema de procesamiento de imágenes integrado con Raspberry PI 2B para reconocimiento y recolección de fresas maduras. *Revista Politécnica*, 13, 75-85. doi:10.33571/rpolitec.v13n25a6
- Dhongade, H., & Chandewar, A. (2013). An in-vitro investigation of the antioxidant activity of *Phyllanthus amarus*. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 4, 435. doi:10.7439/ijbar.v4i6.418
- Donnelly, R., & Singh, T. (2015). *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*.
- Dřimalová, E., Velebný, V., Sasinková, V., Hromádková, Z., & Ebringerová, A. (2005). Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating. *Carbohydrate Polymers*, 61(4), 420-426. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.05.035>
- Duan, X.-J., Zhang, W.-W., Li, X.-M., & Wang, B.-G. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95(1), 37-43. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.015>
- Elmahjoubi, E., Frum, Y., Eccleston, G. M., Wilkinson, S. C., & Meidan, V. M. (2009). Transepidermal water loss for probing full-thickness skin barrier function: correlation with tritiated water flux, sensitivity to punctures and diverse surfactant exposures. *Toxicology in vitro*, 23(7), 1429-1435.
- Eucerin. (2025). Comprender la piel – PH de la piel. Retrieved from <https://www.eucerin.es/acerca-de-la-piel/conocimientos-basicos-sobre-la-piel/ph-de-la-piel>
- Eurell, J. A., & Frappier, B. L. (2013). *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. USA: John Wiley & Sons.
- Falcone, S. J., Palmeri, D. M., & Berg, R. A. (2006). Rheological and cohesive properties of hyaluronic acid. *J. Biomed. Mater. Res.*, 76, 721-728. doi:10.1002/jbm.a.30623

- Fallacara, A., Baldini, E., & Manfredini, S. (2018). Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers (Basel)*, 10 (7). doi:10.3390/polym10070701
- Fernandes, F. A. N., Fonteles, T. V., Rodrigues, S., de Brito, E. S., & Tiwari, B. K. (2020). Ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and phenolics from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) peel: kinetics and mathematical modeling. *J Food Sci Technol*, 57(6), 2321-2328. doi:10.1007/s13197-020-04270-3
- FIRA. (2021). Carne de pollo. *Panorama Agroalimentario-FIRA*, 1-21. Retrieved from <https://www.fira.gob.mx/InvYEvalEcon/EvaluacionIF>
- Fraser, J. R., Laurent, T. C., & Laurent, U. B. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* , 242 (1), 27-33. doi:10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x.
- Fullerton, A., Fischer, T., Lahti, A., Wilhelm, K. P., Takiwaki, H., & Serup, J. (1996). Guidelines for measurement skin colour and erythema A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact dermatitis*, 35(1), 1-10.
- Gallo, M., Ferrara, L., & Naviglio, D. (2018). Application of Ultrasound in Food Science and Technology: A Perspective. *Foods*, 7(10). doi:10.3390/foods7100164
- Ganem-Quintanar, A., Lafforgue, C., Falson-Rieg, F., & Buri, P. (1997). Evaluation of the transepidermal permeation of diethylene glycol monoethyl ether and skin water loss. *International Journal of Pharmaceutics*, 147(2), 165-171. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04809-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04809-0)
- Gázquez Ortiz, A. (2004). *Tratado de histología veterinaria / Antonio Gázquez Ortiz ... [et al.]*. Barcelona: Masson.
- Gherezghiher, T., Koss, M. C., Nordquist, R. E., & Wilkinson, C. P. (1987). Analysis of vitreous and aqueous levels of hyaluronic acid: application of high-performance liquid chromatography. *Experimental eye research*, 45(2), 347-349.
- Gibson, M. (2016). *Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form* (Vol. 199). USA: CRC Press.
- Gilli, R., Kacuráková, M., Mathlouthi, M., Navarini, L., & Paoletti, S. (1994). FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution. *Carbohydr Res*, 263(2), 315-326. doi:10.1016/0008-6215(94)00147-2

- Graça, M. F. P., Miguel, S. P., Cabral, C. S. D., & Correia, I. J. (2020). Hyaluronic acid—Based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 241, 116364. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116364>
- Graciela, C. Q., José Juan, E. C., Gieraldin, C. L., Xóchitl Alejandra, P. M., & Gabriel, A. (2023). Hyaluronic Acid-Extraction Methods, Sources and Applications. *Polymers (Basel)*, 15(16). doi:10.3390/polym15163473
- Guadarrama-Escobar, O. R., Valdés-Alvarez, C. A., Constantino-Gonzalez, K. S., Serrano-Castañeda, P., Peña-Juárez, M. C., Morales-Florido, M. I., . . . Escobar-Chavez, J. J. (2024). Design and Characterization of Ocular Inserts Loaded with Dexamethasone for the Treatment of Inflammatory Ophthalmic Disease. *Pharmaceutics*, 16(2), 294. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1999-4923/16/2/294>
- Gullian-Klanian, & Terrats-Preciat. (2017). Optimization of the Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Brosimum alicastrum Leaves and the Evaluation of Their Radical-Scavenging Activity. *Molecules*, 22 (8) doi:10.3390/molecules22081286
- Guo, X., Huang, S., Sun, J., & Wang, F. (2015). Comparison of the cytotoxicities and wound healing effects of hyaluronan, carbomer, and alginate on skin cells in vitro. *Adv Skin Wound Care*, 28(9), 410-414. doi:10.1097/01.Asw.0000467303.39079.59
- Hafsa, J., Chaouch, M. A., Charfeddine, B., Rihouey, C., Limem, K., Le Cerf, D., . . . Majdoub, H. (2017). Effect of ultrasonic degradation of hyaluronic acid extracted from rooster comb on antioxidant and antiglycation activities. *Pharm Biol*, 55(1), 156-163. doi:10.1080/13880209.2016.1232740
- He, L., Gao, Y., Wang, X., Han, L., Yu, Q., Shi, H., & Song, R. (2021). Ultrasonication promotes extraction of antioxidant peptides from oxhide gelatin by modifying collagen molecule structure. *Ultrasonics Sonochemistry*, 78, 105738. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105738>
- Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrières, J., Versali, M. F., & Rinaudo, M. (2000). Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*, 1(4), 746-751. doi:10.1021/bm000070y
- Hu, F., Lu, R., Huang, B., & Liang, M. (2004). Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. *Fitoterapia*, 75(1), 14-23. doi:10.1016/j.fitote.2003.07.003
- Ignatova, E. Y., & Gurov, A. N. (1990). Principles of extraction and purification of hyaluronic acid (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 24 (3), 211–216. doi:10.1007/bf00771704

- Imenshahidi, M., Roohbakhsh, A., & Hosseinzadeh, H. (2024). Effects of telmisartan on metabolic syndrome components: a comprehensive review. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *171*, 116169. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116169>
- Imhof, R., De Jesus, M., Xiao, P., Ciortea, L., & Berg, E. (2016). New developments in skin barrier measurements. In C. Press (Ed.), *Skin moisturization* (pp. 485-502). New York: CRC Press.
- Instrumentation, A. f. t. A. o. M. (2007). *Biological Evaluation of Medical Devices, Part 12: Sample Preparation and Reference Materials*. Retrieved from
- Kaewbangkerd, K., Hamzeh, A., & Yongsawatdigul, J. (2023). Ultrasound-assisted extraction of collagen from broiler chicken trachea and its biochemical characterization. *Ultrasonics Sonochemistry*, *95*, 106372. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106372>
- Takehi, K., Kinoshita, M., & Yasueda, S. (2013). Hyaluronic acid: separation and biological implications. *Journal of Chromatography B*, *797(1-2)*, 347–355. doi:10.1016/s1570-0232(03)00479-3
- Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry*, *107(2)*, 845-852. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.088>
- Kanchana, S., Arumugam, M., Giji, S., & Balasubramanian, T. (2013). Isolation, characterization and antioxidant activity of hyaluronic acid from marine bivalve mollusc *Amusium pleuronectus* (Linnaeus, 1758). *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *2(1)*, 1-7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.06.001>
- Kang, D. Y., Kim, W. S., Heo, I. S., Park, Y. H., & Lee, S. (2010). Extraction of hyaluronic acid (HA) from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation (FIFFF) coupled with multiangle light scattering (MALS). *J Sep Sci*, *33(22)*, 3530-3536. doi:10.1002/jssc.201000478
- Kato, K., Ninomiya, M., Tanaka, K., & Koketsu, M. (2016). Effects of Functional Groups and Sugar Composition of Quercetin Derivatives on Their Radical Scavenging Properties. *Journal of Natural Products*, *79*. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00274
- Kaynak, M., Bogacz, A., Ski, M., & Sahin, S. (2011). Bioavailability File: Amlodipine. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, *36*, 207-222.
- Ke, C., Qiao, D., Gan, D., Sun, Y., Ye, H., & Zeng, X. (2009). Antioxidant activity in vitro and in vivo of the capsule polysaccharides from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Carbohydrate Polymers*, *75(4)*, 677-682. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.09.008>

- Ke, C., Sun, L., Qiao, D., Wang, D., & Zeng, X. (2011). Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid. *Food Chem Toxicol*, *49*(10), 2670-2675. doi:10.1016/j.fct.2011.07.020
- Khanmohammadi, M., Khoshfetrat, A. B., Eskandarneshad, S., Sani, N. F., & Ebrahimi, S. (2014). Sequential optimization strategy for hyaluronic acid extraction from eggshell and its partial characterization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *20*(6), 4371-4376. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.02.001>
- Khatua, S., Roy, T., & Acharya, K. (2013). Antioxidant and free radical scavenging capacity of phenolic extract from *Russula laurocerasi*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *6*, 156 – 160.
- Khong, N. M. H., Yusoff, F. M., Jamilah, B., Basri, M., Maznah, I., Chan, K. W., . . . Nishikawa, J. (2018). Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes. *Food Chem*, *251*, 41-50. doi:10.1016/j.foodchem.2017.12.083
- Kilara, A., & Shahani, K. M. (1977). Preparation and properties of immobilized papain and lipase. *Biotechnol Bioeng*, *19*(11), 1703-1714. doi:10.1002/bit.260191109
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem*, *50*(13), 3713-3717. doi:10.1021/jf020071c
- Kim, J., Chang, J., & Kim, Y. (2018). Effects of molecular weight of hyaluronic acid on its viscosity and enzymatic activities of lysozyme and peroxidase. *Archives of Oral Biology*, *89*, 55–64. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.02
- Kodama, C., Kodama, T., & Yosizawa, Z. (1988). Methods for analysis of urinary glycosaminoglycans. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, *429*, 293–313. doi:10.1016/s0378-4347(00)83875-x
- Kubo, K., Nakamura, T., & Takagaki, K. (1993). Depolymerization of hyaluronan by sonication. *Glycoconjugate Journal*, *10* (6), 435–439. doi:10.1007/bf00737963
- Kuehl, R. O., & Osuna, M. A. G. (2001). *Diseño de experimentos: principios estadísticos de diseño y análisis de investigación* (L. America Ed.). Australia: Thomson Learning.
- Kulkarni, S., Patil, D., & Chavan, G. (2018). Extraction, purification and characterization of hyaluronic acid from Rooster. *Journal of Applied and Natural Science* *10* (1), 313-315. doi:<https://doi.org/10.31018/jans.v10i1.1623>
- Lanfranco, C., & Davide, R. (2000). United States Patent No. 6,232,303.

- Lapcik, L., Dammer, C., & Valko, M. (1992). Hyaluronic acid-copper(II) complexes: Spectroscopic characterization. *Colloid and Polymer Science*, 270. doi:10.1007/BF00655976
- Lapčák, L., & Lapčák, L. (1998). Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews*, 98 (8), 2663–2684. doi:10.1021/cr941199z
- León-López, A., Fuentes-Jiménez, L., Hernández-Fuentes, A. D., Campos-Montiel, R. G., & Aguirre-Álvarez, G. (2019). Hydrolysed Collagen from Sheepskins as a Source of Functional Peptides with Antioxidant Activity. *Int J Mol Sci*, 20(16). doi:10.3390/ijms20163931
- Lev, R., & Spicer, S. S. (1964). Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem*, 12, 309. doi:10.1177/12.4.309
- Li, D., Mu, C., Cai, S., & Lin, W. (2009). Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(5), 605-609. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.02.004>
- Li, Q. Y., Zhang, J. N., Chen, B. Z., Wang, Q. L., & Guo, X. D. (2017). A solid polymer microneedle patch pretreatment enhances the permeation of drug molecules into the skin. *Rsc Advances*, 7(25), 15408-15415.
- Li, S., Xiong, Q., Lai, X., Li, X., Wan, M., Zhang, J., . . . Lin, Y. (2016). Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 15(2), 237-250. doi:10.1111/1541-4337.12161
- Liu, L., Liu, Y., & Li, J. (2011). Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 10:99, 1-9.
- López-García, J., Lehocký, M., Humpolčėk, P., & Sába, P. (2014). HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *Journal of Functional Biomaterials*, 5(2), 43-57. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2079-4983/5/2/43>
- Machado, M., Salgado, T. M., Hadgraft, J., & Lane, M. E. (2010). The relationship between transepidermal water loss and skin permeability. *International Journal of Pharmaceutics*, 384(1-2), 73-77.
- Mahato, R. (2017). Microneedles in drug delivery. In *Emerging nanotechnologies for diagnostics, drug delivery and medical devices* (pp. 331-353): Elsevier.
- Márquez, E., Arévalo, E., Barboza, Y., Benitez, B., Rangel, L., & Archile, A. (2006). Formulación de un Embutido con Agregado de Piel de Pollo Emulsificada con Sangre de Bovino. *Revista Científica*, 16, 315-324. Retrieved from [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592006000400014](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592006000400014)

- Mason, T. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), S253–S260. doi:10.1016/s1350-4177(96)00034-x
- Mast, B. A., Diegelmann, R. F., Krummel, T. M., & Cohen, I. K. (1993). Hyaluronic Acid Modulates Proliferation, Collagen and Protein Synthesis of Cultured Fetal Fibroblasts. *Matrix*, 13(6), 441-446. doi:[https://doi.org/10.1016/S0934-8832\(11\)80110-1](https://doi.org/10.1016/S0934-8832(11)80110-1)
- Mathias-Rettig, K., & Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur*, 42, 57-66. doi:10.4206/agrosur.2014.v42n2-07
- Matsumura, F., De Salegui, M., Herp, A., & Pigman, W. (1963). The preparation of hyaluronic acid from bovine synovial fluid. *Biochim Biophys Acta*, 69, 574-576. doi:10.1016/0006-3002(63)91314-3
- Mohd Ariffin, N. H., & Hasham, R. (2020). Assessment of non-invasive techniques and herbal-based products on dermatological physiology and intercellular lipid properties. *Heliyon*, 6(5), e03955. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03955
- Morton, L. M., & Phillips, T. J. (2016). Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(4), 589-605. doi:10.1016/j.jaad.2015.08.068
- Muzzarelli, R., & Muzzarelli, C. (2005). Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences. *Polysaccharides I: structure, characterization and use*, 151-209. doi:10.1007/b136820
- Nakano, T., Imai, S., & Koga, T. (1996). Light microscopic histochemical and immunohistochemical localisation of sulphated glycosaminoglycans in the rooster comb and wattle tissues. *J Anat.* , 189, 643-650.
- Nakano, T., Nakano, K., & Sim, J. S. (1994). A Simple Rapid Method To Estimate Hyaluronic Acid Concentrations in Rooster Comb and Wattle Using Cellulose Acetate Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(12), 2766-2768. doi:10.1021/jf00048a022
- Nakano, T., & Sim, J. S. (1989). Research Note: Glycosaminoglycans from the Rooster Comb and Wattle *Poultry Science*, 68 (9), 1303-1306. doi:10.3382/ps.0681303
- Nakano, T., & Sim, J. S. (1994). Rooster Comb and Wattle Tissues Contain an Anti-Keratan Sulfate Monoclonal Antibody Epitope. *Poultry Science*, 73(2), 302–307. doi:10.3382/ps.0730302
- Nangia, A., Patil, S., Berner, B., Boman, A., & Maibach, H. (1998). In vitro measurement of transepidermal water loss: a rapid alternative to tritiated water

- permeation for assessing skin barrier functions. *International Journal of Pharmaceutics*, 170(1), 33-40.
- Nayak, A., Babla, H., Han, T., & Das, D. B. (2016). Lidocaine carboxymethylcellulose with gelatine co-polymer hydrogel delivery by combined microneedle and ultrasound. *Drug delivery*, 23(2), 658-669.
- Negri, M., Possamai, J., & Nakashima, T. (2009). Antioxidant activity of "espíneira-santa" - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., leaves dried in different temperatures. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 553-556. doi:10.1590/S0102-695X2009000400007
- Neuza, J., & Moreno, D. M. (2010). *Eugenia dysenterica* dc: actividad antioxidante, perfil de ácidos grasos y determinación de tocoferoles. *Revista chilena de nutrición*, 37, 208-214. doi:10.4067/S0717-75182010000200010
- NOM-F-317-S-1978. (1978). NORMA OFICIAL MEXICANA "Determinación de pH en Alimentos" NOM-F-317-S-1978. Retrieved from [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4704689&fecha=23/05/1978](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4704689&fecha=23/05/1978)
- O'Regan, M., Martini, I., & Crescenzi, F. (1994). Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16 (6), 283–286. doi:10.1016/0141-8130(94)90056-6
- Ojha, K. S., Aznar, R., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2020). Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 122, 115663. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115663>
- Ortiz, A. G., Pérula, E. A., & Rodríguez, A. B. (2004). *Tratado de Histología Veterinaria: Masson*, S.A. España.
- Pamornpathomkul, B., Wongkajornsilp, A., Laiwattanapaisal, W., Rojanarata, T., Opanasopit, P., & Ngawhirunpat, T. (2017). A combined approach of hollow microneedles and nanocarriers for skin immunization with plasmid DNA encoding ovalbumin. *International Journal of Nanomedicine*, 885-898.
- Papakonstantinou, E., Roth, M., & Karakiulakis, G. (2012). Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol*, 4(3), 253-258. doi:10.4161/derm.21923
- Park, K.-L., Ma, W., Higaki, Y., & Takahara, A. (2016). Design and characterization of hybrid hydrogels composed of imogolite fibrous nanotubular clay and hyaluronic acid. *Polymer*, 100, 238-243. doi:<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.08.018>

- Pavicic, T., Gauglitz, G., & Lersch, P. (2011). Efficacy of cream-based novel formulations of hyaluronic acid of different molecular weights in anti-wrinkle treatment. *Journal of Drugs in Dermatology: JDD*, 10 (9), 990-1000.
- Peluffo, H. (1955). *La reacción del Carbazol en la valoración de los ácidos hexurónicos*. (Doctorado). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Pérez-Gumeta, Meza-Gordillo, & Ventura-Canseco. (2018). Extracción de ácido hialurónico de *Oreochromis niloticus*. *Revista de Agroproductividad*, Vol. 11, Núm. 6, 128-134. Retrieved from <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/443>
- Pineda, R., Bernad-Bernad, J., Rodríguez Cruz, I., & Escobar-Chávez, J. (2020). Development and Characterization of Starch/Gelatin Microneedle Arrays Loaded with Lecithin-Gelatin Nanoparticles of Losartan for Transdermal Delivery. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. doi:10.1007/s12247-020-09494-6
- Piñón-Segundo, E., Nava-Arzaluz, M. G., & Ganem-Rondero, A. (2017). *Effect of the Use of Chemical Enhancers Combined with Sonophoresis, Electroporation, or Microneedles on Transdermal Drug Delivery*.
- Pouyani, T., Harbison, G. S., & Prestwich, G. D. (1994). Novel Hydrogels of Hyaluronic Acid: Synthesis, Surface Morphology, and Solid-State NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 116(17), 7515-7522. doi:10.1021/ja00096a007
- Prophet, E., Mills, B., Arrington, J., & Sobin, L. (1995). *Métodos Histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América*. EUA.
- Pulido-Córdoba, L. G. (2009). *Extracción y caracterización de ácido hialurónico, sulfato condroitín y sulfato dermatán presentes en tejidos de pollo de engorda mexicano (cresta, piel y cartilago del esternón)*. (Maestría en Ciencias Alimentarias). Universidad Veracruzana, Veracruz.
- Quinn, H. L., Kearney, M.-C., Courtenay, A. J., McCrudden, M. T., & Donnelly, R. F. (2014). The role of microneedles for drug and vaccine delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 11(11), 1769-1780.
- Quintana-López. (2011). AVITECNIA. Manejo de las aves domésticas más comunes In *Capítulo XV* (4ta ed., pp. 405). México: Trillas.
- Ramalingam, K., & Ravindranath, M. H. (1970). Histochemical significance of green metachromasia to Toluidine blue. *Histochemistry and cell biology*, 24(4), 322–327.

- Rodríguez-Saldaña. (2011). La carne de pollo (Procesamiento). In Trillas (Ed.), *AVITECNIA. Manejo de las Aves Domésticas más comunes* (Vol. Capítulo XV de la 4ª Edición del libro ). México: Trillas.
- Romruen, O., Karbowiak, T., Auras, R., & Rawdkuen, S. (2024). Smart bilayer film: Quality monitoring for freshness of fish and minced pork delights. *Food Packaging and Shelf Life*, 44, 101299. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2024.101299>
- Rosa, C., Hoelzel, S., Viera, V., Luiz Manique Barreto, P., & Beirão, L. (2008). Atividade antioxidante do ácido hialurônico extraído da crista de frango. *Ciencia rural, ISSN 0103-8478, Vol. 38, Nº. 9, 2008, pags. 2593-2598, 38*. doi:10.1590/S0103-84782008005000031
- Rwei, S.-P., Chen, S.-W., & Mao, C.-F. (2008). Viscoelasticity and wearability of hyaluronate solutions. *Biochemical Engineering Journal*, 40(2), 211–217. doi:10.1016/j.bej.2007.12.021
- Sadhasivam, G., Muthuvel, A., Pachaiyappan, A., & Thangavel, B. (2013). Isolation and characterization of hyaluronic acid from the liver of marine stingray *Aetobatus narinari*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 84-89. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.028>
- Sae-Leaw, T., O'Callaghan, Y. C., Benjakul, S., & O'Brien, N. M. (2016). Antioxidant activities and selected characteristics of gelatin hydrolysates from seabass (*Lates calcarifer*) skin as affected by production processes. *J Food Sci Technol*, 53(1), 197-208. doi:10.1007/s13197-015-1989-7
- Salem, A., Abdelhedi, O., Sebi, H., Ben Taheur, F., Fakhfakh, N., Debeaufort, F., . . . Zouari, N. (2024). Enhancing the Quality of Refrigerated Smooth-Hound Shark Fillet with a Fish Gelatin Coating Enriched with Garden Cress Extract. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 33, 1-16. doi:10.1080/10498850.2024.2320264
- Schwarze, E., & Schröder, L. (1985). *Compendio de Anatomia Veterinaria*. España: Acribia.
- Seidi, F., Yazdi, M. K., Jouyandeh, M., Habibzadeh, S., Munir, M. T., Vahabi, H., . . . Saeb, M. R. (2022). Crystalline polysaccharides: A review. *Carbohydr Polym*, 275, 118624. doi:10.1016/j.carbpol.2021.118624
- Selyanin, M., Boykov, P., Khabarov, V., & Polyak, F. (2015). Methods of Hyaluronic Acid Production. In I. John Wiley & Sons (Ed.), *Hyaluronic Acid* (pp. 77-95). Moscow, Russia: WILEY.
- Serrano-Castañeda. (2019). *Desarrollo de una nueva forma farmacéutica a base de microagujas poliméricas biodegradables acopladas a un parche transdérmico para la liberación de fármacos*. (Doctorado en Ciencias Biológicas y de la

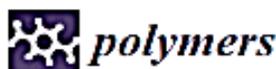
- Salud). Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco, Xochimilco, México. Retrieved from <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/2817>
- Serrano-Castañeda, Ochoa-Loyo, M. A., Tinoco Hernández, C. E., Anaya-Ortega, B. M., Guadarrama-Escobar, O. R., Anguiano-Almazán, E., . . . Escobar-Chávez, J. J. (2023). Ceftriaxone-Loaded Polymeric Microneedles, Dressings, and Microfibers for Wound Treatment. *Polymers*, 15(12), 2610. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4360/15/12/2610>
- SIAP. (2020). Inventario 2020 ave para carne *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera* Inventario 2020 ave para carne Retrieved from [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/655386/Inventario\\_2020\\_ave\\_para\\_carne.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/655386/Inventario_2020_ave_para_carne.pdf)
- Singla, M., & Sit, N. (2021). Application of ultrasound in combination with other technologies in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73 2-13. doi:10.1016/j.ultsonch.2021.10550
- Snetkov, P., Zakharova, K., & Morozkina, S. (2020). Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers*, 12 (8). doi:10.3390/polym12081800
- Sousa, K. C. (2017). *Atividades antioxidante, antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica de extratos da macroalga marinha parda Lobophora variegata (J. V. Lamouroux)*. (Máster). Universidade Federal do Ceará (UFC) Fortaleza. Retrieved from <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/24627> <https://repositorio.ufc.br/> database. (1-98)
- Srisantisaeng, P., Garnjanagoonchorn, W., & Thanachasai, S. (2013). Proteolytic activity from chicken intestine and pancreas: extraction, partial characterization and application for hyaluronic acid separation from chicken comb. *J Sci Food Agric*, 93(13), 3390-3394. doi:10.1002/jsfa.6217
- Standard, I. (2009). *Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity* (3 ed.). Canadá: CSA International.
- Stern, R., Asari, A., & Sugahara, K. (2006). Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, 85 (8), 699–715. doi:10.1016/j.ejcb.2006.05.009
- Sutrisno, E., Ningrum, A., Supriyadi, S., Munawaroh, H. S. H., Aisyah, S., & Susanto, E. (2020). Characterization of tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin edible film incorporated with clove and ginger essential oils and different surfactants. *Food Research*, 5, 440-450. doi:10.26656/fr.2017.5(2).285
- Tabtabaei, S., & Diosady, L. L. (2013). Aqueous and enzymatic extraction processes for the production of food-grade proteins and industrial oil from dehulled yellow

- mustard flour. *Food Research International*, 52(2), 547-556.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.005>
- ThermoScientific. (2010). Purified protein analysis (A280). In *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual*. Thermo Scientific Nanodrop 1000 Spectrophotometer (RRID:SCR\_016517) (pp. 1-19). USA: Thermo Scintific.
- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100–109. doi:10.1016/j.trac.2015.04.013
- Tuan-Mahmood, T.-M., McCrudden, M. T., Torrisi, B. M., McAlister, E., Garland, M. J., Singh, T. R. R., & Donnelly, R. F. (2013). Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(5), 623-637.
- Úrgeová, E., & Vulganová, K. (2016). Comparison of Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides from Eggshells Membranes. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 15. doi:10.1515/nbec-2016-0014
- Vale, J. P. C. d., Ribeiro, L. H. d. F., Vasconcelos, M. A. d., Sá-Firmino, N. C., Pereira, A. L., Nascimento, M. F. d., . . . Teixeira, E. H. (2019). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activities of *Vitex gardneriana* schauer leaves's essential oil. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103608. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103608>
- Vercruyse, K. P., Lauwers, A. R., & Demeester, J. M. (1995). Absolute and empirical determination of the enzymatic activity and kinetic investigation of the action of hyaluronidase on hyaluronan using viscosimetry. *Biochemical Journal*, 306 (1), 153–160. doi:10.1042/bj3060153
- Vilariño-Feltre. (2015). *Conductos de ácido hialurónico para el crecimiento axonal guiado*. (Doctorado). Universitat Politècnica de València, España. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=117280> Available from Dialnet
- Volpi, N. (2000). Hyaluronic Acid and Chondroitin Sulfate Unsaturated Disaccharides Analysis by High-Performance Liquid Chromatography and Fluorimetric Detection with Dansylhydrazine. *Analytical Biochemistry*, 277 (1), 19–24. doi:10.1006/abio.1999.4366
- Volpi, N., & Maccari, F. (2003). Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Biochimie*, 85 (6), 619–625. doi:10.1016/s0300-9084(03)00083-x
- Waghule, T., Singhvi, G., Dubey, S. K., Pandey, M. M., Gupta, G., Singh, M., & Dua, K. (2019). Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 109, 1249-1258.

- Wang, T., Jónsdóttir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116, 240-248. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.041
- Wegrowski, Y., Bellon, G., & Quéreux, C. (1999). Biochemical alterations of uterine leiomyoma extracellular matrix in type IV Ehlers-Danlos syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 180(4), 1032–1034. doi:10.1016/s0002-9378(99)70679-4
- Wiig, M., Abrahamsson, S.-O., & Lundborg, G. (1996). Effects of hyaluronan on cell proliferation and collagen synthesis: a study of rabbit flexor tendons in vitro. *The Journal of hand surgery*, 21(4), 599-604.
- Wu, P.-C., Tsai, P.-J., Lin, S.-C., & Huang, Y.-B. (2014). Formulation Optimization of Arecoline Patches. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 945168. doi:10.1155/2014/945168
- Wu, Y. (2012a). Preparation of low-molecular-weight hyaluronic acid by ozone treatment. *Carbohydr Polym*, 89(2), 709-712. doi:10.1016/j.carbpol.2012.03.081
- Wu, Y. (2012b). Preparation of low-molecular-weight hyaluronic acid by ozone treatment. *Carbohydr Polym.* , 89 (2), 709-712. doi:10.1016/j.carbpol.2012.03.081.
- Xu, Torres, & Hakim. (2021). Collagen and hyaluronic acid-based hydrogels and their biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 146, 1-35. doi:10.1016/j.mser.2021.100641
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., & Terao, J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(6), 1201-1204.
- Ye, Y., Yu, J., Wen, D., Kahkoska, A. R., & Gu, Z. (2018). Polymeric microneedles for transdermal protein delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 127, 106-118.
- Younes, I., Hajji, S., Frachet, V., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. (2014). Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 489-498.
- Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., & Jellouli, K. (2014). Influence of acetylation degree and molecular weight of homogenous chitosan on antibacterial and antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, 185. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.029

- Żelechowska, E., Sadowska, M., & Turk, M. (2010). Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Hydrocolloids*, 24(4), 325-329. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.010>
- Zhao, D., Huang, J., Hu, S., Mao, J., & Mei, L. (2011). Biochemical activities of N, O-carboxymethyl chitosan from squid cartilage. *Carbohydrate Polymers*, 85(4), 832-837.
- Zhou, C., Wang, Y., Ma, H., & He, R. (2008). Effect of Ultrasonic Degradation on In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Food Science and Technology International - FOOD SCI TECHNOL INT*, 14, 479-486. doi:10.1177/1082013208100665
- Zou, Y., Shahidi, F., Shi, H., Wang, J., Huang, Y., Xu, W., & Wang, D. (2021). Values-added utilization of protein and hydrolysates from animal processing by-product livers: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 432-442. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.033>
- Zou, Y., Yang, H., Zhang, X., Xu, P., Jiang, D., Zhang, M., . . . Wang, D. (2020). Effect of ultrasound power on extraction kinetic model, and physicochemical and structural characteristics of collagen from chicken lung. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2, 1-12.
- Zou, Z., Xi, G. L., Yuan, H. B., Zhu, Q. F., & Shi, X. Y. (2009). Telmisartan versus angiotension-converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hum Hypertens*, 23(5), 339-349. doi:10.1038/jhh.2008.132

## 9 ANEXOS



Review

## Hyaluronic Acid—Extraction Methods, Sources and Applications

Callejas-Quijada Graciela <sup>1</sup> , Escobar-Chávez José Juan <sup>2</sup> , Campos-Lozada Gieraldin <sup>1</sup>,  
Pérez-Marroquín Xóchitl Alejandra <sup>1</sup> and Aguirre-Álvarez Gabriel <sup>1,3,\*</sup>

- <sup>1</sup> Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad Km. 1 Rancho Universitario, Tulancingo C.P. 43600, Hidalgo, Mexico; ca290659@uaeh.edu.mx (C.-Q.C.); ca409779@uaeh.edu.mx (C.-L.C.); pe409780@uaeh.edu.mx (P.-M.X.A.)
- <sup>2</sup> Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio 12: Sistemas Transdérmicos, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli C.P. 54714, Estado de México, Mexico; josejuanesco@comunidad.unam.mx
- <sup>3</sup> Uni-Collagen S.A. de C.V., Arnulfo González No. 203, El Paraíso, Tulancingo C.P. 43684, Hidalgo, Mexico
- \* Correspondence: aguirre@uaeh.edu.mx; Tel: +52-7751-459-265

**Abstract:** In this review, a compilation of articles in databases on the extraction methods and applications of hyaluronic acid (HA) was carried out. HA is a highly hydrated component of different tissues, including connective, epithelial, and neural. It is an anionic, linear glycosaminoglycan (GAG) primarily found in the native extracellular matrix (ECM) of soft connective tissues. Included in the review were studies on the extraction methods (chemical, enzymatical, combined) of HA, describing advantages and disadvantages as well as news methods of extraction. The applications of HA in food are addressed, including oral supplementation, biomaterials, medical research, and pharmaceutical and cosmetic industry applications. Subsequently, we included a section related to the structure and penetration routes of the skin, with emphasis on the benefits of systems for transdermal drug delivery nanocarriers as promoters of percutaneous absorption. Finally, the future trends on the applications of HA were included. This final section contains the effects before, during, and after the application of HA-based products.

**Keywords:** hyaluronic acid (HA); glycosaminoglycans (GAG); emerging technologies (ET); molecular weight (Mw); hyaluronidases (HIAS)



Citation: Callejas-Quijada, G.; Escobar-Chávez, J.J.; Campos-Lozada, G.; Pérez-Marroquín, X.A.; Aguirre-Álvarez, G. Hyaluronic Acid—Extraction Methods, Sources and Applications. *Polymers* **2023**, *15*, 3473. <https://doi.org/10.3390/polym15163473>

Academic Editor: Magdalena Krystyan

Received: 14 July 2023  
Revised: 12 August 2023  
Accepted: 17 August 2023  
Published: 19 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

A native extracellular matrix (ECM) is constituted for proteins, including glycosaminoglycans (GAG). GAG are polysaccharides that bind covalently to a protein backbone to form proteoglycans [1].

Hyaluronic acid (HA) is a glycosaminoglycan that is found in the ECM of soft connective tissues. It is a highly hydrated component of connective, epithelial, and neural tissues, and it is present on the ECM. Unlike other GAG, HA is non-sulfated biomaterial with no capacity to bind a core protein in the formation of proteoglycans. It was discovered in 1934 and the term “hyaluronic acid” was proposed by Meyer and Palmer, who extracted this biopolymer from the body of a bovine’s eye. They named it hialoide (meaning vitreous) and uronic acid [2,3].

HA has great biocompatibility and a high affinity for water. These properties make the use of HA in various fields possible [4]. It is commonly used in protective and physiological processes, including in the healing of wounds and burns [5], in tissue regeneration, for cell differentiation, morphogenesis, angiogenesis, and inflammation.

The average molecular weight (Mw) can influence the physico-chemical properties of HA. It is an attractive building block for several applications. Some healing systems containing HA are commonly used in surgery, pharmacology, ophthalmology, dermatology, and cosmetology. In addition, this polysaccharide has been used in various nutritional supplements and cosmetics [6,7].



**La Sociedad Mexicana de Histología A.C.**

Otorga el presente reconocimiento a:

**GRACIELA CALLEJAS QUIJADA**

Por su asistencia como **congresista**

**Durante el XLI Congreso Mexicano y IX Iberoamericano de  
Histología**

(Duración de 30 horas)

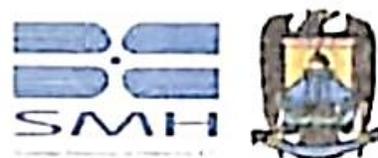
07 al 11 Noviembre 2022

*Torreón, Coahuila, MX*

Dr. Salvador Chavarría Vázquez  
Director FMUACUT

Dr. Rubén García Garza  
Presidente SMH

Dr. Daniel Campos Torres  
Subdirector de Posgrado



**La Sociedad Mexicana de Histología A.C.**

Otorga el presente reconocimiento a:

Callejas-Quijada, Graciela, Aguirre-Álvarez, Gabriel, González-León  
Diana, Escobar-Chávez, José J. y \*Ocampo-López, Juan

Por haber obtenido el **SEGUNDO LUGAR** en la categoría de Histología de  
vertebrados en la presentación del cartel titulado:

**ESTUDIO HISTOLÓGICO DESCRIPTIVO DE LA CRESTA  
DEL GALLO DOMÉSTICO  
*Gallus gallus domesticus***

**Durante el XLI Congreso Mexicano y IX Iberoamericano de  
Histología**

**07 al 11 Noviembre 2022**

*Torreón, Coahuila, MX*

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Salvador Chazarra Vázquez'.

Dr. Salvador Chazarra Vázquez  
Director IMUACUT

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rubén García Garza'.

Dr. Rubén García Garza  
Presidente SMH

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Daniel Campos Torres'.

Dr. Daniel Campos Torres  
Subdirector de Posgrado





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
Unidad de Investigación Multidisciplinaria. Laboratorio 12:  
Sistemas transdérmicos y materiales nanoestructurados  
Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Km. 2.5, San Sebastián Xhala,  
54700, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.  
Tel: (525) 56.23.19.99; Ext: 39442. Cel: 5540247029  
e-mail: [josejuanescoabar@comunidad.unam.mx](mailto:josejuanescoabar@comunidad.unam.mx).

Cuautitlán Izcalli, México a 21 de marzo de 2024

**Graciela Callejas Quijada**  
**Estudiante del Doctorado en Ciencias Agropecuarias**  
**Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo**  
**P R E S E N T E**

**Asunto: Carta Aceptación Estancia Doctoral**

Por medio de la presente hago de su conocimiento que ha sido **aceptada** para realizar una estancia de investigación doctoral en el laboratorio 12: **Sistemas transdérmicos y materiales nanoestructurados de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM**, por el periodo comprendido del 1 de junio 2024 al 30 de agosto de 2024 al desarrollará las actividades contempladas en su proyecto de tesis titulado: *"Extracción, caracterización y aplicación de ácido hialurónico a partir de crestas de pollo mediante el método de ultrasonido de alta intensidad como alternativa al método tradicional"*.

Sin más por el momento, me despido de Usted enviándole un cordial saludo y recordándole que estaré a su disposición para cualquier duda o aclaración.

Atentamente,

**Dr. José Juan Escobar Chávez**  
Profesor de Carrera Titular "B" TC.



Universidade Federal do Ceará  
Centro de Ciências Agrárias  
Departamento de Engenharia de Pesca



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais  
Universidade Federal do Ceará

Por la presente carta, informo que **Graciela Callejas Quijada**, con número de **matrícula 290659**, estudante del Programa del Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), México, ha sido aceptada para realizar una estancia de investigación en el Laboratorio de Tecnología del Pescado de la Universidad Federal de Ceará, en la Ciudad de Fortaleza, Ceará, Brasil, durante el período del **01 de septiembre de 2024 al 31 de octubre de 2024**.

Durante su estancia, la estudiante desarrollará parte de su proyecto de investigación de doctorado: **“Extracción, caracterización y aplicación de ácido hialurónico a partir de crestas de pollo mediante el método de ultrasonido de alta intensidad como alternativa al método tradicional”**, con los siguientes objetivos de trabajo a alcanzar en la UFC:

1. Completar la caracterización físico-química y el potencial biotecnológico de los extractos obtenidos en las etapas iniciales.

Sin más, quedo a disposición de usted para cualquier pregunta o comentario.

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** BARTOLOMEU WARLENE SILVA DE SOUZA  
Data: 24/04/2024 08:10:23 -0300  
Verifique em <https://validar.jb.gov.br>

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais  
Universidade Federal do Ceará  
Centro de Ciências Agrárias  
Departamento de Engenharia de Pesca  
Phone: +558533669737  
Fax: +558533669420