

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÓNICO
OBTENIDO DE CRESTAS DE POLLO.**

JOSE LUIS ARCILA GARCIA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTADA DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA

BUCARAMANGA

2014

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÓNICO
OBTENIDO A PARTIR DE CRESTAS DE POLLO.**

JOSE LUIS ARCILA GARCIA

Proyecto de Grado presentado como requisito para optar por el título de Químico

DIRECTOR:

Hermínsul de Jesús Cano Calle,

Químico, *Ph. D.*

DIRECTOR:

Cristian Blanco Tirado,

Químico, *Ph.D*

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTADA DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA

BUCARAMANGA

2014

DEDICATORIA

Con todo mi amor para Gladis García y Jesús Arcila, mis padres, por el apoyo incondicional y verdadero todo el tiempo, por la ayuda brindada para lograr esta meta y por haber creído en mí.

A Diego y Julián, mis hermanos, por las palabras y consejos dados en el momento indicado.

A Jesús Andrés, mi hermano ángel de la guarda (Q.E.P.D) por la ayuda brindada desde el más allá.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Herminsul Cano y al Doctor Cristian Blanco, por haberme permitido hacer parte de este proyecto de investigación, por la confianza depositada en mí para llevar a cabo este proyecto, por los concejos, aportes y correcciones en este trabajo.

Al Doctor Arnold Rafael Bohórquez, por tomarse el tiempo de calificar y valorar este trabajo de investigación y al mismo tiempo brindar su conocimiento para el desarrollo del mismo.

A la Doctora Yajaira Combariza, por la colaboración brindada en el análisis realizado por medio de la espectrometría de masas.

Al laboratorio de Espectrometría de masas del Parque Tecnológico de Guatiguará (PTG); al laboratorio de análisis instrumental de la escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander por el préstamo del equipo de infrarrojo; y al CENIVAM por la liofilización de las muestras, al laboratorio de microscopía de PTG, por el análisis Raman y al laboratorio de resonancia magnética nuclear (RMN) del Parque Tecnológico de Guatiguará (PTG), por la obtención de espectro de RMN de protones de la muestra.

.

A los compañeros del grupo de investigación GIFTEX, por la colaboración en el laboratorio, por compartir largas jornadas de trabajo y por los momentos de esparcimiento.

A todas las personas que de alguna forma hicieron parte de este arduo trabajo, colaborando directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo, a pesar de las dificultades.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	14
1. DEFINICION DEL PROBLEMA	16
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.2. JUSTIFICACIÓN	17
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GENERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
3. MARCO DE REFERENCIA	19
3.1. PROCESO DE AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO.....	19
3.2. MARCO TEÓRICO	21
3.2.1. ACIDO HIALURÓNICO (AH)	21
3.2.2. USOS Y APLICACIONES.....	23
3.2.3. TECNICAS ANALITICAS.....	24
4. METODOLOGIA	28
4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
4.2. PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	30
4.3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN.....	30
4.3.1. LIOFILIZACIÓN	31
4.4. CARACTERIZACIÓN DE ACIDO HIALURÓNICO.....	33
4.4.1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJO	33

4.4.2. ESPECTROSCOPÍA RAMAN.....	33
4.4.3. RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR RMN.....	33
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	35
5.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO	35
5.2. INFRARROJO.....	41
5.3. RAMAN	45
5.4. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN CRESTA DE POLLO POR VISCOSIMETRIA.....	49
5.5. RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR	52
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	56
BIBLIOGRAFÍA	60

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura general de la unidad dimérica del ácido Hialurónico en la que se observa el ácido glucurónico enlazado a la N-acetilglucosamina.....	22
Figura 2. A) Representación esquemática de ATR, B) Principio de funcionamiento de ATR.....	25
Figura 3. Diagrama de niveles de energía mostrando las tres formas de dispersión de la radiación electromagnética en el efecto Raman.....	26
Figura 4. Diagrama de flujo.....	28
Figura 5. Representación en el plano del diseño experimental factorial 3^2	29
Figura 6. Ácido Hialurónico extraído y recipientes para liofilización.....	32
Figura 7. Reactores en presencia de la papaína.....	39
Figura 8. Precipitación de complejo AH-CTAB.....	40
Figura 9. Complejo AH-CTAB de tres tratamientos diferentes, depositados en el fondo del reactor.....	40
Figura 10. Lavado y liberación del AH extraído.....	41
Figura 11. Espectro Infrarrojo del tratamiento 60°C por 24h.....	43
Figura 12. Espectro infrarrojo reportado en la literatura del AH comercial.....	44
Figura 13. Espectros infrarrojo reportados en la literatura del AH extraído de crestas de pollo.....	44
Figura 14. Dímero de AH señalando los tipos de enlaces del grupo amida.....	46
Figura 15. Espectro Raman en rango de adquisición 800-1800 cm^{-1}	47
Figura 16. Espectro Raman en rango de adquisición 2800-3500 cm^{-1}	47

Figura 17. Espectro Raman de AH reportado en la literatura, en un rango de adquisición de 800-1600 cm^{-1}	48
Figura 18. Espectro Raman de AH reportado en la literatura, en un rango de adquisición de 2700-3000 cm^{-1}	48
Figura 19. Montaje para la determinación de viscosidad intrínseca con viscosímetro Cannon-Fenske.....	49
Figura 20. Viscosidad reducida e inherente, en función de la concentración de AH.....	51
Figura 21. Dímero de AH con la asignación de los protones vistos en el espectro ^1H -RMN.	53
Figura 22. Espectro ^1H -RMN del AH.....	54
Figura 23. Espectro ^1H -RMN de AH reportado en la literatura	54

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Temperaturas y tiempos de incubación de la papaína, en digestión proteolítica	29
Tabla 2. Características organolépticas AH extraído.	35
Tabla 3. Cantidades de crestas utilizadas y de AH obtenido.	36
Tabla 4. Tratamiento estadístico cada tratamiento.	37
Tabla 5. Valores de respuestas en rendimiento de extracción de AH, en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación.....	38
Tabla 6. Análisis de varianza ANOVA en Microsoft Excel 2010.....	38
Tabla 7. Frecuencias de absorción tratamiento 60°C por 24h.	42
Tabla 8. Frecuencias de absorción en IR de AH comercial y AH extraído de crestas de pollo reportados en la literatura.....	43
Tabla 9. Comparación de los desplazamientos Raman en el AH extraído y un espectro reportado en la literatura.....	46
Tabla 10. Ecuaciones para la construcción de grafica de viscosidad intrínseca	50
Tabla 11. Valores de viscosidades y concentracion para la determinacion de la viscosidad intrinseca de AH.	51
Tabla 12. Desplazamientos químicos de ¹ H-RMN del AH.....	52

RESUMEN

TÍTULO

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÓNICO OBTENIDO DE CRESTAS DE POLLO*

AUTOR

ARCILA GARCIA, JOSE LUIS.**

PALABRAS CLAVE

ACIDO HIALURÓNICO, CRESTAS DE POLLO, DIGESTION PROTEOLITICA.

CONTENIDO: teniendo en cuenta la alta producción avícola en el departamento de Santander y la amplia demanda del ácido hialurónico (AH) en la industria farmacéutica y cosmética, en este trabajo se planteó desarrollar una metodología eficiente de extraer este biopolímero de las crestas de pollo (machos y hembras). El propósito de esta investigación, fue determinar la eficiencia de la extracción de dicho oligosacárido, por medio de una digestión proteolítica usando como enzima la *papaina*, variando el tiempo y la temperatura de incubación.

Se realizó la caracterización química del AH extraído, usando diferentes técnicas analíticas. Por medio del análisis de espectroscopía de infrarrojo y Raman se logró determinar la presencia de los grupos funcionales presentes en el AH extraído y se comparó con espectros reportados en la literatura. Para determinar la masa molecular del AH extraído se realizó la medición de la viscosidad de una serie de soluciones de AH, por medio de la cual se pudo determinar que el polisacárido extraído posee una masa molecular de 1200 kDa. Además, se obtuvo el espectro RMN de protones, con el cual se confirmó que el polímero obtenido era evidentemente AH.

Mediante la metodología de extracción para el AH implementada en esta investigación, se obtuvo un 1,5% de rendimiento de extracción, lo que representa un aumento del 0.5% en la eficiencia de la extracción comparado con anteriores investigaciones.

*Trabajo de investigación

** Facultad de ciencias. Escuela de química. Director: Hermínul de Jesús Cano Calle. Director: Cristian Blanco Tirado.

ABSTRACT

TÍTULO

EXTRACTION AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF HYALURONIC ACID OBTAINED FROM CHICKEN COMBS *

AUTHOR

ARCILA GARCIA, JOSE LUIS.**

KEYWORDS

HYALURONIC ACID, CHICKEN COMBS, PROTEOLYTIC DIGESTION.

CONTENT: Santander is a major producer of poultry in Colombia. It is well known that chicken combs contain, among other substances, hyaluronic acid (HA), which is a raw material for many cosmetic and pharmaceutical applications. Currently, poultry production plants use chicken combs for producing supplemental concentrates for animal food. In this work, we develop a methodology to efficiently extract HA by a proteolytic digestion, using papain enzyme and by changing reaction time and incubation temperature.

The chemical characterization of HA extracted was carried out using different analytical techniques. Infrared and Raman spectroscopy analysis were used to determine the existence of functional groups present in the extracted HA. We ascertain the chemical composition by comparing our results with those reported in the literature. Viscosity of a series of HA solutions was performed in order to determine the molecular mass of the extracted HA, through which was possible to determine that the extracted polysaccharide has a molecular weight of 1200 kDa. Furthermore, the proton NMR spectrum was obtained, with which the molecular identity of HA was confirmed.

We found that the methodology developed in this study increases the extraction rate by 0.5% in comparison to the traditional methodologies that reach about 1.0% of HA.

* Honor thesis

** Faculty of sciences. School of Chemistry. Director: Herminio de Jesús Cano Calle. Director: Cristian Blanco Tirado.

INTRODUCCION

Durante los últimos años se ha incrementado el interés a nivel mundial, sobre el estudio y la investigación de biomoléculas de carácter polimérico que se pueden obtener o extraer de fuentes naturales, como los son tejidos animales. Este interés es propio de industrias como la médico-farmacéutica y cosmética ¹, en las que los biopolímeros tienen numerosas aplicaciones como auxiliares en la formulación de medicamentos, como principios activos en tratamientos terapéuticos y como principal componente de tratamientos cosméticos. Entre los materiales poliméricos de gran interés se encuentra el **ácido hialurónico** (AH), también llamado hialuronán, junto con otros oligosacáridos similares, los cuales constituyen una familia, conocidos como glucosaminoglicanos (GAGs).

El AH es un heteropolisacárido de gran tamaño molecular conformado por unidades de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina unidos por enlaces glicosídicos β (1→3) y β (1→4) y debido a estos enlaces glicosídicos, se clasifica como un carbohidrato no reductor. El AH que se extrae por medio de la metodología descrita por Da Rosa y co, se obtiene un tamaño molecular en un rango de 10^6 - 10^7 Da. Sin embargo, existen cadenas poliméricas de menor tamaño molecular, dependiendo del tipo de extracción que se emplee y del tipo de matriz, o tejido animal que se utilice.

En el cuerpo humano, el AH se encuentra en el líquido sinovial de las articulaciones, es parte del tejido conectivo en la piel y en el humor vítreo. Este polímero es de gran interés y de amplia demanda en el sector médico-farmacéutico y cosmético, debido a que el AH posee la capacidad de retener el agua (aproximadamente 500 veces su propio volumen), previniendo la deshidratación de la epidermis, cumple funciones de lubricación en articulaciones principalmente de hombro y rodilla, y en el mantenimiento de volumen por tratarse

de uno de los componentes del tejido conjuntivo, lo que lo convierte en la principal materia prima en la formulación de tratamientos estéticos y farmacéuticos, los cuales se encuentran en diferentes presentaciones y formulaciones (soluciones inyectables, colirios, cremas, geles y suplementos dietarios)².

Dentro de las dos tendencias a nivel mundial para la obtención o aislamiento de este oligosacárido, se encuentran, el empleo de procesos fermentativos a partir de microorganismos³, y el aislamiento del biopolímero a partir de fuentes naturales, principalmente, tejidos de origen animal como es el caso de las crestas de pollo. Con base en lo anterior, la finalidad de esta investigación, fue el desarrollo de una metodología que permitiera la eficiente extracción de AH a partir de cresta de pollo. El interés por obtener el biopolímero, a partir de la cresta del pollo, se debe a la elevada producción de pollo en la región de Santander y Norte de Santander, donde las crestas de los pollos y de las gallinas es considerada un producto de desecho. De esta forma, se contribuye al aprovechamiento de estos productos de desecho aportando un valor agregado a la línea de producción de la industria avícola.

Como aspectos novedosos en esta investigación, está el diseño de una extracción de ácido hialurónico, más amigable con el ambiente, mediante el uso de una sal de amonio cuaternaria de menor efecto tóxico, en comparación con la que se utilizó en previas investigaciones, la cual se emplea en la obtención de este biopolímero a partir de cordones umbilicales residuales. Además, poder emplear técnicas instrumentales que permitan la caracterización de material extraído de las crestas de pollo, con el fin de probar la efectividad de la extracción y de la metodología que esta investigación se plantea, de modo que se pueda demostrar que el material obtenido es de buena calidad y pureza.

1. DEFINICION DEL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las empresas del sector farmacéutico y cosmético, muestran gran interés en materias primas de origen natural, debido a la presencia de biomateriales y biopolímeros con una alta aplicabilidad. Además, este tipo de matrices se encuentra en gran abundancia en la naturaleza y en muchos casos constituyen productos de desecho. Una matriz de origen natural de gran interés, debido a la presencia del AH en su composición (biopolímero utilizado en la formulación de compuestos farmacéuticos y cosméticos) son las crestas de los pollos^{4,5}, las cuales constituyen un producto de desecho en la industria avícola, que en la región de Santander (Santander y Norte de Santander) representa un 25% de la producción nacional en el 2012 y una producción de 22% de la producción nacional hasta el mes de abril de 2013. De acuerdo con datos reportados por la federación nacional de avicultores de Colombia FENAVI⁶

Teniendo en cuenta el problema generado por la descomposición de residuos en la cadena productiva avícola y su impacto a nivel ambiental surge la propuesta de extraer AH a partir de crestas de pollo, dando así un valor agregado en la línea producción de pollo y al mismo tiempo solución al problema ambiental antes mencionado⁷, al utilizar estos residuos de la industria avícola.

En el enfoque comercial, la importancia radica en poder alcanzar la comercialización del AH como materia prima, en industrias tales como la farmacéuticas, y quizá con una mayor rentabilidad, en la industria cosmética, debido al creciente interés de estas industrias en el suministro del AH obtenido a partir de las crestas de pollo, siendo esta una buena alternativa de origen natural a parte de las ya existentes en el mercado.

En cuanto al impacto económico que surge a partir de la extracción de AH a partir de las crestas de los pollos, se resaltan los beneficios que pueden adquirir tanto la industria avícola, como la farmacéutica y cosmética, debido a que, los productores de pollo en la región obtendrán un ingreso económico adicional, y las industrias demandantes podrían obtener materia prima, en este caso, el AH un buen precio.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente Santander es uno de los principales productores de pollo en Colombia. Se sabe que en el departamento se sacrifican 500 mil pollos diariamente⁶. Las crestas de los pollos no es utilizada actualmente en ninguna planta de sacrificio y es considerada un subproducto del proceso, se lleva junto con otras menudencias a los quemadores donde se lleva la materia orgánica a sequedad y se obtiene una pasta que se utiliza en la industria de producción de concentrados, como materia prima para producir alimento para animales. Se consideró que adicionar a la línea de producción de carne de pollo, otro producto con impacto en la industria cosmética y farmacéutica puede dar inicio a un nuevo mercado derivado de la industria avícola. En este estudio se desarrolló una metodología para la producción de ácido hialurónico que sirve como materia prima para las industrias farmacéutica y cosmética. Este trabajo sirve de soporte para otros trabajos mercadeo, elaboración de prototipos y plan de negocios que permita que estos biopolímeros puedan ingresar y competir en los mercados locales, nacionales e internacionales.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar e implementar, una metodología eficiente de extracción de ácido hialurónico presente en las crestas de los pollos, por medio de una digestión proteolítica.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1.** Realizar un diseño experimental para la extracción de ácido hialurónico, en el cual las variables a tener en cuenta sean la temperatura y el tiempo de incubación de la enzima.
- 2.2.2.** Implementar y evaluar el diseño experimental propuesto para la extracción del ácido hialurónico.
- 2.2.3.** Caracterizar el ácido hialurónico presente en las crestas de pollo por medio de técnicas instrumentales, como espectroscopia infrarrojo y Raman, Resonancia magnética nuclear y determinación de viscosidad para obtener el valor promedio del peso molecular.
- 2.2.4.** Evaluar la precisión y exactitud del proceso de extracción del ácido hialurónico de esta matriz natural.

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1. PROCESO DE AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO

Dentro de las formas más sobresalientes para la extracción y aislamiento de AH se encuentran, la síntesis de AH por medios enzimáticos y la obtención o extracción partir de fuentes naturales, principalmente, tejidos animal.

Por vía enzimática, existen investigaciones por medio de inmovilización de células y en la presencia de un microorganismos (*Streptococcus*)⁸ se encuentran microencapsulados en un medio de cultivo propicio, obteniéndose AH de un peso molecular⁴ aproximadamente de $6 \times 10^6 g/mol$. Posteriores investigaciones, han empleado métodos fermentativos con el uso de *Streptococcus hemolíticus* y por medio de ingeniería genética, se ha logrado un mutante del *Streptococcus zooepidemicus*, para biosintetizar AH. Para estos casos el AH obtenido es de alta masa molecular, y se logra precipitar por medio de adición de etanol.

La primera investigación en la cual se menciona y se plantea una metodología de extracción de AH, a partir de matriz natural, fue llevada a cabo en la Universidad de Columbia en Nueva York, por Meyer y Palmer⁹, los cuales extrajeron los glucosaminoglicanos (GAG) totales de los ojos del ganado bovino, dentro de los cuales se encontraba el AH, condroitri-4-sulfato y condroitri-6-sulfato (glucosaminoglicanos conformados por dímeros de N-acetilgalactosamina y ácido glucurónico, con variación a la posición del grupo sulfato en la N-acetilgalactosamina), más adelante determinarían que estaba constituido por dos tipos de sacáridos, uno de los cuales era el ácido urónico (ácido glucurónico). Ellos también propusieron el nombre de Ácido Hialurónico para esta macromolécula⁹.

La extracción se da primero lavando la matriz con acetona, que luego se pulveriza, y al diluir este polvo es diluido en alcohol para dar la precipitación de los

polisacáridos con impurezas. Para purificar el polisacárido, se realizó una precipitación con ácido acético, y el material inorgánico fue eliminado cuando se disolvió el residuo obtenido en HCl 2.0N.

Años más adelante, el investigador Norman Boas, determino la presencia de ácido Hialurónico en crestas de pollo, con una concentración mayor¹⁰. Para la extracción del polisacárido de la matriz, utilizó acetona, acetato de sodio y etanol, para eliminar lípidos e impurezas, luego se usó cloroformo para liberar las proteínas y finalmente para la separación, se llevó a cabo un proceso de diálisis en solución de acetato de sodio.

Luego de varias investigaciones, se ha comprobado que el AH está presente en diferentes fuentes de origen natural como son: ojo de pez globo¹¹, fluido sinovial¹², piel de conejo¹³, células dendríticas¹⁴, pulpa dental de rata¹⁵, cuerno de Wapiti¹⁶, cordones umbilicales humanos^{14,17} y crestas de pollo^{4,5,14,18}, siendo estas dos últimas, las que poseen un concentración de AH mayor. Para cada una de las matrices se han desarrollado diferentes metodologías de extracción, en donde la gran variante se encuentra en los rendimientos de extracción y en el tamaño de las cadenas poliméricas obtenidas en cada uno de ellas. También hay pequeñas variaciones en la eliminación de las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y otros polisacáridos, lo cual puede afectar el tamaño y el estado natural de la molécula, siendo esta la razón por la que el aislamiento de AH es caro y difícil de obtener¹⁹.

En ciertas investigaciones, se han desarrollados metodologías de aislamiento combinando tratamientos del tejido con soluciones salinas y el empleo de enzimas¹⁴. También se ha estudiado los procedimientos de eliminación de contaminantes (proteínas, lípidos, etc.), utilizando mezclas de alcohol amílico-cloroformo, sulfato de amonio, etanol absoluto entre otros, en cada caso se llevan a cabo gradientes de centrifugación en presencias de alguna sal para completar la purificación.

Para el aislamiento de AH de las crestas de pollo, se ha determinado que la mejor forma de llevarla a cabo es por medio de digestión proteolítica en solución buffer y luego precipitar, usando sales de amonio cuaternario, como el cloruro de cetilpiridinio (CPC) y de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)²⁰. Esta última fue utilizada para la precipitación de AH en el uso de cordones umbilicales humanos como fuente de extracción²⁰.

El procedimiento en general, para el aislamiento de AH de crestas de pollo, está constituido en tres etapas fundamentales¹⁴.

- i. Extracción**
- ii. Separación de “contaminantes” (proteínas, lípidos, materiales inorgánicos y orgánicos, entre otros)**
- iii. Precipitación.**

3.2. MARCO TEÓRICO

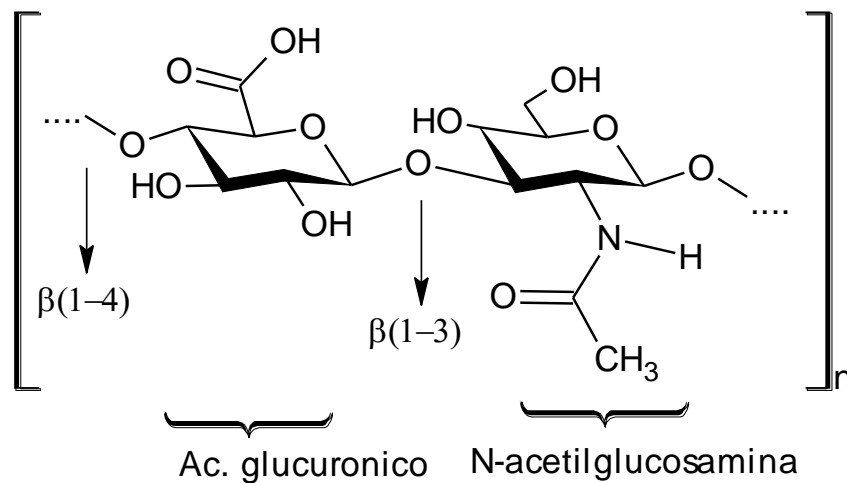
3.2.1. ACIDO HIALURÓNICO (AH)

El AH es un carbohidrato, específicamente, un glucosaminoglicano (GAG), que se produce de forma natural en los seres vivos en diferentes tejidos²¹, el cual se puede considerar como un heteropolisacárido, ya que, posee dos unidades monoméricas diferentes, el ácido glucurónico y N-acetilglucosamina. Posee rangos de tamaño molecular de 10^3 a 10^7 Da, según sea el origen y la función que cumple en el organismo.

Weissman y Meyer en 1954²², demostraron que la unidad dimérica del AH conformada por D-glucurónico y la N-acetilglucosamina, se encuentra unidas por medio de enlaces glicosídicos β (1→3) y β (1→4) como se pueden ver en la figura 1.

El nombre Hialurónico, deriva de la palabra griega *hialoideas*, que significa vítreo, que era la contextura que presentaba cuando lo descubrieron en el humor vítreo del ganado bovino, y ácido por la presencia del ácido glucurónico en su estructura. En las condiciones fisiológicas, este biopolímero se encuentra en su forma ionizada, es decir como hialuronato de sodio o calcio. Como no se puede conocer siempre el grado de ionización, ni cuál es el contra ion, se estableció un nombre general para este polímero: "hialuronan", y es reconocido como el nombre oficial en la nomenclatura de polisacáridos²¹.

Figura 1. Estructura general de la unidad dimérica del ácido Hialurónico en la que se observa el ácido glucurónico enlazado a la N-acetilglucosamina.



En la estructura del AH se puede observar que los grupos voluminosos (hidroxilo, carboxilo y el carbono anomérico del azúcar adyacente) están en posición ecuatorial que es estéricamente favorable, y los grupos pequeños (átomos de hidrogeno) se encuentran de forma axial.

Con la utilización de técnicas instrumentales como difracción de rayos x (DRX), resonancia magnética nuclear (RMN) y microscopia electrónica, se ha podido

demostrar que el AH presenta estructura primaria, secundaria y terciaria^{23,24}. Debido al tipo de interacciones en la estructura secundaria del polímero, es que el AH posee propiedades como viscosidad, poder hidratante, cicatrizante y antiinflamatoria, además, de una barrera que dificulta la difusión de los gérmenes, por lo que se le atribuye propiedades bacteriostáticas¹⁹.

3.2.2. USOS Y APLICACIONES

La mayor cantidad de AH, en el ser humano, se produce en algunas células especializadas de la piel, aproximadamente 90µg/g de tejido seco²⁵, y se encuentra unido al colágeno y a los filamentos de queratina. Su uso como agente cicatrizante e hidratante, ha incrementado el interés de las industrias cosméticas, debido a que a medida que el hombre avanza en edad, las células productoras de AH no cumple eficientemente su función, por lo tanto, hay una disminución en la producción de AH en la piel y por tanto la capacidad hidratante se disminuye.

El AH que se obtiene o que es aislado de matrices naturales como el caso de las crestas de pollo, posee una elevada masa molecular, por lo que posee la propiedad de mantener la piel hidratada y junto al colágeno constituye una barrera protectora ante los ataques del medio. La aplicación más relevante en tratamientos dermatológicos, en la formulación de cremas y soluciones inyectables para la suavización y humectación de la dermis^{26, 27}, siendo el AH el principio activo de estos tratamientos. En otras aplicaciones en el campo de la oftalmología, se utiliza para prevenir efectos postoperatorios en trasplantes de córnea^{28, 29} y operaciones de catarata³⁰, y se utiliza como lubricante en el traumatismo de ojo seco³¹. También se han desarrollado fármacos para el tratamiento ortopédico del dolor en rodilla, hombro y cadera^{32, 33, 34}.

3.2.3. TECNICAS ANALITICAS

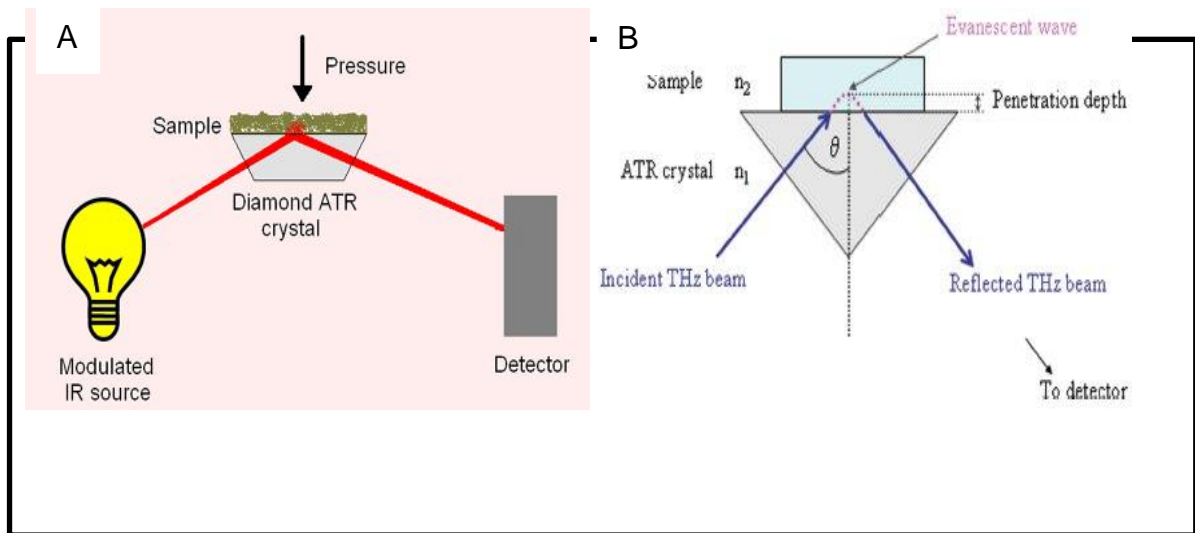
Para la caracterización del AH, se utilizaron técnicas como la espectroscopia infrarrojo y Raman, para determinar la presencia de los grupos funcionales correspondientes a este polisacárido; determinación de la viscosidad intrínseca del AH para la determinación de la masa molecular y la determinación del espectro de protones por RMN. Para la extracción que presentó un mayor rendimiento y pureza.

3.2.3.1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La espectroscopia infrarroja³⁵, se ha utilizado como una herramienta útil para el estudio de moléculas biológicas y en la investigación de la estructura química de moléculas orgánicas, además, es muy versátil con respecto al tipo de muestras que se pueden analizar³⁶. Por medio de la espectroscopia de absorción infrarrojo, las especies moleculares se pueden explicar asumiendo que son el resultado de los distintos cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros³⁷. La caracterización química de moléculas por medio de la espectroscopía infrarroja, permite inferir una posible estructura molecular, identificando grupos funcionales que la conforman, por medio de bandas características con localizaciones e intensidades definidas en los espectros.

El atenuador de reflexión total (ATR), es una técnica de muestreo utilizada en este tipo de análisis, la cual se genera cuando un haz de infrarrojo entra en cristal atenuador transmisor y de elevado índice de refracción. Este cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. La onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito.

Figura 2. A) Representación esquemática de ATR, B) Principio de funcionamiento de ATR.



Fuente A. <http://www.gps.caltech.edu/~chemtob/atr.htm>.

B. <http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/1457-Attenuated-Total-Reflection-Explores-the-Terahertz-Region/>.

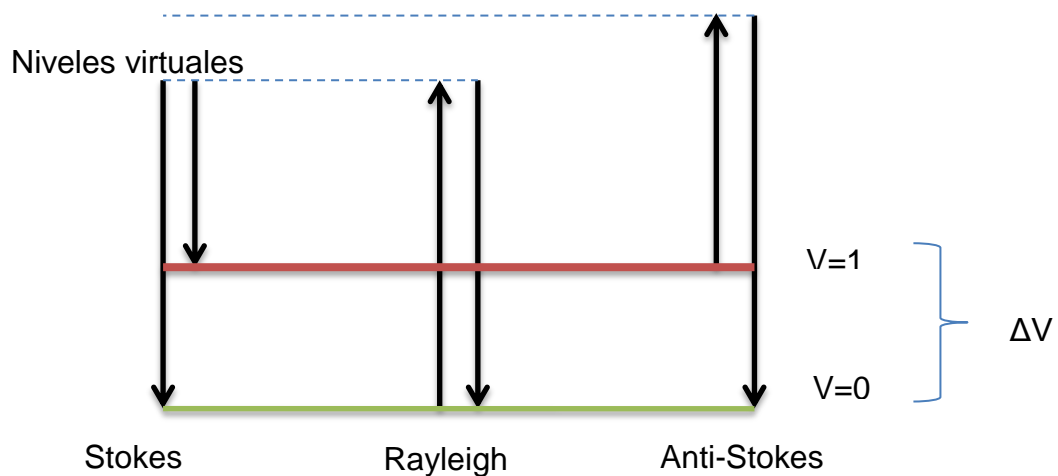
3.2.3.2. ESPECTROSCOPIA RAMAN

La espectroscopía Raman, al igual que la espectroscopía infrarroja, conforman la espectroscopía vibracional, y por tanto están relacionadas con las vibraciones moleculares. Ambos efectos producen transiciones entre niveles vibracionales cuantizados, sin embargo difieren en el mecanismo en que inducen dichas transiciones, en IR la molécula absorbe energía y salta de un nivel vibracional a otro, mientras que el efecto Raman es un efecto de dispersión de luz; por tanto ambas técnicas son complementarias^{40, 41}.

El efecto Raman se basa en los fenómenos de dispersión de luz monocromática, generalmente de un láser en el rango de luz visible, el infrarrojo cercano o ultravioleta cercano. Cuando un fotón interactúa con una molécula se puede dispersar de varias formas, por dispersión elástica, en la que el fotón emitido tiene la misma longitud de onda, igual frecuencia y energía que el fotón incidente; dispersión inelástica, hay un cambio en la frecuencia, longitud de onda y energía

entre el fotón incidente y el emitido. Este cambio puede ocurrir de dos maneras; cuando el fotón cede energía a la molécula, la energía de radiación es menor que la incidente (dispersión Stokes); en cambio si el fotón obtiene energía de la molécula se observa lo contrario (dispersión anti-Stokes), estos fenómenos se pueden ver en la Figura 3⁴⁰.

Figura 3. Diagrama de niveles de energía mostrando las tres formas de dispersión de la radiación electromagnética, en el efecto Raman.



Fuente: COLTHUP, N. Introduction to infrared and Raman Spectroscopy. New York. Academic Press, 1964, Pág. 30. (Figura mejorada por el autor).

Por tanto las señales que se observan en los espectros Raman corresponden a los cambios de energía involucrados en las transiciones de la molécula dispersante, sin embargo, las líneas Stokes son más intensas que las anti-Stokes, además, las líneas anti-Stokes decrecen rápidamente en intensidad al aumentar la frecuencia, de modo que alrededor de 1000 cm^{-1} su intensidad es casi nula.

3.2.4.3 RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

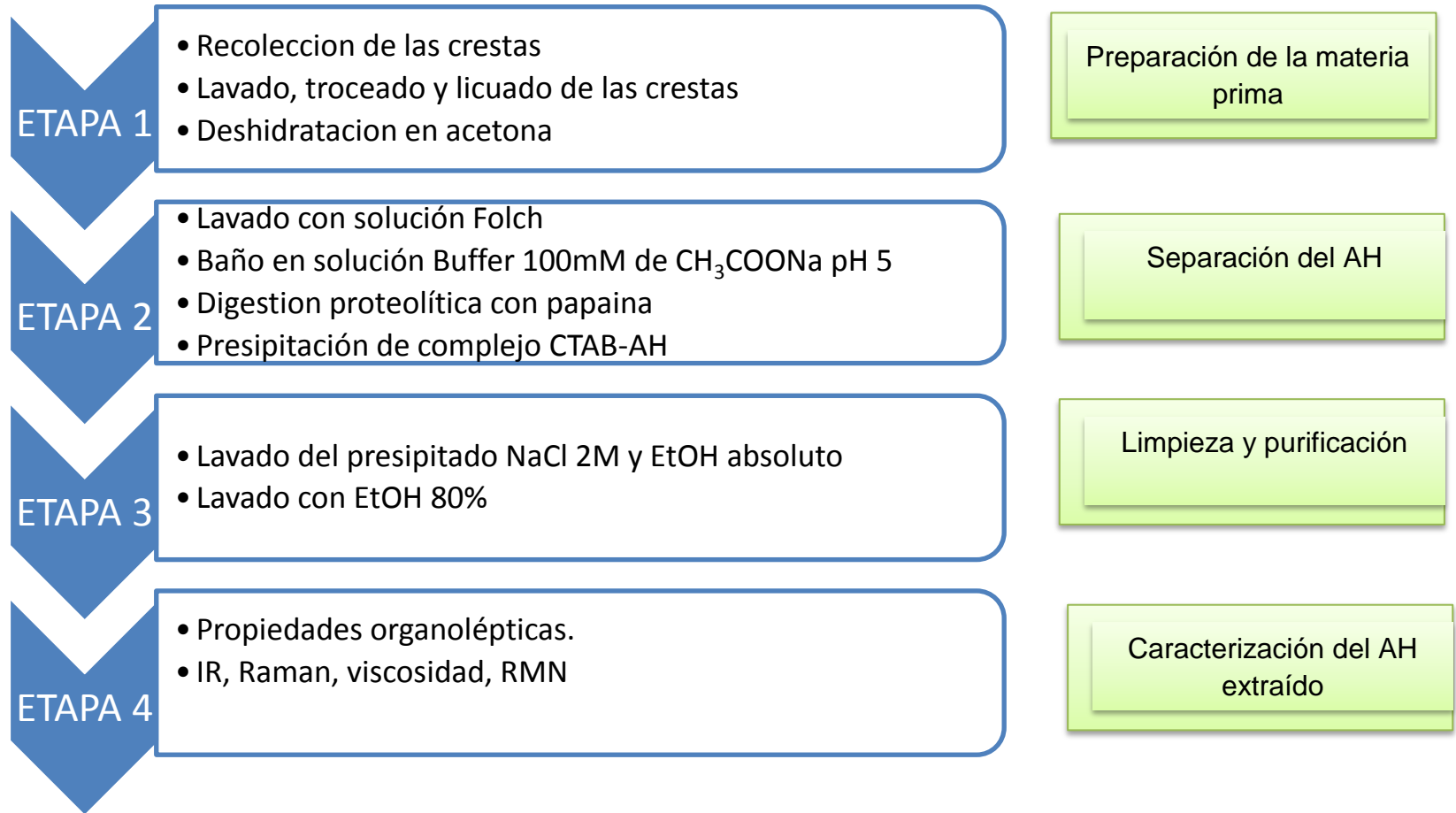
El fenómeno de la resonancia magnética nuclear RMN⁴², se explica rigurosamente a través de mecánica cuántica; dando a conocer el conocimiento y las propiedades del momento angular magnético, y junto con conocimientos de termodinámica estadística, se pueden describir los procesos fluctuantes en estado líquido, responsables del estado de relajación del espín molecular. La RMN es un fenómeno que se produce cuando los núcleos de algunos átomos están inmersos en un campo magnético estático y se exponen a un segundo campo magnético oscilante. Algunos núcleos pueden o no experimentar este fenómeno, dependiendo de si poseen o no spin.

En presencia de un campo magnético externo, que se genera por un potente imán, los núcleos adquieren dos orientaciones, una a favor y una en contra al campo magnético, luego de esto, se aplica una energía externa por medio de impulsos de radiofrecuencias, con lo que los núcleos captan esta energía cambiando su orientación y vector magnético. Finalmente se suprime la radiofrecuencia y los núcleos tienden a situarse de nuevo en su estado original, liberando energía que puede ser detectable, a este paso se le conoce como relajación. La radiofrecuencia es devuelta en forma de señal eléctrica oscilante, y es medida en dos tiempos T1 y T2, que son fundamentalmente los tiempos que miden la rapidez o lentitud de cómo se recuperan los núcleos resonantes al ser sometidos o perturbados por las ondas de radiofrecuencia adecuadas. T1 corresponde al tiempo que los núcleos han rotado 180° fuera del campo magnético retornen a su plano de equilibrio (tiempo de relajación longitudinal), y T2 es el tiempo necesario para que los protones se relajen en dirección transversal.

En los últimos 10 años, la espectroscopia RMN ha sido fundamental en la caracterización y elucidación de las estructuras tridimensionales de macromoléculas en diluciones acuosas. Como técnica de para la determinación estructural con resolución a nivel atómico, está por encima de DRX.

4. METODOLOGIA

Figura 4. Diagrama de flujo.



4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

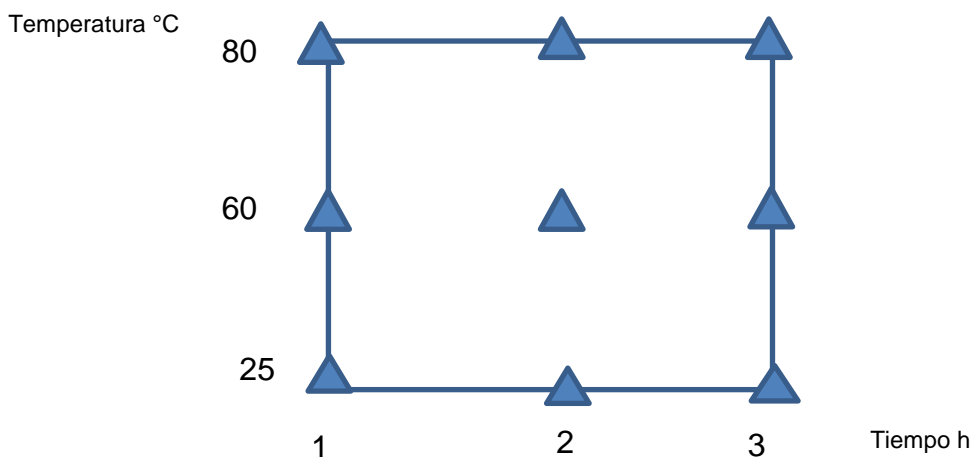
El diseño experimental propuesto se basó en la variación de dos variables de interés en el proceso de extracción: la temperatura y el tiempo de incubación de la papaína (enzima que libera el AH de las crestas de pollo) y así poder evaluar la reproducibilidad y precisión de la investigación. Los valores de las variables a tener en cuenta, se registran en la Tabla 1.

Tabla 1. Temperaturas y tiempos de incubación de la papaína, en digestión proteolítica

TEMPERATURAS (° C)	TIEMPO (horas)
25	12
60	24
80	36

Por ser dos factores a tener en cuenta, para tres tratamientos distintos, el diseño experimental planteado es un diseño factorial 3^2 , lo que corresponde a 9 experimentos o tratamientos distintos, resultado de las combinaciones de tiempo y temperatura de incubación de la papaína, representados en la figura 5. Cada experimento se realizó por duplicado, y el experimento en el que se encuentran todas las proyecciones, se realizó 4 veces (experimento del centro de la figura 5) para obtener la estadística de las extracciones, llevándose a cabo 20 extracciones en total.

Figura 5. Representación en el plano del diseño experimental factorial 3^2



4.2. PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Las crestas fueron recolectadas de una población de pollos machos y hembras de aproximadamente 8 semanas de vida (aproximadamente 2 meses de vida), en diferentes plazas de mercado de los municipios de Bucaramanga y Floridablanca Santander. Las crestas fueron lavadas con agua de grifo y luego fueron sumergidas en agua caliente por 30 minutos, después se cortaron en trozos pequeños de aproximadamente 1 cm, para después pasarlos por la licuadora y de esta manera disminuir su tamaño y obtener una masa más uniforme, luego se almacenaron en el congelador de una nevera CHALLENGER COOL MASTER. Las crestas fueron utilizadas sin distinción de género.

4.3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

En base al método descrito por DA ROSA y col.¹⁸, para cantidades de crestas de 50-60 g, y evaluando el efecto del tiempo y la temperatura de acción de la *papaína* en cada extracción, se llevó a cabo la extracción de AH. Además de utilizar una sal de amonio cuaternaria menos toxica que el Cloruro de cetilpiridinio (CPC), el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), como agente precipitante del AH.

En primer lugar se dejaron las crestas en acetona con el fin de deshidratar y separar parte de los lípidos presentes en la muestra, esto se efectuó por 4 horas con agitación constante y se dejó en reposo hasta completar 24 horas a temperatura ambiente. La separación se llevó a cabo por centrifugación desechando el sobrenadante.

Posteriormente, se aplicó el método de Folch, el cual consiste en preparar una solución de cloroformo: metanol (2:1, V: V). El metanol afecta los enlaces covalentes entre lípidos y proteínas de las membranas e inhibe la acción de las enzimas lipasas (desnaturalizándolas), mientras que el cloroformo permite la dilución de los lípidos. Se realizó una centrifugación a 3200 rpm durante 20 minutos, en la centrifuga de referencia SIGMA 4-16KS, luego, se separó la fase

liquida, que contiene los lípidos, de la fase sólida. Las crestas deshidratadas y libres de lípidos, se dejaron secar al aire libre. Una vez secas las crestas, se pesaron de 50 a 60 g para cada extracción.

Cada muestra de crestas se depositaron en un vaso de precipitados, y se les adicionó 500 mL de solución buffer de acetato de sodio 100mM, pH 5, en presencia de 5mM de cisteína y 5mM EDTA disódico, esta solución permite crear un medio adecuado para la digestión proteolítica. Las crestas se dejaron en esta solución buffer, por 24 horas a una temperatura de 4 °C con agitación constante. Una vez cumplido este tiempo, se adicionó 1 g de papaína (SIGMA EC 3.4.22.2; 1,07144.0025) por cada reactor, y se dejó incubando la enzima a las condiciones establecidas para cada experimento (tabla 1). La digestión proteolítica se realizó con agitación constante.

Cumplido el tiempo de la digestión proteolítica para cada experimento, se realizó una centrifugación a 3200 rpm por 30 minutos, desechando el precipitado y recolectando el sobrenadante por separado, el cual contenía el AH en solución, para lograr la precipitación de se adicionó a cada reactor 3 gramos de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), formándose un complejo viscoso y pegajoso en el fondo, que luego de 24 horas a temperatura ambiente, el precipitado se recolectó por medio de centrifugación, y fue adicionado a una solución 2,0 M de cloruro de sodio y 20 mL de etanol absoluto, se dejó 24 horas en el congelador de la nevera. Luego, se adicionó 30 mL más de etanol absoluto y a las 24 horas se retiró cada extracto y se lavó con solución de etanol 80% y se guardó en la nevera. Finalmente se realizó liofilización de cada extracto, para obtener el AH puro y seco para posteriormente realizar la caracterización.

4.3.1. LIOFILIZACIÓN

Para el proceso de liofilización del AH extraído, se depositó en recipientes plásticos (Figura 6) y se les colocó papel de filtro en la parte superior y luego se

les colocó la tapa, se guardaron en la nevera y posteriormente se llevaron al CENIVAM. Las muestras se mantuvieron congeladas a una temperatura de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y al vacío ($0,133\text{ mbar}$) durante 3 horas, luego a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas manteniendo el vacío y finalmente a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 horas a las mismas condiciones de vacío. Una vez finalizado el proceso de liofilización se retiraron los recipientes de la bandeja del equipo, se sellaron con teflón para evitar el ingreso de humedad a los recipientes y se calcularon los rendimientos de extracción de cada muestra.

Figura 6. Ácido Hialurónico extraído y recipientes para liofilización.



4.4. CARACTERIZACIÓN DE ACIDO HIALURÓNICO

4.4.1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJO

Se empleó la técnica de espectroscopía de absorción infrarroja, en un equipo con transformada de Fourier (IR-TF), modelo TENSOR 27 de la firma BRUKER, con atenuador de reflexión total (ATR), del laboratorio de instrumentación química de la Universidad Industrial de Santander. La técnica se utilizó para la detección de los principales grupos funcionales presentes en el AH purificado para compararlo con espectros de AH estándar reportados en la literatura. Se tomó aproximadamente 0.5 mg del AH extraído en cada tratamiento y se depositaron en el ATR. El espectro se realizó mediante un barrido desde 4000 a 650 cm^{-1} .

4.4.2. ESPECTROSCOPIA RAMAN

Para la toma de espectros Raman, se utilizó el equipo Lab Ram HR Evolution de la marca HORIBA SCIENTIFIC, del laboratorio de microscopía de Parque Tecnológico de Guatiguará (PTG). Se elaboró una pastilla con AH, la cual, se depositó en un portaobjetos, en donde se le hace incidir un rayo láser de longitud de onda de 785 nm, con un ángulo de incidencia de 90°, en un rango de adquisición de 800-1700 cm^{-1} y 3050 cm^{-1} , con 20 scans y con un tiempo de adquisición de 45 minutos y 15 minutos, respectivamente.

4.4.3. RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR RMN

Para la obtención del espectro de protones por RMN, se tomó una muestra de 50 mg de AH y se depositaron en un vial de vidrio de 1,5 mL y se disolvió con 600 μL de agua deuterada D_2O . Debido a que el AH en presencia de agua forma un gel y la cantidad de D_2O era mínima, se formó una pasta, de la cual fue necesario tomar una muestra y disolverlo, luego se llevó al equipo RMN Bruker Ultrashield 400.

4.4.4. DETERMINACION DE LA VISCOSIDAD DE LA SOLUCION DE AH

Para la obtención de la viscosidad y posteriormente realizar el cálculo de la peso molecular promedio del AH, se prepararon 5 soluciones de concentración 2×10^{-3} – 2×10^{-2} g/mL de AH y midieron los tiempos de desplazamiento de la solución a través de un viscosímetro Cannon-Fenske como el que se puede ver en la figura 22. Las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura constante de 36° C para evitar alteraciones del líquido por variaciones de temperatura.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

5.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO

Durante el proceso de extracción, se utilizaron muestras de 60 gramos en promedio, las cuales se lavaron primero con agua y luego se dejaron en un baño de acetona. Se encontró, que a 3600 rpm, se logró una buena separación de la fase acuosa y la fase sólida, además, se dejó la parte sólida por 10 minutos al sol para lograr una mayor deshidratación, y lograr evaporar completamente la acetona.

La utilización de CTAB en solución 1% p/v, permite la formación de complejos de AH. El empleo de esta sal de amonio cuaternaria, no se encuentra reportado en la literatura para la extracción de AH partir de crestas de pollo, pero si para la obtención del polímero a partir de cordones umbilicales. Para la obtención de este complejo, se llevan a cabo centrifugaciones 3200 rpm por 30 minutos cada una. En la tabla 2 se encuentran registradas las características organolépticas del AH extraído, las cuales coinciden con las características organolépticas reportadas en la literatura.

Tabla 2. Características organolépticas AH extraído.

Parámetro	Característica
Aspecto físico	Polvo
Color	Blanco
Olor	Característico
pH	5.7 (solución 2×10^{-4} g/ml)
Solubilidad	Agua, glicerina, etanol (aprox. 15%)

Los resultados de cada uno de los tratamientos se muestran en la tabla 3 y, en la que se encuentran registradas las variables que se evaluaron y las cantidades de matriz, AH obtenido y la cantidad de *papaína* utilizadas para cada uno de los

tratamientos. En la tabla 4 se puede encontrar registradas los rendimientos de extracción y las desviaciones para cada tratamiento.

Tabla 3. Cantidades de crestas utilizadas y de AH obtenido.

TRATAMIENTOS	Crestas (g)	AH (g)	papaína (g)
25° C-12h	60,1345	0,1301	1,0559
	60,2234	0,1297	1,0345
25° C-24h	58,4426	0,4249	1,0845
	59,2315	0,3989	1,0533
25° C-36h	60,1895	0,3704	1,029
	61,2533	0,3655	1,0334
60° C-12h	60,9356	0,8661	1,0466
	60,8945	0,8588	1,0503
60° C-24h	59,6243	0,9182	1,0851
	59,8396	0,9064	1,2013
	60,0023	0,8965	1,0333
	60,0321	0,9003	1,0423
60° C-36h	61,7543	0,8027	1,0173
	60,9925	0,79	1,0322
80° C-12h	60,7008	0,807	1,0303
	60,8912	0,8034	1,0437
80° C-24h	59,0199	0,5168	1,0542
	60,2156	0,5235	1,0533
80° C-36h	60,5879	0,4929	1,0801
	60,3312	0,52	1,0127

Los resultados obtenidos fueron estudiados estadísticamente, es decir, se calculó el promedio de AH extraído en cada tratamiento, se calculó el rendimiento, la desviación estándar y el coeficiente de varianza.

Al comparar los resultados obtenidos, se puede apreciar que los rendimientos alcanzados para cada uno de los tratamientos son similares a rendimientos reportados por da ROSA y col., en un rango de 0,8-1% de rendimiento. En esta investigación se logró aumentar el rendimiento de extracción a un 1,5%, en el

tratamiento de 60°C-24h, superando el rendimiento obtenido en investigaciones anteriormente mencionadas.

Tabla 4. Tratamiento estadístico cada tratamiento.

TRATAMIENTOS	Rendimiento	Desviación estándar	% Coeficiente de Variación
25° C-12h	0,2199	0,0003	0,2177
25° C-24h	0,7018	0,0184	4,4634
25° C-36h	0,6030	0,0035	0,9417
60° C-12h	1,4225	0,0052	0,5985
60° C-24h	1,5264	0,0095	1,0480
60° C-36h	1,2891	0,0090	1,1277
80° C-12h	1,3921	0,0025	0,3161
80° C-24h	0,7996	0,0047	0,9108
80° C-36h	0,8451	0,0192	3,7837

Por otro lado, las desviaciones estándar obtenidas en cada uno de los tratamientos llevados a cabo, se muestra una alta reproducibilidad en la extracción. Los tratamientos de 60°C-12h y 24h, presentan la desviación estándar y el coeficiente de varianza menor, siendo los tratamientos de mayor reproducibilidad. Al analizar la desviación del tratamiento con el mayor rendimiento (60° C-24h), se observa, que su desviación estándar tiene un valor aceptable, ya que 0,0095 no representa gran incertidumbre en el proceso de extracción, además presenta un coeficiente de variación muy bajo.

Tabla 5. Valores de respuestas en rendimiento de extracción de AH, en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación.

Tiempo (B)	Temperatura (A)		
	25 °C	60 °C	80 °C
12	0,2199	1,4225	1,3921
24	0,7018	1,5264	0,7996
36	0,603	1,2891	0,8451

El análisis de varianza (ANOVA) para el diseño experimental que se planteó presenta los siguientes datos:

Tabla 6. Análisis de varianza ANOVA en Microsoft Excel 2010

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	0,0192089	2	0,0096045	8,9711	0,00926181	6,944272
Columnas	1,2323694	2	0,6161847	10,471	0,00856058	6,944272
Error	0,3561218	4	0,0890304			
Total	1,6077002	8				

Para este análisis se utilizó la herramienta estadística de Microsoft Excel 2010, la cual se denomina “análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo”, luego de seleccionar el tipo de análisis, se introduce el rango de entrada, que corresponde a los valores de respuesta Tabla 5 en rendimiento de extracción del AH, en las condiciones de tiempo de incubación temperatura. El análisis de varianza permite determinar el valor estadística “F” que representa el grado de parecido existente entra las medias que se están comparando, siendo una

estimación de la varianza poblacional basada en la variabilidad existente entre las medias experimentales.

Para el diseño experimental planteado, el valor de “F” por filas correspondiente al tiempo de incubación de la papaína, es de 8,97, cuyo valor es significativo ya que está por encima del valor crítico para “F” (6,94) y la probabilidad “P” es de 0,009 está por debajo del valor mínimo 0,05.. El valor de “F” de las columnas, correspondiente a la Temperatura de incubación, es de 10,47 y también está por encima del valor crítico y la probabilidad “P” es 0,0080 menor que 0.05. Esto significa que el efecto del tiempo de incubación y de la Temperatura es significativo en el proceso de extracción de AH a partir de las crestas de pollo.

Figura 7. Reactores en presencia de la papaína.

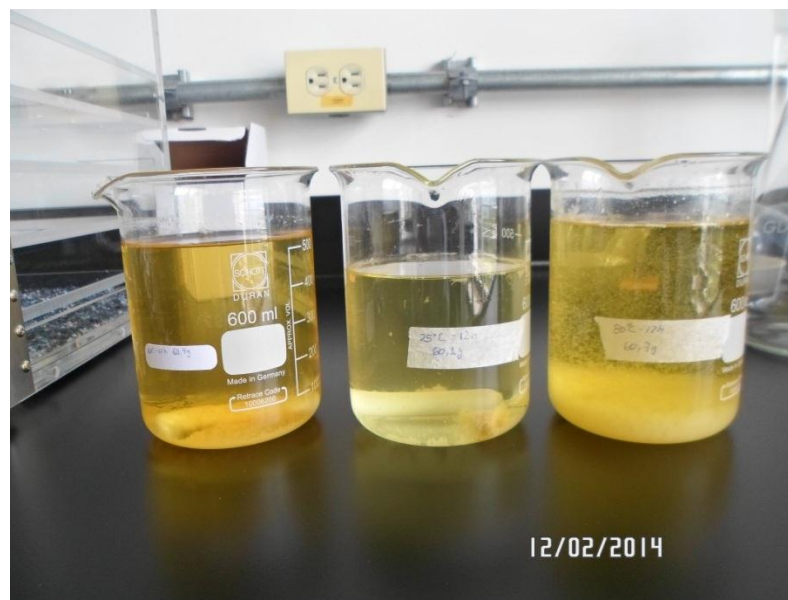


En las figuras 7, 8 ,9 y 10 se pueden observar las etapas de digestión proteolítica, en donde la figura 7 muestra cada uno de los reactores en presencia de la papaína, la figura 8 se puede observar la forma que en que el complejo AH-CTAB precipita por gravedad después de un proceso de agitación, y posteriormente se puede observar en cada uno de los reactores el precipitado en el fondo.

Figura 8. Precipitación de complejo AH-CTAB.



Figura 9. Complejo AH-CTAB de tres tratamientos diferentes, depositados en el fondo del reactor.



Para el proceso de purificación se lavaron cada uno de las extracciones con solución de NaCl 2M, y Etanol absoluto para liberar el AH del complejo formado en la precipitación, estos lavados se lleva a cabo -4° C.

Figura 10. Lavado y liberación del AH extraído.



5.2. INFRARROJO

La caracterización del AH, en primer lugar se llevó a cabo por medio de la técnica de espectroscopía infrarroja, utilizando un espectrómetro de infrarrojo con una celda de ATR. Se tomaron los espectros de infrarrojo para cada tratamiento de extracción, y luego se compararon con el espectro infrarrojo de AH comercial y de AH extraído de crestas de pollo, reportados en la literatura (figura 15, figura 16).

En las figuras 11 se puede ver el espectro infrarrojo de los tratamientos 60° C-24h, y en la figura 12 y 13, correspondientes a los reportados en la literatura, para AH de una marca comercial, y AH extraído de crestas de pollo usando CPC como agente para la formación de complejo de precipitación. Se puede ver que las extracciones realizadas con estas condiciones, presentan un mayor grado de pureza y concordancia con lo que se reporta en la literatura.

En cuanto al análisis de las bandas en cada uno de los espectros, se observan bandas características de polisacáridos a 3329 cm^{-1} (figura 11), 3435 cm^{-1} (figura 12 y 13) asociadas al estrechamiento en el plano del grupo O-H (correspondientes a los OH unidos al anillo); a 2923 cm^{-1} (figura 11), 2925 cm^{-1} (figura 13), señales características de estiramientos C-H en el plano de grupos metilo (en la figura 12

aparece una pequeña banda pero no es identificada por los autores); a 1625 cm^{-1} (figura 11), 1618 cm^{-1} (figura 12), 1645 cm^{-1} (figura 13), que corresponden a grupos amida I correspondiente a la tención N-H, además de la tención del enlace C=O; 1396 cm^{-1} (figura 11), 1412 cm^{-1} (figura 12), 1416 cm^{-1} (figura 13) pertenecientes a el estrechamiento C-O del plano del ácido glucurónico; en 1043 cm^{-1} y 611 cm^{-1} (figura 11), 1043 cm^{-1} y 611 cm^{-1} (figura 12), 1051 cm^{-1} (figura 13) correspondiente al enlace C-O-C correspondiente al enlace β glicosídico, y a la tención correspondiente al enlace C-OH.

Alrededor de 1490-1510, se alcanza a ver una pequeña banda muy solapada, que podría asignársele a al enlace amida II, que corresponde a la tención del enlace N-H.

Tabla 7. Frecuencias de absorción tratamiento 60° C-24h .

	Banda (cm^{-1})	Grupo funcional
60° C-24h	3329	-OH; N-H
	2923	-CH
	2854	-CH
	1625	C=O; amida I (N-H)
	1396	C-O (ácido)
	1319	CH_2 ; CH_3 ; C-O-H C-O; Amida III (C-N)
	1041	C-OH; C-O-C enlace β
	611	C-O-C

Tabla 8. Frecuencias de absorción en IR de AH comercial y AH extraído de crestas de pollo reportados en la literatura.

	Banda (cm^{-1})	Grupo funcional
AH comercial	3435	-OH, -NH
	1618	C=O; amida I (N-H)
	1412	C-O (ácido)
	1043	C-OH; C-O-C enlace β
	611	C-O-C
AH extraído de crestas de pollo	3435	-OH, -NH
	2925	-CH
	1645	C=O; amida I (N-H)
	1416	C-O (ácido)
	1377	CH_2 ; CH_3 ; C-O-H C-O; Amida III (C-N)
	1237	-CO
	1051	C-OH; C-O-C enlace β

Figura 11. Espectro Infrarrojo del tratamiento 60° C-24h

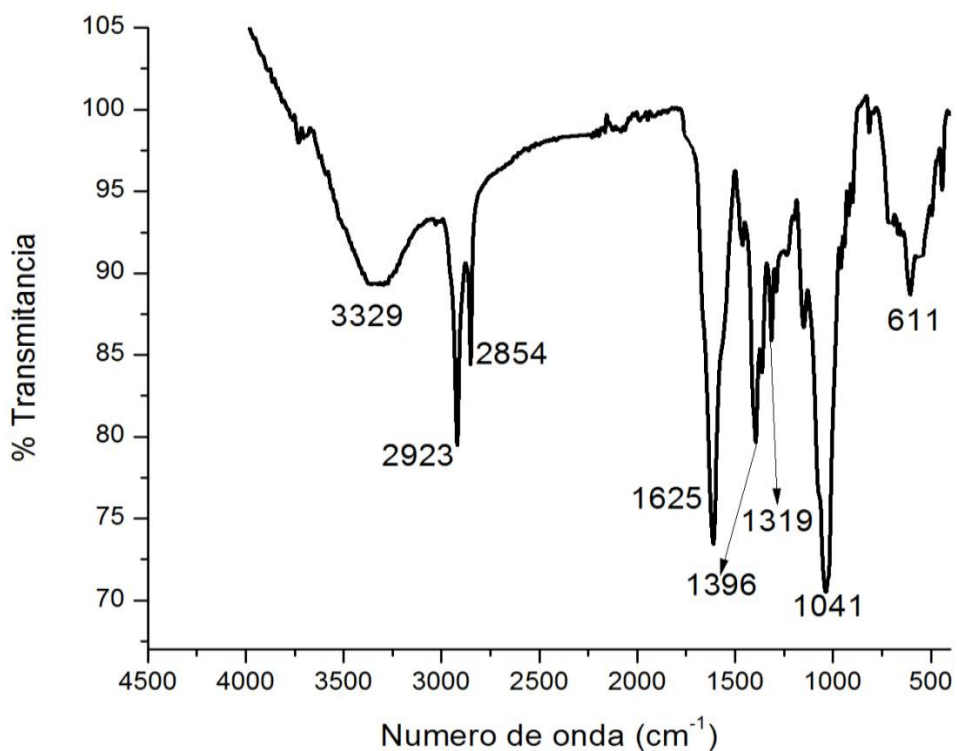


Figura 12. Espectro infrarrojo reportado en la literatura del AH comercial.

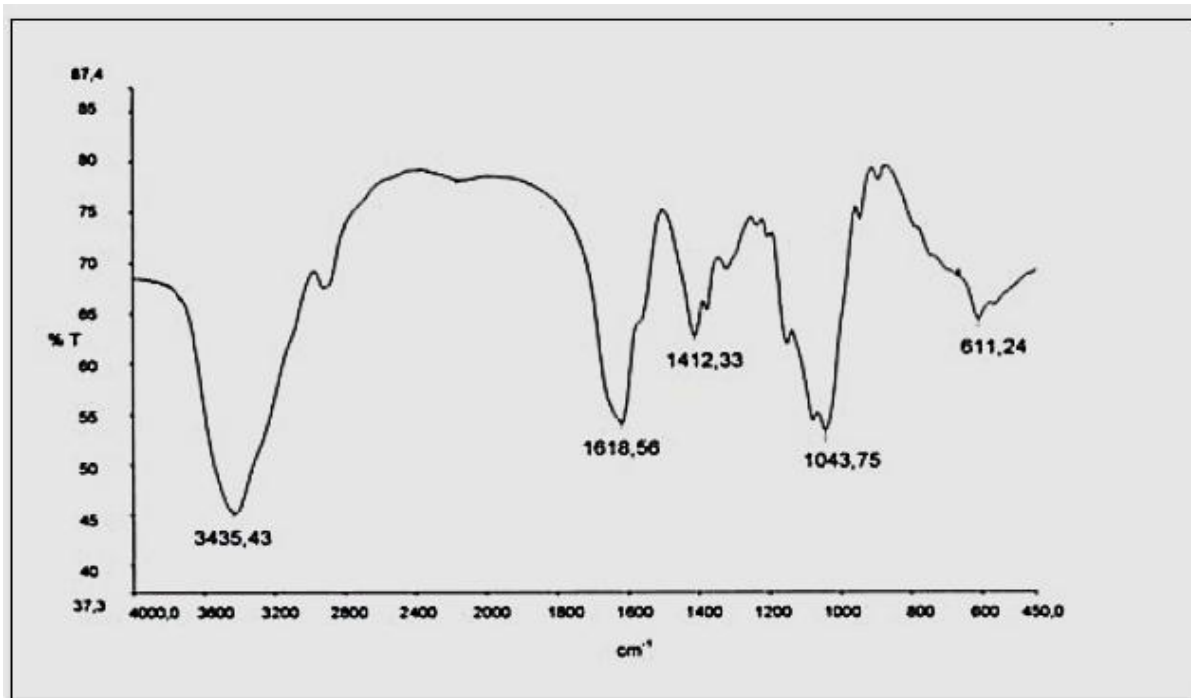
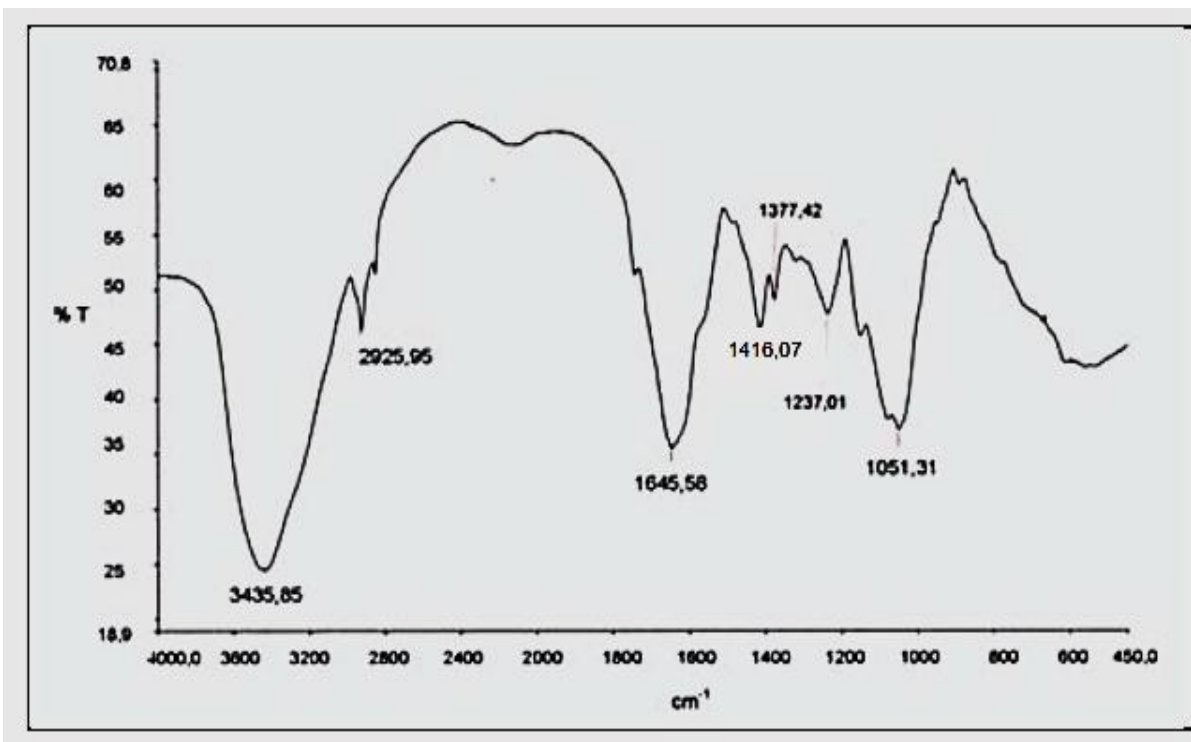


Figura 13. Espectros infrarrojo reportados en la literatura del AH extraído de crestas de pollo.



5.3. RAMAN

Como se estableció previamente, el espectro Raman es característico para cada especie dispersante, y el AH no es la excepción, y por tanto de los niveles de energía involucrados en los efectos vibracionales y/o rotacionales del mismo. Por tanto, en las figuras 15 y 16, se encuentran los espectros experimentales del AH extraído de las crestas de pollo. El espectro Raman del AH es uno solo, sin embargo, se tomaron dos espectros con diferente rango de adquisición, para mejorar la resolución de cada una de las partes, debido que según lo que se reporta en la literatura en el rango de 1800 a 2500 cm^{-1} , no se encuentran bandas propias del biopolímero, como se ve en la figura 17 y 18 correspondientes al espectro Raman experimental⁴³.

En la tabla la 13 se pueden ver los desplazamientos Raman y su respectivo grupo funcional. Al comparar los espectros Raman del AH extraído con el espectro reportado por Barrett y col.⁴³ se puede ver que los espectros poseen las mismas bandas de dispersión, de modo que se puede comprobar que la muestra analizada por esta técnica espectroscópica, corresponde a AH, sin embargo, en el espectro no se ven las bandas de 1301, 1658, 2852 cm^{-1} las cuales, en la literatura consultada presentan una muy baja intensidad.

Las asignaciones de bandas que hacen referencia a amida I, II o III, no hace referencia a amidas primarias secundarias o terciarias (Figura 14), hace referencia al tipo de vibraciones que existen entre los átomos del grupo funcional, de modo que amida I está asociada principalmente con la vibración de tensión del C=O, la banda amida II está relacionada con la vibración de flexión del enlace N-H, y la banda amida III está relacionada con la tensión C-N.

Figura 14. Dímero de AH señalando los tipos de enlaces del grupo amida.

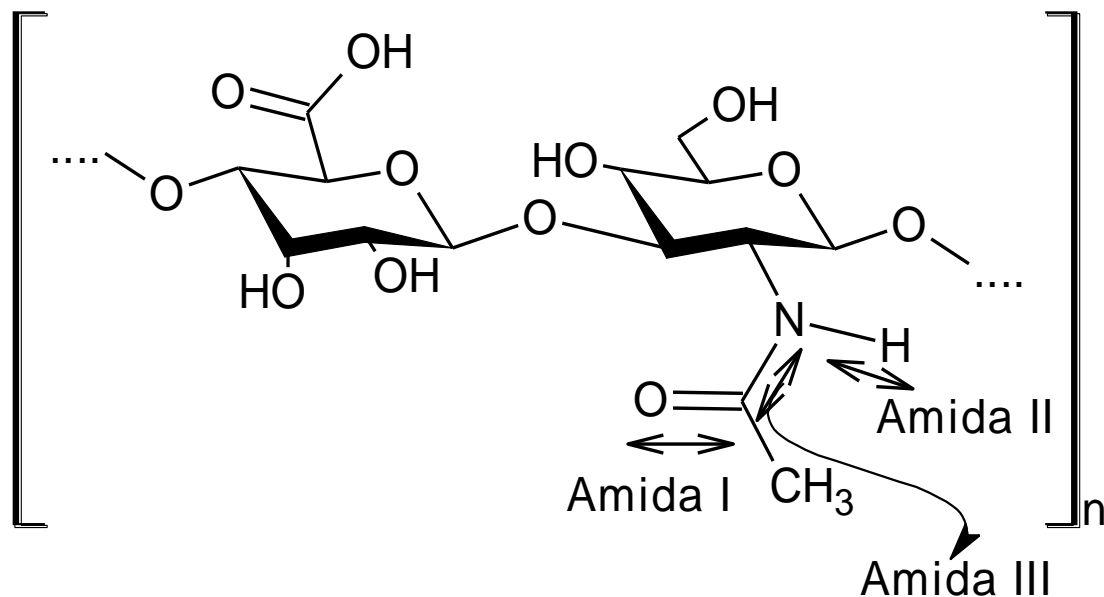


Tabla 9. Comparación de los desplazamientos Raman en el AH extraído y un espectro reportado en la literatura.

Banda (cm ⁻¹) AH extraído	Banda (cm ⁻¹) AH reportado en literatura	Asignación de la banda
896	899	Deformación C ₍₁₎ -H; enlaces β
946	945	C-O-C
1049	1050	C-O, C-C
1089	1100	Enlace C-OH, grupo acetil
1129	1129	Enlace C(4) – OH; enlace C ₍₄₎ -H
1206	1210	Torsión CH ₂
1301		Enlace C-H y Amida I
1374	1376	Deformación CH ₃ ; COO ⁻ estiramiento simétrico.
1418	1413	COO ⁻ y amida III
1658		Amida II
2852		CH ₂
2903	2950	CH
2935	2994	NH; OH

Figura 15. Espectro Raman en rango de adquisición 800-1800 cm^{-1}

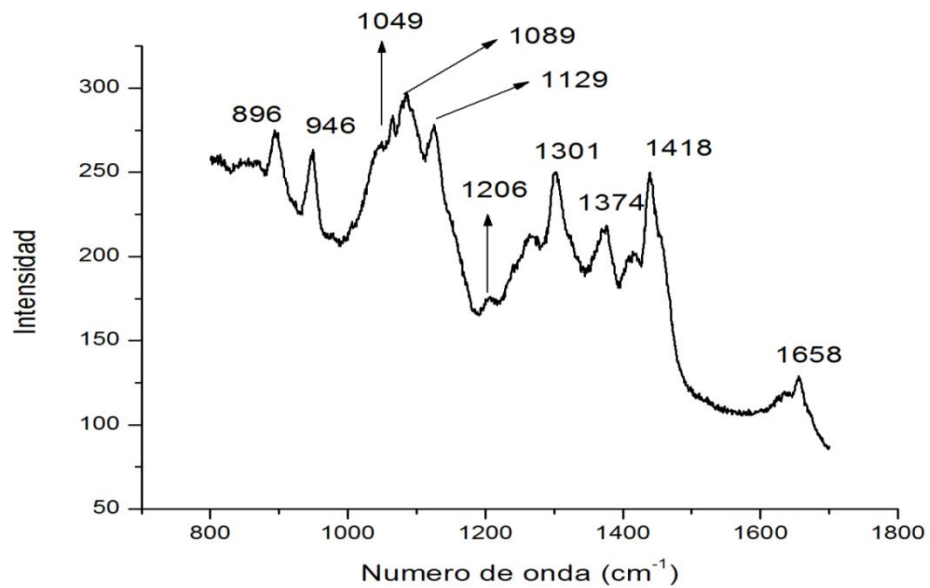


Figura 16. Espectro Raman en rango de adquisición 2800-3500 cm^{-1}

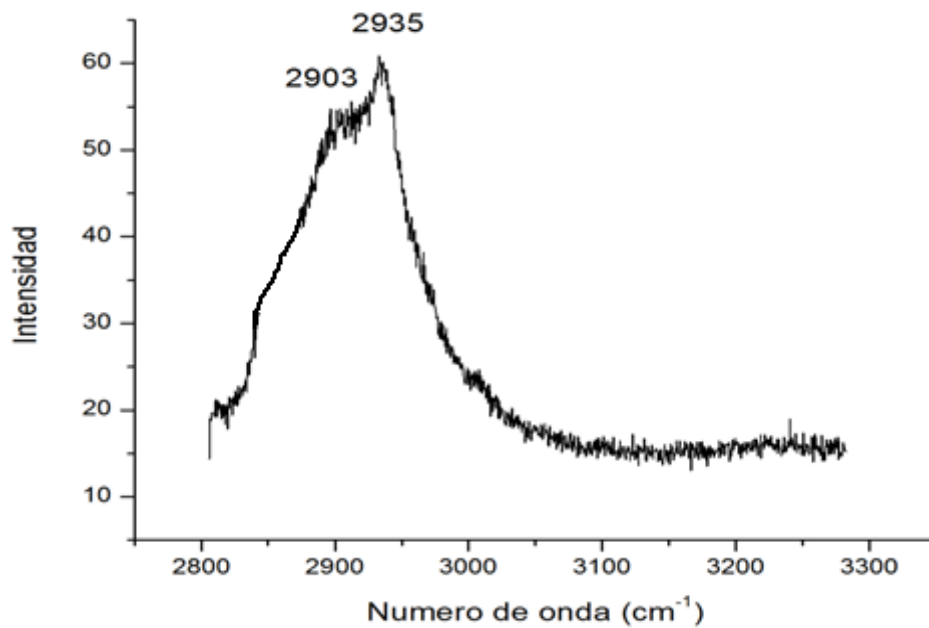


Figura 17. Espectro de AH reportado en la literatura, en un rango de adquisición de 800-1600 cm^{-1} .

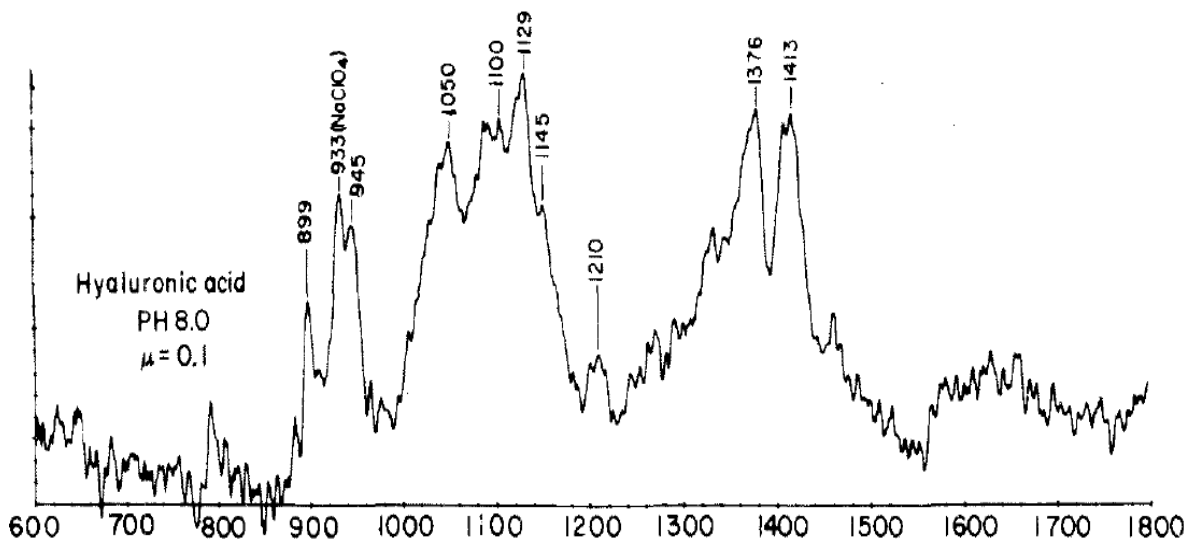
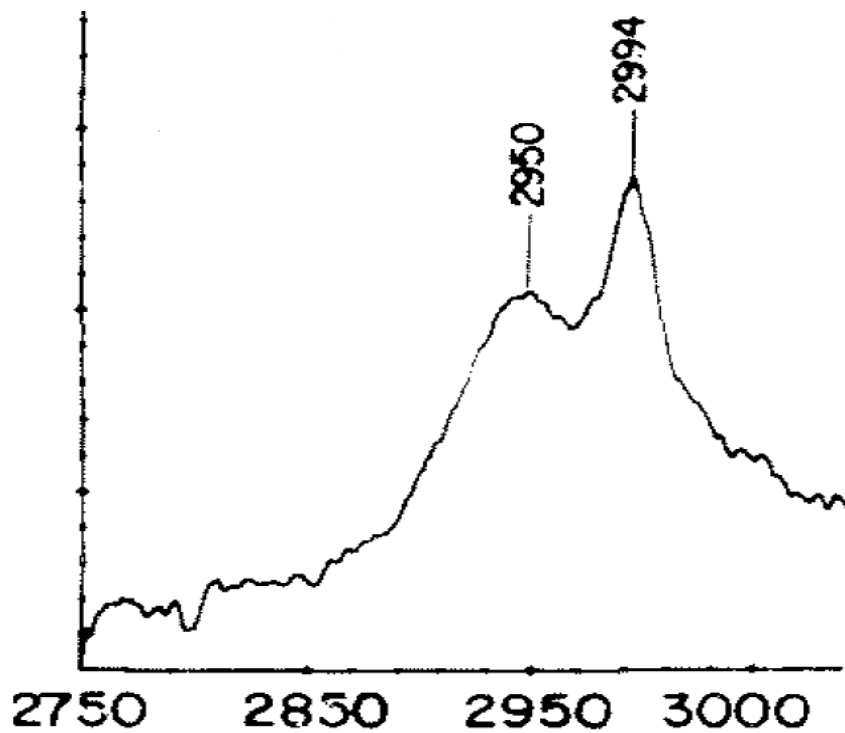


Figura 18. Espectro de AH reportado en la literatura, en un rango de adquisición de 2700-3000 cm^{-1} .



5.4. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN CRESTA DE POLLO POR VISCOSIMETRIA

Para la determinación del peso molecular del AH, se realizó la determinación de viscosidad intrínseca, utilizando un viscosímetro Cannon-Fenske, acoplado a un baño de agua para mantener la temperatura a 36° C, como se ve en la figura 19.

La viscosidad intrínseca fue calculada usando la ecuación de la recta obtenida para la viscosidad reducida dada en la figura 20. Esta grafica se obtiene de graficar la viscosidad reducida (η reducida) y la viscosidad inherente (η inherente), según la tabla 10, en dónde t , corresponde al tiempo de flujo de la solución de AH; t_0 , es el tiempo de flujo del solvente (agua); C , es la concentración de AH en la solución.

Figura 19. Montaje para la determinación de viscosidad intrínseca con viscosímetro Cannon-Fenske.



En la tabla 11 se encuentran las concentraciones de cada una de las soluciones de biopolímero que se corrieron en el instrumento de medición de viscosidad, con los datos obtenidos de viscosidad relativa, reducida e inherente. Se puede observar que a medida que aumenta la concentración de AH, se puede ver un aumento en el valor de la viscosidad relativa y por tanto, un aumento en la viscosidad reducida. Las medidas de viscosimétricas se hacen generalmente en disoluciones que contienen 0,01-0,001 g de polímero por mililitro de disolución, sin embargo para este estudio se realizaron diluciones de menor concentración, debido a que se esperaban pesos moleculares muy altos (10^6 Da).

Tabla 10. Ecuaciones para la construcción de gráfica de viscosidad intrínseca

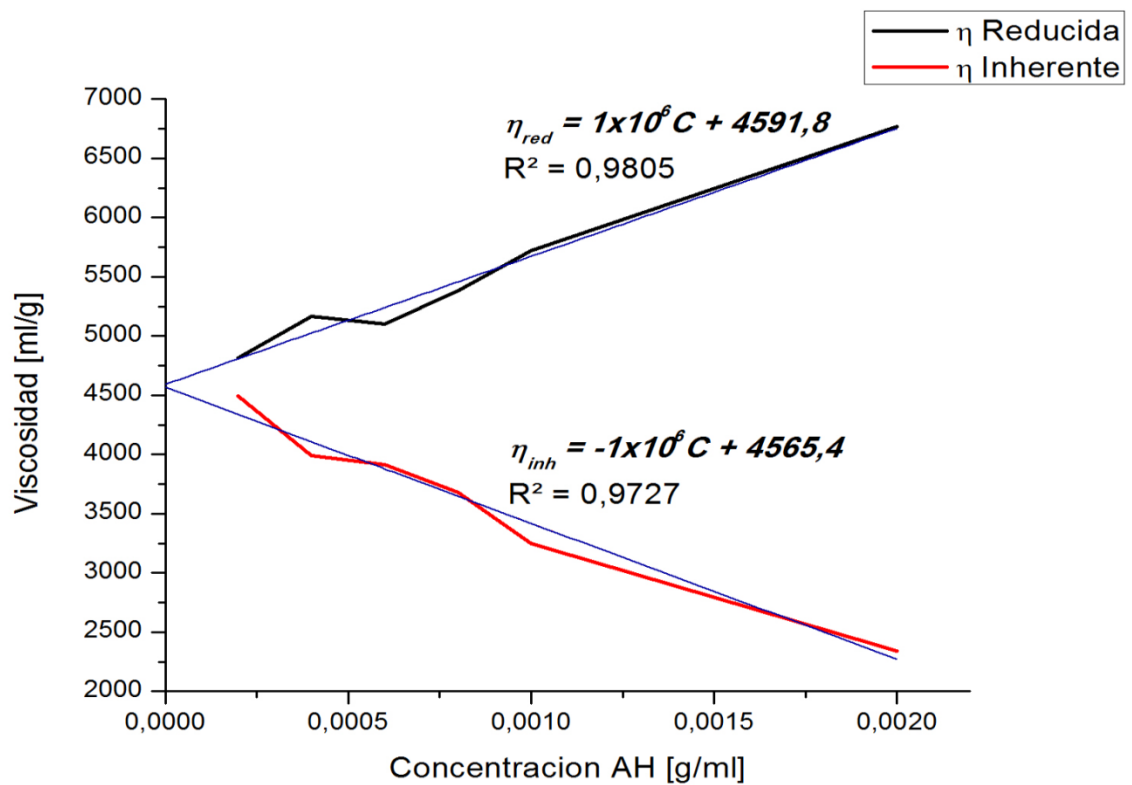
Viscosidades	Ecuación	Símbolo
η relativa	$\eta = t/t_0$	η_{rel}
η específica	$\eta_{rel} - 1$	η_{sp}
η reducida	η_{sp}/C	η_{red}
η inherente	$\ln \eta_{rel}/C$	η_{inh}
η intrínseca	$\lim_{(C \rightarrow 0)} (\eta_{sp}/C)$	$[\eta]$

Se trabajó a una temperatura constante de 36 °C, para evitar efectos en la medición con los cambios de temperatura, debido a que el instrumento de medición es muy básico y podría ser afectado por los cambios de la temperatura ambiente. La determinación de la viscosidad intrínseca se realizó por medio de la extrapolación de la recta de viscosidad reducida a un valor de concentración de AH igual a cero, de la cual se obtuvo una viscosidad intrínseca de 4591,8 ml/g, como se puede ver en la figura 20.

Tabla 11. Valores de viscosidades y concentración para la determinación de la viscosidad intrínseca de AH.

Concentración AH (g/ml)	η relativa	η reducida	η inherente
0,0002	1,96244	4812,205	4489,323
0,0004	3,06573	5164,319	3987,442
0,0006	4,06103	5101,721	3913,423
0,0008	5,30516	5381,455	3678,323
0,0010	6,72300	5723,004	3245,453
0,0020	14,53991	6769,953	2343,123

Figura 20. Viscosidad reducida e inherente, en función de la concentración de AH.



Como parte de la caracterización del AH extraído, se determinó el peso molecular (promedio), utilizando la relación existente entre el peso molecular y la viscosidad

Intrínseca, valor obtenido a partir de la figura 16. Esta relación viene dada la ecuación de Mark-Houwink⁴⁴

$$[\eta] = K\bar{M}^{-a}$$

En donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca; K , es la constante de proporcionalidad característica para el polímero de AH y el disolvente, y el exponente a , es una función de la forma de la hélice del polímero en la disolución. Las constantes de Mark-Houwink para estos polímeros se obtuvieron de la literatura ($K = 5.7 \times 10^{-2}$ mL/g y $a = 0,76$)⁴⁵ y $[\eta]=4591,8$ ml/g obtenido de la figura 16.

$$[\eta] = K\bar{M}^{-a}$$

$$\log_{10} 4591,8 = \log_{10} 5.7 \times 10^{-2} + 0,76 \log_{10} \bar{M}$$

$$\bar{M} = 1.2 \times 10^6 \text{ Da}$$

5.5. RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

Para terminar de caracterizar el AH extraído, se llevó a cabo la obtención del espectro de protones del material, del cual se obtuvieron las señales que se ven en la figura 22. Las señales corresponden a:

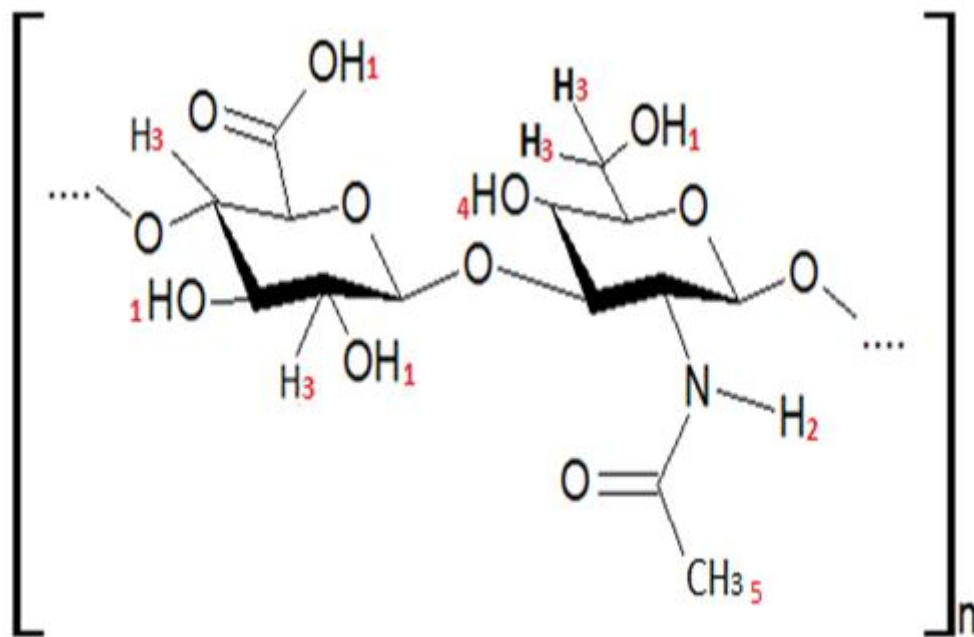
Tabla 12. Desplazamientos químicos de ¹H-RMN del AH.

Numero	Desplazamientos químico (ppm)	Asignación
1	4,562	OH
2	4,365	NH
3	3,560	CH ₂ y H de las conformaciones β de los anillos piranosidos.
4	3,530	CH ₂
5	1,871	CH ₃

En el espectro RMN de protones del AH, se presentan a campos altos un triplete con un desplazamiento de 1.871 ppm correspondiente al metilo del grupo acetamido de la N-acetilglucosamina, además en esta zona se puede ver muchas

señales basura, debidas posiblemente a la dificultad presentada para la toma del espectro. A 3,567 un doblete correspondiente al CH₂ también perteneciente a la N-acetilglucosamina, pero este corresponde a uno de los carbonos piranósidos, sin embargo en este desplazamiento puede haber un solapamiento de las señales correspondientes a los protones unidos al anillo piranósidos y que corresponden a la conformación β del ácido glucurónico⁴⁶. En 4,365 se observa un singlete que hace referencia al protón del grupo NH, sin embargo no es muy confiable esta señal, debido a que los protones de este tipo (N-H) por lo general se ven muy disminuidos y por último un singlete en 4,562 correspondiente al protón del grupo OH. En la figura 26 se puede observar el espectro ¹H-RMN del AH nativo reportado en la literatura⁴⁷.

Figura 21. Dímero de AH con la asignación de los protones vistos en el espectro ¹H-RMN.



La asignación de números en color rojo en la figura 21, hace referencia a la identificación del protón y no a un subíndice, con el objetivo de identificarlos por

separado en la tabla 12; a diferencia del número en color negro por ejemplo del grupo metilo, que si corresponde al subíndice.

Figura 22. Espectro ^1H -RMN del AH.

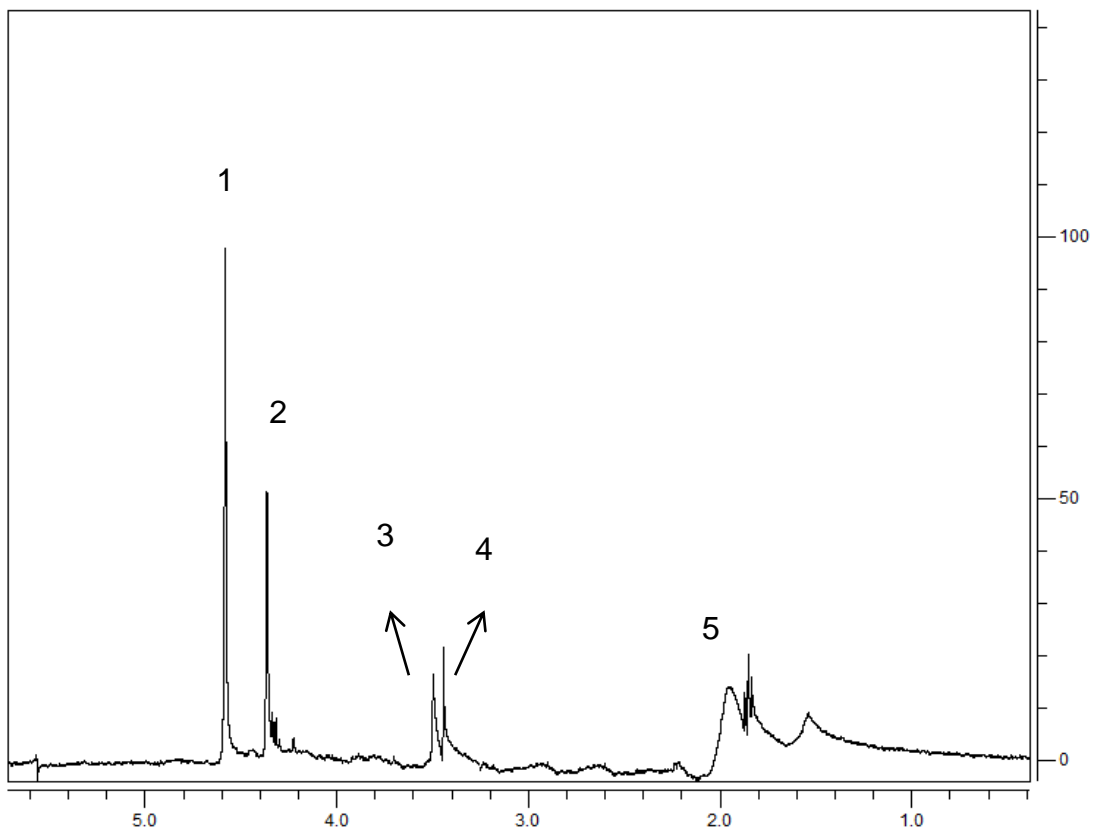
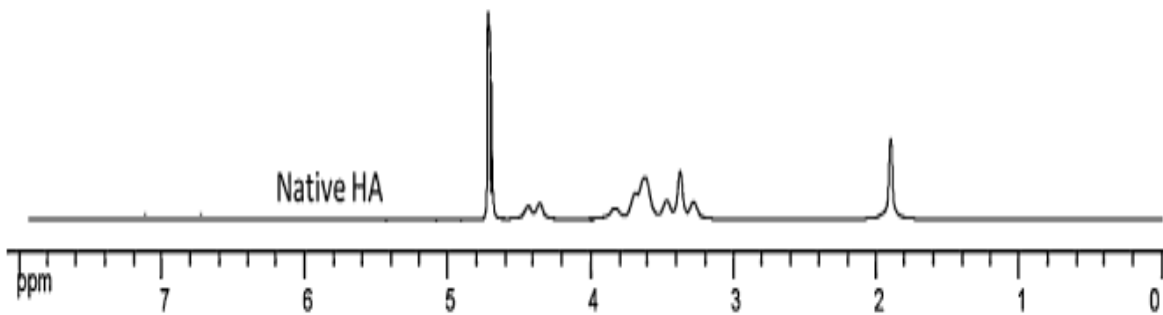


Figura 23. Espectro ^1H -RMN de AH reportado en la literatura ^[60].



CONCLUSIONES

Por medio de los estudios realizados con las técnicas espectroscópicas de IR y Raman, se pudo corroborar que el material obtenido corresponde al AH con alto grado de pureza, presente en las crestas de pollo, debido a que se pudo visualizar las bandas características de los grupos funcionales propios de este biopolímero.

Se pudo observar la ausencia de bandas correspondientes al CTAB utilizado para formar el complejo de precipitación en el proceso de extracción, de modo que la tercera etapa de la metodología, correspondiente a la purificación del material, fue exitosa.

La determinación de la viscosidad de una serie de soluciones de AH, fue necesaria para lograr determinar que la masa molecular del biopolímero extraído correspondiera a 1200 kDa, cuyo valor se encuentra en el rango de masas para este tipo de polímeros reportados en la literatura. Con este valor de masa molecular obtenido, se puede utilizar el AH extraído para la formulación de tópicos y demás con el objetivo de evitar la deshidratación del tejido cutáneo.

El proceso de digestión proteolítica, bajo la acción de la *papaína* durante 24 horas y a una temperatura 60 °C, fue el tratamiento más eficiente, con 1,5% rendimiento de extracción de AH, dando un aumento del 0,5% en procedimientos realizados en otras investigaciones. Esto se debe a la utilización de CTAB como agente precipitante en el proceso de separación del AH y la matriz natural usada.

Con el análisis de varianza (ANOVA), se pudo corroborar que las variaciones de tiempo y temperatura de la *papaína* tienen un efecto significativo en el rendimiento de extracción como valor de respuesta en el diseño experimental planteado.

REFERENCIAS

1. NAGORSKI, C.; Opalensky, D.; Bettelhein, F. A study of collagen-hyaluronan interaction through swelling in poliacrylamide gels. *Res. Commun Mol. Pathol. Pharmacol.* **1995**, 89, 179-185.
2. GHERSETICH, I.; Lotti, T.; Campanile, G.; Grappone, C.; Dini, G. Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *Int. Jour. Derma.* **1994**, 33, 119-122.
3. PIRES, A.; Macedo, A.; Eguchi, S.; Santana, M. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource Technology.* **2010**, 101, 6506-6509.
4. DA ROSA, C; Tovar, A; Mouãro, P; Pereira, R; Barreto, P; Beirão, L. H. Purification and characterization of hyaluronic acid from chicken combs. *Ciência Rural.* **2012**, 42, 1682-1687.
5. KANG, D.; Kim, W.S.; Heo, I.; Park, Y.; Lee, S. Extraction of hyaluronic acid (HA) from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation (FIFFF) coupled with multiangle light scattering (MALS) 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.* **2010**, 33, 3530-3536.
6. Federación Nacional de Avicultores de Colombia (FENAVI). Producción Publico [Bogotá, Colombia] Documento Excel: Información Por Departamentos. [citado 22 feb. 2014] Disponible en Internet: <URL:http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2472&Itemid=1330#magictabs_fqjfe_1 >
7. NUNES, R.; Pozza, P.; Nunes, C.; Campestrini, E.; Kühl, R.; Rocha, L.; Costa, F. Valores energeticos de subproductos de origen natural para aves. *R. Bras. Zootec.* **2005**, 34, 1217-1224.
8. POLI, S.; Bochiala, G.; Casanto, E. Proceso para la preparación de ácido hialurónico mediante fermentación con *Streptococcus*. **1998**, Italia, Pat. 199407269415.
9. MEYER, Karl.; Palmer, John. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Bio. Chem.*, **1934**, 107, 629-634.
10. BOAS, N. Isolation of hyaluronic acid from chock's combs. *J. Bio. Chem.*, **1949**, 181, 573-575.
11. MURANO, M.A.; Montemayor, M.i.; Cabo, M.; Vazquez, J.; Gonzalez, M. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. *Food and Bio. Pro.* **2012**, 90, 491-498.

12. KVAN, C.; Granese D.; Flaibani A.; Zanetti F.; Paoletti S. Purification and characterization of hyaluronan from synovial fluid. *Anal. Biochem.* **1993**, 211, 44-49.
13. MUNAKATA, H.; Yosizawa, Z. Extraction of Hyaluronic Acid from Rabbit Skin with Lanthanum Chloride. *Tohoku . J. exp. Med.* **1998**, 132, 337-340
14. SHIEDLIN, A.; Bigelow, R.; Christopher, W.; Arbabi, S.; Yang, L; Maier,R.; Wainwright,N.; Childs, A.; Miller, R. Evaluation of Hyaluronic acid from Different Sources: Streptococcus zooepidemicus, Rooster Comb, Bovine Vitreous and Human Umbilical Cord. *Biomacromolecules.*, **2004**, 5, 2122-2127.
15. SHIBATA, S.; Yoneda S.; Yanagishita M.; Yamashita Y. Isolation of proteoglycans (versicans) aggregate from rat dental pulp . *Archives of oral biology.* **2000**, 45, 563-568
16. SUNWOO, H.H.; Nakano T.; Sim J.S. Isolation and characterization of proteoglycans from growing antlers of wapiti. *Biochem. Mol. Bio.* **1998**, 124, 437-442.
17. DA ROSA, C; Hoelzel, S.C; Viera, V; Barreto, P; Beirão, L. H. Atividade antioxidante do ácido hialurônico extraído da crista de frango. *Ciência Rural.* **2008**, 38, 2593-2598.
18. DA ROSA, C.; Mouão, P.; Pereira, R.; Barreto, P.; Beirão, L. H. Extraction, quantification, and molar mass determination of hyaluronic acid extracted from chicken crest. *Alim. Nutr.* **2007**, 18, 237-240.
19. KUO, W. Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products. Primera edicion. Boston: CRC Taylor and Francis., **2006.**, 1.
20. LAGO, G. Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtencion de ácido hialuronico y sus fracciones. Tesis de doctorado. La Habana. Centro de histoterapia placentaria, instituto de farmacia y alimentos. Departamento de quimica Farmaceutica. **2007**.
21. NECAS, J.; Bartosikova, P.; Brauner, P.; Kolar, J. Hyaluronic acid (Hyaluronan): a review. *Vet. Med.* **2008**, 8, 397-411.
22. WEISSMAN B., Meyer K., The structure of hialobiuronic acid from umbilical cord. *J.Am.Chem.* **1954**, 76, 1753-1757.
23. MIKELSAAR, R.H.; Scott, J.E. Molecular modelling of secondary and tertiary structures of hyaluronan compared with electron microscopy and NMR data. *Glyconj. J.* **1994**, 11, 65-71.
24. SCOTT, J.; Heatley F. Hyaluronic form specific stable tertiary structure in aqueous solution: A13C-NMR study. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96,4866-4855.
25. STACEY, M., Barker S. A Carbohydrate of Living Tissues. *J Clin Pathol.* 1962, 215 -217.
26. TUYEN, T.N. Reticulated acidic polysaccharides and their uses. **1997**, Pat No 9600065.

27. COLIN, J.; Durand, L.; Mouillon, M.; Lagoutte, F. Comparative clinical trial of AMO Vitrax and Healon use in extracapsular cataract extraction. *J. Cataract Refract Surg.* **1995**, 21, 196-201.
28. GÓMEZ, J.A.; Amankwah, R.; Powell-Richards, A.; Dua, S. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol.* **2004**, 88, 821-825.
29. LIMA, A.; Cavalcanti, R.; Aldo da Cunhay, M. The topic effect of hyaluronic acid on the healing of cornea an experimental study in rats. *Rev. Bras. Oftalmol.* **1999**, 58, 933-937.
30. LYM, S.; Suh, Y.; Park C.K. Effect of hyaluronic acid on the polymorphonuclear leukocyte (PMN) release of active oxygen and protection of bovine corneal endothelial cells from activated PMNs . *Korean J. Ophthalmol.* **2004**, 18, 23-28.
31. MACNUGTH, P.T. Artificial tears. **2001**, UE Pat. 91904702.
32. KELLY, M.A.; Moskowitz, R.W.; Lieberman, J.R. Hyaluronan therapy: Looking toward the future. *Am. J. Orthop.* **2004**, 33, 23-28.
33. HASCALL, V.C. Hyaluronan, a common thread. *Glycoconjugate J.* **2000**, 17, 607-616.
34. ROSIER, R.N.; O' Keefe, R.J. Hyaluronic acid therapy. Instructional course lectures. **2000**, 49, 495-502.
35. COLTHUP, N. Introduction to infrared and Raman Spectroscopy. New York. Academic Press, **1964**, Pág. 30
36. SKOOG, D.; Holler, J.; Nieman, T. Principios de Análisis Instrumental, quinta edición. Mcgraw-Hill, **1992**, Pág. 409-410.
37. STUART, B.; Ando, D. Biological Applications of Infrared Spectroscopy, primera edicion. Londres: Series Wiley, **1997**. Pág. 1-5.
38. CHEMTOB, S. Attenuated total reflection [online][California, USA] 2010[cited 25 may. 2014]. Available from Internet:<URL: <http://www.gps.caltech.edu/~chemtob/atr.htm>
39. OBRADOVIC, J.; Newnham, D.; Taday, P. Attenuated total reflection explores the terahertz region. *American laboratory.* [online] [cited 25 may. 2014]. Available from Internet:<URL: <http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/1457-Attenuated-Total-Reflection-Explores-the-Terahertz-Region/>

40. COLTHUP, N. Introduction to infrared and Raman Spectroscopy. New York. Academic Press, **1964**, Pág. 30
41. CONTRERAS, G. Espectroscopía Raman y estructura molecular. Primera edición. Concepción. Editorial Anibal Pinto S. A. **1987**, Pág. 2-3.
42. HORNAK, J. The basics of NMR. [online] [Rochester, USA] 1997 [cited 25 may. 2014]. Available from Internet:<URL: <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>
43. BARRENT, T, W; PETICOLAS, W, L. Laser Raman inelastic light scattering investigations of hyaluronic acid primary and secondary structure. *J. Raman Spect.* **1979**, 8, 35-38.
44. SEYMOUR, R; Carraher, C. Introducción a la química de los polímeros. Reverte **1995**, Pág. 50-59.
45. SHIMADA, E; Matsumura, G. Viscosity and molecular weight of hyaluronic acid. *J. Biochem.* **1975**, 78, 513-517.
46. RAMOS, L; Caldeira, M; Gil, V. NMR study of uronic acids and their complexation whit molybdenum (VI) and tungsten (VI) oxoions. *Carbohydrate research.* **1996**, 286, 1-15.
47. ZUBER, G; Schanté, C. Improvement of hyaluronic acid enzymatic stability by the grafting of amino-acids. *Carbohydrate Polymers.* **2012**, 87, 2211-2216.

BIBLIOGRAFÍA

- BARRENT, T, W; Peticolas, W, L. Laser Raman inelastic light scattering investigations of hyaluronic acid primary and secondary structure. *J. Raman Spect.* **1979**, 8, 35-38.
- BOAS, N. Isolation of hyaluronic acid from chock's combs. *J. Bio. Chem.*, 1949, 181, 573-575.
- CHEMTOB, S. Attenuated total reflection [online][California, USA] 2010[cited 25 may. 2014]. Available from Internet:<URL: <http://www.gps.caltech.edu/~chemtob/atr.htm>
- COLIN, J.; Durand, L.; Mouillon, M.; Lagoutte, F. Comparative clinical trial of AMO Vitrax and Healon use in extracapsular cataract extraction. *J. Cataract Refract Surg.* **1995**, 21, 196-201.
- COLTHUP, N. Introduction to infrared and Raman Spectroscopy. New York. Academic Press, **1964**, Pág. 30
- CONTRERAS, G. Espectroscopía Raman y estructura molecular. Primera edición. Concepción. Editorial Anibal Pinto S. A. **1987**, Pág. 2-3.
- DA ROSA, C.; Mouãro, P.; Pereira, R.; Barreto, P.; Beirão, L. H. Extraction, quantification, and molar mass determination of hyaluronic acid extracted from chicken crest. *Alim. Nutr.* **2007**, 18, 237-240.
- DA ROSA, C; Hoelzel, S.C; Viera, V; Barreto, P; Beirão, L. H. Atividade antioxidante do ácido hialurónico extraído da crista de frango. *Ciência Rural.* **2008**, 38, 2593-2598.
- DA ROSA, C; Tovar, A; Mouãro, P; Pereira, R; Barreto, P; Beirão, L. H. Purification and characterization of hyaluronic acid from chicken combs. *Ciência Rural.* 2012, 42, 1682-1687.
- Federación Nacional de Avicultores de Colombia (FENAVI). Producción Publico [Bogotá, Colombia] Documento Excel: Información Por Departamentos. [citado 22 feb. 2014] Disponible en Internet: <URL:http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2472&Itemid=1330#magictabs_fjife_1 >
- GHERSETICH, I.; Lotti, T.; Campanile, G.; Grappone, C.; Dini, G. Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *Int. Jour. Derma.*1994, 33, 119-122.
- GÓMEZ, J.A.; Amankwah, R.; Powell-Richards, A.; Dua, S. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol.* **2004**, 88, 821-825.
- HASCALL, V.C. Hyaluronan, a common thread. *Glycoconjugate J.* **2000**, 17, 607-616.
- HORNAK, J. The basics of NMR. [online] [Rochester, USA] 1997 [cited 25 may. 2014]. Available from Internet:<URL: <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm> >

- KANG, D.; Kim, W.S.; Heo, I.; Park, Y.; Lee, S. Extraction of hyaluronic acid (HA) from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation (FIFFF) coupled with multiangle light scattering (MALS) 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.* 2010, 33, 3530-3536.
- KELLY, M.A.; Moskowitz, R.W.; Lieberman, J.R. Hyaluronan therapy: Looking toward the future. *Am. J. Orthop.* **2004**, 33, 23-28.
- KUO, W. Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products. Primera edicion. Boston: CRC Taylor and Francis., **2006**., 1.
- KVAN, C.; Granese D.; Flaibani A.; Zanetti F.; Paoletti S. Purification and characterization of hyaluronan from synovial fluid. *Anal. Biochem.* 1993, 211, 44-49.
- LAGO, G. Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtencion de ácido hialuronico y sus fracciones. Tesis de doctorado. La Habana. Centro de histoterapia placentaria, instituto de farmacia y alimentos. Departamento de quimica Farmaceutica. **2007**.
- LIMA, A.; Cavalcanti, R.; Aldo da Cunhay, M. The topic effect of hyaluronic acid on the healing of cornea an experimental study in rats. *Rev. Bros. Oftalmol.* **1999**, 58, 933-937.
- LYM, S.; Suh, Y.; Park C.K. Effect of hyaluronic acid on the polymorphonuclear leukocyte (PMN) release of active oxygen and protection of bovine corneal endothelial cells from activated PMNs . *Korean J. Ophthalmol.* **2004**, 18, 23-28.
- MACNUGTH, P.T. Artificial tears. 2001, UE Pat. 91904702.
- MEYER, Karl.; Palmer, John. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Bio. Chem.*, 1934, 107, 629-634.
- MIKELSAAR, R.H.; Scott, J.E. Molecular modelling of secondary and tertiary structures of hyaluronan compared with electron microscopy and NMR data. *Glyconj. J.* 1994, 11, 65-71.
- MUNAKATA, H.; Yosizawa, Z. Extraction of Hyaluronic Acid from Rabbit Skin with Lanthanum Chloride. Tohoku . *J. exp. Med.* 1998, 132, 337-340
- MURANO, M.A.; Montemayor, M.i.; Cabo, M.; Vazquez, J.; Gonzalez, M. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. *Food and Bio. Pro.* **2012**, 90, 491-498.
- NAGORSKI, C.; Opalensky, D.; Bettelhein, F. A study of collagen-hyaluronan interaction through swelling in polyacrylamide gels. *Res. Commun Mol. Pathol. Pharmacol.* 1995, 89, 179-185.
- NECAS, J.; Bartosikova, P.; Brauner, P.; Kolar, J. Hyaluronic acid (Hyaluronan): a review. *Vet. Med.* 2008, 8, 397-411.

NUNES, R.; Pozza, P.; Nunes, C.;Campestrini, E.; Kühl, R.; Rocha, L.; Costa,F. Valores energeticos de subproductos de origen natural para aves. *R. Bras. Zootec.* 2005, 34, 1217-1224.

OBRADOVIC, J.; Newnham, D.; Taday, P. Attenuated total reflection explores the terahertz region. *American laboratory*. [online] [cited 25 may. 2014]. Available from Internet:<URL: <http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/1457-Attenuated-Total-Reflection-Explores-the-Terahertz-Region/>>

PIRES, A.; Macedo, A.; Eguchi, S.; Santana, M. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivates. *Bioresource Technology*. 2010, 101, 6506-6509.

POLI, S.; Bochiala, G.; Casanto, E. Proceso para la preparación de ácido hialurónico mediante fermentación con Streptococcus. 1998, Italia, Pat. 199407269415.

RAMOS, L; Caldeira, M; Gil, V. NMR study of uronic acids and their complexation whit molybdenum (VI) and tungsten (VI) oxoions. *Carbohydrate research*. **1996**, 286, 1-15.

ROSIER, R.N.; O' Keefe, R.J. Hyaluronic acid therapy. Instructional course lectures. **2000**, 49, 495-502.

SCOTT, J.; Heatley F. Hyaluronic form specific stable tertiary structure in aqueous solution: A13C-NMR study. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **1999**, 96,4866-4855.

SEYMOUR, R; Carraher, C. Introducción a la química de los polímeros. Reverte **1995**, Pág. 50-59.

SHIBATA, S.; Yoneda S.; Yanagishita M.; Yamashita Y. Isolation of proteoglycans (versicans) aggregate from rat dental pulp . *Archives of oral biology*. 2000, 45, 563-568

SHIEDLIN, A.; Bigelow, R.; Christopher, W.; Arbabi, S.; Yang, L; Maier,R.; Wainwright,N.; Childs, A.; Miller, R. Evaluation of Hyaluronic acid from Different Sources: Streptococcus zoepidemicus, Rooster Comb, Bovine Vitreous and Human Umbilical Cord. *Biomacromolecules.*, **2004**, 5, 2122-2127.

SHIMADA, E; Matsumura, G. Viscosity and molecular weight of hyaluronic acid. *J. Biochem*. 1975, 78, 513-517.

SKOOG, D.; Holler, J.; Nieman, T. Principios de Análisis Instrumental, quinta edición. Mcgraw-Hill, **1992**, Pág. 409-410.

STACEY, M., Barker S. A Carbohydrate of Living Tissues. *J Clin Pathol*. 1962, 215 -217.

STUART, B.; Ando, D. Biological Applications of Infrared Spectroscopy, primera edicion. Londres: Series Wiley, **1997**. Pág. 1-5.

SUNWOO, H.H.; Nakano T.; Sim J.S. Isolation and characterization of proteoglycans from growing antlers of wapiti. *Biochem. Mol. Bio*. **1998**, 124, 437-442.

TUYEN, T.N. Reticulated acidic polysaccharides and their uses. **1997**, Pat No 9600065.

WEISSMAN B., Meyer K., The structure of hialobiuronic acid from umbilical cord. *J.Am.Chem.* **1954**, 76, 1753-1757.

ZUBER, G; Schanté, C. Improvement of hyaluronic acid enzymatic stability by the grafting of amino-acids. *Carbohydrate Polymers.* **2012**, 87, 2211-2216.